



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DE LA FRACCIÓN DE GLUTATIÓN TRANSFERASA DE *Taenia solium*  
SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE RATÓN.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

VERA TERESA VEGA ANGELES

TUTOR PRINCIPAL

Dr. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
Facultad de Medicina (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO  
Facultad de Medicina (UNAM)

Dr. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM)

Ciudad de México. Diciembre, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

CGEP/PMDCB/1871/2019

**Vega Ángeles Vera Teresa**  
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
**Presente**

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 12 de agosto del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis **"Efecto de la fracción de Glutatión transferasa de Taenia solium sobre la respuesta inmune del ratón"**, dirigida por el/la Dr(a). **Landa Piedra Abraham**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Gonsebatt Bonaparte María Eugenia
VOCAL	Licon Limón Paula
VOCAL	Carrero Sánchez Julio César
VOCAL	Salazar Martínez Ana María
SECRETARIO	Torres y Torres Nimbe

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de agosto de 2019.  
**COORDINADORA**



**Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ**

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra. Este proyecto fue financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: Atención a Problemas Nacionales (CONACyTPN-594, Producción de inhibidores enzimáticos contra tres enzimas esenciales de *Taenia solium*), y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT-UNAM IN217419: Producción de inhibidores enzimáticos contra cuatro enzimas esenciales de *Taenia solium*).

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para la realización de sus estudios de Doctorado en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, con el número de becario 378618 (246278). Además, la autora recibió apoyo para la asistencia a un congreso nacional y a uno internacional por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Abraham Landa y a los integrantes del Laboratorio de Biología molecular de *Taenia solium* especialmente a la M. en C. Alicia Ochoa y a la Dra. Lucía Jiménez, así como a todos los compañeros estudiantes por su guía, apoyo, disposición y colaboración.

A los miembros del comité tutorial Dr. Edgar Zenteno Galindo y especialmente al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por su valioso acompañamiento, enseñanzas, críticas, aportaciones, ayuda y colaboración.

A los integrantes del laboratorio de Inmunoparasitología de la UBIMED, FES Iztacala, en particular a la Dra. Yadira Ledesma y el Dr. Alberto N. Peón.

A los miembros del jurado de examen por sus comentarios que enriquecieron la presente tesis.

A mi abuelita, mi mamá, hermanos, esposo, tíos y amigos por su paciencia, su apoyo incondicional, su presencia y su constante motivación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los que la hacen posible, así como a todas las instituciones educativas públicas que me otorgaron la formación académica que, de no existir dichas instituciones, no hubiera alcanzado.

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	4
<i>Taenia solium</i> .....	5
Neurocisticercosis.....	6
Respuesta inmune contra la neurocisticercosis.....	8
Modelo experimental de cisticercosis.....	9
Respuesta inmune T cooperadora y macrófagos en el modelo murino de <i>T. crassiceps</i> .....	9
Moléculas moduladoras de la respuesta inmune en <i>Taenia</i> .....	11
Proteínas de sistema desintoxicante en <i>T. solium</i> .....	13
Glutación transferasas.....	14
Respuesta inmune frente a las GSTs de parásitos.....	16
Glutación transferasas en <i>Taenia solium</i> .....	18
<b>Hipótesis</b> .....	20
<b>Objetivos</b> .....	21
<b>Materiales y métodos</b> .....	22
Estrategia experimental y Material biológico.....	22
Purificación de la fracción GST.....	23
Obtención de macrófagos peritoneales.....	23
Cultivo y estimulación de macrófagos.....	24
Extracción de RNA y RT-PCR.....	24
Co-cultivo de macrófagos y linfocitos.....	25
Análisis de moléculas de membrana por citometría de flujo.....	26
Microscopía confocal.....	27
Determinación de citocinas por ELISA.....	28
Análisis de la secuencia primaria de la SGSTF.....	28
Análisis estadístico.....	28
<b>Resultados</b> .....	29
Macrófagos estimulados con la fracción GST de <i>Taenia solium</i> expresan marcadores M1.....	29
Expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC-II en los macrófagos expuestos a la SGSTF.....	32
Internalización de la SGSTF por los macrófagos.....	34
Macrófagos expuestos a la SGSTF favorecen la producción de INF- $\gamma$ en las células T CD4+.....	36
Epítopes de la SGSTF promotores de la respuesta Th1.....	41
<b>Discusión</b> .....	43
<b>Conclusiones</b> .....	50
<b>Perspectivas</b> .....	51
<b>Anexo</b> .....	52
<b>Bibliografía</b> .....	68

## ABREVIATURAS

<b>ABZ</b>	Albendazol
<b>APC</b>	Célula Presentadora de Antígeno
<b>C</b>	Macrófagos control cultivados sin estímulo
<b>CDNB</b>	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
<b>FCS</b>	Fluido cerebroespinal
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GSH</b>	Glutación Reducido
<b>GST</b>	Glutación transferasa
<b>LLGP's</b>	Lectin lectina
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido de <i>E. coli</i>
<b>M1</b>	Macrófago clásicamente activado
<b>M2</b>	Macrófago alternativamente activado
<b>M(LPS)</b>	Macrófago estimulado con LPS
<b>M(SGSTF)</b>	Macrófagos estimulados con la SGSTF
<b>M(Tc-8w)</b>	Macrófagos extraídos de peritoneo de ratones infectados con <i>T. crassiceps</i> durante 8 semanas
<b>NC</b>	Neurocisticercosis
<b>N-IgG</b>	Inmunoglobulina G normal
<b>OVA<sub>323-339</sub></b>	Péptido de la Ovoalbúmina
<b>PBS</b>	Amortiguador de fosfatos
<b>PEC</b>	Células de exudado peritoneal
<b>RT-PCR</b>	Transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
<b>SGSTF</b>	Fracción de Glutación Transferasa de <i>Taenia solium</i> .
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>TAC</b>	Tomografía axial computarizada
<b>TcES</b>	Extractos solubles de <i>T. crassiceps</i>
<b>TLRs</b>	Receptores Toll-like
<b>TSA</b>	Antígenos solubles de <i>T. crassiceps</i>
<b>Ts25GST</b>	Glutación Transferasa de <i>T. solium</i> de 25.5 kDa
<b>Ts26GST</b>	Glutación Transferasa de <i>T. solium</i> de 26.5 kDa

## RESUMEN

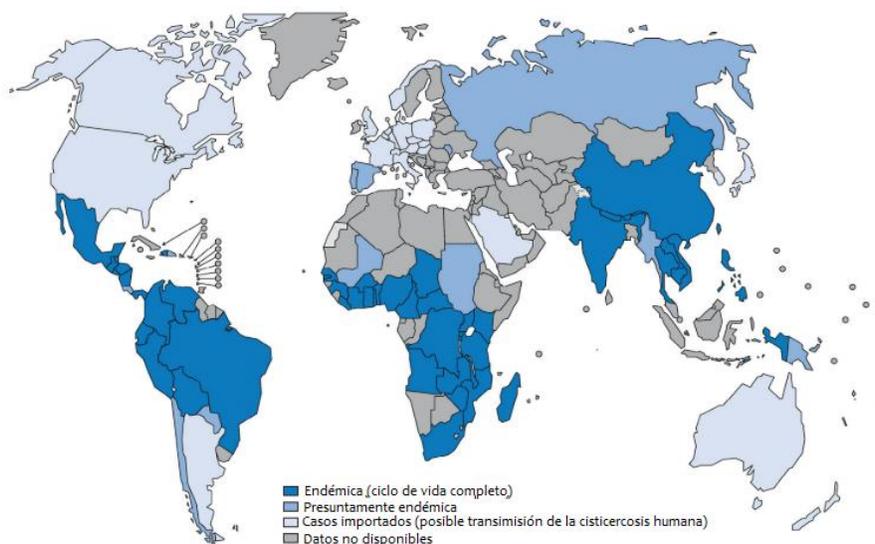
*Taenia solium* posee un sistema de desintoxicación que le permite defenderse del ataque del hospedero, así como del efecto de los xenobióticos. La principal enzima de este sistema es la Glutación transferasa (GST) que existe en tres formas en este parásito. En nuestro laboratorio se han aislado dos formas citosólicas de esta enzima como una fracción (SGSTF) compuesta por dos enzimas de 25.5 (Ts25GST) y de 26.5 kDa (Ts26GST). En experimentos de inmunización dicha SGSTF disminuyó la carga parasitaria en el modelo murino de cisticercosis peritoneal, sin embargo, los mecanismos inmunológicos de esta protección no se han estudiado. En este trabajo se investigó el efecto que la SGSTF tiene sobre los macrófagos y linfocitos estimulándolos *in vitro*. En macrófagos se observó un aumento en los marcadores *Nos2*, TNF e IL-12 así como de IL-10 y CD86, mientras que no se encontró expresión de moléculas como *Chil3* o CD206. Por microscopía confocal se observó que los macrófagos internalizan a la SGSTF y que esta co-localizó con el MHCII en la membrana a los 60 min. Además, los macrófagos estimulados con la SGSTF en co-cultivo con linfocitos T CD4+ pre activados con anti-CD3 promovieron una alta secreción de IFN- $\gamma$  y una elevada expresión de CD25 y CD69. En ensayos similares, pero usando células T CD4+ de ratones transgénicos en el TCR para la ovoalbúmina también aumentó la proliferación y la secreción de INF- $\gamma$ . También mediante análisis de comparación de secuencia de aminoácidos se buscaron los péptidos P1, P5 y P6 de la GST28 de *S. japonicum*, dichos péptidos han sido identificados como fuertes promotores de la respuesta Th1. Estos péptidos fueron encontrados en las Ts25GST y Ts26GST que componen a la SGSTF. Todo lo antes mencionado sugiere que la SGSTF induce un fenotipo proinflamatorio en los macrófagos que a su vez activan a los linfocitos T cooperadores hacia una respuesta tipo Th1, respuesta que es protectora para el hospedero.

## ABSTRACT

Glutathione transferase (GST) is an essential enzyme in cestodes for the detoxification of xenobiotics. In *Taenia solium*, two GSTs (Ts25GST and Ts26GST kDa) were isolated as a fraction (SGSTF) by GSH-Sepharose-4B chromatography. Immunization assays with SGSTF reduced up to 90% of the parasitic burden in a murine model of cysticercosis. To investigate how SGSTF induces this protective immune response, peritoneal macrophages were exposed to SGSTF for 24 h; such exposure favored the production of IL-12, TNF and IL-10 as well as the expression of nitric oxide synthase 2 inducible (*Nos2*) and CD86 and did not induce the expression of chitinase-like3 (*Chil3*) or other alternative activation markers. Confocal microscopy showed that macrophages internalize SGSTF which co-localized in plasma membrane with MHC-II after 60 min. In addition, macrophages exposed to SGSTF and co-cultured with anti-CD3 pre-activated T CD4+ cells enhanced the lymphocyte proliferation, induced high interferon- $\gamma$  secretion and elevated the expression of CD25 and CD69. Similar assay using T CD4+ cells from DO11.10 mice and ovalbumin (OVA<sub>323-339</sub>) peptide plus SGSTF as stimuli, showed enhanced cell proliferation and OVA-specific IFN- $\gamma$  secretion. These data are in-line with those indicating that the P1, P5, and P6 peptides of *Schistosoma japonicum* 28GST highly promote T-cell proliferation and Th1 response *in vitro*. We found that such peptides are also present on Ts25GST and Ts26GST. It suggests that SGSTF activates peritoneal macrophages to a classically activated-like phenotype, and that these macrophages induce the differentiation of T CD4+ cells towards a Th1-type response. In this work we demonstrate the first isolated molecule of *Taenia solium* that is able to activate immune response to a M1 and Th1 phenotype, activation that could be protective to host.

## INTRODUCCIÓN

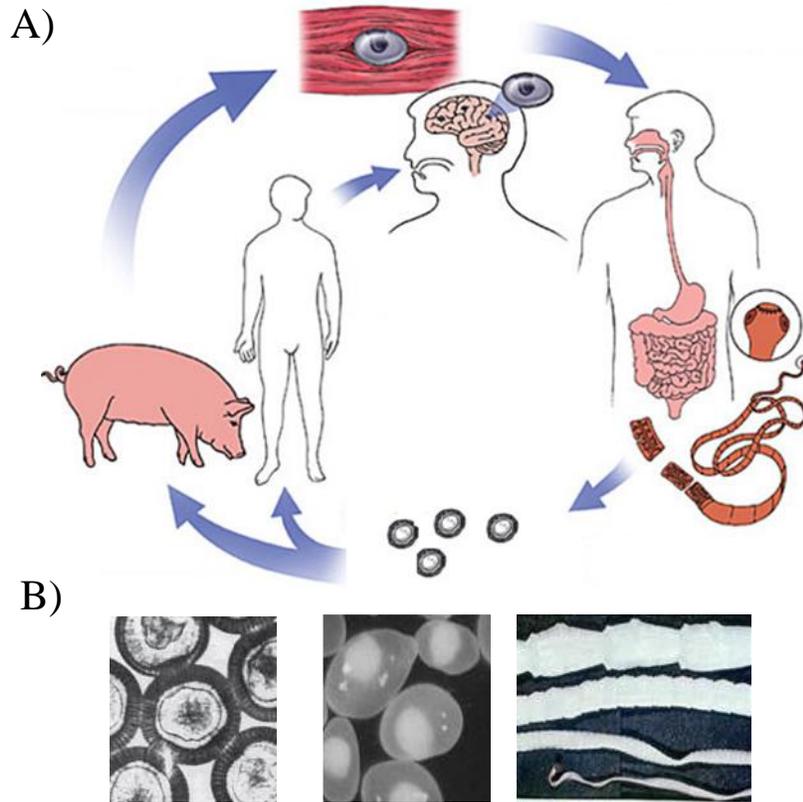
La neurocisticercosis (NC) es la forma más grave de las enfermedades causadas por el parásito *Tenia solium*, es una parasitosis relacionada a condiciones de pobreza y es endémica en muchos países de América Latina, África y Asia, también es una enfermedad presente en países industrializados que anteriormente se consideraban libres de esta enfermedad (Del Brutto, 2012; Garcia, Nash, y Del Brutto, 2014; Laranjo-González et al., 2017). En Estados Unidos, por ejemplo, han resurgido casos de esta infección y se ha observado que la presencia de NC es debida más a la migración de personas provenientes de países endémicos que a la transmisión local de la infección, lo que nos demuestra que dicha parasitosis ha cambiado su dinámica conforme se dan fenómenos sociales que modifican las actividades humanas, debido a esto es posible encontrar reportes de prevalencia de *T. solium* (Fig.1) en gran parte del mundo (Crocker et al., 2012; Ong et al., 2002). En México hasta el día de hoy se siguen reportando casos de NC y aunque la incidencia de esta enfermedad es baja, es posible que se deba a la falta de pruebas diagnósticas sensibles y accesibles, además de que esta enfermedad la mayoría de las veces sigue un curso benigno e incluso pasa desapercibida por el enfermo (Sciutto et al., 2000; Sistema Único de Información, 2019).



**Fig.1.** Prevalencia geográfica de *Taenia solium* (modificado de WHO, 2009)

## ***Taenia solium***

*Taenia solium* es un cestodo de la familia *Taenidae* que tiene como hospedero definitivo al humano y como hospedero intermediario al cerdo (Fig. 2A). El parásito adulto se aloja en el intestino delgado del hospedero definitivo fijándose a través de un escólex formado por un rostelo, una corona de ganchos y cuatro ventosas. El cuerpo de este parásito, denominado estróbilo está formado por segmentos o proglótidos unidos que en su exterior están recubiertos por un tegumento. Estos se dividen en inmaduros, maduros y grávidos siendo los primeros los que parten del cuello del helminto, le siguen los proglótidos maduros que son los que poseen los órganos sexuales diferenciados y por último los proglótidos grávidos que se encuentran llenos de huevos en la parte más distal del parásito y que se desprenden espontáneamente del estróbilo siendo expulsados frecuentemente en las heces y liberando así los huevos. Los huevos contienen un embrión hexacanto protegido dentro de varias capas, la más cercana al embrión es la membrana oncosferal, le sigue el embrióforo formado por material proteínico cementante que le confiere protección al embrión y le da la apariencia estriada, y por último la capa más externa formada por un sincicio que es el vitelo (Fig. 2B). Cuando el humano o el cerdo ingieren los huevos las enzimas gástricas del hospedero liberan a la oncósfera que es capaz de atravesar las paredes intestinales para llegar a la sangre y así distribuirse en tejidos como el subcutáneo y el muscular o en órganos como los ojos y el cerebro, una vez ahí se instala para convertirse en cisticerco. Cuando el cerdo ingiere los huevos de *T. solium* se convierte en el hospedero intermediario, cerrándose el ciclo cuando el humano ingiere la carne de un cerdo con cisticercosis. Así mismo el humano puede desarrollar la cisticercosis cuando ingiere los huevos del parásito convirtiéndose en hospedero accidental, dicha ingesta de huevos ocurre principalmente por la vía fecal-oral y está relacionada al contacto estrecho con un portador del parásito adulto (Garcia, 2018; Larralde y Aluja, 2007; O'Neal et al., 2012)



**Figura 2.** Ciclo de vida y estadios del desarrollo de *Taenia solium*. A) El hospedero intermediario es el cerdo que al ingerir huevos del parásito desarrolla la cisticercosis. El ciclo se cierra cuando el humano, hospedero definitivo, ingiere la carne de cerdo infectada y desarrolla el parásito adulto en el intestino. El humano puede desarrollar cisticercosis cuando ingiere de manera accidental huevos del parásito adulto debido a malas prácticas de higiene (Modificado de [www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg](http://www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg)). B) El huevo de *Taenia solium* contiene un embrión hexacanto que al ser ingerido por el cerdo y alojarse en tejidos como el músculo se convierte en el cisticerco que es una vesícula ovalada que contiene invaginado el escólex. Una vez que el cisticerco es ingerido, el escólex se fija a las paredes intestinales y comienzan a formarse los proglótidos del estadio adulto (Tomada de Larralde C. y De Aluja A., 2007).

### Neurocisticercosis

La forma más grave de la cisticercosis se presenta cuando el cisticerco se aloja en el sistema nervioso central donde puede localizarse en el parénquima cerebral, el espacio subaracnoideo, el sistema ventricular o en la médula espinal. La forma parenquimatosa suele progresar a una lesión granulomatosa que se calcifica o desaparece eventualmente, por el contrario, la NC extraparenquimal puede evolucionar de formas diferentes dependiendo de la localización de los cisticercos.

Por ejemplo, los cisticercos que se alojan en el compartimento ventricular bloquean la circulación del líquido cefalorraquídeo provocando hidrocefalia obstructiva e hipertensión intracraneal. Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la NC son las convulsiones, la epilepsia, la hipertensión intracraneal, las deficiencias neurológicas focales y las alteraciones cognitivas (Gonzales, Rivera, y Garcia, 2016; Marcin Sierra et al., 2017; Nash, Bustos, y Garcia, 2017).

El mejor diagnóstico de la NC requiere del uso de técnicas de imagenología como la Tomografía axial computarizada (TAC) y la Resonancia magnética que proveen información sobre la localización, el número y el tamaño del parásito, sin embargo, el uso de estas técnicas no es posible en muchos casos por la falta del equipo necesario o por la falta del recurso económico. Así mismo, estas técnicas se complementan con la técnica de inmunoelectrotransferencia que detecta en el suero anticuerpos contra antígenos glicoprotéicos de una fracción obtenida pasando un extracto crudo del cisticerco por una cromatografía con la *Lectin lectina*, denominada LLGP's (García y Del Brutto, 2003; Scheel et al., 2005).

El tratamiento contra la cisticercosis está basado en el uso de fármacos antiparasitarios y antiinflamatorios siendo los de elección albendazol (ABZ), y praziquantel junto con la dexametasona en diferentes combinaciones y dosis dependiendo del número de cisticercos, de su viabilidad y de su localización (Garcia et al., 2016; White et al., 2018). La eficacia del ABZ en un primer tratamiento para la neurocisticercosis parenquimal es de entre el 30% y el 40% en términos de la resolución total de las lesiones. El albendazol es un fármaco anti-helmíntico de amplio espectro que inhibe de manera selectiva la polimerización de los microtúbulos de las células de los parásitos e inhibe a las enzimas fumarato reductasa y superóxido dismutasa de Cu/Zn, ocasionando la pérdida de funcionalidad, la alteración de la cadena respiratoria, el daño por estrés oxidante y la lisis celular sin afectar el tejido normal del huésped (Castellanos-González, Jiménez, y Landa, 2002; Garcia et al., 2014; Movahedi, Li, Gu, y Xu, 2017; Parra-Unda, Vaca-Paniagua, Jiménez, y Landa, 2012). Por su parte el praziquantel es un fármaco que aumenta la permeabilidad de la membrana favoreciendo el influjo de

calcio en el parásito y provocando la contracción masiva y parálisis. En dosis altas produce la vacuolización y daño al tegumento lo que expone antígenos que la respuesta inmune reconocerá atacando al parásito (Cupit y Cunningham, 2015).

### **Respuesta inmune contra la neurocisticercosis**

Las manifestaciones clínicas de la cisticercosis en humanos dependen de factores como la localización, el número de cisticercos y la respuesta inmune del hospedero. Los cisticercos pueden encontrarse en el tejido en su forma vesicular (cisticerco con estructuras intactas), en su forma coloidal (con algunas estructuras dañadas y con apariencia coagulada) o calcificados; esta diversidad de formas está relacionada a los eventos inmunológicos ocurridos durante la infección (Sciutto et al., 2000). La NC provocada por un solo cisticerco localizado en el parénquima cursa con bajo contenido celular en el fluido cerebro espinal (FCS) y es frecuentemente asintomática. Por el contrario, cuando los cisticercos se ubican en el espacio subaracnoideo o en los ventrículos aumenta la cantidad de células en el FCS, se puede presentar hipertensión intracraneal y el aumento en la inflamación puede cursar con aracnoiditis dejando secuelas severas (Saénz et al., 2006; Singhi y Singhi, 2004). En la NC sintomática citocinas pro-inflamatorias como la IL-5 y la IL-6 así como la presencia de linfocitos B, T CD8+ y T CD69+ están incrementados, sin embargo en formas más severas de la enfermedad como en la cisticercosis subaracnoidea también se ha encontrado un aumento en la concentración de TNF e IL-1 $\beta$  en el FCS. Así mismo en muestras histológicas obtenidas de necropsias, la IL-10 se encuentra en altos niveles, probablemente interviniendo en la regulación de la respuesta inflamatoria y promoviendo la producción de linfocitos T reguladores (Sciutto, Chavarria, Fragoso, Fleury, y Larralde, 2007). Se ha observado que los linfocitos T reguladores (Treg) están incrementados tanto en la sangre periférica como en el FCS de pacientes con NC que muestran una respuesta linfoproliferativa específica y no específica disminuida. Dichos linfocitos expresan PD-1 y CTLA-4 moléculas que están involucradas en el efecto supresor de los Treg, además se ha encontrado un aumento en los niveles de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ , lo que indica que la

respuesta predominante en esta enfermedad es reguladora y favorece al parásito (Adalid-Peralta et al., 2012; Arce-Sillas et al., 2016).

### **Modelo experimental de cisticercosis**

Mucho del conocimiento existente sobre la inmunología de la cisticercosis proviene de lo observado en el modelo murino. En este modelo, ratones de una cepa susceptible (BALB/c) son infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps*, que en su ciclo natural tiene como hospedero definitivo a los cánidos mientras que los roedores desarrollan los cisticercos al ingerir los huevos. En el laboratorio se dispone de un modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* (cepa ORF) en el que 20 cisticercos son inyectados en la cavidad peritoneal de los ratones que en un periodo de 8 semanas alojarán más de 3000 cisticercos. Dichos cisticercos se pueden mantener a través del pase del peritoneo de un ratón a otro. Utilizando este modelo se han identificado moléculas antihelmínticas y sus mecanismos de acción, se ha caracterizado la respuesta inmune temprana y tardía, se han estudiado moléculas importantes en la relación hospedero-parásito y se han realizado estudios de vacunación. A través de este modelo se sabe también que existe una fuerte similitud antigénica entre *T. solium* y *T. crassiceps*, lo que hace este modelo útil para realizar estudios de la relación hospedero-parásito en la cisticercosis (Gómez-García, Rivera-Montoya, Rodríguez-Sosa, y Terrazas, 2006; Sciutto et al., 2013; Willms y Zurabian, 2010).

### **Respuesta inmune T cooperadora y macrófagos en el modelo murino de *T. crassiceps***

Existe una relación importante entre la respuesta T cooperadora y el combate o el establecimiento de la cisticercosis peritoneal por *T. crassiceps*. Al inicio de la infección en la primera y segunda semana post inoculación cuando el número de parásitos en la cavidad peritoneal es baja, la respuesta inmune es de tipo Th1 con predominancia de INF- $\gamma$ , NO e IgG2a. Conforme la infección avanza y el número de parásitos aumenta, la respuesta cambia del perfil Th1 al Th2 con un aumento de IL-4 e IL-13 que se mantiene además de promover la anergia de las células T

cooperadoras a través del contacto macrófago-célula T y la vía PD-1/PDL's, haciendo permisivo al hospedero (Terrazas, Bojalil, Govezensky, y Larralde, 1998; Terrazas, Montero, Terrazas, Reyes, y Rodríguez-Sosa, 2005). Se ha demostrado que, si la respuesta T cooperadora se modifica, por ejemplo, administrando INF- $\gamma$  recombinante a los ratones infectados de manera que el perfil Th1 se mantenga, el establecimiento de la infección no ocurre y se obtienen cargas parasitarias bajas (Terrazas et al., 1999). Por el contrario, si la respuesta Th1 es bloqueada como en el caso de los ratones STAT4 $^{-/-}$ , los parásitos se establecen rápidamente favoreciendo una respuesta Th2 e induciendo la presencia de IgG1, IgE, IL-4, IL-10 e IL13 (Rodríguez-Sosa et al., 2004). Esta relación entre la respuesta de los linfocitos T cooperadores y el establecimiento o no de la infección está a su vez dirigida principalmente por los macrófagos y las células dendríticas. Se ha observado que las células dendríticas expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* desarrollan respuestas alteradas frente a la estimulación a través de TLRs con baja secreción de citocinas proinflamatorias como IL-12 y TNF además de permanecer en estado de inmadurez y promover la respuesta Th2 cuando se usan como células presentadoras de antígeno (Terrazas, Alcántara-Hernández, Bonifaz, Terrazas, y Satoskar, 2013). Así mismo, a la octava semana post infección cuando la respuesta es de tipo Th2 y la carga parasitaria es mayor, los macrófagos extraídos del peritoneo secretan bajas concentraciones de IL-12, IL-1 $\beta$  y NO y muestran disminución de la expresión de CD80 y CD86, por el contrario expresan altos niveles de marcadores de activación alternativa como el Receptor de Manosa (CD206), la enzima Arginasa-1 (Arg-1), la lectin quitinasa Ym1, el receptor alfa de la IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) además de los ligandos de muerte programada PD-L1 y PD-L2 (Rodríguez-Sosa et al., 2002; Terrazas et al., 2005). Estos macrófagos promueven la diferenciación de los linfocitos T hacia el perfil Th2 además de provocar la baja respuesta proliferativa de los linfocitos aislados de bazo de ratones BALB/c infectados incluso cuando se les estimula de manera policlonal (Reyes, González, Ledesma-Soto, Satoskar, y Terrazas, 2011; Terrazas et al., 2005). En conjunto la presencia de macrófagos predominantemente antiinflamatorios en las etapas tardías de la infección y la respuesta Th2 permiten el desarrollo descontrolado de

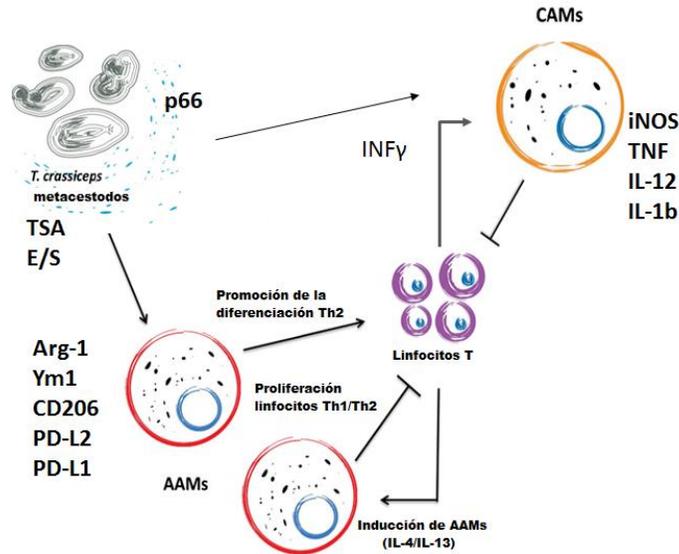
los cisticercos en la cavidad peritoneal. Por el contrario, cuando se extraen macrófagos en las primeras semanas post inoculación, éstos presentan marcadores de activación clásica o proinflamatoria como la producción de NO, TNF e IL-12, en esta etapa el número de cisticercos en la cavidad peritoneal es muy baja. Además, se ha demostrado que la resistencia o susceptibilidad de ciertas cepas de ratones está determinada por el perfil de activación de los macrófagos, de manera que los macrófagos obtenidos de ratones resistentes C57BL/6 mantienen la secreción de TNF, IL-12 y de óxido nítrico durante toda la infección, mientras que los macrófagos obtenidos de ratones BALB/c a la semana 2 muestran un fenotipo inflamatorio cambiando hacia la activación alternativa conforme aumentan los parásitos en la cavidad peritoneal (Reyes, Terrazas, Vera-Arias, y Terrazas, 2009).

### **Moléculas moduladoras de la respuesta inmune en *Taenia***

Se ha identificado en diversos helmintos que la desregulación o supresión de la respuesta inmune es provocada por la actividad misma del parásito como una estrategia de evasión ante el ataque del hospedero. Los extractos solubles, así como las moléculas obtenidas de los medios de cultivo donde los parásitos se mantuvieron y moléculas aisladas directamente de las larvas, los huevos o los parásitos adultos se han utilizado para conocer el efecto de éstos en la regulación de la respuesta (Fig. 3).

En el caso de *T. crassiceps* los extractos solubles (TcES) al ser inyectados en ratones reclutaron células involucradas en la inhibición de la proliferación de linfocitos T siendo las glicoproteínas encontradas en dichos extractos las moléculas que inducen un fenotipo inmaduro en las células dendríticas que a su vez producen la diferenciación hacia la respuesta Th2 (Gómez-García, Rivera-Montoya, Rodríguez-Sosa, y Terrazas, 2006). Un efecto similar se encontró al usar antígenos de excreción/secreción para estimular a las mismas células. Éstas se volvieron incapaces de responder ante la estimulación por TLRs y produjeron la diferenciación de linfocitos T CD4+ naïve hacia el tipo Th2, en este caso el efecto también fue dependiente de los carbohidratos dado que al alterar la estructura de estos el efecto se pierde (Terrazas, Gómez-García, y Terrazas, 2010). Debido a su potencial para

provocar respuestas anti-inflamatorias Th2 los TcES han sido probados como moduladores de la respuesta inmune en patologías donde la respuesta pro-inflamatoria crónica genera daños severos como en el caso de la Encefalomiелitis autoinmune (modelo experimental en ratón de la Esclerosis múltiple) o en la colitis experimental (Ledesma-Soto et al., 2015; Peón et al., 2017). Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados sobre inmunomodulación se han utilizado antígenos totales solubles y sólo de algunas moléculas aisladas se conoce su efecto sobre el sistema inmune del hospedero. Por ejemplo, la estimulación de células de exudado peritoneal (PEC) de ratón BALB/c con la proteína p66, aumentó la secreción de IFN- $\gamma$ , NO e IL-10, así mismo favoreció la proliferación y la producción de IFN- $\gamma$  e IL-10 en linfocitos T (Spolski, Thomas, See, Mooney, y Kuhn, 2002). Otro ejemplo son los antígenos KETc de *T. crassiceps* que inducen la proliferación de células TCD8+ y TCD4+ produciendo un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2, efecto que está relacionado a la protección que producen en el modelo murino de ratón cuando son administrados de manera conjunta o separada (Toledo et al., 2001). Dentro de estos antígenos, GK-1 un péptido que forma parte de KETc 7 y que ha sido probado como antígeno vacunal, es capaz de producir altos títulos de anticuerpos y disminuir la carga parasitaria en ratones y en cisticercos de *T. solium* produce la muerte de las larvas debido al daño causado por la fijación de complemento (Núñez et al., 2018; Toledo et al., 1999). Otras moléculas aisladas que ha sido probada como antígeno vacunal es la Fracción glutatión transferasa (SGSTF) de *T. solium*, que compone el sistema desintoxicante del parásito, sistema que le otorga protección frente al ataque del hospedero.



**Figura 3.** Antígenos de *Taenia crassiceps* identificados como inductores de la respuesta Th2 y de macrófagos alternativamente activados (AAMs). Estos macrófagos expresan marcadores como Arginasa-1, Quitinasa-1, CD206 y ligandos de muerte programada PDL-1 y PDL-2 que promueven la diferenciación de los linfocitos T cooperadores hacia Th2 además de tener otros efectos como la anergia de las células. P66 es una de las pocas moléculas inductoras de la secreción de IFN- $\gamma$  en los linfocitos T (Modificado de Peón et. al., 2018).

### Proteínas de sistema desintoxicante en *T. solium*

*Taenia solium* posee un sistema desintoxicante que le protege del ataque del sistema inmune del hospedero, así como de la acción de los xenobióticos, los fármacos antiparasitarios y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de mantener el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas dentro y fuera del parásito. Dentro de este sistema las familias de enzimas más importantes de este parásito son las Súperóxido dismutasas (SOD), la 2-Cys peroxiredoxina (2-CysPrx) y las Glutación transferasas (GST).

Las Superóxido dismutasas son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en  $H_2O_2$  y  $O_2$ . En los helmintos se han identificado dos tipos de SODs: las MnSOD ubicadas en la matriz mitocondrial y las Cu,Zn SOD citosólicas y de secreción (Fridovich, 1995). En *T. taeniaeformis* y en *T. solium* dichas enzimas forman dímeros o tetrámeros de aproximadamente 30 y 64 kDa y son del tipo Cu,ZnSOD. Esta enzima se expresa en todos los estadios de *T. solium*

y el tiabendazol así como el albendazol son capaces de inhibir su actividad (Castellanos-González et al., 2002; González R, Mendoza-Hernández, y Plancarte, 2002; Leid y Suquet, 1986)

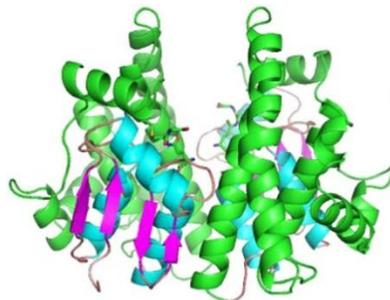
Las Peroxirredoxinas catalizan la reducción de peróxidos de hidrógeno y de peroxinitritos para formar agua, así como de los hidroperóxidos en alcoholes y agua. Estas enzimas están clasificadas con base en la presencia y localización o ausencia de la cisteína de resolución (C<sub>R</sub>) en tres subfamilias: 2-Cys Peroxirredoxinas, 2-Cys Peroxirredoxinas atípicas y las 1-Cys Peroxirredoxinas. Se caracterizan por utilizar una o dos cisteínas para la catálisis y por desempeñar su actividad mediante la interacción con otras proteínas reduciendo grupos disulfuro además de ser proteínas que participan en la transducción de señales (Balsera y Buchanan, 2019; Fujii y Ikeda, 2002; Rhee, 2016) En platelmintos las 2-CysPrx se consideran las principales enzimas de la defensa contra el estrés oxidativo producido por el hospedero debido a la falta de Catalasas y a la poca actividad de Glutación peroxidasa que tienen los helmintos (Henkle-Dührsen y Kampkötter, 2001; Wang et al., 2018). En *T. solium* se ha caracterizado una 2-CysPrx típica que se localiza en el tegumento y se expresa en todos los estadios del parásito, los anticuerpos producidos contra esta reconocen también a la enzima de *T. saginata* y de *T. crassiceps* (Molina-López, Jiménez, Ochoa-Sánchez, y Landa, 2006).

### **Glutación transferasas**

Las Glutación transferasas (GST) son enzimas que conjugan el glutati6n a compuestos electrofílicos (xenobi6ticos). En humanos se han descrito una gran variedad de patologías en las que las GST est6n involucradas, como en el c6ncer, enfermedades bucales, infertilidad, preeclampsia entre otras (Dong et al., 2018; Kolesnikova et al., 2017; Slijivancanin Jakovljevic et al., 2019).

Las GST son prote6nas dim6ricas que est6n clasificadas en 3 superfamilias: las GST mitocondriales, las GST microsomales o MAPEG (Prote6nas asociadas a membrana involucradas en el metabolismo de icosanoides y de glutati6n) y las GST citos6licas. Las primeras tienen actividad de peroxidasa y est6n involucradas en la  $\beta$ -oxidaci6n

de ácidos grasos, las segundas participan en la síntesis de leucotrienos y en la activación de lipoxigenasas mientras que las GST citosólicas tienen como principal función la de transferasas. A su vez las GST se agrupan, con base en sus características bioquímicas, estructurales, inmunológicas, genéticas y su origen especie-específico, en clases. Las clases lambda, fi y tau se han identificado en plantas, la beta en procariontes, la nu en nemátodos, la delta, épsilon, iota y xi en insectos mientras que las clases alfa (A), mu (M), pi (P), teta (T), sigma (S), zeta (Z) y omega (O) se encuentran en el citosol de las células de una gran cantidad de organismos (Dixon, Davis, y Edwards, 2002; Frova, 2006). Las GST citosólicas participan en el metabolismo de xenobióticos y se les ha relacionado a fenómenos de resistencia a quimioterapias contra el cáncer, a insecticidas y herbicidas, así como a antibióticos (Hayes, Flanagan, y Jowsey, 2005; Morgenstern, Zhang, y Johansson, 2011; Board y Menon, 2013). Dichas enzimas tienen subunidades entre 24 a 27 kDa con una secuencia primaria promedio de 250 aminoácidos que forman ya sea homodímeros o heterodímeros unidos de manera no covalente con subunidades homólogas o heterólogas. Presentan dos dominios: el dominio G, con plegamiento parecido al de las tioredoxinas ( $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ ) altamente conservado entre especies y localizado en el amino terminal, donde se encuentra el sitio de unión y de activación del glutatión reducido; y el dominio H, únicamente formado por hélices  $\alpha$  que varían en número dependiendo de la clase, ubicado en el carboxilo terminal y altamente variable (lo que explica el amplio rango de compuestos que las GST citosólicas pueden usar como sustratos) es el sitio de unión del sustrato. Cada monómero contiene ambos dominios (Sheehan, Meade, Foley, y Dowd, 2001) (Fig. 4).



**Figura 4.** Estructura de una GST alfa-1 citosólica (GSTA-1) típica. Dímero donde las hélices-alfa del amino terminal se muestran en azul y las del carboxilo terminal en verde. Las láminas-beta se muestra en magenta.

Se ha encontrado que las GST participan en otros procesos que no dependen de su actividad enzimática como en la síntesis de prostaglandinas, en vías de señalización celular donde interacciona con moléculas como JNK o ASK1 o en la formación y regulación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (RyR) de la célula muscular (Board y Menon, 2013).

En helmintos, la fase I del sistema desintoxicante muestra muy baja actividad enzimática por lo que las GST son las principales enzimas de defensa contra fármacos antiparasitarios, por lo que han sido propuestas como blancos farmacológicos o vacunales. En *Schistosoma* se ha observado que cuando las GSTs son inhibidas con anticuerpos disminuye la fertilidad del parásito (Remoué et al., 2000).

### **Respuesta inmune frente a las GSTs de parásitos**

Debido a la importancia de las GST para la supervivencia de los parásitos estas proteínas han sido probadas como antígenos vacunales o como moléculas moduladoras del sistema inmune (Tabla 1). De las más estudiadas, las GST de *Schistosoma* están involucradas en la defensa contra fármacos, en la síntesis de prostaglandina PGD<sub>2</sub>, en la fertilidad de dicho trematodo y en la modulación de la respuesta inmune del hospedero hacia un perfil Th2 (Capron, Riveau, Capron, y Trottein, 2005). En estudios de vacunación la GST28 de *S. mansoni* (SmGST28) ha demostrado disminuir la producción y viabilidad de huevos teniendo una efectividad del 75%-80% en primates y 85%-94% en terneros, dicha disminución está relacionada al aumento de IgG3 e IgA que actúan inhibiendo a la GST (Boulanger et al., 1999; C. B. Xu et al., 1993). Así mismo en *S. japonicum* se han identificado péptidos promotores de la respuesta Th1, el péptido P6 induce proliferación de linfocitos T y la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Li et al., 2005).

**Tabla 1.** GST de algunos parásitos y su efecto como antígenos.

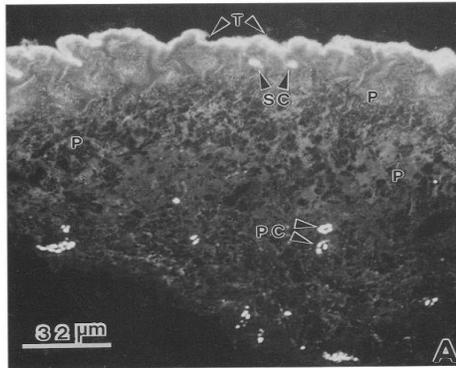
<b>GST</b>	<b>Efecto</b>	<b>Respuesta inmune</b>	<b>Dosis</b>
SmGST28 (vacunación)	Disminución de viabilidad, disminución de la carga parasitaria	IgA, IgG3	50 µg
Sj28GST (epítopes linfocitos T, vacunación e <i>in vitro</i> )	Disminución de la carga parasitaria	INF-γ, IL-2 Proliferación T CD4+	100 µg
EgGST (vacunación)	Reducción quistes hidatídicos	IgG2a, INF-γ, IL-2	50 µg 10 µg
Tc52 ( <i>in vitro</i> macrófagos)	Desconocido	IL-1α, IL-10, IL-12	5 µg
GST-ESA <i>Fasciola hepática</i> (esplenocitos, macrófagos)	Disminución leve de la carga parasitaria	Disminución NO, Antiproliferativa esplenocito	10,20 y 30 µg
nFhGST	Disminución de la carga parasitaria	Humoral Regulación de NFκB Anti-inflamatoria (ratones)	20 µg 100 µg

De la misma forma, en ensayos de inmunización con la GST de *E. granulosus* (EgGST) en ratones, se ha observado la disminución de quistes y aumento en la secreción de IL-4, IL-10 e IFN-γ así como de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG3. Además, epítopes de EgGST han demostrado potenciar la respuesta Th1 protectora en ratones C57BL/6 cuando se inmuniza junto con otras proteínas que, administradas de manera aislada, inducen baja protección (Esmaelizad et al., 2013; Zhu et al., 2015).

En contraste, la GST recuperada de productos de excreción/secreción (GST-ESA) de *F. hepática* ha demostrado tener propiedades antiinflamatorias y supresoras de la respuesta Th1; en cultivo con esplenocitos de rata disminuyó la respuesta linfoproliferativa así como la producción de NO en macrófagos peritoneales. En modelos de sepsis en ratones C57BL/6 la GST citosólica de parásitos adultos suprimió la producción de TNF e IL-1β en macrófagos y aumentó la supervivencia de dichos ratones. Sin embargo, en ovejas inmunizadas con esta proteína la carga parasitaria disminuyó en un 78% (Aguayo et al., 2019; Cervi, Rossi, y Masih, 1999; Sexton et al., 1990).

## Glutación transferasas en *Taenia solium*

En *T. solium* se han aislado tres Glutación transferasas citosólicas, una de 24.5 kDa (TsGSTS), una de 25.5 kDa (Ts25GST) y otra de 26.5 kDa (Ts26GST) que se han clasificado como clase sigma, mu y alfa-mu, respectivamente. Las Ts25GST y Ts26GST representan entre el 3 y 4% de proteína soluble total del cisticerco y se obtienen de extractos crudos de cisticercos pasados por cromatografía de afinidad a GSH, lo que se ha denominado como la fracción de glutación Transferasa (SGSTF) (Vibanco-Pérez, Jiménez, Merchant, y Landa, 1999). Ambas enzimas son diméricas y cada monómero contiene el sitio G y H característico de las GSTs además de motivos SNAIL/TRAIL que definen a las GST. Dichas proteínas se localizan en el tegumento, parénquima y en el citoplasma de células protonefridiales y subtegumentales y forman un gradiente de concentración hacia la superficie del tegumento (Fig.5). La SGSTF además de su función desintoxicante ha demostrado ser un antígeno vacunal eficaz disminuyendo en un 90% la carga parasitaria a las 4 semanas post-infección y 85% a las 8 semanas en el modelo murino de cisticercosis. De igual manera la administración temprana de la Ts26GST purificada disminuyó en un 74% el número de parásitos mientras que la Ts25GST únicamente tuvo un 25%. Los anticuerpos IgG2a específicos contra las GSTs fueron los predominantes. Además, los anticuerpos anti-SGSTF muestran reactividad cruzada con GSTs de otras tenias como *T. saginata* y *T. taeniaeformis* mientras que no hubo reconocimiento con las GSTs de *S. japonicum* ni con GSTs obtenidas del hígado de ratón, conejo y cerdo (Torres-Rivera y Landa, 2008; Vibanco-Pérez, Jiménez, Mendoza-Hernández, y Landa, 2002).



**Fig.5.** Localización de las GST de 25 y 26 kDa en corte de la pared vesicular de cisticerco de *T. solium*. (Vibanco-Pérez et. al.,1999). Se observa su presencia en PC: células protonefridiales, T: tegumento, SC: celulas subtegumentales y P: parénquima. Se utilizaron anticuerpos contra la fracción SGSTF marcados con isotiocianato de fluorescencia.

## **HIPÓTESIS**

La SGTSF al activar a los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio, inducirá en los linfocitos T CD4+ una respuesta Th1 en co-cultivos “*in vitro*”.

## **OBJETIVO GENERAL**

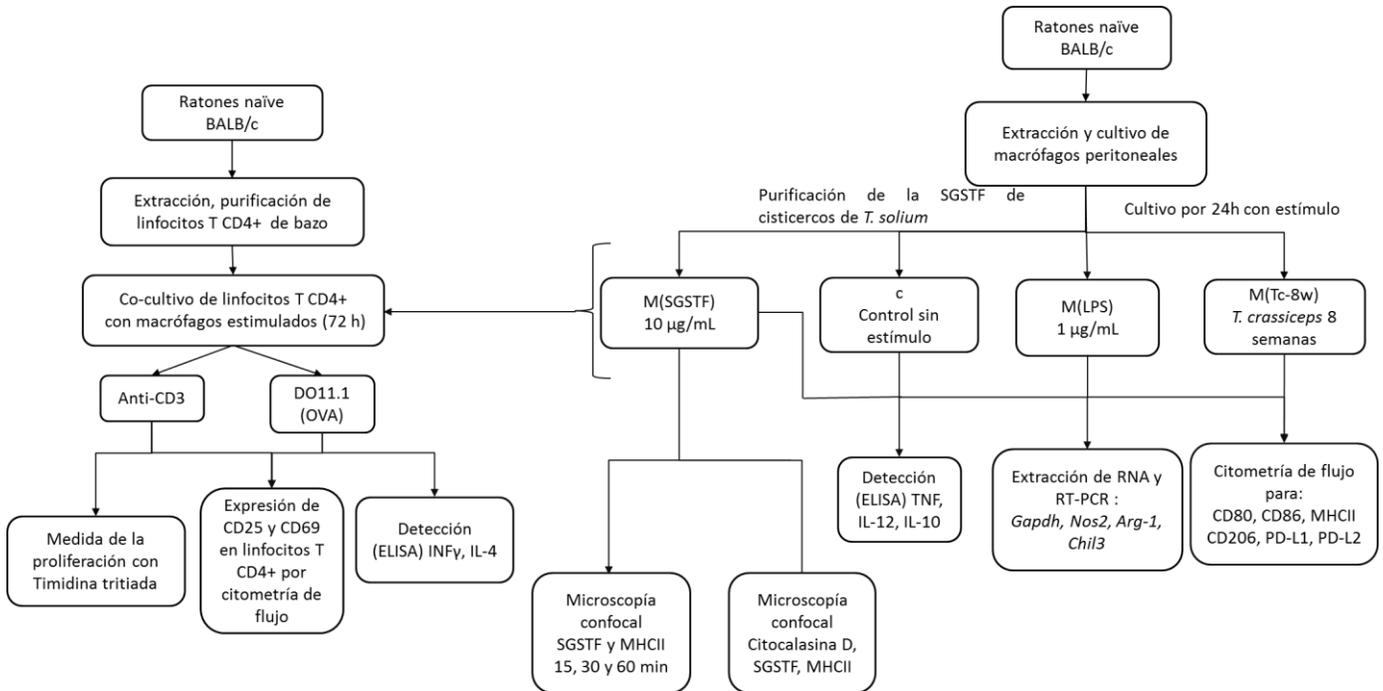
Determinar si la fracción GST de *Taenia solium* (SGSTF) es capaz de modificar la respuesta T cooperadora hacia un fenotipo Th1.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar el efecto de la SGSTF sobre la expresión de marcadores de activación en macrófagos peritoneales.
- Investigar si la exposición a la SGSTF provoca su internalización y presentación en los macrófagos peritoneales.
- Determinar si la SGSTF es capaz de dirigir la activación y polarización de los linfocitos T CD4+ pre-activados de manera inespecífica y en los linfocitos T CD4+ estimulados con un antígeno específico (OVA).

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Estrategia experimental



### Material biológico

Los cisticercos de *Taenia solium* fueron colectados del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente proporcionados por la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones (*Mus musculus*) hembra BALB/c de entre 8 y 10 semanas de edad fueron comprados a Harlan Laboratories y mantenidos en bioterio en un ambiente libre de patógenos en la Facultad de Medicina de la UNAM. Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos de ratones hembra BALB/c previamente infectados intra-peritonealmente con 20 cisticercos (cepa ORF). Se dejó transcurrir la infección durante 3 meses, se sacrificaron los ratones y de nuevo se obtuvieron los cisticercos que fueron lavados 3 veces con PBS e inyectados inmediatamente (20 cisticercos por ratón) en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c naïve. Se dejó transcurrir la nueva infección durante 8 semanas para la obtención de macrófagos peritoneales y bazos de dichos ratones.

El protocolo usado fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la misma facultad y está en concordancia con la NOM-062-ZOO-1999.

### **Purificación de la fracción GST (SGSTF)**

Los cisticercos (10 g) de *T. solium* fueron homogenizados en un Sonics vibracell con 50 mL de amortiguador de extracción (PBS, Tritón 1%, pH= 7.2) con inhibidores de proteasas (TLCK 10 mM, EDTA 0.5 M, PMSF 200 mM). Este homogenado fue centrifugado (10 min, 16,200 g, 4°C), filtrado y pasado por una columna de GSH-Sepharose 4B (GE-Healthcare). Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con 5 mM de GSH. El eluido con la proteína pura se dializó y concentró usando un filtro Amicon Ultra (Millipore). La concentración fue determinada por el método de Lowry y la pureza en un PAGE-SDS al 12% teñido con azul de Coomassie (Vibanco-Pérez et al. 1999). La fracción obtenida mostró 2 bandas de ~25 y ~26 kDa y a ésta se le denominó fracción de Glutación transferasa de *T. solium* (SGSTF). La actividad de la SGSTF fue determinada por el método de Habig (Habig y Jakoby, 1981) usando el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) como sustrato. El contenido de endotoxina se determinó usando el E-toxate kit (Sigma) y en la SGSTF pura fue menor a 0.2 EU/μg. La SGSTF fue conservada en alícuotas a -20°C.

### **Obtención de macrófagos peritoneales**

Se administró intraperitonealmente medio tioglicolato al 3% estéril (Sigma-Aldrich) y conservado por 3 meses en ratones BALB/c naïve. Tres días después los ratones fueron sacrificados y los macrófagos obtenidos por inyección intraperitoneal con 10 ml de solución salina isotónica estéril (SSI, PISA) fría dando un masaje en el abdomen para después recuperar la suspensión celular de la cavidad peritoneal. Esta suspensión se centrifugó a 1000 g durante 10 min y posteriormente se volvió a suspender en 1 ml de medio RPMI. Se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad con azul tripano.

Del mismo modo se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones con 8 semanas de infección con *T. crassiceps*.

## **Cultivo y estimulación de macrófagos**

Las células peritoneales obtenidas como se describió anteriormente fueron sembradas ( $3 \times 10^6$ ) en placas para cultivo celular de 24 pozos con fondo plano (Costar, Corning Inc.) en medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/mL estreptomina (Sigma)) y suero fetal bovino (Gibco) y se incubaron durante 2 h a  $37^\circ \text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Pasado este tiempo se lavaron 3 veces los pozos con SSI a  $37^\circ \text{C}$  con la finalidad de remover las células no adherentes. Las células adherentes (75-85% macrófagos identificados por citometría de flujo) fueron puestas en medio RPMI suplementado y estimuladas con: 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la fracción SGSTF purificada o con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de LPS de *E. coli* (Sigma) o sin estímulo durante 24h a  $37^\circ \text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ ; así mismo las células adherentes obtenidas del peritoneo de ratones infectados durante 8 semanas se cultivaron sin estímulo en las mismas condiciones. A los macrófagos cultivados en presencia de la SGSTF se les denominó M(SGSTF), a los cultivados con LPS se les indica como M(LPS) y a los macrófagos alternativamente activados provenientes de ratones infectados se les nombró M(Tc-8w). Los macrófagos sin estimular se indican con la letra c.

## **Extracción de RNA y RT-PCR**

Se removió el medio de cultivo de las células en pozo y se lavaron con solución salina isotónica (SSI) a  $37^\circ \text{C}$ , posteriormente se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de TRIzol (Invitrogen) por pozo y mediante agitación con pipeta se disgregaron las células, se pasaron a un tubo Eppendorf y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agitó y se dejó actuar durante 5 min para posteriormente centrifugar a 12000 g por 10 min. En un tubo estéril, se colectó el sobrenadante del centrifugado anterior y se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 15 min a  $-20^\circ \text{C}$ . Se centrifugó de nuevo a 12000 g por 10 min y el precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol frío al 75% y se centrifugaron a 7500 g por 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar para luego conservarla en 50  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC al 0.1%. Se cuantificó el RNA, se verificó su integridad

en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio y se preservó a -70°C hasta su utilización.

La técnica de la transcriptasa reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y 2 oligonucleótidos específicos para cada gen de interés, se utilizaron para amplificar una región de cada marcador de activación de macrófagos: Glicerinaldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) (Renshaw et al., 2002), arginasa-1 (*Arg1*), quitinasa lectina (*Ym1*) (Nair et al. 2003) y óxido nítrico sintasa inducible (*Nos2*) (Yoshida et al. 2000). Como primera parte, para el RT-PCR se sintetizó el DNA complementario a partir de 1 µg de RNA total, para cada reacción se adicionaron los oligonucleótidos específicos (50 pM) para cada gen y se siguieron las instrucciones sugeridas en el estuche de SuperScript One-Step (Invitrogen). La mezcla se incubó a 45°C por 30 min e inmediatamente se empezó la PCR utilizando para todos los genes (excepto para *Nos2* la Tm usada fue 62°C) el siguiente programa: 1 ciclo (94°C por 2 min), 30 ciclos de (94°C por 30 seg, 56°C 1 min, 72°C por 30 seg de polimerización) y un ciclo de 72°C por 5 min, 15°C por 15 min. Los fragmentos amplificados se observaron en geles de agarosa y se analizaron en un fotodocumentador Sistem 120 de KODAK. La transcripción relativa se cuantificó por densitometría de las bandas observadas en los genes utilizando el software ImageJ, los valores se expresaron en unidades arbitrarias.

### **Co-cultivo de macrófagos y linfocitos**

Las células T CD4+ y los esplenocitos usados en los co-cultivos *in vitro* que se realizaron fueron obtenidos de bazo de ratones BALB/c sanos. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical previa sedación y los bazo fueron removidos en condiciones de esterilidad. Los linfocitos fueron obtenidos por perfusión de los bazo, se colectaron en tubos Falcon de 15 mL y se centrifugaron a 10000 g durante 10 min. El sobrenadante se descartó y se agregó solución de Boyle estéril para eliminar los eritrocitos presentes, posteriormente se centrifugó y este paso se repitió dos veces hasta tener una suspensión linfocitaria libre de residuos eritrocitarios. Se eliminaron los residuos de la solución de lisis, se colocaron las células en medio RPMI completo, se determinó la viabilidad y se realizó el conteo de células con azul

tripano en cámara de Neubauer. Las células T CD4+ se aislaron usando el sistema de separación magnética MACS acoplado a anticuerpos anti-CD4+ (Miltenyi Biotec) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y por citometría de flujo se verificó la purificación. Los macrófagos se obtuvieron del peritoneo de ratones naïve por extracción de la cavidad con SSI fría siguiendo el procedimiento descrito en “Obtención de macrófagos peritoneales”. Los co-cultivos se realizaron adicionando los macrófagos sin estímulo, M(SGSTF), M(LPS) y M(Tc-8w) a las células T CD4+ pre estimuladas con anticuerpos anti-CD3 o a células T CD4+ obtenidas de ratones transgénicos DO11.1 y agregando el péptido OVA<sub>323-339</sub> (Sigma) en relación 1:4 y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. A las 18 horas previas al término del experimento se agregó timidina tritiada (0.5 µCi, metil-[3H]-TDR, Amersham) y se continuaron los cultivos hasta cumplir el tiempo establecido. Las células se colectaron en filtros de fibra de vidrio (Whatman) y se llevaron al cosechador (Tomtec) para realizar el conteo de timidina incorporada en un contador 1450 microβ-plate (Trilux). Los valores se representan como cuentas/min (CPM).

### **Análisis de moléculas de membrana por citometría de flujo**

Los macrófagos estimulados como se indica en “Obtención de macrófagos peritoneales” y en “Cultivo y estimulación de macrófagos” fueron colectados de las placas en cultivo agregando PBS con EDTA 5 mM estéril frío durante 10 min usando un gendarme. Las células cosechadas se lavaron con amortiguador FACS (BD Biosciences) y se centrifugaron para posteriormente incubarse con anticuerpos anti-CD16/32 (Biolegend) durante 20 min a 4°C para bloquear los receptores Fc. Al término de este tiempo las células se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo anti-CD16/32 y se tiñeron, según el caso, con anticuerpos marcados con fluorocromos contra F4/80, MHCII, CD206, IL-4Ra, PD-L1, PD-L2, CD80 y CD86 (Biolegend) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células marcadas fueron analizadas en un citómetro FACsCalibur (BD Biosciences) con los programas CellQuest y FlowJo.

Para los experimentos descritos en la sección “Co-cultivo de macrófagos y linfocitos” se colectaron a las 72 h de cultivo las células T CD4+, se lavaron con amortiguador

de FACS (BD Biosciences) y se marcaron, según se indica, con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-CD69 (Biolegend). Estas células se analizaron en un citómetro AtuneX el FACsCalibur (BD Biosciences) con los programas CellQuest y FlowJo.

### **Microscopía confocal**

Macrófagos peritoneales extraídos como se indica en “Obtención de macrófagos peritoneales” fueron cultivados sobre cubreobjetos estériles cubiertos de poli-L-lisina (Neuvitro) en medio RPMI a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 2 horas de cultivo, las células no adherentes fueron removidas a través de lavados con SSI estéril a 37°C. A las células que permanecieron en el cubreobjetos se les agregó el estímulo de SGSTF (10 µg/mL) en medio RPMI y continuaron en cultivo durante 15, 30 y 60 min. Al término de cada tiempo las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, posteriormente se agregó el anticuerpo IgG de conejo anti SGSTF (1:200) y se dejaron incubando a 4°C toda la noche. Después se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo FITC (1:100, Santa Cruz Biotech) durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se lavó con PBS para continuar con la doble tinción agregando anticuerpo IgG de rata anti-IA-IE (1:100, Biolegend) 4°C toda la noche. Al siguiente día se agregó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo TexasRed (1:100, Santa Cruz Biotech) y se incubó durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se lavaron las muestras y se montaron en medio de montaje UltraCruz Hard-set mounting medium (Santa Cruz Biotech). Las muestras se observaron en un microscopio LMS 800 de Zeiss (63x) y las imágenes se analizaron con los softwares Zen Zeiss e ImageJ. En los ensayos de inhibición de la internalización se trató a los macrófagos con citocalasina D (10 µM, Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 30 min a 37°C, según lo descrito por Roy et., al., 2014. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se incubó con 10 µg la SGSTF durante 30 min. Al cabo de este tiempo se realizó la doble inmunofluorescencia como se indica arriba. Macrófagos no tratados con citocalasina D y estimulados igualmente con la SGSTF en el mismo tiempo se usaron como control. Las imágenes ortogonales se tomaron en proyecciones de 17-

18 secciones secuenciales, escaneadas de 5 a 7 veces cada una (10.5  $\mu\text{m}$  de grosor) y capturadas con un objetivo de inmersión 63x y un zoom de 1.5 en un microscopio Leica DMi8 SP8 y procesado con el software correspondiente.

### **Determinación de citocinas por ELISA**

En los sobrenadantes de todos los cultivos se determinó por el método de ELISA la concentración de las interleucinas IL-12, IL-10 y TNF en el caso de macrófagos y en los co-cultivos se determinó IL-12, INF- $\gamma$  e IL-4 siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISA Development Kit, Peprotech). En placas para ELISA (nunc MaxiSorp, Apogent) se agregó el anticuerpo de captura correspondiente a la interleucina a medir en la concentración que nos indica el fabricante y se dejaron sensibilizar durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la placa, se bloqueó con BSA 1% en PBS y se agregó el sobrenadante a probar. Después de desechar los sobrenadantes y lavar la placa, se agregó el anticuerpo de detección correspondiente a la interleucina que se determinó y se continuó el protocolo indicado por el fabricante de los estuches utilizados. Se incubó 2 horas a 37°C y luego se reveló por medio de la reacción del anticuerpo biotinilado con avidina, agregándose posteriormente ABTS/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La concentración se determinó por medio de la absorbancia a 405 nm en un lector de placas para ELISA Multiscan Ascent (Termolab system).

### **Análisis de la secuencia primaria de la SGSTF**

Se realizó un alineamiento de las secuencias primarias de los tres péptidos Th1 de la 28GST de *S. japonicum* P1, P5 y P6 con la Ts25GST y Ts26GST usando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

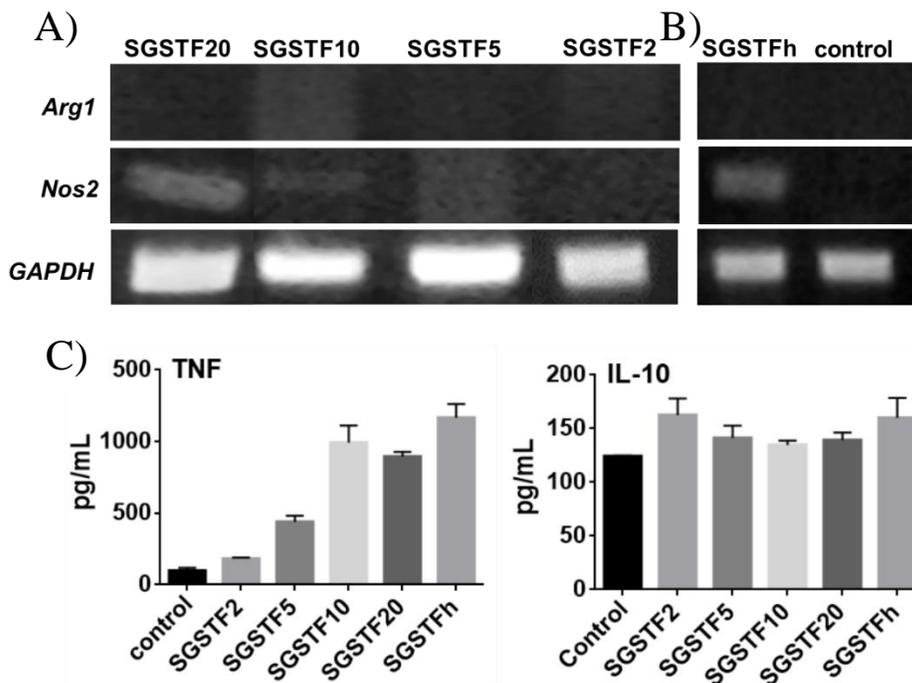
### **Análisis estadístico**

Se calcularon los promedios y errores estándar, así como se realizó la prueba One-way ANOVA con Bonferroni post-tests para el análisis estadístico en el programa GraphPad Prism. Se consideró  $p < 0.05$  como significativamente diferente, con intervalo de confianza del 99%.

## RESULTADOS

### Macrófagos estimulados con la fracción GST de *Taenia solium* expresan marcadores M1

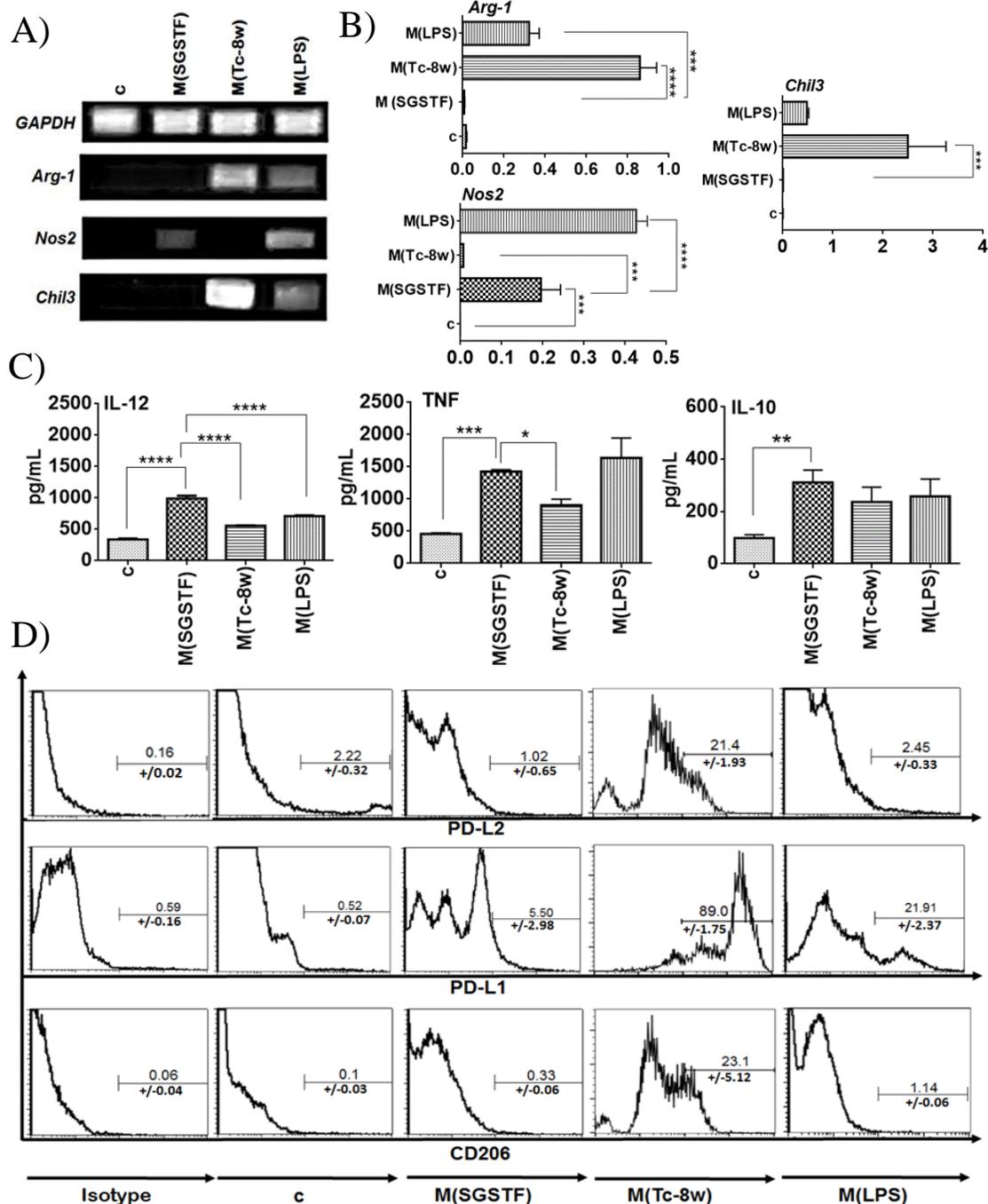
Para saber si la SGSTF es capaz de activar a las células del sistema inmune innato se realizaron cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón reclutados con tioglicolato en presencia de la GST y se determinaron algunos de los marcadores de activación M1 y M2 más usados. Se realizó una curva de dosis-respuesta donde se encontró que las dosis de 10  $\mu\text{g/mL}$  y 20  $\mu\text{g/mL}$  indujeron la expresión del gen *Nos2*, y la secreción de TNF (Fig.6 A y C) por lo que se eligió la dosis de 10  $\mu\text{g/mL}$  para realizar todos los experimentos siguientes. La misma respuesta se encontró utilizando una SGSTF desnaturalizada por calor con la dosis seleccionada (B) indicando que la actividad de la enzima no está relacionada con su efecto en los macrófagos.



**Fig.6.** Ensayo de dosis respuesta de macrófagos estimulados *in vitro* por 24h con 2, 5, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$  de SGSTF y con 10  $\mu\text{g/mL}$  de SGSTF desnaturalizada por calor (SGSTFh). A) y B) Expresión de *Arg1* y *Nos2* detectadas por RT-PCR B) Secreción de citocinas TNF e IL-10 medidas por ELISA. Se muestran gráficos de un experimento representativo de dos en el caso del RT-PCR y de tres experimentos de ELISA, expresados como  $\pm$  SD (n=3). Los experimentos fueron independientes.

Cabe mencionar que, aunque los macrófagos fueron extraídos utilizando tioglicolato estéril al 3%, en ninguno de los ensayos realizados se encontró expresión significativa de ningún marcador.

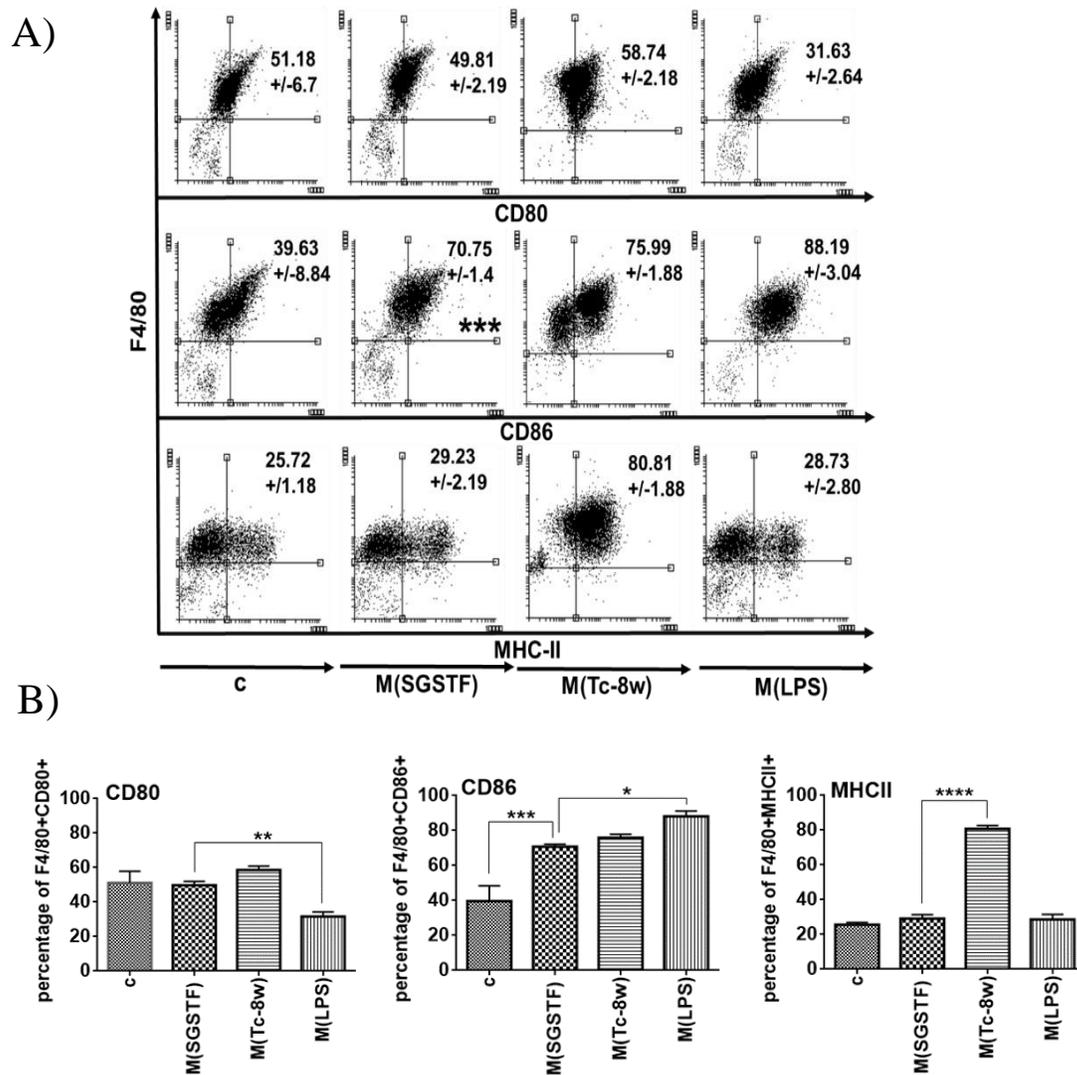
Una vez seleccionada la dosis a usar de la SGSTF (10 µg/mL) se realizaron los cultivos por 24h de macrófagos en presencia de la proteína (M(SGSTF)) o de lipopolisacárido (M(LPS)) además de los macrófagos alternativamente activados provenientes de ratones infectados (M(Tc-8w)). Como control de macrófagos sin ninguna activación se cultivaron macrófagos únicamente en medio RPMI en las mismas condiciones (c). Como se había observado en la curva dosis-respuesta, el único marcador que en el RT-PCR mostró un aumento significativo al estímulo con la SGSTF fue el gen Nos2 (Fig. 7A y B) contrario a lo observado para los macrófagos (M(Tc-8w) que aumentaron la expresión de Arg-1 y Chil3. Por otro lado, los macrófagos (M(LPS) también expresaron Nos2 además de Arg-1 y Chil3. Además, de los sobrenadantes colectados de todos los cultivos realizados se buscaron las citocinas secretadas a las 24h (Fig. 7C). La SGSTF indujo un aumento de IL-12, TNF e IL-10 con respecto al control (c) y un aumento de IL-12 y TNF con respecto a los macrófagos M(Tc-8w) mientras que solamente aumentó la IL-12 con respecto a los macrófagos M(LPS). La producción de IL-10 se mantuvo por encima del control pero sin cambios en los tres grupos. En los ensayos de citometría de flujo (Fig. 7D) los macrófagos expuestos a la SGSTF mostraron baja expresión de PD-L1 que no fue significativa con respecto al control y no se detectó la presencia de PD-L2 y CD206, de manera similar los macrófagos M(LPS) únicamente expresaron PD-L1 y no PD-L2 ni CD206. Por el contrario, los macrófagos M(Tc-8w) mostraron una alta expresión de PD-L1, PD-L2 y CD206.



**Fig.7.** Efecto sobre la expresión de marcadores de activación en macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con la SGSTF. A) Determinación de los niveles de transcrito de *Gapdh*, *Arg1*, *Nos2* y *Chil3* por RT-PCR. B) Transcripción relativa en unidades arbitrarias. C) Determinación de citocinas (IL-12, TNF e IL-10) en los sobrenadantes de los cultivos por ELISA. D) Citometría de flujo para detectar PD-L1, PD-L2 y CD206 en la membrana de los macrófagos de todos los grupos. En (c) control de macrófagos cultivados sin estímulo, con 10  $\mu$ g/mL de la SGSTF. Macrófagos M(Tc-8w) y M(LPS) fueron usados como control de activación alternativa y clásica respectivamente. Se muestran los datos expresados como  $\pm$  SD (n=3) de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados (\*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.0005, \*\*\*\*p<0.0001).

### **Expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC-II en los macrófagos expuestos a la SGSTF**

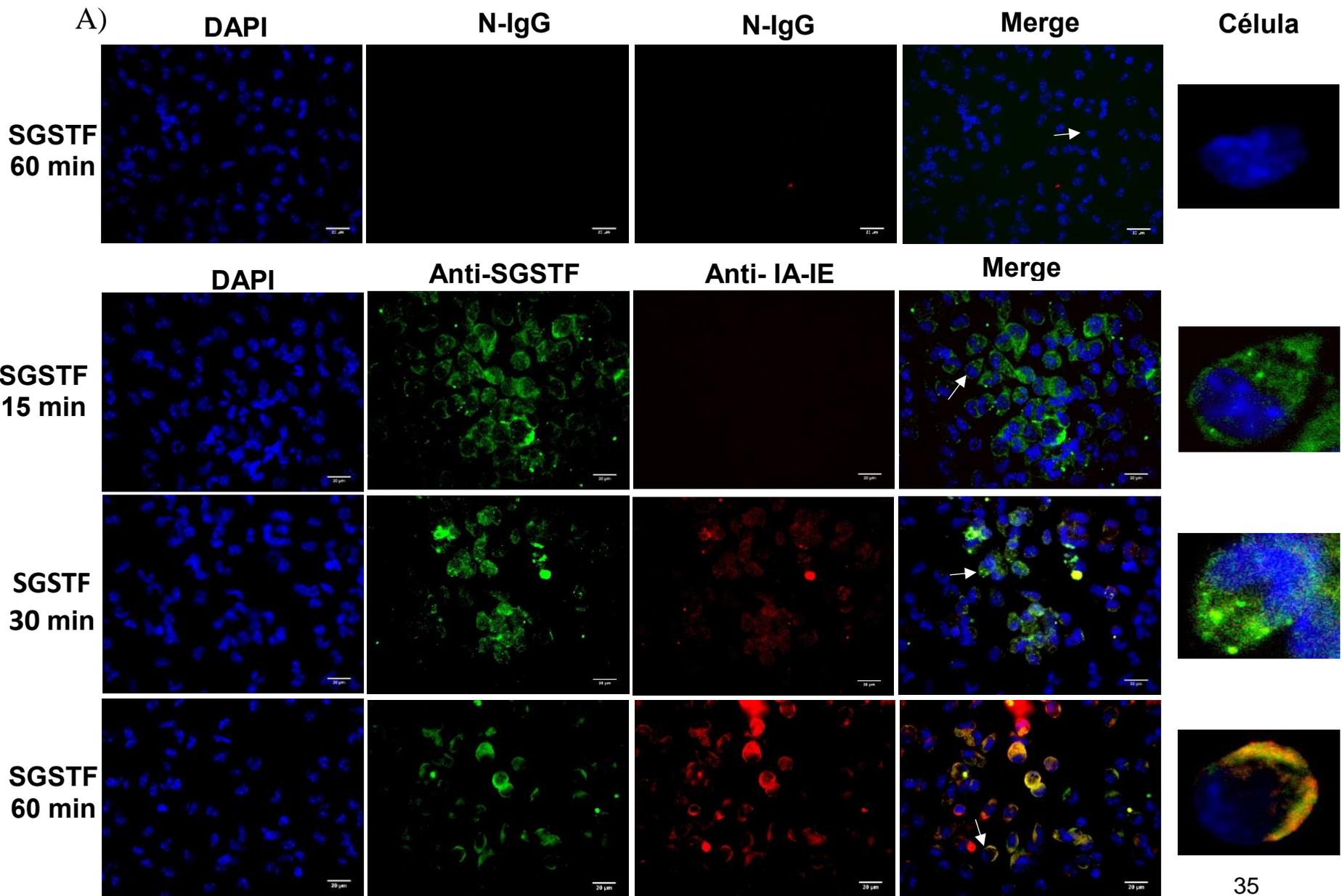
Además de los marcadores de activación se buscó la presencia de CD80, CD86 y MHCII por citometría de flujo en los macrófagos cultivados en presencia de la SGSTF durante 24 horas. La expresión de CD80 fue constante en los macrófagos M(Tc-8w), en los macrófagos estimulados con la SGSTF y en los macrófagos control sin mostrar diferencias significativas. Para esta molécula únicamente los macrófagos M(LPS) mostraron una ligera disminución en la expresión con respecto a las células en presencia de la SGSTF. Las células positivas para CD86 aumentaron en todos los grupos con respecto a los macrófagos control incluyendo los macrófagos M(SGSTF) mientras que para MHC-II no se encontraron diferencias significativas en estos macrófagos al igual que en los M(LPS). Sin embargo, los macrófagos M(Tc-8w) mostraron la más alta expresión de este marcador (Fig. 8A y B).

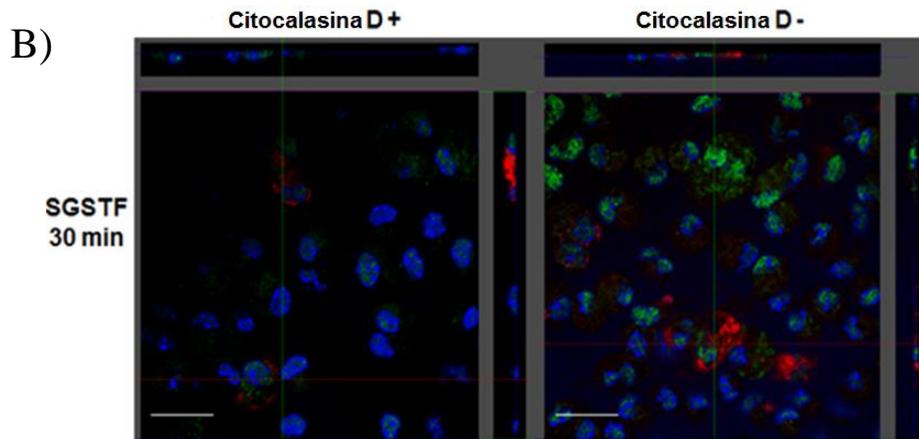


**Fig.8.** Citometría de flujo para detectar la expresión de CD80, CD86 y MHCII en la membrana de macrófagos peritoneales estimulados con SGSTF. A) Dot-plots de la expresión de dichos marcadores. B) Porcentaje de células dobles positivas para F4/80 y CD80, CD86 o MHC-II. En (c) control de macrófagos cultivados sin estímulo, macrófagos estimulados con 10 µg/mL de la SGSTF. Macrófagos M(Tc-8w) y M(LPS) fueron usados como control de activación alternativa y clásica respectivamente. Datos expresados como  $\pm$  SD (n=3) de un experimento representativo de tres experimentos independientes (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

## **Internalización de la SGSTF por los macrófagos**

Usando microscopía confocal se observó la internalización en macrófagos de la SGSTF en ensayos a los 15, 30 y 60 min *in vitro* (Fig.9A). A los 15 min se observó a la SGSTF, marcada en verde (anti-SGSTF) dispersa en el citoplasma de los macrófagos y la señal del MHCII (rojo, anti-IA-IE) no se detectó. A los 30 min, la mayoría de la señal de la SGSTF se encontró concentrada en motas en el citoplasma, aunque alguna todavía apareció dispersa. En este tiempo la señal de MHCII comenzó a aparecer en el citoplasma también, aunque en la imagen superpuesta (Merge) de los tres canales se observó una mínima superposición. A los 60 min la mayoría de la SGSTF se observó localizada hacia la membrana de los macrófagos al igual que la señal de MHCII que a este tiempo se mostró más intensa. En la imagen superpuesta ambas señales co-localizaron en la mayoría de los macrófagos (amarillo) sin embargo algunas células mostraron sólo la señal de SGSTF y otras sólo MHCII. Como control se utilizaron células estimuladas por 60 min con la SGSTF en las que se realizó la inmunofluorescencia usando IgG normales (N-IgG) y no se observó ninguna señal en estas. Imágenes ortogonales de macrófagos incubados durante 30 min con la SGSTF con y sin Citocalasina-D fueron tomadas y analizadas (Fig.9B). En presencia de la Citocalasina-D no se observó señal de la SGSTF dentro de los macrófagos y la presencia de MHCII se observó muy disminuida. Por el contrario, las células cultivadas sin citocalasina-D mostraron el mismo patrón observado en los experimentos anteriores a 30 min de incubación.



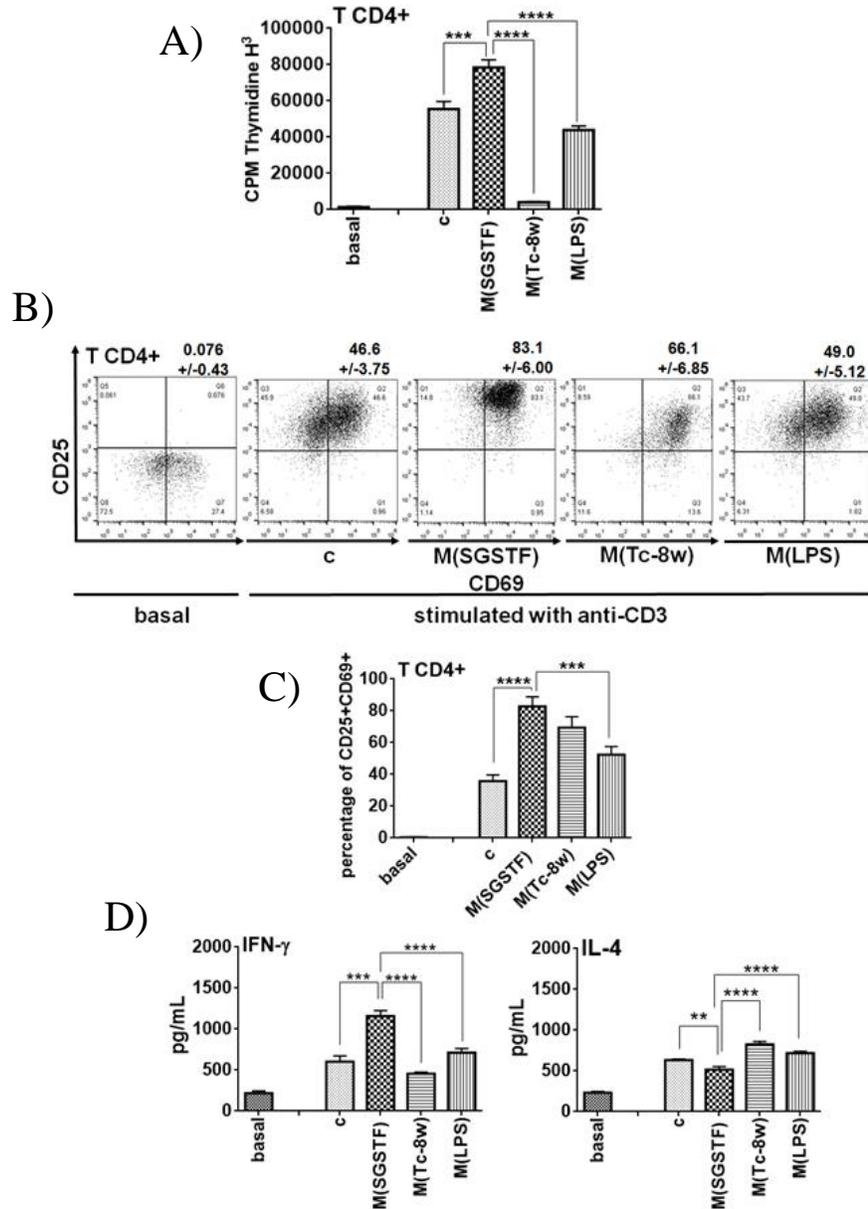


**Fig.9.** Observación por microscopía confocal de la internalización de la SGSTF de *Taenia solium* por los macrófagos peritoneales. A) Los macrófagos fueron estimulados durante 15, 30 y 60 min con la SGSTF y posteriormente tratados con IgG normales o con anticuerpos contra la SGSTF (anti-SGSTF) o anti-IA-IE (MCHII) y con anticuerpos secundarios conjugados a FITC y Texas Red respectivamente. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se ilustran las imágenes superpuestas de los tres canales adquiridos (Merge) y ampliaciones digitales de las células marcadas con una flecha en los campos mostrados (una célula). B) Imágenes ortogonales (plano Z simple) de macrófagos incubados durante 30 min con la SGSTF con y sin Citocalasina-D y tratados de la misma manera arriba mencionada. La barra blanca que se encuentra en cada foto equivale a 20 micras.

### **Macrófagos expuestos a la SGSTF favorecen la producción de IFN- $\gamma$ en las células T CD4+**

Posteriormente se investigó la habilidad de los macrófagos estimulados con la SGSTF de modular la respuesta de los linfocitos T cooperadores, las principales células involucradas en la resistencia o susceptibilidad en la cisticercosis experimental. En la figura 10A se observa la influencia de los macrófagos estimulados sobre la proliferación de los linfocitos T CD4+ pre-activados con anti-CD3. En el grupo de células expuestas a la SGSTF dicha proliferación aumentó de manera significativa con respecto al control de células T CD4+ co-cultivadas con macrófagos sin estimular e incluso con respecto a los co-cultivos con macrófagos M(LPS). Por el contrario, los co-cultivos con macrófagos M(Tc-8w) inhibieron la proliferación a niveles basales. Los co-cultivos basales fueron los co-cultivos realizados con macrófagos sin estimular y con linfocitos T CD4+ sin pre-activar con el anti-CD3. Además de la proliferación se buscó la presencia de marcadores de

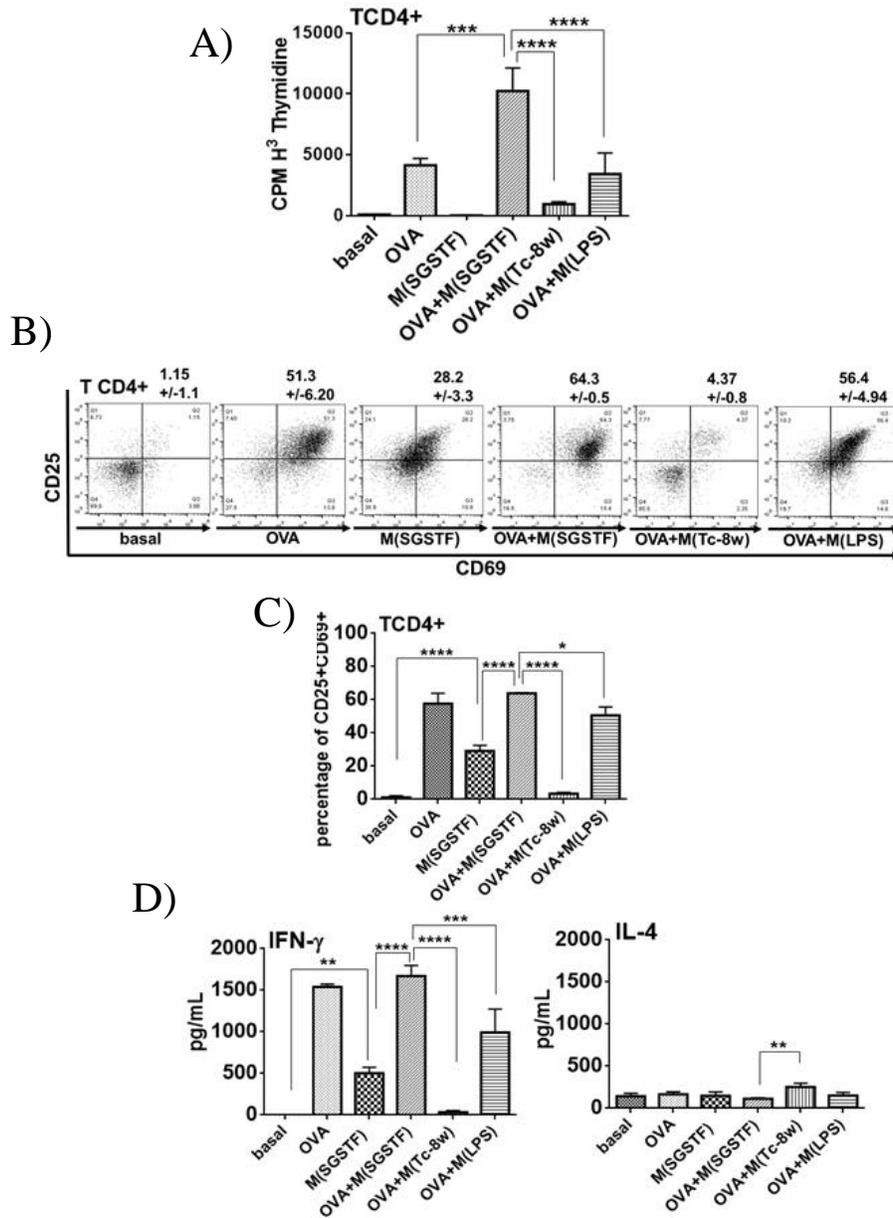
activación en la membrana de los linfocitos T en co-cultivo así como la secreción de citocinas de tipo Th1 y Th2 (Fig.10 B y C), de acuerdo con lo observado en la proliferación, los co-cultivos con macrófagos M(SGSTF) también aumentaron los linfocitos dobles positivos para CD25 y CD69 y estos tuvieron una mayor producción de IFN- $\gamma$  y baja de IL-4 con respecto a los demás grupos. Los co-cultivos con macrófagos M(Tc-8w) también mostraron células CD25+CD69+ sin embargo la producción de IFN- $\gamma$  fue menor con respecto a los co-cultivos con M(SGSTF) y M(LPS) mientras que la secreción de IL-4 fue mayor.



**Fig.10.** Respuesta de los linfocitos T CD4+ tratados con anticuerpos anti-CD3 en co-cultivo con macrófagos estimulados con SGSTF por 72 h: A) Proliferación B) Expresión de CD69 y CD25, y C) Expresión de las citocinas secretadas (IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-12). En co-cultivos no estimulados (c), en co-cultivos estimulados con la GSTSF (SGSTF, 10  $\mu$ g/mL); co-cultivos realizados con macrófagos alternativamente activados y con macrófagos clásicamente activados respectivamente. Linfocitos T CD4+ co-cultivados sin tratamiento y sin anti-CD3 se usaron como controles de respuesta basal. Datos expresados como  $\pm$  SD (n=3) de un experimento representativo de tres experimentos independientes \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.005 \*\*\*\*p<0.0001

En estudios previos se ha demostrado que los antígenos de *Taenia* son capaces de inhibir la respuesta de los linfocitos T hacia los estímulos policlonales y hacia otros antígenos como en el caso de la respuesta frente a la OVA. (Spolski, Alexander-Miller, y Kuhn, 2002; L. I. Terrazas, Montero, Terrazas, Reyes, y Rodríguez-Sosa, 2005). En modelos *in vitro*, antígenos como los extractos solubles de *T. crassiceps* inhiben la activación de las células T CD4+ transgénicas en el TCR para la OVA, aún cuando la OVA está presente, a través de la promoción de macrófagos alternativamente activados. Con el fin de confirmar si la SGSTF es capaz de mostrar un efecto contrario a estos antígenos de manera que los macrófagos promuevan y mantengan una respuesta Th1 cuando un antígeno no relacionado como la OVA está presente se realizaron experimentos similares a los arriba descritos (Fig. 10) pero usando linfocitos T CD4+ obtenidos de ratones transgénicos DO11.10 a los cuales se les agregaron los macrófagos y el péptido OVA<sub>323-339</sub> además del estímulo correspondiente. Los co-cultivos realizados con macrófagos M(SGSTF) más el péptido OVA<sub>323-339</sub> mostraron una mayor proliferación que los estimulados únicamente con dicho péptido (c) y que los co-cultivos con M(LPS); por el contrario, los co-cultivos realizados con macrófagos M(Tc-8w) inhibieron la proliferación inducida por el péptido OVA<sub>323-339</sub> (Fig.11 A). La expresión de CD25 y CD69 se mantuvo sin diferencias significativas entre los co-cultivos probados exceptuando al que se realizó con los macrófagos M(Tc-8w) que mostró una muy baja presencia de linfocitos CD25+CD69+ inhibiendo también el efecto de la estimulación con OVA<sub>323-339</sub> sobre estos marcadores (Fig.11 B y C). Interesantemente, los co-cultivos estimulados sólo con la SGSTF sin OVA<sub>323-339</sub> que se usaron como control (M(SGSTF)), mostraron un incremento significativo en la expresión de estas moléculas con respecto al control de expresión basal. El co-cultivo basal fue el que se realizó sin agregar OVA<sub>323-339</sub> ni ningún otro estímulo. Por otro lado, en los sobrenadantes obtenidos se midieron las cantidades de IFN- $\gamma$  e IL-4. Los co-cultivos en presencia de OVA<sub>323-339</sub> y los co-cultivos con macrófagos M(SGSTF) más OVA<sub>323-339</sub> mostraron alta producción de IFN- $\gamma$  por encima de los co-cultivos con macrófagos M(LPS)+OVA mientras que los cultivados con macrófagos M(Tc-8w)+OVA tuvieron la más baja secreción de esta interleucina.

Así mismo, se detectó presencia de CD25 y CD69 en los co-cultivos con SGSTF sin OVA<sub>323-339</sub>, también hubo secreción de IFN- $\gamma$  por encima del basal y del co-cultivo con macrófagos M(Tc-8w). Respecto a la IL-4, todos los co-cultivos secretaron concentraciones por debajo de los 300 pg/mL y sólo se encontró un pequeño aumento en los co-cultivos con macrófagos M(Tc-8w).



**Fig.11.** Respuesta de células T CD4+ transgénicas DO11.10 co-cultivadas con macrófagos estimulados con la SGSTF M(SGSTF) a los que se agregó el péptido OVA<sub>323-339</sub> (M(SGSTF)+OVA) por 72 h. En A) Proliferación de las células. B) y C) Expresión de CD25 y CD69 en las células T CD4+ en cultivo y en D) Secreción de IFN e IL-4. Datos expresados como  $\pm$  SD (n=3) de un experimento representativo de tres experimentos independientes \*p<0.05 \*\*p<0.005 \*\*\*p<0.0005 \*\*\*\* p<0.0001

### Epítopes de la SGSTF promotores de la respuesta Th1

Además de observar el efecto de la SGSTF, se buscaron epítopes en las TsGSTs que estuvieran relacionados con dicho efecto. En la 28GST de *S. japonicum* se han



## DISCUSIÓN

Se sabe que los parásitos liberan moléculas que modulan la respuesta inmune generada contra ellos permitiéndoles evadir el ataque del hospedero. Algunas de ellas funcionan como homólogos de citocinas, moléculas inhibitoras de proteasas, o factores de crecimiento y su producción favorece el establecimiento, reproducción y permanencia de los parásitos durante largos periodos de tiempo. En el modelo de cisticercosis experimental los macrófagos y las células T cooperadoras son importantes para establecer la resistencia o susceptibilidad en esta infección debido a que modulan el balance de las respuestas Th1/Th2 (Rodríguez-Sosa et al., 2002; Villa y Kuhn, 1996). La activación de macrófagos durante la infección es crucial para el aumento o disminución de la carga parasitaria. Se ha demostrado que la remoción de los macrófagos alternativamente activados en etapas tempranas de la infección favorece el ambiente Th1 y disminuye el número de parásitos; así mismo, en los ratones C57BL/6 los cuales son resistentes a esta infección, la activación clásica de macrófagos se mantiene en el tiempo restringiendo el crecimiento de los cisticercos (Reyes et al., 2010, 2009). Se ha encontrado que los extractos de excreción/secreción y los extractos solubles *T. crassiceps* pueden dirigir la respuesta Th2 ayudando a la proliferación de los cisticercos (Gómez-García et al., 2006; Terrazas et al., 2010) mientras que muy pocas moléculas se han detectado como promotoras de una respuesta Th1 resistente.

Previamente se demostró que la inmunización con 5-10 µg de la SGSTF disminuye de manera eficaz el número de cisticercos en los ratones; sin embargo, los mecanismos inmunológicos asociados a esta protección no se han investigado. Para probar si la SGSTF es capaz de modificar la respuesta inmunológica de manera favorecedora para el hospedero, primero se realizaron ensayos de estimulación *in vitro* de macrófagos peritoneales. De los marcadores de activación clásica y alternativa más comunes solamente se encontraron *Nos2*, TNF e IL-12, mientras que no hubo presencia de marcadores de activación alternativa, lo que sugirió la inducción de un fenotipo proinflamatorio en los macrófagos, no obstante, estos macrófagos también secretaron IL-10, citocina que promueve la homeostasis,

suprime la inflamación y limita el daño (Xu W. et al., 2006; Xu X. et al., 2016) lo que podría indicar un fenotipo intermedio. Sin embargo, la proporción IL-12/IL-10 se ha usado anteriormente para clasificar de una mejor manera la activación de los macrófagos de forma que la predominancia de la IL-12 sobre la IL-10 se considera una activación clásica (Ma et al., 2016; Mantovani et al., 2004). Los resultados mostraron que los macrófagos M(SGSTF) tuvieron una mayor secreción de IL-12 sobre IL-10 lo que parece estar favoreciendo el fenotipo clásicamente activado y que la IL-10 producida no es suficiente para inhibir la respuesta Th1. Recientemente se demostró que los macrófagos M(Tc-8w) de etapas tardías de la infección (alternativamente activados) son predominantemente PD-L2+ IL-10- (C. Terrazas et al., 2017) lo que muestra que la IL-10 no es determinante para el desarrollo de la Th2 en esta infección. Así mismo anteriormente se demostró que los macrófagos extraídos del peritoneo de ratones en las primeras semanas de infección, semanas determinantes para la resolución de la infección, expresan TNF e IL-12 y no muestran ningún marcador de activación alternativa (Rodríguez-Sosa et al., 2002) de la misma manera que los macrófagos M(SGSTF) obtenidos en este trabajo.

Además, los macrófagos M(SGSTF) incrementaron la expresión de CD86 mientras que mantuvieron niveles constantes de CD80, moléculas de co-estimulación esenciales para la activación tanto de la APC como de los linfocitos T, células en las que a través de CD28 promueven la supervivencia y la secreción de citocinas que están relacionadas a la diferenciación Th1/Th2 (Chen y Flies, 2013; Okano et al., 2001). Se ha encontrado una mayor relación entre CD86 y el inicio de la respuesta T proliferativa en presencia de anti-CD3 o aloantígenos así como se le ha relacionado con la regulación de la secreción de IL-10 y la estimulación de la producción de IL-4 e IL-10 por los linfocitos T CD4+ favoreciendo a Th2 (Han, Shen, Zhu, y Qiu, 2017; Nakajima, 1997; Newton et al., 2004). Sin embargo, esta relación entre la presencia o ausencia de CD80 o CD86 o de ambas moléculas en la diferenciación hacia algún perfil Th parece depender de la patología y el modelo estudiados. Por ejemplo, CD80 y CD86 se han considerado igualmente importantes para la proliferación de los linfocitos T pre-activados *in vitro* con dosis bajas de PHA

o con anti-CD3 dado que en ausencia de alguno de los dos la respuesta se mantiene (Liebert, Vasilevko, Ghochikyan, y Holterman, 2002). Diferente efecto se observa en células de pacientes con asma atópica bronquial en las cuales CD86 tiene un papel preponderante en la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Rutkowski et al., 2003; Tsuyuki et al., 1997) mientras que en modelos de sepsis el aumento de CD80 se ha relacionado con una mayor severidad del shock séptico y de la inflamación (Nolan et al, 2009;). En ratones susceptibles a *T. crassiceps* se ha observado una disminución importante de CD80 y CD86 en los macrófagos alternativos obtenidos de 8 semanas de infección que podría estar relacionado con el aumento de la IL-4 y la anergia observada en las células T a esos mismos tiempos de infección, por lo que el aumento de CD86 en los macrófagos activados con la SGSTF podría ser importante para la activación tanto de los macrófagos como de la célula T CD4+ y la promoción de una respuesta Th1 protectora. Cabe mencionar que, aunque los macrófagos utilizados para este ensayo fueron obtenidos utilizando medio tioglicolato estéril al 3%, los macrófagos sin estimular usados como control en todos los ensayos y obtenidos de la misma forma no mostraron expresión basal de marcadores como Nos2, Arg-1 ni ninguno de los marcadores de membrana medidos. Sin embargo, en los ensayos de ELISA sí se detectaron cantidades bajas de citocinas como TNF e IL-12 y sí hubo expresión basal de moléculas co-estimuladoras como MHC-II por lo que es posible que el efecto de la SGSTF se haya visto aumentado por este fenotipo “pre-activado” producido por la forma de reclutamiento, fenotipo que ha sido reportado previamente en macrófagos obtenidos por esta forma (Cook, Braine, y Hamilton, 2003; Ghosn et al., 2010; Leijh, Van Zwet, Ter Kuile, y Van Furth, 1984; Li, Baviello, Vlassara, y Mitsuhashi, 1997). Ensayos de estimulación con SGSTF en macrófagos peritoneales naïve deben realizarse para confirmar si la forma de obtención tuvo un efecto significativo en la respuesta observada.

Usando microscopía confocal se evidenció la interacción de la SGSTF con los macrófagos también en experimentos *in vitro* donde a través del tiempo (15, 30 y 60 min) se buscó a la SGSTF. A los 15 minutos la proteína se observó en el citoplasma de los macrófagos e interesantemente, a los 30 min de estimulación comenzó a

detectarse el MHCII y a los 60 min se encontró co-localización de la SGSTF con dicha molécula. Por el contrario, cuando se impidió el reordenamiento de la actina usando citocalasina D no se detectó SGSTF en los macrófagos ni se observó la presencia de MHCII. Lo anterior sugiere primero, que la estimulación con la proteína induce un aumento en su expresión en etapas tempranas (dado que a 24 h se buscó por citometría esta molécula y no se encontró aumentada de manera significativa) y segundo, que la SGSTF pudiera internalizarse por macropinocitosis (ya que no se conoce algún receptor para la SGSTF) y al ser células presentadoras de antígenos pudieran presentarla en el contexto del MHCII, sin embargo es necesario realizar más estudios para conocer el mecanismo exacto de la entrada de la SGSTF.

Los resultados anteriores indican que la SGSTF activa a los macrófagos induciendo la expresión de marcadores de activación clásica como *Nos2*, IL-12 y TNF así como moléculas involucradas en la presentación de antígenos y la estimulación de la respuesta T cooperadora.

Una vez demostrado lo anterior, se probó en experimentos *in vitro* si la activación de los macrófagos podría tener un efecto sobre la proliferación y diferenciación de las células T CD4+ hacia el fenotipo Th1. Los co-cultivos realizados con macrófagos M(SGSTF) promovieron la proliferación y la expresión de CD25 y CD69 así como la secreción de IFN- $\gamma$  en los linfocitos T CD4+ pre-activados con anti-CD3 mientras que en los co-cultivos en presencia de OVA<sub>323-339</sub> y macrófagos M(SGSTF) aumentó la proliferación y se mantuvieron las células CD25+CD69+ y la producción de IFN- $\gamma$ , contrario a lo observado en los co-cultivos con macrófagos M(Tc-8w) que inhibieron la proliferación y la expresión de CD25 y CD69 incluso en presencia de la OVA<sub>323-339</sub>. CD25 y CD69 se expresan en la membrana de las células activas y son cruciales en la amplificación de la señal de IL-2, en la generación de una óptima respuesta T, en la secreción de TNF y en la generación de respuestas Th1 y Th17 (de la Fuente et al., 2014; Létourneau, Krieg, Pantaleo, y Boyman, 2009; Marzio, Mauël, y Betz-Corradin, 1999). La presencia de IFN- $\gamma$  durante la cisticercosis murina impide el establecimiento del parásito y se ha observado que la administración de IFN- $\gamma$  recombinante tiene un efecto protector en los ratones. Si

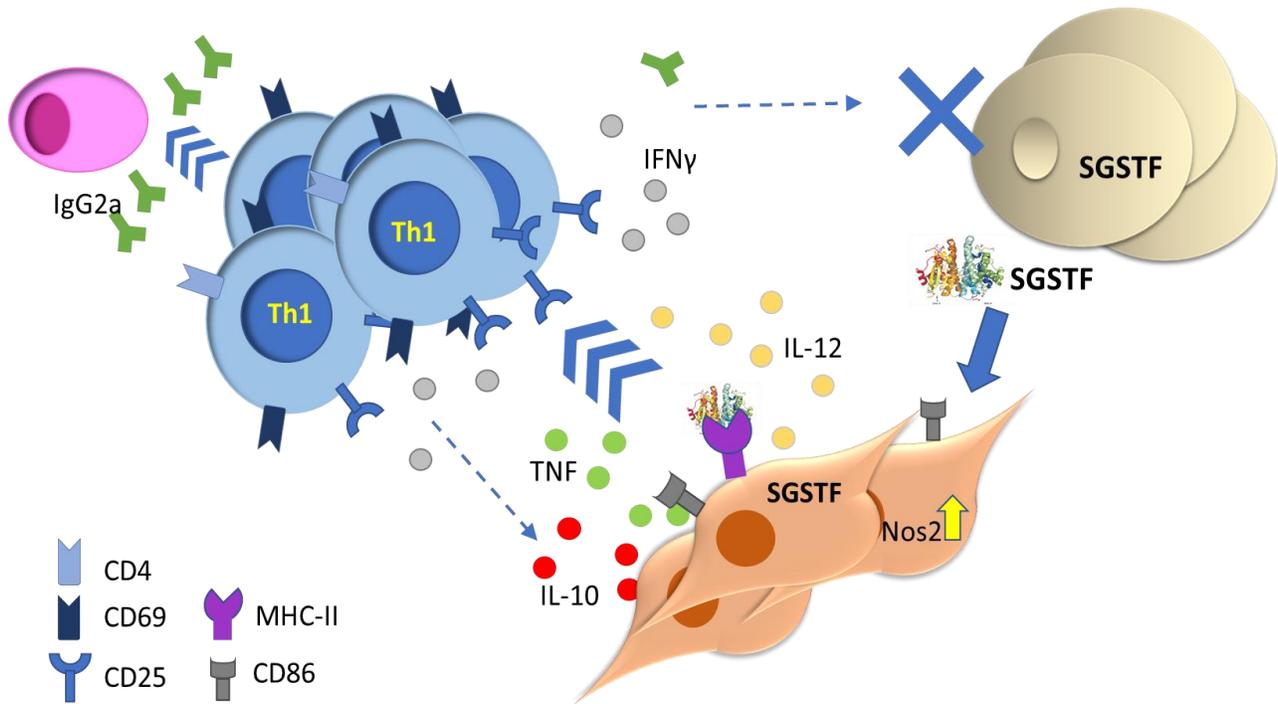
por el contrario ocurre una anergia de las células Th1 y predominan las Th2, la carga parasitaria aumenta (Terrazas et al., 1999) por lo que la promoción de la proliferación y la secreción de IFN- $\gamma$  en las células T CD4+ inducida por los macrófagos M(SGSTF) podrían ser uno de los mecanismos protectores de esta proteína. Resultaría interesante realizar más estudios donde a través de citometría de flujo se detectara intracelularmente el origen de citocinas como el IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-4 e IL-10 para poder conocer cuáles células en el co-cultivo son las células blanco y cuáles las productoras, además de que se sabe que las poblaciones de linfocitos T CD4+ naïve son heterogéneas de forma intrínseca e interaccionan de manera dinámica con las APC's (Hurez et al., 2003; Itoh y Germain, 1997) lo que pudo provocar que no se observara una marcada producción de IFN e IL-4 incluso en los grupos con M(LPS) y M(Tc-8wk), respectivamente.

Por otro lado, el alineamiento de la SGSTF con epítopes Th1 de la GST28 de *S. japonicum* mostró que las Ts25GST y Ts26GST poseen epítopes Th1 homólogos principalmente en el péptido P6 que en experimentos *in vitro* provocaron una fuerte respuesta Th1 contra *S. japonicum* y que se ha propuesto como candidato para la realización de vacunas (Li et al., 2005). Estos péptidos se encuentran localizados dentro y alrededor del motivo consenso conservado SNAIL/TRAIL que distingue a las GST de helmintos de las de mamíferos (Torres-Rivera y Landa, 2008). Este hallazgo junto con lo observado en la microscopía confocal y la producción de anticuerpos IgG2a previamente descrita además de no haberse encontrado diferencia en la expresión de Nos2 y citocinas al haberse estimulado a los macrófagos con la SGSTF desnaturalizada por calor, sugieren que el efecto de la SGSTF está más relacionado con el procesamiento y presentación de los epítopes de la proteína que con otros posibles efectos derivados de su actividad como enzima como en la regulación del balance de glutatión importante para células como los macrófagos o de su participación en otras funciones celulares como en la unión a proteínas como ASK1 o JNK (Fraternale et al., 2010; Pajaud, Kumar, Rauch, Morel, y Aninat, 2012), sin embargo más estudios deben realizarse para comprobar el mecanismo de acción.

Así mismo los resultados indican que la SGSTF en conjunto con otros péptidos podría usarse para desarrollar una vacuna anti-helmíntica polivalente o como una vacuna contra *T. solium* al administrarse sola o junto con moléculas como p66, GK1 y GK2 (Garrido, Tato, y Molinari, 2001; Spolski et al., 2002; Toledo et al., 2001) que además de promover la producción de anticuerpos modulara la respuesta manteniendo el perfil Th1 para evitar el establecimiento y desarrollo del parásito en cualquier estadio. Se sabe que cuando el cisticerco se encuentra viable, metabólicamente activo e íntegro los antígenos que secreta son favorecedores para él por lo que la SGSTF, que se encuentra en la pared vesicular del cisticerco, podría ser uno de los antígenos promotores de la respuesta inflamatoria que se da cuando el cisticerco es dañado por fármacos o por la respuesta inmune del hospedero contribuyendo de manera importante a la destrucción del parásito.

Además, moléculas moduladoras de parásitos se han utilizado para tratar patologías relacionadas con el desbalance de la respuesta Th1/Th2 principalmente en autoinmunidad administrándose para promover la respuesta Th2 y disminuir el daño provocado. En el caso de la SGSTF se podría utilizar para promover la diferenciación de macrófagos al fenotipo clásicamente activado y respuesta Th1 en enfermedades como el cáncer donde los macrófagos M2-reparadores indirectamente promueven el cáncer (Mills, Lenz, y Harris, 2016).

No se sabe con exactitud qué moléculas y cuáles mecanismos modulan el balance Th1/Th2 en la cisticercosis murina ni en la neurocisticercosis donde incluso otro tipo celular está involucrado, las células Treg; sin embargo, el descubrimiento de nuevos factores y sus efectos sobre los macrófagos son importantes para entender los mecanismos moduladores de la respuesta Th1/Th2, por lo que este trabajo aporta nuevo conocimiento sobre una de las proteínas más importantes para la supervivencia no sólo de *T. solium* si no de una gran variedad de parásitos, sobre la inmunología de esta proteína y sobre las interacciones hospedero-parásito que pueden determinar el curso de un infección y el curso de una respuesta inmune local y sistémica.



**Fig. 13.** La SGSTF purificada de *T. solium* activa a los macrófagos y linfocitos T *in vitro* hacia un fenotipo protector para el hospedero. Los macrófagos internalizan a la SGSTF y aumentan la expresión de Nos2 y CD86 además de secretar TNF, IL-12 e IL-10. La SGSTF podría ser procesada y presentada por estas células en el contexto del MHC-II y junto con las citocinas producidas, inducir la proliferación y activación de los linfocitos T CD4+ secretores de IFN-γ. Estos linfocitos favorecerían el establecimiento de una respuesta Th1 provocando la producción de IgG2a lo que impediría la multiplicación de los parásitos protegiendo al hospedero. En el modelo de vacunación la producción de la respuesta Th1 por la SGSTF podría ser un mecanismo de la protección descrita en estudios previos y en condiciones de la infección, la acción de fármacos o de la propia respuesta del hospedero al dañar al cisticerco podría estar exponiendo a la SGSTF y así contribuir a generar la respuesta proinflamatoria observada en pacientes.

## CONCLUSIONES

- La SGSTF activa a los macrófagos produciendo la expresión de Nos2, TNF, IL-12, IL-10 y CD86 sin promover la expresión de marcadores de activación alternativa lo que indica un fenotipo predominantemente inflamatorio propio de la estimulación con la SGSTF.
- La SGSTF induce la expresión de moléculas importantes en la sinapsis inmunológica y en la activación del linfocito T CD4+, como el CD86 y el MHCII.
- La SGSTF es internalizada por los macrófagos y a los 60 minutos co-localiza con MHCII. En presencia de Citocalasina D no se internaliza ni se expresa MHCII lo que sugiere que es procesada y presentada en el contexto del MHCII.
- Los macrófagos estimulados con la SGSTF promovieron la proliferación, la expresión de CD25, CD69 y la secreción de IFN- $\gamma$  de los linfocitos T CD4+.
- Los macrófagos estimulados con la SGSTF promovieron la proliferación y mantuvieron la respuesta Th1 en presencia del péptido OVA.
- Los péptidos homólogos de P1, P5 y P6 en la SGSTF son importantes para el efecto de la proteína.
- La SGSTF podría ser usada junto con otros antígenos para realizar una vacuna eficaz en contra de la *T. solium* que podría ser aplicada en el cerdo.

## PERSPECTIVAS

- Confirmar el procesamiento y el mecanismo de activación de la SGSTF en los macrófagos
- Probar el efecto de SGSTF en monocitos de cerdo y de humano.
- Probar el efecto de SGSTF en un modelo *in vivo* ya sea en la infección por *T. crassiceps* o en cerdos infectados con *T. solium*.
- Caracterizar la respuesta inmune en ensayos de vacunación con SGSTF.
- Probar el efecto modulador de los M(SGSTF) en alguna patología o modelo de respuesta inmune Th2.

## ANEXO

Bioscience Reports (2019) 39 BSR20181132  
https://doi.org/10.1042/BSR20181132



Research Article

# *Taenia solium* glutathione transferase fraction activates macrophages and favors the development of Th1-type response

Vera Teresa Vega-Angeles<sup>1</sup>, Luis I. Terrazas<sup>2</sup>, Yadira Ledesma-Soto<sup>2</sup>, Lucía Jiménez<sup>1</sup> and  Abraham Landa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510, CDMX; <sup>2</sup>Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México

Correspondence: Abraham Landa (landap@unam.mx)



Glutathione (GSH) transferase (GST) is an essential enzyme in cestodes for the detoxification of xenobiotics. In *Taenia solium*, two GSTs (Ts25GST and Ts26GST kDa) were isolated as a fraction (SGSTF) by GSH-Sepharose-4B. Both are located on the tegument. Immunization assays with SGSTF reduced up to 90% of the parasitic load in a murine model of cysticercosis. It prompted us to investigate how SGSTF induces this protective immune response. To test it, we exposed peritoneal macrophages to SGSTF for 24 h; such exposure favored the production of IL-12, TNF, and IL-10 as well as the expression of nitric oxide synthase 2 inducible (*Nos2*) and CD86, but did not induce the expression of chitinase-like 3 (*Chil3*). Confocal microscopy showed that the macrophages internalize the SGSTF which co-localized after 1 h with MHC-II in their plasma membranes. Macrophages exposed to SGSTF and co-cultured with anti-CD3 pre-activated T CD4<sup>+</sup> cells, enhanced the proliferation of CD4<sup>+</sup> cells, induced high interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) secretion, and elevated the expression of CD25 and CD69, molecules associated with cell activation. Similar assay using T CD4<sup>+</sup> cells from DO11.10 mice and ovalbumin (OVA) peptide+SGSTF as stimuli, showed enhanced cell proliferation and OVA-specific IFN- $\gamma$  secretion. These data are in-line with those indicating that the P1, P5, and P6 peptides of *Schistosoma japonicum* 28GST highly promote T-cell proliferation and Th1 response *in vitro*. We found that such peptides are also present on Ts25GST and Ts26GST. It suggests that SGSTF activates peritoneal macrophages to a classically activated-like phenotype, and that these macrophages induce the differentiation of T CD4<sup>+</sup> cells toward a Th1-type response.

## Introduction

Neurocysticercosis (NCC) is the most severe form of the diseases caused by *Taenia solium*, and remains to be the major cause of epileptic seizures in developing countries such as México. WHO estimates that approximately 2.56–8.30 million people suffer from NCC [1,2]. The early immune response against cysticercosis has been less studied due to the nature of the evolution of the disease in humans [3,4]. In contrast, it has been well characterized in a murine model of cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* (ORF), where it is known that macrophage activation is an essential step in the development of immune responses. During the first weeks following infection, the macrophages show a classically activated phenotype, and are accompanied with a high expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and proliferation of T CD4<sup>+</sup> cells. As the infection progresses, the macrophages exhibit an alternatively activated phenotype with the ability to block lymphocyte proliferative response and express high levels of chitinase-like 3 (*Chil3*) type 1 (*Ym1*) and arginase 1 (*Arg1*), likewise programmed

Received: 09 July 2018  
Revised: 21 November 2018  
Accepted: 23 November 2018

Accepted Manuscript Online:  
11 December 2018  
Version of Record published:  
18 January 2019

death-ligands 1 and 2 (PD-L1 and PD-L2) [5,6]. On the other hand, it has been reported that the excreted/secreted products of the cysticerci of *T. crassiceps* (TcES) induce polarization toward Th2 responses in mice [7]. For example, dendritic cells (DC) stimulated *in vitro* with TcES are unable to respond to LPS, and in co-culture with T CD4<sup>+</sup> cells from DO11.10 mice suppress IFN- $\gamma$  secretion and induce IL-4 production in response to the class II (Kb)-restricted peptide epitope of ovalbumin (OVA) [8]. The carbohydrates of *T. crassiceps* also promote a Th2 response through receptors such as mannose (CD206), macrophage galactose lectin (MGL) and toll-like receptor 2 (TLR2) [9,10]. Nevertheless most of the studies have been done using TcES and only few studies have been carried out with isolated molecules in the murine cysticercosis model by *T. crassiceps*. A few such studies include: (i) the stimulation of peritoneal exudate cells (PECs) with *T. crassiceps* p66 which induces augmented NO, IFN- $\gamma$ , and IL-10 secretion as well as the proliferation of lymphocytes [11]; (ii) studies with the F2 component of the *T. solium* metacystode factor (MF), and the KETc1 and KETc12 peptides which induce the proliferation of T cells and the production of IFN- $\gamma$ . In addition, the last two peptides protect against murine cysticercosis [12,13].

Glutathione (GSH) transferases (GSTs) are an enzyme family whose main role is to detoxify xenobiotics by reducing GSH conjugation. Furthermore, they participate in several important processes such as the transportation of molecules, signaling, transcription, prostaglandin synthesis, formation of ion channels, isomerization, susceptibility to asthma, and in allergic reactions [14,15]. Therefore, they have been proposed as a pharmacological target for the development of anti-helminthic drugs [16]. Moreover, the GSTs used in vaccination assays have demonstrated a high degree of protection to the host. A few such instances include the protection offered by *T. solium* GST fraction (SGSTF) from *T. crassiceps* in mice, *Schistosoma japonicum* 28GST in sheep, and *Schistosoma mansoni* 28GST in humans on which a phase II clinical trial has also been performed [17,18]. Similarly, the inhibition of the activity of GSTs from Schistosomes (Sm28GST, Sh28GST and Sj28GST) using specific antibodies demonstrated a partial protective effect in animal models by affecting worm fecundity and egg viability [19,20]. In addition, studies with recombinant Sh28GST have shown that it induces a Th2 immune response [21,22]; while studies with recombinant of *Echinococcus granulosus* (EgGST) suggest that the protein induces a protective Th1-type response with the production of IgG2 and IgG3 [23,24]. Cytosolic SGSTF exists as two isoenzymes, Ts25GST and Ts26GST, with the second isoenzyme being the most abundant. Both are distributed in the cytoplasm of the parenchyma and the subtegumentary cells of the cysticerci, and are able to conjugate GSH to several electrophilic compounds [25]. It has also been observed that mice immunized with SGSTF show a decreased cysticerci burden of 90% and 85% at 4 and 8 weeks post-infection respectively, and elevated levels of specific IgG2a. In addition, the mice immunized only with the Ts26GST isoenzyme exhibited a reduced cysticerci burden of 74 and 44% at 4 and 8 weeks post-infection, respectively [26]. However, little is known about the effect of GSTs on innate immune cells such as antigen presenting cells (APCs).

In the present study, we demonstrate that *in vitro* SGSTF is capable of generating a classically activated-like phenotype in peritoneal macrophages, and these activated macrophages promote a Th1-type response in T CD4<sup>+</sup> cells.

## Materials and methods

### Parasites

Cysticerci of *T. solium* were collected from a naturally infected muscle pig, provided by Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

### Mice (*Mus musculus*)

Seven to ten weeks old female BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratories, and maintained in a pathogen-free environment at Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México according to the government guidelines (Official Mexican Regulation NOM-062-ZOO-1999). The protocol used here was approved by the Committee of the Ethics and Committee for Care and Management of Laboratory Animals (CICUAL) of Facultad de Medicina, UNAM.

### Infection

Seven-week-old female BALB/c mice were intraperitoneally infected with 20 cysticerci of *T. crassiceps* (ORF strain). Four months later, the cysticerci were retrieved from the peritoneal cavity, washed thrice with PBS, and immediately injected into the peritoneal cavity of naïve BALB/c mice.

## Purification of SGSTF

*T. solium* cysticerici (10 g) were homogenized, and SGSTF was separated by an affinity column of GSH-Sepharose-4B (Pharma) using the method previously described [25]. The purified SGSTF was concentrated using Amicon Ultra filter (Millipore), and its concentration and purity were tested on 12% SDS/PAGE. The SGSTF was aliquoted and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use. All solutions and materials used in this method were LPS-free.

## In vitro stimulation of peritoneal macrophages

PECs were elicited by thioglycollate administration into the peritoneum of BALB/c mice and collected by thorough washing of the peritoneal cavity with sterile isotonic saline solution (SSI). After determination of viability by Trypan Blue exclusion, the cells were counted and adjusted to a density of  $3 \times 10^6$  cells/ml in RPMI medium (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Gibco) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, Sigma). They were then cultured on to 25-well plates at  $37^{\circ}\text{C}$  in an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . After 2 h of incubation, the non-adherent cells were removed by washing with warm sterile SSI. Flow cytometry assays revealed that 90% of the adherent cells were F4/80+, and we denominated them peritoneal macrophages. Dose-response curves with 100, 500, 1000, and 1500 ng/ml were made to find the LPS doses where we could clearly observe the expression of activation markers of peritoneal macrophages, this was also done for the SGSTF using 0.5, 1, 5, and 10  $\mu\text{g}$  (data not shown), in addition these doses were previously used in vaccination assays [26]. Therefore, peritoneal macrophages were stimulated with LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) or with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SGSTF to obtain M(LPS) and M(SGSTF) macrophages, respectively. Peritoneal macrophages from 8 weeks post-infection were obtained from *T. crassiceps*-infected mice M(Tc-8w) and non-stimulated macrophages control (c) were cultivated only in RPMI medium. All macrophages were cultivated for 24 h under the same conditions. This macrophage activation nomenclature was made as recently described [27].

## RNA extraction and reverse-transcription PCR

RNA was recovered from the cultured macrophages with TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. For reverse-transcription PCR (RT-PCR), 1  $\mu\text{g}$  of total RNA was retro-transcribed and amplified with a couple of gen-specific primers at 50 pM using the SuperScript III One-Step RT-PCR System kit (Invitrogen). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) (housekeeping gene), *Arg1*, nitric oxide synthase 2 inducible (*Nos2*), and *Chil3* genes were amplified using the primers designed previously [28–30]. The amplicons were electrophoresed on 1% agarose gel and stained with Ethidium Bromide. Gels were visualized and images captured in a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 120. The relative transcription of genes was determined by densitometry quantitation of the bands observed for each group in the gels using ImageJ software, values are presented as arbitrary units.

## Co-culture of peritoneal macrophages with T CD4<sup>+</sup> cells

Lymphocytes were obtained under sterile conditions from the spleens of naïve or 8 weeks infected BALB/c mice by perfusion, and the erythrocytes in the samples were lysed with Boyle's solution. The T CD4<sup>+</sup> cells were specifically extracted using a magnetic separation system MACS coupled to anti-CD4 antibodies (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. After determination of viability by Trypan Blue assay, the T CD4<sup>+</sup> cells were cultured for 2 h in 96-well flat-bottomed culture plates (Costar) previously sensitized with anti-CD3 antibodies (Biolegend). Then, non-stimulated (c), M(SGSTF), M(LPS), or M(Tc-8w) peritoneal macrophages were added in a 1:4 ratio. All co-cultures were incubated for 72 h and then the lymphocytes and supernatants were collected from them. For the proliferation assays, 0.5  $\mu\text{Ci}$  of tritiated thymidine (methyl- $^3\text{H}$ ]-TDR, Amersham) was added and the cells were incubated for a further 18 h. The cells were then harvested on a 96-well harvester (Tomtec), and finally counted using a counter 1450 micro $\beta$ -plate (Trilux). Values are represented as counts/min (CPM).

## Co-culture of peritoneal macrophages with OVA-specific T CD4<sup>+</sup> cells

For co-cultures stimulated with OVA peptide (323–339, Sigma), the macrophages and T CD4<sup>+</sup> cells were obtained from DO11.10 mice as described before. The macrophages M(SGSTF), M(LPS), or M(Tc-8w), as well as the non-stimulated macrophages (c) were cultured with OVA peptide (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 2 h and then the T CD4<sup>+</sup> cells were added in a 1:4 ratio and co-cultured for 96 h. The lymphocytes and supernatants were collected and allowed to proliferate. ELISA and flow cytometry assays were performed as described below.

## Analysis of cell surface markers

The peritoneal macrophages treated as in the section, 'In vitro stimulation of peritoneal macrophages' were harvested from culture plates using a 5 mM cold PBS-EDTA mixture for 10 min, washed, and then re-suspended in an FACS buffer (BD Biosciences). To avoid unspecific unions with antibodies, anti-mouse CD16/32 (93, dil. 2:100) was added for 20 min at 4°C to block the Fc receptors on the cell surface of macrophages. Then cells were washed with FACS buffer (BD Biosciences) and stained as indicated, with antibodies against F4/80 (BM8, 1:100), MHC-II (M5/114.15.2, 1:100), CD206 (C068C2, 2:100), IL-4R $\alpha$  (I015F8, 4:100), PD-L1 (B7-H1, 2:100), PD-L2 (TY-25, 2:100), CD80 (16-10A1, 4:100), and CD86 (GL-1, 2:100) in staining buffer at 4°C and used according to manufacturer's instructions (Biolegend). The stained cells were analyzed on a FACsCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using Cell Quest and FlowJo software. Parallel samples of the cells were stained with the corresponding isotype control. T CD4<sup>+</sup> cells obtained from the section, 'Co-culture of peritoneal macrophages with lymphocyte T cells' were washed with the FACS buffer (BD Biosciences), marked with anti-CD4 (GK1.5, 1:100), anti-CD25 (3C7, 1:100) and anti-CD69 (H1.2F3, 1:100) antibodies (Biolegend), and analyzed on Attune NxT flow cytometer (Thermo Fisher) using FlowJo software.

## Confocal microscopy

Peritoneal macrophages ( $2 \times 10^6$  cells/ml) were cultured on to a sterile slide cover treated with poly-L-lysine (Neu-vitro) in 24-well plates (Costar) either without or stimulated with SGSTF (10  $\mu$ g/ml) for 15, 30, and 60 min. Then, cells were washed, fixed in 4% paraformaldehyde and treated with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min and non-specific background staining was blocked with 5% BSA (Sigma-Aldrich) diluted in 0.1 M PBS (pH 7.2). Subsequent incubation with primary antibodies against SGSTF (1:200) and IA-IE (1:100, MHC-II) (Biolegend) were performed at 4°C overnight. Secondary antibodies coupled with FITC (1:100) and Texas Red (1:100) were used respectively (Santa Cruz Biotechnology). Slides were mounted on to UltraCruz Hard-set mounting with DAPI medium (Santa Cruz Biotechnology) until observation. The samples were observed under an LMS 800 Zeiss microscope at 63 $\times$  and analyzed using ZEN Zeiss and ImageJ software.

For experiments on no-SGSTF internalization, cytochalasin D treatment of macrophages was carried out as described earlier [31]. Briefly, macrophages were incubated with cytochalasin D (10  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. Cytochalasin D was removed by two washes with PBS, then was incubated with SGSTF for 30 min and following the treatment described above. Macrophages without cytochalasin were used as control. The orthogonal images were taken in projections of 17-18 sequential sections, were scanned five to seven times each, with a thickness of 10.5  $\mu$ m and captured with the objective 63 $\times$  with immersion oil and a zoom of 1.5 in a Leica DMI8 SP8 microscope and processed with their software.

## Cytokine assays

Concentrations of IL-10, IL-12, IL-4, IFN- $\gamma$  and TNF were measured in the collected supernatants from all cultures using the ELISA Development kit (PeproTech) in 96-well plates (NuncMaxiSorp) following the protocol described by the manufacturer.

## GSTs primary sequence analyses

An alignment of the primary sequences of the three peptides, P1, P5 and P6 from *S. japonicum* 28GST was performed using the Clustal W program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) with those of the *T. solium* 25GST and 26GST.

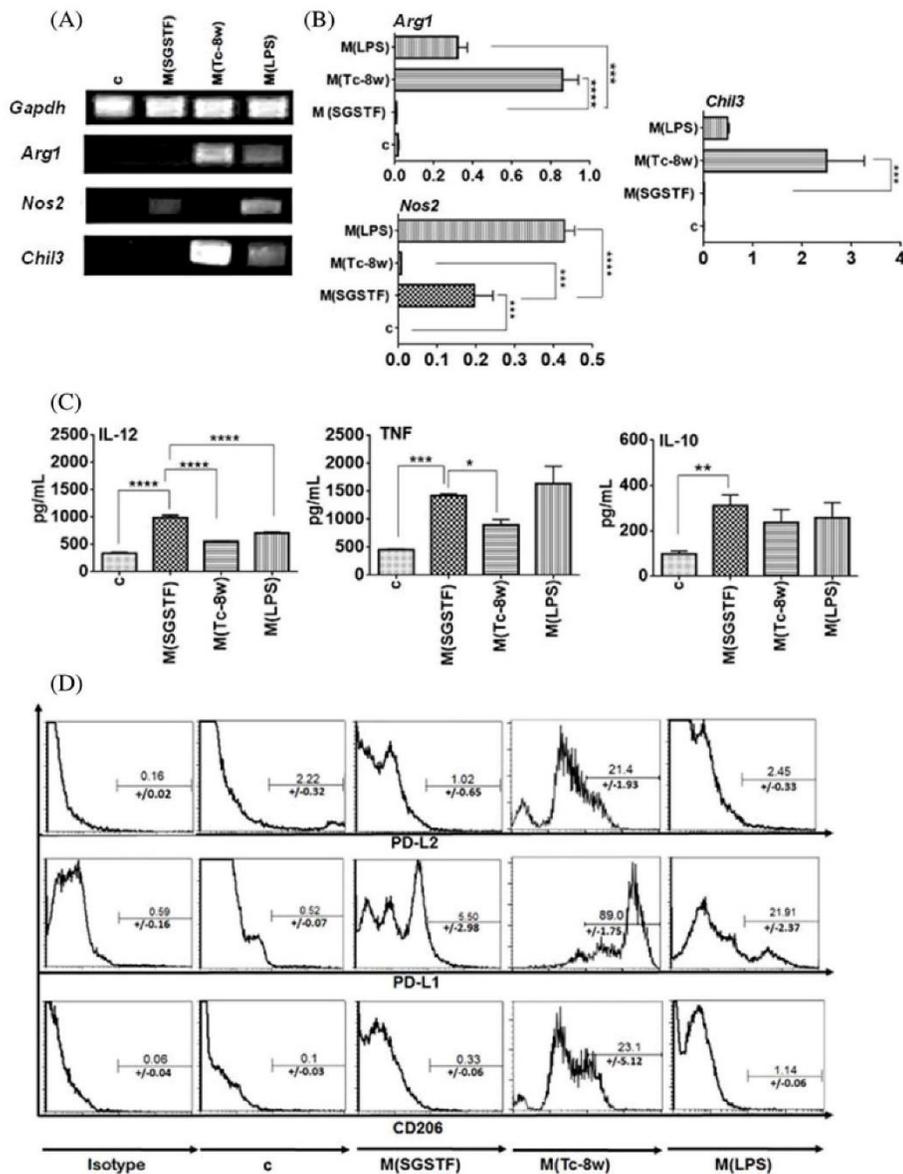
## Statistical analysis

One-way ANOVA with Bonferroni's test were used for the statistical analyses of collected data and *P*-values <0.05 were considered significant.

## Results

### Macrophages exposed to SGSTF express M1 activation markers

In order to determine whether SGSTF may directly activate peritoneal macrophages, we exposed them to SGSTF for 24 h and compared the expression of several markers to those obtained from the non-stimulated control (c), M(LPS), and M(Tc-8w) macrophages. Figure 1A,B shows the results of the RT-PCR assay carried out to measure the expression levels of the classical and alternative activation gene markers. M(SGSTF) macrophages expressed *Nos2*, but did not express *Arg1* and *Chil3*. In contrast, the M(Tc-8w) macrophages expressed high levels of *Arg1* and *Chil3*, but



**Figure 1.** Effect on the expression of classically and alternative activation markers on peritoneal macrophages by the *in vitro* stimulation for 24 h with SGSTF

(A) Determination of transcript levels of *Gapdh*, *Arg1*, *Nos2*, and *Chil3* by RT-PCR. (B) Relative transcription in arbitrary units. (C) Determination of cytokines (TNF, IL-12, IL-10) in the culture supernatants from all groups of macrophages by ELISA. (D) Flow cytometry to determine PD-L2, PD-L1, and CD206 on macrophage membranes. In (C) control macrophages of non-stimulation, in SGSTF macrophages stimulated with SGSTF (10 µg/ml) and in M(LPS) and M(Tc-8wk) macrophages controls of classically or alternative activation respectively. The data shown are representative of three independent experiments ( $n=3$ ) and are expressed as mean  $\pm$  S D. One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test were used for statistical analyses ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.005$ ,  $***P<0.0005$ ,  $****P<0.0001$ ).

did not express *Nos2*. In addition M(LPS) macrophages highly expressed *Nos2* and showed moderate expression of *Arg1* and *Chil3*. The non-stimulated macrophages (c) did not express any of the genes tested. *Gapdh* gene was used as a housekeeping gene and it presented a constant rate of expression in all macrophages groups. Moreover, supernatants from the same cultures were tested for cytokine production. Figure 1C shows the determination of the proinflammatory cytokines secreted by macrophages in culture by ELISA. Macrophages exposed to SGSTF displayed significantly higher production of IL-12 compared with the non-stimulated (c), to M(Tc-8w) and to M(LPS) macrophages, while TNF production was higher in M(SGSTF) and M(LPS) macrophages than non-stimulated (c) and M(Tc-8w) macrophages. Interestingly, secretion of IL-10 increased significantly in M(SGSTF) macrophages with respect to non-stimulated macrophages (c) and there were no differences with respect to M(LPS) and M(Tc-8w). In addition, flow cytometry assays showed that SGSTF-exposed macrophages expressed low levels of PD-L1 that was not statistically significant and did not express PD-L2 or CD206 in a manner similar to M(LPS) macrophages (Figure 1D). As expected, M(Tc-8w) macrophages displayed a typically high expression of PD-L1, PD-L2, and CD206 [32] and non-stimulated macrophages (c) did not express any of these markers.

### Expression of co-stimulatory molecules and MHC-II on peritoneal macrophages exposed to SGSTF for 24 h

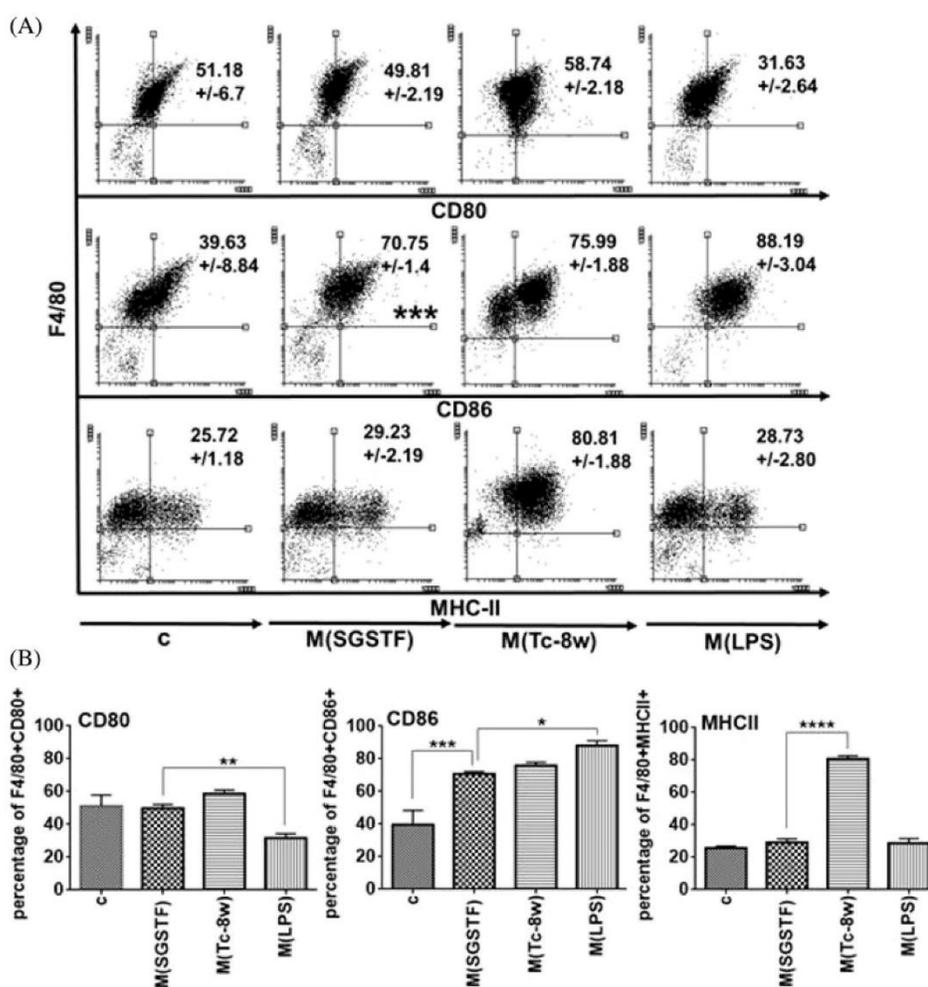
Flow cytometry assays were performed using specific antibodies against CD80, CD86, and MHC-II molecules to determine their expression in the macrophages after stimulation for 24 h (Figure 2A,B). CD80 was highly expressed in the M(Tc-8w) macrophages followed by the SGSTF-stimulated macrophages and non-stimulated macrophages (c); but they did not show significant differences. However, expression of CD80 in M(SGSTF) macrophages was significantly higher than in M(LPS) macrophages, but M(SGSTF) macrophages did not show differences with respect to the non-stimulated macrophages. Furthermore, CD86 expression was significantly higher in M(SGSTF) macrophages with respect to non-stimulated macrophages (c) and it was comparable with respect to M(Tc-8w), but it was less than M(LPS) macrophages. In addition, MHC-II in M(SGSTF) macrophages showed no differences in expression with respect to non-stimulated (c) and M(LPS) macrophages. In contrast, M(Tc-8w) macrophages showed higher MHC-II expression with respect to others.

### Uptake of SGSTF by macrophages

In order to determine whether SGSTF was being internalized by macrophages we performed a confocal microscopy assay (Figure 3), where macrophages were exposed to SGSTF for 15, 30, and 60 min. At 15 min, a strong green signal (SGSTF) was found dispersed in the cytoplasm and MHC-II was detected as a weak red signal in some cells; the merged image at this time point displayed only SGSTF in the cytoplasm. After 30 min, most of the SGSTF was concentrated in granules, although some was still dispersed in the cytoplasm. However, it is noteworthy to mention that at this time point, MHC-II (red signal) started to appear in cytoplasm; the merged image at this time point displayed a poor co-localization between SGSTF and MHC-II. At 60 min, a major part of the SGSTF appeared concentrated closely to the membrane in most macrophages, and MHC-II increased in intensity and showed the same pattern as SGSTF. The merge image at this time point showed a crescent-shaped co-localization between SGSTF and MHC-II (yellow signal) in most of the macrophages. However, some cells only showed green (SGSTF) or red (MHC-II) signals without any co-localization. This could be explained by the lack of synchronization amongst macrophages in culture. Normal IgG (N-IgG) was used as a control; it showed non-unspecific recognition of the primary and secondary antibodies and no signal was observed. Orthogonal images of experiments performed incubating macrophages without and with cytochalasin D and after incubating for 30 min with SGSTF (Figure 3B). Macrophages without cytochalasin D showed similar internalization of SGSTF as observed at the same time in Figure 3A (SGSTF 30 min) with green signal on to cytoplasm and a weak red signal to MHC-II. In contrast, cytochalasin D treated macrophages decrease the internalization of SGSTF. Noteworthy, we also observed the delay in the appearance of the MHC-II molecule in macrophages treated with cytochalasin D. Orthogonal analysis of these experiments shown that the SGSTF is inside macrophages.

### Macrophages exposed to SGSTF favor IFN- $\gamma$ production in T CD4<sup>+</sup> cells

Then, we analyzed the ability of the SGSTF-stimulated macrophages to modulate T CD4<sup>+</sup> cell responses. Thus, we performed different assays with anti-CD3 pre-activated CD4<sup>+</sup> cells that were co-cultured for 72 h with macrophages exposed to different stimuli. Figure 4A shows the macrophages influence on T CD4<sup>+</sup> cell proliferation; the CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with SGSTF-exposed macrophages displayed a significantly higher proliferation compared with co-cultures with non-stimulated (c) and M(LPS) macrophages. As expected by previous reports, the CD4<sup>+</sup> cells

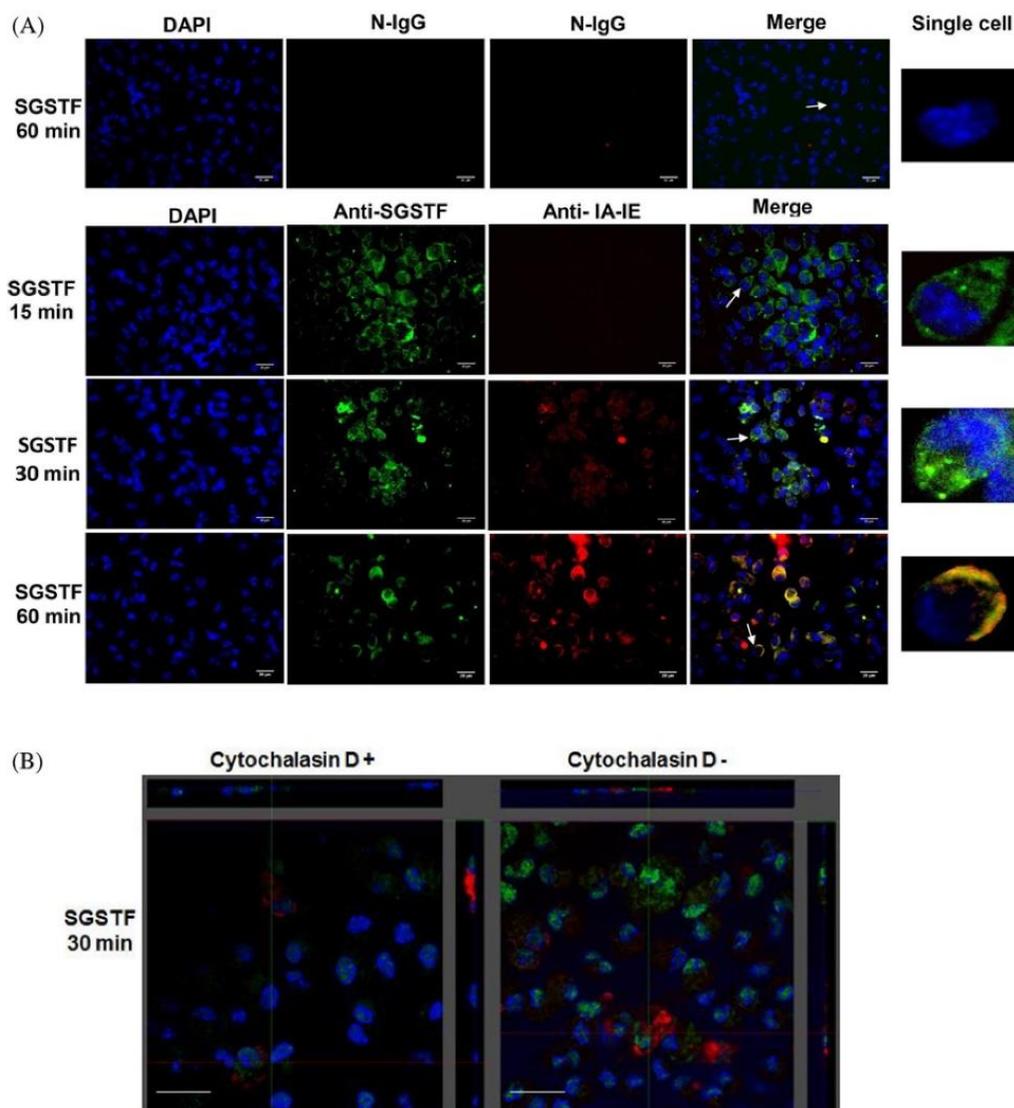


**Figure 2. Flow cytometry assays to detect expression of CD80, CD86, and MHC-II surface molecules in peritoneal non-stimulated and SGSTF-stimulated macrophages**

(A) Dot-plots show the expression of CD86 in non-stimulated control macrophages (c) and in SGSTF-stimulated macrophages. M(Tc-8w) and M(LPS) peritoneal macrophages were used as controls for alternative or classical activation. (B) Bar graphs show the percentage of double positive cells for CD80, CD86, or MHC-II accordingly. Data shown are representative of three independent experiments and are expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ). One-way ANOVA with Bonferroni's post hoc test were used for statistical analyses ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.005$ ,  $***P<0.0005$ ,  $****P<0.0001$ ).

co-cultured with M(Tc-8w) macrophages displayed a markedly inhibited cell proliferation, and the T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured without anti-CD3 antibodies showed no proliferation (basal). In addition, T CD4<sup>+</sup> cells from parallel co-cultures were analyzed by flow cytometry to detect the expression of CD69 and CD25 molecules, which are associated with cell activation, SGSTF-exposed macrophages showed a pronounced augmented expression of CD69 and CD25 on CD4 cells (Figure 4B,C) compared with T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with non-stimulated (c) or M(LPS) macrophages and no significant differences with respect to M(Tc-8w) macrophages were found. Finally, a basal expression of CD69 and CD25 was observed in co-cultures with T CD4<sup>+</sup> cells not treated with anti-CD3 and with non-stimulated macrophages (basal).

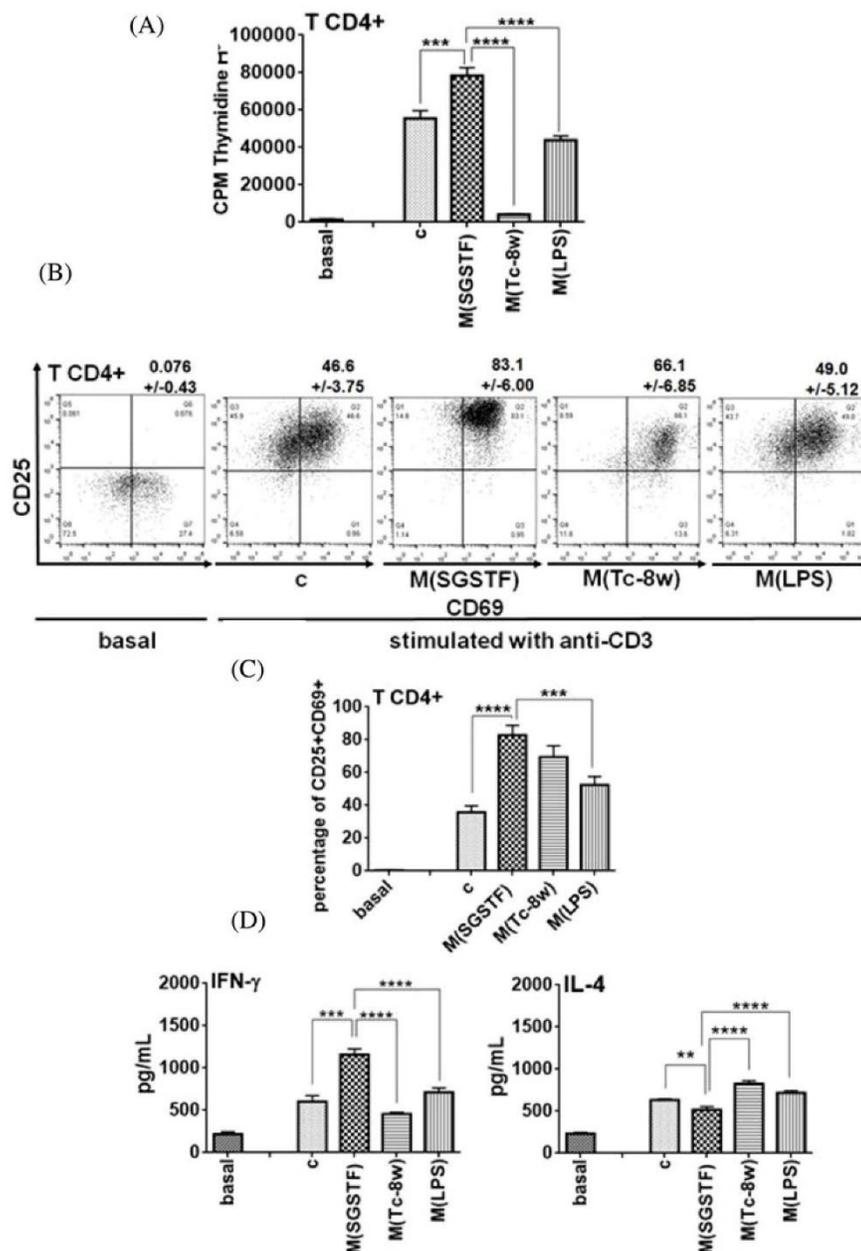
Supernatants from these co-cultures were analyzed by ELISA for IFN- $\gamma$  and IL-4 production (Figure 4D). Co-cultured T CD4<sup>+</sup> cells with SGSTF-exposed macrophages displayed a significant increase in IFN- $\gamma$  production with respect to those co-cultured with non-stimulated macrophages (c) and this increment was also significant with



**Figure 3. Uptake of SGSTF by peritoneal macrophages as observed by confocal microscopy**

(A) Macrophages stimulated with SGSTF (SGSTF) for 15, 30, and 60 min were initially incubated with N-IgG or antibodies against SGSTF (anti-SGSTF) and against IA-IE (Anti-IA-IE). Secondary antibodies conjugated to FITC (green) and Texas Red (red) respectively, were used to identify SGSTF and MHC-II. Nuclei from macrophages were stained with DAPI. We depict the merged images and digital amplifications of a single cell (white arrow) to observe the three channels in detail. Scale bars in figures represent 20  $\mu\text{m}$ . (B) Orthogonal images (single Z-plane) from macrophages incubated without (-) and with (+) cytochalasin D and stimulated with SGSTF for 30 min, and following the treatment mentioned above.

respect to M(LPS) and M(Tc-8w) macrophages. Interestingly, IL-4 secretion by T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with the SGSTF-exposed macrophages was significantly lower compared with T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with M(Tc-8w) and with M(LPS) macrophages and with non-stimulated macrophages (c). All the co-cultures with anti-CD3 pre-activated T CD4<sup>+</sup> cells and different groups of macrophages showed IL-12 concentrations lesser than 300 pg/ml (data not shown). Co-cultures with non-stimulated macrophages and no pre-CD3 activation showed the lowest concentration of all measured cytokines (basal).



**Figure 4. Response of naive T CD4<sup>+</sup> cells pre-treated with anti-CD3 antibody co-cultured with (c) non-stimulated, M(SGSTF), M(Tc-8w), and M(LPS) macrophages during 72 h**

(A) Proliferation, (B,C) Expression of CD69 and CD25 in T CD4<sup>+</sup> cells. (D) Cytokines secreted (IFN-γ and IL-4) by co-cultures. T CD4<sup>+</sup> cells not treated with anti-CD3 and co-cultured with non-stimulated macrophages were used as basal control (basal). Data shown are representative of three independent experiments and are expressed as mean ± S.D. (*n*=3). One-way ANOVA with a Bonferroni's test were used for statistical analyses (\*\**P*<0.005, \*\*\**P*<0.0005, \*\*\*\**P*<0.0001).

In order to demonstrate that the effect of SGSTF on macrophages may also be an antigen-specific response, we performed similar experiments as described above, but using purified DO11.10 T CD4<sup>+</sup> cells, which express a TCR specific for OVA peptide 323-339. Co-cultures with SGSTF-stimulated macrophages showed a remarkable and significantly higher proliferation rate of DO11.10 T CD4<sup>+</sup> cells when OVA peptide was added to the co-cultures (OVA+M(SGSTF)) compared with non-stimulated macrophages plus OVA peptide (OVA) and to M(LPS) macrophages plus OVA peptide. In contrast, T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with M(Tc-8w) macrophages displayed a limited proliferation. No proliferation was observed in co-cultures with non-stimulated (basal) and M(SGSTF) macrophages without OVA peptide (Figure 5A).

In addition, Figure 5B,C show the expression of CD69 and CD25 detected in the co-cultured DO11.10 T CD4<sup>+</sup> cells. Co-cultures with SGSTF-stimulated macrophages plus OVA peptide (OVA+M(SGSTF)) showed no significant differences in CD69 and CD25 expression with respect to co-cultures with non-stimulated macrophages plus OVA peptide (OVA), but it was significant with respect to the co-cultures with M(LPS) macrophages plus OVA (OVA+M(LPS)). In contrast, T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with M(Tc-8w) macrophages plus OVA peptide showed a decrease in the expression of these molecules with respect to SGSTF-stimulated macrophages plus OVA peptide (OVA+M(SGSTF)). Interestingly, T CD4<sup>+</sup> cells cultured with SGSTF-stimulated macrophages without OVA exhibited a higher expression of these molecules than co-cultures without stimulus (basal) and with respect to M(Tc-8w) macrophage plus OVA peptide. Furthermore, supernatants from all these co-cultures were analyzed for the production of IFN- $\gamma$  and IL-4. As observed in Figure 5D, T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with SGSTF-exposed macrophages plus OVA peptide showed high production of IFN- $\gamma$  (OVA+SGSTF) which was higher than the co-cultures with M(LPS) macrophages, however, this level was not statistically different with respect to co-cultured T CD4<sup>+</sup> cells only stimulated with OVA. In contrast, T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with M(Tc-8w) macrophages plus OVA showed no secretion of IFN- $\gamma$  comparable with T CD4<sup>+</sup> cells co-cultured with non-stimulated macrophages and without OVA (basal). Interestingly, co-cultures SGSTF-stimulated macrophages without OVA showed a IFN- $\gamma$  secretion (M(SGSTF)) that was significant with respect to basal. In contrast, IL-4 secretion by T CD4<sup>+</sup> cells were less than 300 pg/ml in all co-cultures and only significant differences were found amongst OVA+M(Tc-8wk) and M(SGSTF)+OVA co-cultures.

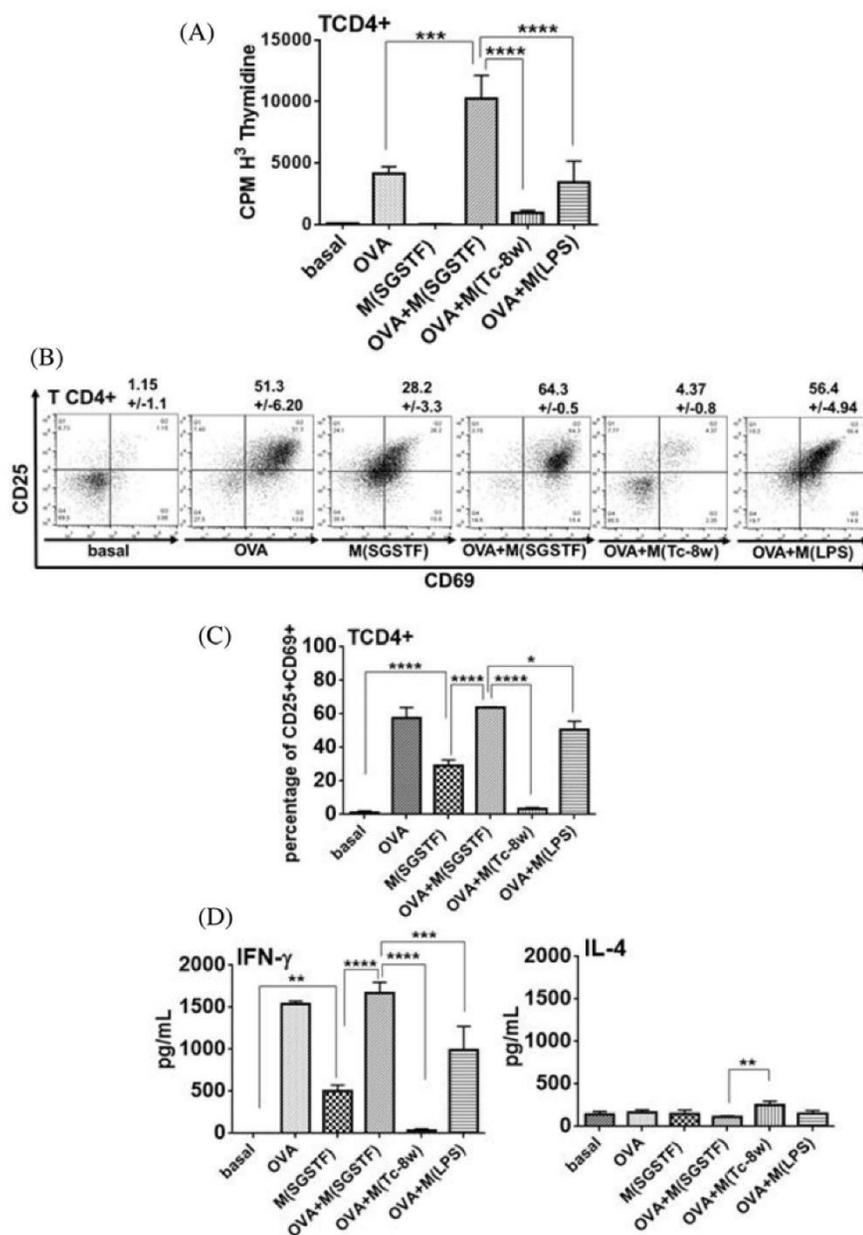
### Search for Th1 epitopes' localization in *Taenia solium* GST

To ascertain whether the peptides P1, P5, and P6 (Th1 epitopes) from *S. japonicum* 28GST were also localized on the *T. solium* 25GST and 26GST [33], their primary sequences were aligned to find similarities (Figure 6). Our analysis of the alignment indicated that the three peptides (P1, P5, and P6) of *S. japonicum* 28GST share a homology in the range of 64.31, 71.42, and 77.77% with the *T. solium* 25GST and 26GST. Interestingly, these peptides are localized either inside or around of the conserved motif (SNAIL/TRAIL) presented in all GSTs [34].

### Discussion

The innate immune system is the first line of defense against various pathogens and is mediated by cells such as macrophages and dendritic cells, which possess different classes of pattern recognition receptors (PRRs, such as Toll-like receptors) to recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In murine (BALB/c) cysticercosis caused by *T. crassiceps*, macrophages and T CD4<sup>+</sup> cells are the major players that modulate the Th1/Th2 balance and the parasite growth [35,36]. It is known that the depletion of alternatively activated macrophages during early infection in this model decreases parasitic burden and restores the antigen-specific proliferative response in T lymphocytes from late infections [6,32]. In contrast, using a C57BL/6-resistant mouse strain, which maintains the presence of classically activated macrophages and also a pro-inflammatory profile throughout the infection, restricts the growth of this parasite [37]. These reports suggest that macrophages are important to develop Th1-responses to protect mice from cysticercosis.

Previously, we have demonstrated that immunization with 5–10  $\mu$ g of SGSTF induces a reduction in up to 90% in parasite burden in experimental cysticercosis [26]. However, immunological mechanism associated with SGSTF protection was undefined. To test if SGSTF and macrophages may interact to modulate Th1/Th2 immune responses *in vitro*, we exposed macrophages to SGSTF for 24 h. These macrophages expressed the *Nos2* and favored TNF and IL-12 production but did not express alternatively activated macrophages' markers such as the *Arg1* and *Chil3*, PD-L2, CD206, or IL-4R $\alpha$ , suggesting that stimulation with SGSTF induces macrophages toward a pro-inflammatory profile. These results are in agreement with observations that macrophages activated by LPS, IFN- $\gamma$ , TNE, or macrophages from early stages of infection in the murine model of *T. crassiceps* cysticercosis highly express the same pro-inflammatory cytokines but not alternative activation markers and because of that are considered classically activated macrophages [36,38,39]. However, secretion of IL-10 was also detected in SGSTF-stimulated



**Figure 5. Response of transgenic T CD4<sup>+</sup> cells (DO11.10) in 72 h co-cultured with macrophages: non-stimulated without OVA peptide (basal) and non-stimulated with OVA (OVA, 10 μg/ml)**

M(SGSTF) macrophages and M(SGSTF) macrophages with OVA peptide (OVA+M(SGSTF)); M(Tc-8w) macrophages plus OVA (OVA+M(Tc-8w)) and M(LPS) macrophages plus OVA (OVA+M(LPS)). (A) Proliferation; (B,C) expression of CD69 and CD25 in T CD4<sup>+</sup> cells. (D) Cytokines secreted (IFN-γ, and IL-4) in co-culture supernatants were detected by ELISA. Data shown are representative of three independent experiments and are expressed as mean ± S.D. (n=3). One-way ANOVA with Bonferroni were used for statistical analyses (\*P<0.05, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.0005, \*\*\*\*P<0.0001).



**Figure 6.** Alignment of the primary sequences of the peptides (P1, P5, and P6) of *S. japonicum* 28 kDa GST (Sj28GST; P26624) with SGSTFs of 25 kDa (Ts25GST; AAM64054) and 26 kDa (Ts26GST; AAX19694)

Homology is shown in white lettering with a black background. In a closed box are shown the amino acids that form the consensus SNAIL/TRAIL motif.

macrophages and it is known that alternatively activated macrophages are sources of IL-10, a cytokine that promotes homeostasis, suppresses the pro-inflammatory response, limits the damage, and is involved in tissue remodeling and the clearance of apoptotic cells [40,41]. The presence of IL-10 in SGSTF-stimulated macrophages could be indicating that they are responding to SGSTF in a mixed way. Nevertheless SGSTF-stimulated macrophages secreted greatest concentrations of IL-12 than IL-10 and the ratio of IL-12/IL-10 that has been used to determine the classical or alternative activation in macrophages [42,43] indicates that dominance of IL-12 over IL-10 in M(SGSTF) macrophages favors the pro-inflammatory phenotype, thus SGSTF induces in this way an M1-like phenotype. In addition the evidence of a recent report that demonstrated that M(Tc-8w) macrophages which arises from the late stages of infection in the cysticercosis model by *T. crassiceps* are mostly PD-L2<sup>+</sup> and do not express IL-10 [44] showed that in this infection, presence of IL-10 is not an alternative activation determinant, but membrane markers as PD-Ls and the diminished expression of pro-inflammatory cytokines markers are more relevant [37]. Furthermore, SGSTF-stimulated macrophages showed a high and sustained expression of CD86, co-stimulatory signals through B7 molecules are crucial for the activation of APCs and the proliferation and cytokine production of T cell; the absence of this signal induces clonal anergy when TCR stimulation is present [45,46]. It is known that CD86 and CD80 are ligands for CD28 and are related to the development of Th1 or Th2 responses when APCs prime naïve T cells and have different roles in various diseases [47,48]. In addition, the decreased levels of CD80 and CD86 in *T. crassiceps*-susceptible mice [37], and the increment in CD86 levels in SGSTF-stimulated macrophages together suggest the importance of CD86 in the development of Th1 response. Additionally, macrophages that uptake SGSTF in culture, show a co-localization between MHC-II and SGSTF after 60 min; which suggests that an early expression of the MHC-II molecule is involved in antigenic presentation to T cells. All these findings indicate that macrophages respond to SGSTF as an inflammatory stimulus and express molecules that are considered markers for classically activated macrophages such as Nos2, IL-12, and TNF and similarly the molecules involved in the antigen presentation to T CD4<sup>+</sup> cells, such as CD86, MHC-II, and MHC-II+SGSTF complex.

Having demonstrated that SGSTF exposure drives peritoneal macrophages toward an M1-like phenotype, our next step was to analyze if such activation may impact the differentiation of naïve T cells toward the Th1 phenotype and the expansion and survival of activated T cells [49,50]. Co-cultures with SGSTF-stimulated macrophages promoted augmented proliferation of T CD4<sup>+</sup> cells and augmented expression of CD25 and CD69 molecules. It is known that CD25 and CD69 on the surface of activated lymphocytes in humans and mice are crucial for the amplification of IL-2 signaling, for the secretion of TNF and to elicit Th1 and Th17 responses [51,52]. Co-cultures with SGSTF-stimulated macrophages also showed an increase in the production of IFN- $\gamma$  and a decrease in IL-4 secretion with respect to co-cultures with M(Tc-8w) macrophages that suppressed the proliferation of T CD4<sup>+</sup>, even when expression of CD25 and CD69 is present. It has been observed that administration of rIFN- $\gamma$  in mice has a protective role in murine cysticercosis model, on the contrary, anergy of Th1 cells and dominance of Th2-type response are permissive for this parasite [53]. According to these previous data, the reported protective effect of SGSTF on experimental cysticercosis [25,26] may be due to activating directly innate cells such as macrophages where an M1-like phenotype is induced that in turn favors Th-1 polarization that is protective in this experimental infection. In contrast, if macrophages are eliminated at an early stage of infection, a permissive Th2-type response is established with a high production of IL-4 and a low production of IFN- $\gamma$ , which favors the parasite growth [32,53]. The high production of IFN- $\gamma$  together with the expression of CD25 and CD69 by T CD4<sup>+</sup> cells and higher rates of proliferation induced by the SGSTF-stimulated

macrophages, support the idea that pro-inflammatory activation of macrophages by SGSTF is driving T CD4<sup>+</sup> cells toward a Th1 phenotype. In addition, the production of IL-12 by the SGSTF-stimulated macrophages, is in agreement with studies showing that IL-12 is an inducer of IFN- $\gamma$  secretion, and necessary to develop a Th1 response against helminths, including *T. crassiceps* [54,55].

On the other hand, in a similar assay using T CD4<sup>+</sup> cells from DO11.10 mice and OVA+SGSTF peptide as stimuli, we detected enhanced cell proliferation and OVA-specific IFN- $\gamma$  secretion, but no significant differences in the expression of CD25 and CD69 markers, which suggests that SGSTF favor the pro-inflammatory response to an unrelated antigen such as OVA. This is important because previous studies have demonstrated that *T. crassiceps* antigens induce secretion of IL-4 and IL-10 and inhibited the proliferation and IFN- $\gamma$  response against OVA in DO11.1 T CD4<sup>+</sup> cells [5,8,9] likewise similar effects were also demonstrated in other helminth antigens [56,57]. Furthermore, SGSTF stimulus in co-cultures showed IFN- $\gamma$  secretion and activation markers in OVA-specific T CD4 cells, this result supports the idea that SGSTF is acting as an adjuvant that drives macrophages to prime T CD4<sup>+</sup> cells to a pro-inflammatory profile.

Recently, vaccination assays have demonstrated that nine Th1-type peptides of *S. japonicum* 28GST promote T-cell proliferation and a Th1 response *in vitro*. Peptide 6 strongly promotes a Th1 response with a high production of IFN- $\gamma$  and IL-2, and has been proposed as an antigen that can be targeted to develop a vaccine against *S. japonicum* infection [33]. It is of note that these peptides (P1, P5, and P6) promote strong Th1 responses against *S. japonicum*, are also presented in the *T. solium* 25GST and 26GST, and are localized in the consensus conserved motif (SNAIL/TRIAL) that distinguishes GST parasites from mammals [34]. In addition, these findings suggest that SGSTF together with other GSTs could be used to develop a polyvalent vaccine against helminths or to develop a *Taenia* vaccine alone or together with other molecules such as p66, F2 metacestode factor, GK1 and GK2 peptides [11–13]. However, the mechanisms that induce T CD4<sup>+</sup> cells toward Th1 or Th2 responses have not been solved yet in cysticercosis, but discovery of new factors such as natural antigens and the mechanism of how antigen-producing classically activated (M1) or alternatively activated (M2) macrophages function are important to understand the polarization of immune response.

In conclusion our data provide evidence that SGSTF is able to bind and activate macrophages to an M1-like phenotype with increased expression of co-stimulatory molecules as well as soluble factors (IL-12 and TNF) that are able to promote in T CD4<sup>+</sup> murine cells a Th1-type response *in vitro*, which may be associated with the conferred protection against cysticercosis previously reported for this molecule.

## Acknowledgements

This work was done by V.T.V.-A. in partial fulfillment of the requirements for a Ph.D. degree from *Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas* (PMYDCB) of UNAM. We thank Alicia Ochoa for her technical assistance in confocal experiments.

## Author contribution

Conceived and designed the experiments: V.T.V.-A., L.I.T., L.J., and A.L. Performed the experiments: V.T.V.-A., L.J., and Y.L.-S. Analyzed the data: V.T.V.-A., L.I.T., and A.L. Contributed reagents/materials/analysis tools: A.L. and L.I.T. Wrote the paper: V.T.V.-A., L.I.T., and A.L.

## Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT contract) [grant number 176925]; the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT contract) [grant number IN219711]; and a scholarship from CONACYT [grant number 246278 (to V.T.V.-A.)].

## Competing interests

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

## Abbreviations

APC, antigen presenting cell; Arg1, arginase 1; Chil3, chitinase-like 3; CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; Gapdh, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSH, glutathione reduced; GST, GSH transferase; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL, interleukin; NCC, neurocysticercosis; Nos2, nitric oxide synthase 2 inducible; OVA, ovalbumin; PD-L, programmed

death-ligand; PEC, peritoneal exudate cell; rIFN- $\gamma$ , recombinant INF- $\gamma$ ; RT-PCR, reverse-transcription PCR; SGSTF, *Taenia solium* GST fraction; SSI, sterile isotonic saline solution; TcES, excreted/secreted products of the cysticerci of *Taenia crassiceps*; TCR, T cell receptor; TNF, tumor necrosis factor; UNAM, *Universidad Nacional Autónoma de México*.

## References

- García, H.H., Nash, T.E. and Del Brutto, O.H. (2014) Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* **13**, 1202–1215, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8)
- World Health Organization (2018) Fact sheet on taeniasis/cysticercosis (updated February 2018). *Weekly Epidemiological record* **93** (46), 630–632, <http://www.who.int/iris/handle/10665/275879>
- Bueno, E.C. (2012) Cysticercosis and the immunosuppression: what are the mechanisms involved? *Arq. Neuropsiquiatr.* **70**, 243–244, <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2012000400002>
- Verma, A. (2011) Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **200**, 255–261, <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0198-x>
- Rodríguez-Sosa, M. (2002) Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect. Immun.* **70**, 3656–3664, <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3656-3664.2002>
- Terrazas, L.I., Montero, D., Terrazas, C.A., Reyes, J.L. and Rodríguez-Sosa, M. (2005) Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1349–1358, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.003>
- Peon, A.N., Espinoza-Jimenez, A. and Terrazas, L.I. (2013) Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 13, <https://doi.org/10.1155/2013/498583>
- Terrazas, C.A., Gómez-García, L. and Terrazas, L.I. (2010) Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1051–1062, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.016>
- Gómez-García, L., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M. and Terrazas, L.I. (2006) Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacystodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol. Res.* **99**, 440–448, <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0159-2>
- Terrazas, C.A., Alcántara-Hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L.I. and Satoskar, A.R. (2013) Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB J.* **27**, 4547–4560, <https://doi.org/10.1096/fj.13-228932>
- Spolski, R.J., Thomas, P.G., See, E.J., Mooney, K.A. and Kuhn, R.E. (2002) Larval *Taenia crassiceps* secretes a protein with characteristics of murine interferon- $\gamma$ . *Parasitol. Res.* **88**, 431–438, <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0590-y>
- Garrido, E., Tato, P. and Molinari, J.L. (2001) A factor isolated from *Taenia solium* metacystodes stimulates T lymphocytes to proliferate and produce gamma interferon. *Parasitol. Res.* **87**, 956–962
- Toledo, A. (2001) Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* **69**, 1766–1773, <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1766-1773.2001>
- Board, P.G. and Menon, D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3267–3288, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Tamer, L. (2004) Glutathione-S-transferase gene polymorphisms (GSTT1, GSTM1, GSTP1) as increased risk factors for asthma. *Respirology* **9**, 493–498, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2004.00657.x>
- Mahajan, S. and Atkins, W.M. (2005) The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione S-transferases. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1221–1223, <https://doi.org/10.1007/s00018-005-4524-6>
- Cervi, L., Rossi, G. and Masih, D.T. (1999) Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **119**, 627–633, <https://doi.org/10.1017/S003118209900517X>
- Capron, A., Capron, M., Dombrowicz, D. and Riveau, G. (2001) Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **124**, 9–15, <https://doi.org/10.1159/000053656>
- Grzych, J.M. (1998) Relationship of impairment of schistosome 28-kilodalton glutathione S-transferase (GST) activity to expression of immunity to *Schistosoma mattheei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-kilodalton GST. *Infect. Immun.* **66**, 1142–1148
- Capron, A., Riveau, G., Capron, M. and Trottein, F. (2005) Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends Parasitol.* **21**, 143–149, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.01.003>
- Medhat, A. (1998) Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to *Schistosoma haematobium* adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment. *J. Infect. Dis.* **178**, 512–519, <https://doi.org/10.1086/515630>
- Riveau, G. (2012) Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1704, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001704>
- Zhu, M. (2015) Mechanism of protective immunity by vaccination with recombinant *Echinococcus granulosus* glutathione s-transferase (Chinese strain) in mice. *Exp. Ther. Med.* **10**, 1127–1132, <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2582>
- Esmaelizad, M. (2013) Induction of protective T-helper 1 immune responses against echinococcus granulosus in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 408–413, <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013003>
- Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Merchant, M.T. and Landa, A. (1999) Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* **85**, 448–453, <https://doi.org/10.2307/3285777>

- 26 Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Mendoza-Hernández, G. and Landa, A. (2002) Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* **88**, 398–404, <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0580-5>
- 27 Murray, P.J. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- 28 Nair, M.G., Cochrane, D.W. and Allen, J.E. (2003) Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol. Lett.* **85**, 173–180, [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00225-0)
- 29 Renshaw, M. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* **169**, 4697–4701, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.9.4697>
- 30 Yoshida, A. (2000) Schistosoma mansoni infection cancels the susceptibility to Plasmodium chabaudi through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int. Immunol.* **12**, 1117–1125, <https://doi.org/10.1093/intimm/12.8.1117>
- 31 Roy, S., Kumar, G.A., Jafurulla, M., Mandal, C. and Chattopadhyay, A. (2014) Integrity of the actin cytoskeleton of host macrophages is essential for Leishmania donovani infection. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 2011–2018, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2014.04.017>
- 32 Reyes, J.L. (2010) Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. *Int. J. Parasitol.* **40**, 731–742, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.014>
- 33 Li, G.F. (2005) Identification of immunodominant Th1-type T cell epitopes from Schistosoma japonicum 28 kDa glutathione-S-transferase, a vaccine candidate. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **37**, 751–758, <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00111.x>
- 34 Torres-Rivera, A. and Landa, A. (2008) Cooperative kinetics of the recombinant glutathione transferase of *Taenia solium* and characterization of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **477**, 372–378, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.07.008>
- 35 Villa, O.F. and Kuhn, R.E. (1996) Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant energy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* **112**, 561–570, <https://doi.org/10.1017/S0031182000066142>
- 36 Rodriguez-Sosa, M., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R. and Terrazas, L.I. (2002) Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J. Immunol.* **168**, 3135–3139, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3135>
- 37 Reyes, J.L., Terrazas, C.A., Vera-Arias, L. and Terrazas, L.I. (2009) Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Genet. Evol.* **9**, 1115–1127, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.011>
- 38 Bogdan, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**, 907–916, <https://doi.org/10.1038/ni1001-907>
- 39 Benoit, M., Desnues, B. and Mege, J.-L. (2008) Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* **181**, 3733–3739, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>
- 40 Xu, X. (2016) Lysosomal cholesterol accumulation in macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38-/-mice. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 1001–1013, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12788>
- 41 Xu, W. (2006) IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* **107**, 4930–4937, <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4144>
- 42 Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N. and Wei, F. (2015) Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000 Research* **4** (F1000 Faculty Rev), 1465, <https://doi.org/10.12688/f1000research.7010.1>
- 43 Mantovani, A. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686, <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- 44 Terrazas, C. (2017) Helminth-induced Ly6Chi monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Sci. Rep.* **7**, 40814, <https://doi.org/10.1038/srep40814>
- 45 Thompson, C.B. (1995) Distinct roles for the costimulatory ligands B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* **81**, 979–982, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(05\)80001-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(05)80001-7)
- 46 Van Gool, S.W. (1999) Blocking CD40 - CD154 and CD80/CD86 - CD28 interactions during primary allogeneic stimulation results in T cell anergy and high IL-10 production. *Eur. J. Immunol.* **29**, 2367–2375, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199908\)29:08%3c2367::AID-IMMU2367%3e3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08%3c2367::AID-IMMU2367%3e3.0.CO;2-3)
- 47 Rutkowski, R. (2003) CD80 and CD86 expression on LPS-stimulated monocytes and the effect of CD80 and CD86 blockade on IL-4 and IFN-gamma production in nonatopic bronchial asthma. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* **51**, 421–428
- 48 Okano, M. (2001) Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1501–1507, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.8.2011072>
- 49 Mosser, D.M. (2003) The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 209–212, <https://doi.org/10.1189/jlb.0602325>
- 50 Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N., Ma, W. and Kumar, A. (2009) The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **8**, 40–52, <https://doi.org/10.2174/187152809787582507>
- 51 Marzio, R., Mauël, J. and Betz-Corradin, S. (1999) CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**, 565–582, <https://doi.org/10.3109/08923979909007126>
- 52 de la Fuente, H. (2014) The leukocyte activation receptor CD69 controls T cell differentiation through its interaction with Galectin-1. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2479–2487, <https://doi.org/10.1128/MCB.00348-14>
- 53 Terrazas, L.I. (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* **85**, 135–141, <https://doi.org/10.1007/s004360050522>
- 54 Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146, <https://doi.org/10.1038/nri1001>
- 55 Al-Qaoud, K.M. and Abdel-Hafez, S.K. (2008) The induction of T helper type 1 response by cytokine gene transfection protects mice against secondary hydatidosis. *Parasitol. Res.* **102**, 1151–1155, <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0883-x>

- 56 Dowling, D.J. (2010) Major secretory antigens of the helminth *Fasciola hepatica* activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses. *Infect. Immun.* **78**, 793–801, <https://doi.org/10.1128/IAI.00573-09>
- 57 Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C. and Stevenson, M.M. (2007) Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur. J. Immunol.* **37**, 1887–1904, <https://doi.org/10.1002/eji.200636553>

## BIBLIOGRAFÍA

- Adalid-Peralta, L., Fleury, A., García-Ibarra, T. M., Hernández, M., Parkhouse, M., Crispín, J. C., ... Sciutto, E. (2012). Human Neurocysticercosis: In Vivo Expansion of Peripheral Regulatory T Cells and Their Recruitment in the Central Nervous System. *Journal of Parasitology*, 98(1), 142–148. <https://doi.org/10.1645/GE-2839.1>
- Aguayo, V., Valdés Fernandez, B. N., Rodríguez-Valentín, M., Ruiz-Jiménez, C., Ramos-Benítez, M. J., Méndez, L. B., y Espino, A. M. (2019). Fasciola hepatica GST downregulates NF- $\kappa$ B pathway effectors and inflammatory cytokines while promoting survival in a mouse septic shock model. *Scientific Reports*, 9(1), 2275. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37652-x>
- Arce-Sillas, A., Álvarez-Luquín, D. D., Cárdenas, G., Casanova-Hernández, D., Fragoso, G., Hernández, M., ... Adalid-Peralta, L. (2016). Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. *Clinical & Experimental Immunology*, 183(2), 271–279. <https://doi.org/10.1111/cei.12709>
- Balsera, M., y Buchanan, B. B. (2019). Evolution of the thioredoxin system as a step enabling adaptation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.003>
- Board, P. G., y Menon, D. (2013). Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(5), 3267–3288. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Boulanger, D., Warter, A., Sellin, B., Lindner, V., Pierce, R. J., Chippaux, J. P., y Capron, A. (1999). Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. *Vaccine*, 17(4), 319–326.
- Capron, A., Riveau, G., Capron, M., y Trottein, F. (2005). Schistosomes: The road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. *Trends in*

Parasitology, 21(3), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.01.003>

Castellanos-González, A., Jiménez, L., y Landa, A. (2002). Cloning, production and characterisation of a recombinant Cu/Zn superoxide dismutase from *Taenia solium*. *International Journal for Parasitology*, 32(9), 1175–1182.

Cervi, L., Rossi, G., y Masih, D. T. (1999). Potential role for excretory-secretory forms of glutathione-S-transferase (GST) in *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 119(6), 627–633. <https://doi.org/10.1017/S003118209900517X>

Chen, L., y Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*, 13(4), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>

Cook, A. D., Braine, E. L., y Hamilton, J. A. (2003). The Phenotype of Inflammatory Macrophages Is Stimulus Dependent: Implications for the Nature of the Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4816–4823. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4816>

Croker, C., Redelings, M., Reporter, R., Sorvillo, F., Mascola, L., y Wilkins, P. (2012). The Impact of Neurocysticercosis in California: A Review of Hospitalized Cases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), e1480. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001480>

Cupit, P. M., y Cunningham, C. (2015). What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike? *Future Medicinal Chemistry*, 7(6), 701–705. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.11>

de la Fuente, H., Cruz-Adalia, A., Martínez del Hoyo, G., Cibrian-Vera, D., Bonay, P., Pérez-Hernández, D., ... Sánchez-Madrid, F. (2014). The Leukocyte Activation Receptor CD69 Controls T Cell Differentiation through Its Interaction with Galectin-1. *Molecular and Cellular Biology*, 34(13), 2479–2487. <https://doi.org/10.1128/MCB.00348-14>

- Del Brutto, O. H. (2012). Neurocysticercosis among international travelers to disease-endemic areas. *Journal of Travel Medicine*, 19(2), 112–117. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2011.00592.x>
- Dixon, D. P., Davis, B. G., y Edwards, R. (2002). Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30859–30869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202919200>
- Dong, S.-C., Sha, H.-H., Xu, X.-Y., Hu, T.-M., Lou, R., Li, H., ... Feng, J. (2018). Glutathione S-transferase  $\pi$ : a potential role in antitumor therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 12, 3535–3547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S169833>
- Esmaelizad, M., Ahmadian, G., Aghaiypour, K., Shamsara, M., Paykari, H., y Tebianian, M. (2013). Induction of protective T-helper 1 immune responses against echinococcus granulosus in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 408–413. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013003>
- Fraternale, A., Paoletti, M. F., Dominici, S., Caputo, A., Castaldello, A., Millo, E., ... Magnani, M. (2010). The increase in intra-macrophage thiols induced by new pro-GSH molecules directs the Th1 skewing in ovalbumin immunized mice. *Vaccine*, 28(48), 7676–7682. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.09.033>
- Fridovich, I. (1995). Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), 97–112. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Frova, C. (2006). Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular Engineering*, 23(4), 149–169. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020>
- Fujii, J., y Ikeda, Y. (2002). Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Report*, 7(3), 123–130. <https://doi.org/10.1179/135100002125000352>

- Garcia, H. H. (2018). Neurocysticercosis. *Neurologic Clinics*, 36(4), 851–864. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.07.003>
- García, H. H., y Del Brutto, O. H. (2003). Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Tropica*, 87(1), 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00057-3](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00057-3)
- Garcia, H. H., Lescano, A. G., Gonzales, I., Bustos, J. A., Pretell, E. J., Horton, J., ... Gilman, R. H. (2016). Cysticidal Efficacy of Combined Treatment With Praziquantel and Albendazole for Parenchymal Brain Cysticercosis. *Clinical Infectious Diseases*, 62(11), 1375–1379. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw134>
- Garcia, H. H., Nash, T. E., y Del Brutto, O. H. (2014). Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology*, 13(12), 1202–1215. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8)
- Garrido, E., Tato, P., y Molinari, J. L. (2001). A factor isolated from *Taenia solium* metacestodes stimulates T lymphocytes to proliferate and produce gamma interferon. *Parasitol Res*, 87(11), 956–962. <https://doi.org/10.1007/s004360100484>
- Ghosn, E. E. B., Cassado, A. A., Govoni, G. R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D. M., ... Herzenberg, L. A. (2010). Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2568–2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>
- Gómez-García, L., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M., y Terrazas, L. I. (2006). Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology Research*, 99(4), 440–448. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0159-2>
- González R, Mendoza-Hernández, G., y Plancarte, A. (2002). Purification of *Taenia solium* cysticerci superoxide dismutase and myoglobin copurification. *Parasitology Research*, 88(10), 881–887. <https://doi.org/10.1007/s00436-002->

- Gonzales, I., Rivera, J. T., y Garcia, H. H. (2016). Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunology*, 38(3), 136–146. <https://doi.org/10.1111/pim.12307>
- Habig, W. H., y Jakoby, W. B. (1981). [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases (pp. 398–405). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
- Han, L., Shen, L., Zhu, Y., y Qiu, Y. (2017). A monoclonal antibody against CD86 and its protection in a murine lupus nephritis model of chronic graft-versus-host disease. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39(5), 285–291. <https://doi.org/10.1080/08923973.2017.1354878>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., y Jowsey, I. R. (2005). Glutathione Transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1), 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Henkle-Dührsen, K., y Kampkötter, A. (2001). Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. - PubMed - NCBI. *Mol Biochem Parasitol*, 114, 129–142.
- Hurez, V., Saporov, A., Tousson, A., Fuller, M. J., Kubo, T., Oliver, J., ... Weaver, C. T. (2003). Restricted Clonal Expression of IL-2 By Naive T Cells Reflects Differential Dynamic Interactions with Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(1), 123–132. <https://doi.org/10.1084/jem.20022230>
- Itoh, Y., y Germain, R. N. (1997). Single Cell Analysis Reveals Regulated Hierarchical T Cell Antigen Receptor Signaling Thresholds and Intraclonal Heterogeneity for Individual Cytokine Responses of CD4 + T Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 186(5), 757–766. <https://doi.org/10.1084/jem.186.5.757>

- Kolesnikova, L. I., Kurashova, N. A., Bairova, T. A., Dolgikh, M. I., Ershova, O. A., Dashiev, B. G., ... Koroleva, N. V. (2017). Role of Glutathione-S-Transferase Family Genes in Male Infertility. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(5), 643–645. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3869-9>
- Laranjo-González, M., Devleeschauwer, B., Trevisan, C., Allepuz, A., Sotiraki, S., Abraham, A., ... Dermauw, V. (2017). Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Western Europe. *Parasites & Vectors*, 10(1), 349. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2280-8>
- Larralde, C., y Aluja, A. S. De. (2007). Cisticercosis: Guía para Profesionales de la Salud Editor's Note .... *Journal of Parasitology*, 93(4), 975–976. <https://doi.org/10.1645/GE-1379.1>
- Ledesma-Soto, Y., Callejas, B. E., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., Espinoza-Jiménez, A., González, M. I., ... Terrazas, L. I. (2015). Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2015/563425>
- Leid, R. W., y Suquet, C. M. (1986). A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18(3), 301–311.
- Leijh, P. C. J., Van Zwet, T. L., Ter Kuile, M. N., y Van Furth, R. (1984). Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*, 46(2), 448–452.
- Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G., y Boyman, O. (2009). IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(4), 758–762. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.011>
- Li, Y. M., Baviello, G., Vlassara, H., y Mitsuhashi, T. (1997). Glycation products in aged thioglycollate medium enhance the elicitation of peritoneal macrophages.

*Journal of Immunological Methods*, 201(2), 183–188.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(96\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(96)00224-4)

Li, G. F., Wang, Y., Zhang, Z. S., Wang, X. J., Ji, M. J., Zhu, X., ... Wu, G. L. (2005). Identification of immunodominant Th1-type T cell epitopes from *Schistosoma japonicum* 28 kDa glutathione-S-transferase, a vaccine candidate. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 37(11), 751–758.  
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00111.x>

Liebert, M. A., Vasilevko, V., Ghochikyan, A., y Holterman, M. J. (2002). the Initiation and Maintenance of CD4<sup>+</sup> T-Cell Proliferation after Activation with Suboptimal Doses of PHA, 21(3), 137–149.

Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., ... Wei, F. (2016). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells [ version 1 ; referees : 3 approved ] Referee Status :, 4(0), 1–13.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7010.1>

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., y Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>

Marcin Sierra, M., Arroyo, M., Cadena Torres, M., Ramírez Cruz, N., García Hernández, F., Taboada, D., ... Fleury, A. (2017). Extraparenchymal neurocysticercosis: Demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), e0005646.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005646>

Marzio, R., Mauël, J., y Betz-Corradin, S. (1999). CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 21(3), 565–582. <https://doi.org/10.3109/08923979909007126>

Mills, C. D., Lenz, L. L., y Harris, R. A. (2016). A Breakthrough: Macrophage-Directed Cancer Immunotherapy. *Cancer Research*, 76(3), 513–516.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1737>

- Molina-López, J., Jiménez, L., Ochoa-Sánchez, A., y Landa, A. (2006). Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*. *The Journal of Parasitology*, 92(4), 796–802. <https://doi.org/10.1645/GE-754R.1>
- Morgenstern, R., Zhang, J., y Johansson, K. (2011). Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles. *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 300–306. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558511>
- Movahedi, F., Li, L., Gu, W., y Xu, Z. P. (2017). Nanoformulations of albendazole as effective anticancer and antiparasite agents. *Nanomedicine*, 12(20), 2555–2574. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0102>
- Nair, M. G., Cochrane, D. W., y Allen, J. E. (2003). Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunology Letters*, 85(2), 173–180. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00225-0)
- Nakajima, A. (1997). Requirement of CD28-CD86 co-stimulation in the interaction between antigen-primed T helper type 2 and B cells. *International Immunology*, 9(5), 637–644. <https://doi.org/10.1093/intimm/9.5.637>
- Nash, T. E., Bustos, J. A., y Garcia, H. H. (2017). Disease Centered Around Calcified *Taenia solium* Granuloma. *Trends in Parasitology*, 33(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.09.003>
- Newton, S., Ding, Y., Chung, C.-S., Chen, Y., Lomas-Neira, J. L., y Ayala, A. (2004). Sepsis-Induced Changes in Macrophage Co-Stimulatory Molecule Expression: CD86 as a Regulator of Anti-Inflammatory IL-10 Response. *Surgical Infections*, 5(4), 375–383. <https://doi.org/10.1089/sur.2004.5.375>
- Nolan, A., Kobayashi, H., Naveed, B., Kelly, A., Hoshino, Y., Hoshino, S., ... Gold, J. A. (2009). Differential Role for CD80 and CD86 in the Regulation of the Innate Immune Response in Murine Polymicrobial Sepsis. *PLoS ONE*, 4(8), e6600.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006600>

Núñez, G., Villalobos, N., Herrera, C. P., Navarrete-Perea, J., Méndez, A., Martínez-Maya, J. J., ... del Arenal, I. P. (2018). Anti-GK1 antibodies damage *Taenia crassiceps* cysticerci through complement activation. *Parasitology Research*, 117(8), 2543–2553. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5943-2>

Okano, M., Azuma, M., Yoshino, T., Hattori, H., Nakada, M., Satoskar, A. R., ... Nishizaki, K. (2001). Differential role of CD80 and CD86 molecules in the induction and the effector phases of allergic rhinitis in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(8 I), 1501–1507. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.164.8.2011072>

O'Neal, S. E., Moyano, L. M., Ayvar, V., Gonzalvez, G., Diaz, A., Rodriguez, S., ... Gonzalez, A. E. (2012). Geographic Correlation between Tapeworm Carriers and Heavily Infected Cysticercotic Pigs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1953. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001953>

Ong, S., Talan, D. A., Moran, G. J., Mower, W., Newdow, M., Tsang, V. C. W., y Pinner, R. W. (2002). Neurocysticercosis in Radiographically Imaged Seizure Patients in U.S. Emergency Departments<sup>1</sup>. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6), 608–613. <https://doi.org/10.3201/eid0806.010377>

Pajaud, J., Kumar, S., Rauch, C., Morel, F., y Aninat, C. (2012). Regulation of Signal Transduction by Glutathione Transferases. *International Journal of Hepatology*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/137676>

Parra-Unda, R., Vaca-Paniagua, F., Jiménez, L., y Landa, A. (2012). Cu,Zn superoxide dismutase: Cloning and analysis of the *Taenia solium* gene and *Taenia crassiceps* cDNA. *Experimental Parasitology*, 130(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.10.002>

Peón, A. N., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J. E., Bautista-Donis, M., Sciutto, E., y Terrazas, L. I. (2017). Helminth Products Potently Modulate Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Downregulating Neuroinflammation and

Promoting a Suppressive Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, 2017.  
<https://doi.org/10.1155/2017/8494572>

Remoué, F., Rogerie, F., Gallissot, M., Guyatt, H. L., Neyrinck, J., Diakkhate, M., ... Riveau, G. (2000). Sex-Dependent Neutralizing Humoral Response to *Schistosoma mansoni* 28GST Antigen in Infected Human Populations. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1855–1859.  
<https://doi.org/10.1086/315454>

Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., y Sambhara, S. (2002). Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(9), 4697–4701.

Reyes, J. L., González, M. I., Ledesma-Soto, Y., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2011). TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1323–1333.  
<https://doi.org/10.7150/ijbs.7.1323>

Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Alonso-Trujillo, J., van Rooijen, N., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2010). Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. *International Journal for Parasitology*, 40(6), 731–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.014>

Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias, L., y Terrazas, L. I. (2009). Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1115–1127. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.011>

Rhee, S. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, 39(1), 1–5.  
<https://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>

Rodriguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2002). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(7), 3135–3139.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3135>

Rodriguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E. P., Rosas, L. E., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2004). A STAT4-Dependent Th1 Response Is Required for Resistance to the Helminth Parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity*, 72(8), 4552–4560. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4552-4560.2004>

Rutkowski, R., Moniuszko, T., Stasiak-Barmuta, A., Kosztyła-Hojna, B., Alifier, M., Rutkowski, K., y Tatarczuk-Krawiel, A. (2003). CD80 and CD86 expression on LPS-stimulated monocytes and the effect of CD80 and CD86 blockade on IL-4 and IFN-gamma production in nonatopic bronchial asthma. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51(6), 421–428.

Sáenz, B., Ruíz-García, M., Jiménez, E., Hernández-Aguilar, J., Suastegui, R., Larralde, C., ... Fleury, A. (2006). Neurocysticercosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 25(9), 801–803. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000233548.81204.97>

Scheel, C. M., Khan, A., Hancock, K., Garcia, H. H., Gonzalez, A. E., Gilman, R. H., ... Cysticercosis Working Group in Peru. (2005). Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(4), 771–776.

Sciutto, E., Chavarria, A., Fragoso, G., Fleury, A., y Larralde, C. (2007). The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: Protection and injury. *Parasite Immunology*, 29(12), 621–636. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00967.x>

Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J. P., Sotelo, J., Aluja, A., ... Larralde, C. (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*, 2(15), 1875–1890.

Sciutto, E., Fragoso, G., Hernández, M., Rosas, G., Martínez, J. J., Fleury, A., ... Larralde, C. (2013). Development of the S3Pvac Vaccine Against Porcine

- Taenia solium Cysticercosis: A Historical Review. *Journal of Parasitology*, 99(4), 686–692. <https://doi.org/10.1645/GE-3102.1>
- Sexton, J. L., Milner, A. R., Panaccio, M., Waddington, J., Wijffels, G., Chandler, D., ... Mitchell, G. F. (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(11), 3905–3910.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., y Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 360(1), 1. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>
- Singhi, P., y Singhi, S. (2004). Topical Review: Neurocysticercosis in Children. *Journal of Child Neurology*, 19(7), 482–492. <https://doi.org/10.1177/08830738040190070201>
- Sistema Unico de Información. (2019). Boletín epidemiológico SINAVE semana 33. Semana 33, Vol. 36.
- Slijvancanin Jakovljevic, T., Kontic - Vucinic, O., Nikolic, N., Carkic, J., Soldatovic, I., y Milasin, J. (2019). Glutathione - S - transferase M1 polymorphism and pro - inflammatory cytokines tumour necrosis factor -  $\alpha$  and interleukin - 1  $\beta$  are associated with preeclampsia in Serbian women. *American Journal of Reproductive Immunology*, 81(5), e13105. <https://doi.org/10.1111/aji.13105>
- Spolski, R. J., Alexander-Miller, M. A., y Kuhn, R. E. (2002). Suppressed cytotoxic T lymphocyte responses in experimental cysticercosis. *Veterinary Parasitology*, 106(4), 325–330. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00105-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00105-x)
- Spolski, R. J., Thomas, P. G., See, E. J., Mooney, K. A., y Kuhn, R. E. (2002). Larval *Taenia crassiceps* secretes a protein with characteristics of murine interferon- $\gamma$ . *Parasitology Research*, 88(5), 431–438. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0590-y>

- Terrazas, C. A., Gómez-García, L., y Terrazas, L. I. (2010). Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International Journal for Parasitology*, 40(9), 1051–1062. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.02.016>
- Terrazas, C. A., Alcántara-Hernández, M., Bonifaz, L., Terrazas, L. I., y Satoskar, A. R. (2013). Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway. *FASEB Journal*, 27(11), 4547–4560. <https://doi.org/10.1096/fj.13-228932>
- Terrazas, C., de Dios Ruiz-Rosado, J., Amici, S. A., Jablonski, K. A., Martínez-Saucedo, D., Webb, L. M., ... Partida-Sánchez, S. (2017). Helminth-induced Ly6Chi monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scientific Reports*, 7, 40814. <https://doi.org/10.1038/srep40814>
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., y Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of Parasitology*, 84(1), 74–81.
- Terrazas, L. I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F., y Larralde, C. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, 85(2), 135–141.
- Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., y Rodríguez-Sosa, M. (2005). Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *International Journal for Parasitology*, 35(13), 1349–1358. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.003>

- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, F., ... Sciutto, E. (2001). Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infection and Immunity*, 69(3), 1766–1773. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1766-1773.2001>
- Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., ... Sciutto, E. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity*, 67(5), 2522–2530.
- Torres-Rivera, A., y Landa, A. (2008). Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Tropica*, 105(2), 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.005>
- Tsuyuki, S., Tsuyuki, J., Einsle, K., Kopf, M., y Coyle, A. J. (1997). Costimulation through B7-2 (CD86) Is Required for the Induction of a Lung Mucosal T Helper Cell 2 (TH2) Immune Response and Altered Airway Responsiveness. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(9), 1671–1680. <https://doi.org/10.1084/jem.185.9.1671>
- Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Mendoza-Hernández, G., y Landa, A. (2002). Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitology Research*, 88(5), 398–404. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0580-5>
- Vibanco-Pérez, N., Jiménez, L., Merchant, M. T., y Landa, A. (1999). Characterization of glutathione S-transferase of *Taenia solium*. *The Journal of Parasitology*, 85(3), 448–453.
- Villa, O. F., y Kuhn, R. E. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology*, 112 ( Pt 6(6), 561–570. <https://doi.org/10.1017/s0031182000066142>

- Wang, H., Li, J., Zhang, C., Guo, B., Wei, Q., Li, L., ... Wen, H. (2018). Echinococcus granulosus sensu stricto : silencing of thioredoxin peroxidase impairs the differentiation of protoscoleces into metacestodes. *Parasite*, 25, 57. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018055>
- White, A. C., Coyle, C. M., Rajshekhar, V., Singh, G., Hauser, W. A., Mohanty, A., ... Nash, T. E. (2018). Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis: 2017 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 66(8), 1159–1163. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy157>
- World Health Organization. (2009). *First WHO report on neglected tropical diseases*. Geneva.
- Xu, C. B., Verwaerde, C., Gras-Masse, H., Fontaine, J., Bossus, M., Trottein, F., ... Capron, A. (1993). Schistosoma mansoni 28-kDa glutathione S-transferase and immunity against parasite fecundity and egg viability. Role of the amino- and carboxyl-terminal domains. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 150(3), 940–949.
- Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A. M., Daha, M. R., y van Kooten, C. (2006). IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood*, 107(12), 4930–4937. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4144>
- Xu, X., Yuan, X., Li, N., Dewey, W. L., Li, P. L., y Zhang, F. (2016). Lysosomal cholesterol accumulation in macrophages leading to coronary atherosclerosis in CD38-/-mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(6), 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12788>
- Yoshida, A., Maruyama, H., Kumagai, T., Amano, T., Kobayashi, F., Zhang, M., ... Ohta, N. (2000). Schistosoma mansoni infection cancels the susceptibility to Plasmodium chabaudi through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *International Immunology*, 12(8), 1117–1125.

<https://doi.org/10.1093/intimm/12.8.1117>

Zhu, M., Wang, X., Wang, H., Wang, Z., Zhao, J., Wang, Y., y Zhao, W. (2015). Mechanism of protective immunity by vaccination with recombinant *Echinococcus granulosus* glutathione s-transferase (Chinese strain) in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(3), 1127–1132. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2582>

*Dedicado a las más de 3 mil víctimas de feminicidio, a los más de 40 mil desaparecidos y sus familias, en especial a las víctimas de desaparición forzada y a los 43 estudiantes desaparecidos el 26 de septiembre de 2014 que han visto truncadas sus aspiraciones de darle a sus familias una vida mejor.*