



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**ESTUDIO DE LA INMUNOMODULACIÓN EN LA COINFECCIÓN  
*Taenia crassiceps-Plasmodium yoelii* 17XL**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**VICTOR HUGO SALAZAR CASTAÑÓN**

DIRECTORA DE TESIS  
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

COMITÉ TUTOR  
DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
Facultad de Medicina

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO,  
ABRIL DE 2020



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.

**En memoria de:**

**Maria del Rosario de la Peña y salas Puento**

**Eloisa Dafne Salazar de la Peña**

**Marilu Castañón Díaz**

**Víctor Manuel Salazar de la Peña**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado.

Al CONACyT por la beca: 0443480 otorgada para mis estudios de doctorado.

Al proyecto CONACyT: A1-S-10463 por el financiamiento parcial de este proyecto.

Al Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA-UNAM (PAPIIT: 209718 y PAPIIT: 220417) por el financiamiento de este proyecto.

Un agradecimiento especial a la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, por su dedicación en mi formación profesional y por haberme guiado no solo en la ciencia sino en la vida. Le agradezco, su apoyo incondicional en los momentos difíciles, su lucha constante y confianza para hacer esto posible.

A La Dra. Martha Legorreta Herrera, por su dedicación, sus consejos y esmero al enseñarme. Agradezco mucho sus pláticas científicas y la emoción que siempre sembró en mí y me motivaron en este proyecto, mi más sincero respeto y admiración.

Al Dr. Abraham Landa Piedra, por sus invaluable observaciones, sus consejos y enseñanzas en la realización de este proyecto. Ha sido una experiencia muy valiosa para mí aprender de usted.

A la cDra. Imelda Juárez Avelar, por todo su apoyo a lo largo de mis estudios de doctorado.

A mis compañeros: Juan de Dios, Jaime, Alicia, Tonatiuh y Thalia, por los momentos compartidos en la vida y en la ciencia.

Un agradecimiento especial a mis sinodales por la atención prestada a esta tesis:

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González

Dra. Maria Magdalena Aguirre García

Dr. Armando Pérez Torres

Dr. Julio César Carrero Sánchez

Este trabajo se realizó en el laboratorio 5, “Inmunidad Innata”, de la Unidad de Biomedicina (UBIMED). Y fue parcialmente financiado por: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA), No. de proyecto 209718 y 220417, y por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), No. de proyecto A1-S-10463.

La sustentan: Víctor Hugo Salazar Castañón becario del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), No de becario 0443480.

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	vii
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT:</b> .....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1. Infecciones parasitarias .....	4
1.2. Malaria .....	4
1.3. Ciclo de vida.....	6
1.4. Cuadro clínico de la enfermedad .....	9
1.5. Distribución mundial .....	10
1.6. Modelos animales en la malaria .....	12
1.7. Respuesta inmune a malaria.....	14
1.8. <i>Plasmodium yoelii</i> ( <i>P. yoelii</i> )17XL .....	20
1.9. Helmintos .....	21
1.10. Respuesta inmune a helmintos .....	22
1.11. Efecto de los helmintos en la respuesta inmune hacia vacunas y enfermedades inflamatorias .....	23
1.12. <i>Taenia crassiceps</i> ( <i>T. crassiceps</i> ).....	24
1.13. Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i> .....	25
1.14. Respuesta inmune <i>T. crassiceps</i> .....	26
1.14. Coinfecciones.....	28
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	33
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	33
4.1. GENERAL .....	33
4.2. PARTICULARES.....	34
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b> .....	34
5.1. Animales .....	34
5.1.1. Ratones.....	34
5.1.2. Declaración de ética.....	35

5.2.	Parásitos, infección y coinfección .....	35
5.2.1.	<i>Taenia crassiceps</i> .....	35
5.2.2.	<i>Plasmodium yoelii</i> 17XL .....	36
5.3.	Severidad de la infección .....	36
5.4.	Cinética de la parasitemia .....	37
5.5.	Sobrevida y peso de los ratones infectados.....	37
5.6.	Cuantificación de la concentración de hemoglobina .....	37
5.7.	Índice esplenico .....	38
5.8.	Obtención de antígeno soluble de <i>P. yoelii</i> 17XL ( <i>PyAg</i> ).....	38
5.9.	Obtención de antígeno total de <i>T. crassiceps</i> ( <i>TcAg</i> ).....	39
5.10.	Cuantificación de proteínas totales de antígeno de <i>PyAg</i> y <i>TcAg</i> .....	39
5.11.	Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal .....	42
5.12.	Proliferación celular.....	42
5.13.	Obtención de esplenocitos .....	44
5.14.	Obtención del suero .....	44
5.15.	Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sandwich).....	45
5.16.	Análisis estadístico .....	46
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
6.1.	Carga parasitaria y perfil de citocinas en suero de ratones infectados con <i>T. crassiceps</i> .....	48
6.2.	Parasitemia <i>P. yoelii</i> 17XL .....	49
6.2.1.	Sobrevida .....	49
6.3.	Determinación de la pérdida y/o ganancia de peso .....	51
6.3.1.	Determinación de la concentración de hemoglobina.....	51
6.4.	Determinación del índice esplenico .....	54
6.5.	Determinación de citocinas en sobrenadantes de macrófagos peritoneales de ratones infectados y coinfectados con <i>T. crassiceps</i> y <i>P. yoelii</i> 17XL .....	56
6.6.	Proliferación celular.....	59
6.6.1.	Determinación de citocinas en sobrenadante de esplenocitos de ratones infectados y coinfectados .....	59
6.7.	Producción de citocinas en suero .....	62

<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	64
<b>8. RESUMEN DE RESULTADOS</b> .....	76
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	77
<b>10. ANEXO 1. Resultados no publicados</b> .....	79
10.1. Concentración de citocinas en sobrenadante de los macrófagos estimulados con el <i>PyTcAg</i> .....	79
10.2. Respuesta linfoproliferativa a Con-A .....	80
10.2.1. Concentración de citocinas en sobrenadante de esplenocitos en respuesta a Con-A .....	80
10.3. Concentración de MIF en suero durante la infección y coinfección con <i>P. yoelii</i> 17XL.....	83
10.4. Parasitemia y sobrevida de los ratones MIFKO infectados con <i>Py</i> 17XL	84
10.5. Patología los ratones MIFKO infectados con <i>Py</i> 17XL.....	86
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	89
<b>12. ANEXO 2.</b> .....	90
<b>13. ANEXO 3.</b> .....	90
<b>14. APÉNDICES</b> .....	91
14.1. Apéndice 1 .....	91
14.2. Apéndice 2 .....	111
<b>15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	130

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tablas</b>	<b>Pág.</b>
1. Taxonomía del parásito <i>Plasmodium sp</i>	5
2. Especies de <i>Plasmodium</i> que causan la malaria humana	6
3. Especies de <i>Plasmodium</i> que causan la malaria en ratones	13
4. Infecciones mas comunes de helmintos en humanos	22
5. Parasitemia y concentración de citocinas en suero de ratones infectados con <i>T. crassiceps</i>	49
<b>Figuras</b>	
1. Ciclo biológico de la malaria.	8
2. Síntomas de la malaria.	10
3. Porcentaje de población mundial en riesgo de infección con malaria.	11
4. Áreas con trasmisión de malaria en México.	12
5. Diagrama que ilustra el mecanismo de la inmunidad en ratones infectados con <i>Plasmodium spp.</i>	20
6. Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i> .	25
7. Fotografía del helminto adulto de <i>T. crassiceps</i> .	26
8. Polarización de la respuesta inmune en ratones BALB/c infectados con <i>T. crassiceps</i> .	28
9. Curva patrón de albúmina. concentración antígeno de <i>T. crassiceps</i> y <i>P. yoelii</i> 17XL.	41
10. Diseño experimental.	47
11A. Curso de la parasitemia en la infección de <i>P. yoelii</i> 17XL.	51
11B. Sobrevida.	51
12A. Porcentajes de peso.	54
12B. Concentración de hemoglobina.	54
13A. Esplenomegalia en ratones infectados y coinfectados.	56
13B. Índice esplénico.	56

14. Concentración de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 en macrófagos en respuesta a AgPy.	58
15A. Respuesta proliferativa a AgPy.	61
15B,C y D. Concentración de IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ en sobrenadante de esplenocitos en respuesta a AgPy.	61
16. Concentración de citocinas en suero.	64
17. Modelo hipotético: <i>T. crassiceps</i> modifica la respuesta inmune del hospedero a la infección por <i>P. yoelii</i> 17XL.	75
18. Concentración de IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ en los macrófagos estimulados con el PyTcAg.	80
19. Respuesta linfoproliferativa a Con-A.	81
20. Concentración de IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , e IL-17 en sobrenadante de esplenocitos en respuesta a Con-A.	82
21. Concentración de MIF en suero durante la infección y coinfección con <i>P. yoelii</i> 17XL.	84
22. Parastemia y sobrevida de los ratones MIFKO infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.	86
23. Patología de los ratones MIFKO infectados con <i>P. yoelii</i> 17XL.	88

## ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
AAM $\Phi$	Macrófagos alternativamente activados
BSA	Suero fetal bovino
CD4 <sup>+</sup>	Linfocitos T cooperadores
CM	Malaria cerebral
CSP-2	Proteína de la superficie del esporozoíto 2
CD8	Linfocitos T citotóxicos
DC	Células dendríticas.
ELISA	Ensayo inmuno enzimático
GPI	Glicosilfosfatidinositol
Hb	Hemoglobina
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
LSA	Antígenos específicos del estadio hepático
MSP1	Proteína de la superficie del merozoíto 1
MyD88	Proteína 88 de la respuesta primaria de la diferenciación de mieloides
M $\phi$	Macrófago
ND	No detectado
NK.	Células asesinas naturales
PBS	Amortiguador de fosfatos

HMS	Síndrome de esplenomegalia hiperreactiva
SMA	Anemia severa malaria
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Th1	Linfocito TCD4 <sup>+</sup> de tipo 1 (promueve una respuesta inmune proinflamatoria)
Th2	Linfocito TCD4 <sup>+</sup> de tipo 2 (promueve una respuesta antagónica a la respuesta Th1 y producción de anticuerpos)
TLRs	Receptores tipo toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Con A	Concanavalina A
AgTc	Antígeno de <i>Taenia crassiceps</i>
AgPy	Antígeno de <i>P. yoelii</i> 17XL
AgTcPy	Antígeno de <i>T. crassiceps</i> y <i>P. yoelii</i> 17XL

## RESUMEN

Las infecciones por helmintos son prevalentes en regiones tropicales, en donde coexisten con otros agentes infecciosos asociados a la pobreza como la infección por *Plasmodium*. Si bien, las coinfecciones helminto-*Plasmodium* son muy comunes, las implicaciones de esta coexistencia en la respuesta inmune del hospedero no se han comprendido completamente. Para determinar el efecto de la infección por un helminto en la respuesta inmune contra la infección de *Plasmodium* (en diferentes tiempos de coinfección), desarrollamos un modelo murino de coinfección con el helminto *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) y *Plasmodium yoelii* 17XL (*Py* 17XL). Ratones BALB/c se infectaron vía intraperitoneal (i.p.) con 10 cisticercos de *T. crassiceps*, después de 2 u 8 semanas (*Tc2* o *Tc8*) se coinfectaron vía intravenosa (i.v.) con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados por *Py* 17XL. Los ratones infectados únicamente con *Py* 17XL desarrollaron patología severa (caquexia, esplenomegalia y anemia), y todos perecieron en el día 11 post infección con *Py* 17XL. De manera interesante, cuando los ratones presentaron una infección aguda por *T. crassiceps* y se coinfectaron con *Py* 17XL (*Tc2+Py* 17XL), la sobrevivencia se incrementó hasta el 58% en el día 11, pero desarrollaron patología severa (caquexia y esplenomegalia) y perecieron en el día 18 post infección con *Py* 17XL, la cual estuvo asociada a los niveles elevados en suero de IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  y una ligera reducción de IFN- $\gamma$  comparados con los ratones infectados solo con *Py* 17XL. Cabe destacar que, cuando los ratones presentaron una infección crónica por *T. crassiceps* y se coinfectaron con *Py* 17XL (*Tc8+Py* 17XL), la sobrevivencia se incrementó hasta el 80% en el día 11 y perecieron hasta el día 30 post infección con

*Py 17XL*. Esta mayor tasa de sobrevivencia conferida por la infección crónica con *T. crassiceps* (*Tc8*) estuvo asociada con un retraso o disminución en la patología y a un perfil inmune mixto pro inflamatorio Th1/anti inflamatorio Th2, caracterizado por un incremento en la producción de citocinas como la IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-10, y la reducción de TNF- $\alpha$  de los M $\phi$ , altos niveles de la IL-4 e IL-10 y los bajos niveles de IFN- $\gamma$  de los esplenocitos, además de los altos niveles de citocinas en suero: IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 y la significativa reducción de IFN- $\gamma$ . Nuestros datos indican que la polarización de la respuesta inmune generada y modulada por el tiempo previo de infección con *T. crassiceps*, impacta de manera diferente en la respuesta inmune del hospedero y la patología hacia *Py 17XL* y depende del tiempo previo de infección por *T. crassiceps*.

## ABSTRACT

Although helminth-*Plasmodium* coinfections are common in tropical regions, the implications of this coexistence for the host immune response are poorly understood. In order to understand the effect of helminth infection at different times coinfection on the immune response against *Plasmodium* infection, BALB/c mice were intraperitoneally infected with *Taenia crassiceps* (*Tc*). At two (*Tc*2) or eight (*Tc*8) weeks post-infection, mice were intravenously infected with  $1 \times 10^3$  *Plasmodium yoelii* (*Py*) 17XL-parasitized red blood cells. *Py* 17XL-single-infected mice developed cachexia, splenomegaly and anemia, and died at 11 days post-infection. Importantly, *Tc*2+*Py*-coinfected mice showed increased survival of 58% on day 11, but developed pathology (cachexia and splenomegaly) and succumbed on day 18 post-coinfection, this latter associated with high levels of IL-1 $\beta$ , IL-12 and TNF- $\alpha$ , and reduced IFN- $\gamma$  in serum compared with *Py* 17XL-single-infected mice. Interestingly, *Tc*8+*Py*-coinfected mice showed increased survival up to 80% on day 11 and succumbed on day 30 post-coinfection. This increased survival rate conferred by chronic helminth infection was associated with a decreased pathology and mixed inflammatory-type 1/anti-inflammatory-type 2 immune profile as evidenced by the production of high levels of IL-1 $\beta$ , IL-12 and IL-10, and reduced TNF- $\alpha$  from macrophages, high levels of IL-4 and IL-10 and low levels of IFN- $\gamma$  from spleen cells. Also high serum levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 and IL-10, but a significant reduction of IFN- $\gamma$  were observed. Together, these data indicate that polarization of the cell-mediated response modulated by a pre-existing helminth infection, differentially impacts on the host immune response to *Py* 17XL in a time-dependent manner.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Infecciones parasitarias

Las infecciones ocasionadas por parásitos son los responsables de un incremento en el índice de morbilidad y mortalidad que cualquier otro microorganismo infeccioso. Se estima que las infecciones por helmintos afectan a 2.5 mil millones de personas a nivel mundial [1, 2], mientras que, las infecciones por protozoos afectan a mil millones de personas y prevalecen en 149 países, provocando enfermedades como leishmaniosis, tripanosomiosis y malaria, entre otras [3].

El siglo XX ha sido testigo de la más grande lucha contra enfermedades infecciosas alrededor del mundo. Los esfuerzos para controlar algunas enfermedades como sarampión, la hepatitis B y la lepra han sido exitosos. Sin embargo, otras enfermedades infecciosas (las más notables, el virus de inmunodeficiencia humana adquirida -VIH-, tuberculosis -TB- y la malaria) constituyen barreras al progreso de la salud global [4].

La malaria es la parasitosis humana de mayor importancia, desde el punto de vista médico (alta morbi-mortalidad) y socio-económico (promueve la pobreza y limita el progreso ); el parásito ha resistido todos los esfuerzos para su control y representa uno de los mayores retos a la salud pública mundial [5].

## 1.2. Malaria

La malaria es una enfermedad causada por un protozoo parásito del género *Plasmodium* (cuadro 1), que infecta, se replica y destruye a los glóbulos rojos [6], el parásito se transmite por la picadura del mosquito hembra infectado del género

*Anopheles* infectado. *Plasmodium* es la principal causa de morbilidad y mortalidad en las regiones tropicales. La malaria humana se origina por la infección con una de las 5 especies del género *Plasmodium* que afectan al hombre ( *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, y *P. knowlesi* ). De estas especies *P. falciparum* y *P. vivax* son los principales causante de la malaria severa y clinica, mientras que, *P. malariae* y *P. ovale* son causantes de una malaria moderada. Cada especie de *Plasmodium* presenta diferentes características como: ciclo eritrocítico, severidad, parasitemia, etc (cuadro 2).

<b>Domino</b>	<b>Eukaryota</b>	<b>Whittaker &amp; Margulis,1978</b>
<b>Reino</b>	Protozoa	Owen
<b>Phylum</b>	Apicomplexa	Levine, 1970
<b>Clase</b>	Aconoidaidasida	Melhorne, Peters y Haeikorn,1980
<b>Orden</b>	Haesmosporidae	Danieleswski, 1985
<b>Familia</b>	Plasmodiidae	Mesnil 1903
<b>Género</b>	<i>Plasmodium</i>	Marchiata y Celli, 1885

Cuadro 1. Taxonomía del parásito *Plasmodium* tomado de Martinez *et. al.* 2007

*Plasmodium falciparum* es la especie que ocasiona la mayor mortalidad en el mundo. A pesar de que se han hecho muchos esfuerzos para controlar a éste patógeno, se estima que en el 2018 se presentaron 228 millones de casos clínicos y 405 000 muertes a escala mundial [7]. Aproximadamente, el 77% de las muertes asociadas a malaria en todo el mundo ocurren en niños menores de 5 años. En México, *P. vivax* es responsable de poco más del 99% de los casos de malaria [8].

Plasmodium	Características de la infección humana	Ciclo eritrocítico
<i>P. falciparum</i> Welch, 1897.	Causante de la malaria más severa. Genera infecciones crónicas, pero no se desarrolla la forma de hipnozoito (estadio que permanece en latencia y persiste en el hepatocito), por lo que no se presentan recaídas. Puede ser fatal.	48 h afecta todo tipo de eritrocitos
<i>P. vivax</i> Grassi & Feletti, 1890.	El principal causante de la malaria clínica. Se desarrolla la forma de hipnozoito y se pueden presentar recaídas muchos años después de una aparente cura. Rara vez es fatal.	48 h solo afecta reticulocitos
<i>P. malariae</i> Laveran, 1881.	Casos poco frecuentes, causante de la malaria clínica, especialmente en África. Las infecciones sin tratamiento pueden persistir en niveles bajos de parasitemia por varias décadas.	72 h afecta eritrocitos
<i>P. ovale</i> Stephens, 1922	Existen pocos casos y son causantes de una malaria clínica moderada. Se puede detectar en infecciones mixtas con otras especies. Se desarrollan hipnozoitos y pueden existir recaídas.	50 h solo afecta reticulocitos
<i>P. knowlesi</i> Sinton, 1932	Causa una zoonosis (se transmite entre macacos y humanos a través del vector). Los pacientes desarrollan hiperparasitemias y malaria severa. Puede ser fatales. Su ciclo es asincrónico.	24 h afecta todo tipo de eritrocitos

Cuadro 2. Especies de *Plasmodium* que causa la malaria humana. Tomado y modificado de Mary M. Stevenson *et. al.* 2004.

### 1.3. Ciclo de vida de *Plasmodium spp*

*Plasmodium* tiene un ciclo de vida complejo, presenta varias etapas de desarrollo, que implica un mosquito *Anopheles* como vector en donde se desarrolla la reproducción sexual (gametos, cigoto, oocisto, oocineto y esporozoíto) y un hospedero vertebrado (esporozoítos, etapas asexuales exoeritrocítica e intraeritrocítica y gametocitos). Cada etapa el parásito expresa proteínas específicas, por lo que su estudio se vuelve complejo. Además, en su hospedero humano, el parásito se desarrolla en dos etapas: en el hígado (etapa exoeritrocítica) y en la sangre (etapa intraeritrocítica) [9].

La infección en el humano comienza cuando la hembra del mosquito del género *Anopheles* infectada inyecta de 10-100 esporozoítos asexuales a través de la saliva durante la hematofagia. Una pequeña cantidad de esporozoítos permanece en la piel; otros esporozoítos penetran en los vasos sanguíneos, viajan al hígado e invaden a los hepatocitos (típicamente de 1 a 10 por célula). Dentro del hepatocito, se desarrolla la esquizogonia pre-eritrocítica, los esporozoítos se desarrollan por un período aproximado de una semana en un esquizonte exoeritrocítico que contiene entre 30,000 a 40,000 merozoítos. Dos de las cuatro especies que infectan al hombre (*P. vivax* y *P. ovale*) pueden desarrollar hipnozoítos, el estadio latente que puede provocar reinfecciones meses o años más tarde. *P. falciparum* no desarrolla esta forma latente. El esquizonte, junto con el hepatocito infectado, se rompen para liberar a los merozoítos, los cuales pueden reinfectar hepatocitos o infectar eritrocitos. Esto inicia el ciclo de esquizogonia eritrocítica, mediante el cual los merozoítos se expanden a través de las etapas intermedias trofozoíto de anillo y trofozoíto maduro, en un periodo de 48-72 horas. Durante este tiempo, el merozoíto invasor se desarrolla finalmente en un esquizonte dentro de una vacuola parasitófora en el eritrocito donde da origen a 20 nuevos merozoítos, aproximadamente, que se liberan e infectan nuevos eritrocitos. El ciclo de vida en el humano se completa al desarrollarse las formas sexuales (gametocitos) en los eritrocitos.

El ciclo o reproducción esporogónica se lleva a cabo en el mosquito hembra *Anopheles* que ingiere los parásitos durante la hematofagia de personas infectadas, los gametocitos pasan por el tubo digestivo, ya en el estómago del mosquito, los gametos salen de los eritrocitos infectados y ocurre el proceso de exflagelación del

gameto masculino, la fertilización del gameto femenino da lugar a los ooquistes que atraviesan la pared intestinal, y se transforman en ooquiste que contienen esporozoítos inmaduros, con la ruptura del ooquiste se liberan y se diseminan dentro del cuerpo del vector, viajan a las glándulas salivales del mosquito, vía por la cual se inoculan los esporozoítos en la próxima alimentación del mosquito, dando inicio de nuevo al ciclo de vida (Fig. 1) [10].

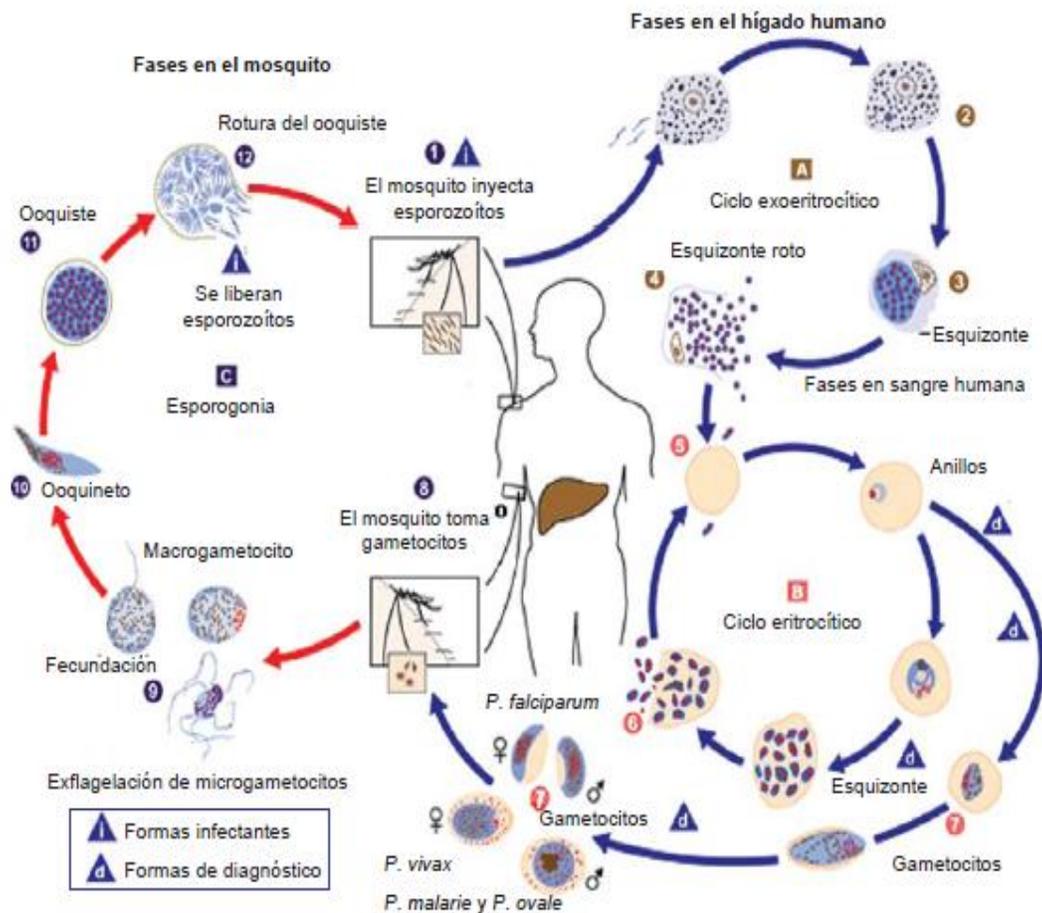


Figura. 1. Ciclo biológico de *Plasmodium*. En el proceso de hematofagia la hembra de mosquito *Anopheles* inocula los esporozoítos en el hombre (1). Los esporozoítos infectan a los hepatocitos (2) y se multiplican por esquizogonia (3) dando lugar a la formación de merozoítos (4). Después de esta multiplicación en el hígado (esquizogonia exoeritrocítica) (A), el parásito invade a los eritrocitos, entonces el parásito se reproduce por esquizogonia (esquizogonia eritrocítica) (B) y se liberan

merozoítos que invaden a nuevos eritrocitos (5). En el eritrocito se lleva a cabo otro ciclo de reproducción asexual y se forman trofozoítos anulares que se convierten en esquizontes que originan nuevos merozoítos (6). Algunos parásitos se diferencian sexualmente y se transforman en gametocitos (7). Los gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) son ingeridos por un mosquito *Anopheles* durante la hematofagia (8). La multiplicación del parásito en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico (C). Los microgametos fecundan a los macrogametos y se desarrollan los cigotos (9). El cigoto se convierte en ooquinetos móviles (10), invade la pared del intestino y se convierte en ooquiste (11). El ooquiste desarrolla en su interior esporozoítos (12), que una vez liberados ascienden a las glándulas salivales. La inoculación de los esporozoítos en un nuevo hospedador perpetúa el ciclo de la malaria (1). Tomado de <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>.

#### **1.4. Cuadro clínico de la enfermedad**

La sintomatología de la malaria se desarrolla, generalmente, dentro de los 10-15 días posteriores a la infección y está asociada con la ruptura de los eritrocitos parasitados. Los enfermos presentan fiebre, escalofríos, sudoración, cefaléa y mialgias. Con menor frecuencia, manifiestan tos, dolor abdominal, náuseas, vómito y diarrea. La enfermedad pueden escalar rápidamente hacia una malaria severa, desarrollándose: malaria cerebral (CM), falla renal, falla hepática, anemia grave, trombocitopenia, síndrome de esplenomegalia hiperreactiva (HES), acidosis metabólica y edema pulmonar, entre otras (Fig. 2 ) [11].



Figura. 2. Sintomatología de la malaria.

Las principales amenazas clínicas para los pacientes son la malaria cerebral y la anemia. La CM es la principal causa de muerte en los individuos infectados con *P. falciparum*. Se estima que aproximadamente del 19 al 25% de las personas con CM mueren y una gran proporción de sobrevivientes sufren daño neuronal permanente [11]. Por otro lado, la anemia por *P. falciparum* tiene una tasa de mortalidad mayor al 13% y es la principal causa de muerte en regiones endémicas [12].

### 1.5. Distribución mundial

La malaria está restringida a altitudes inferiores a 1500 metros, en zonas tropicales y subtropicales. Aún así, aproximadamente el 50 % de la población mundial está expuesta a la malaria. En el 2016, 91 países estaban clasificados como zonas endémicas de alto riesgo de transmisión activa de malaria, de los cuales 21 pertenecen a América Latina, entre ellos México (Fig. 3) [13].

Existen aproximadamente 2.57 mil millones de individuos que están en riesgo de infectarse con *Plasmodium*. Aproximadamente 1,440 millones de personas viven en el área de riesgo estable de transmisión, principalmente en África, Yemen, Arabia Saudita (753.38 millones), centro y sureste asiático (658.04 millones) y América (31.41 millones)(Fig. 3) [14]. En México las áreas de alto riesgo de infección comprenden a los estados de Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Durango, Nayarit, Chiapas, Tabasco, Campeche y Quintana Roo. En el 2008, se reportaron 20,833 casos, en Mesoamérica (desde el sur de México hasta Panamá) de los cuales el 11.3% correspondieron a México (Fig. 4) [15, 16].

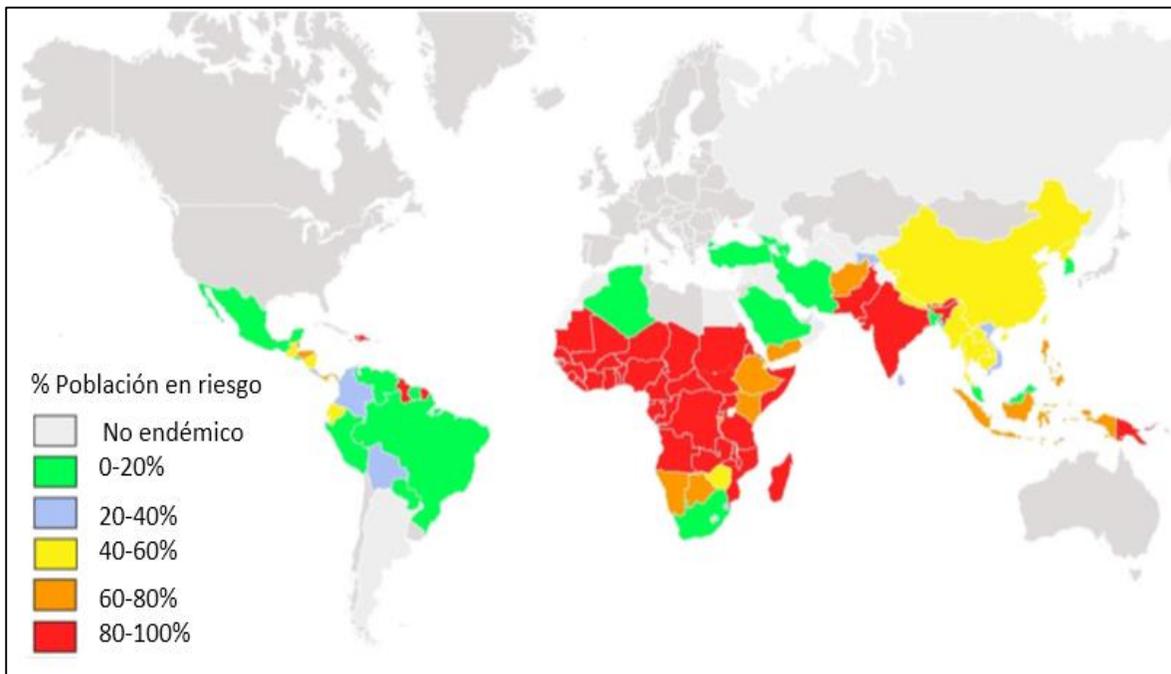


Figura 3. Porcentaje de población mundial en riesgo de infección por malaria. Imagen tomada de Eikenberry SE, Gumel AB, 2018.

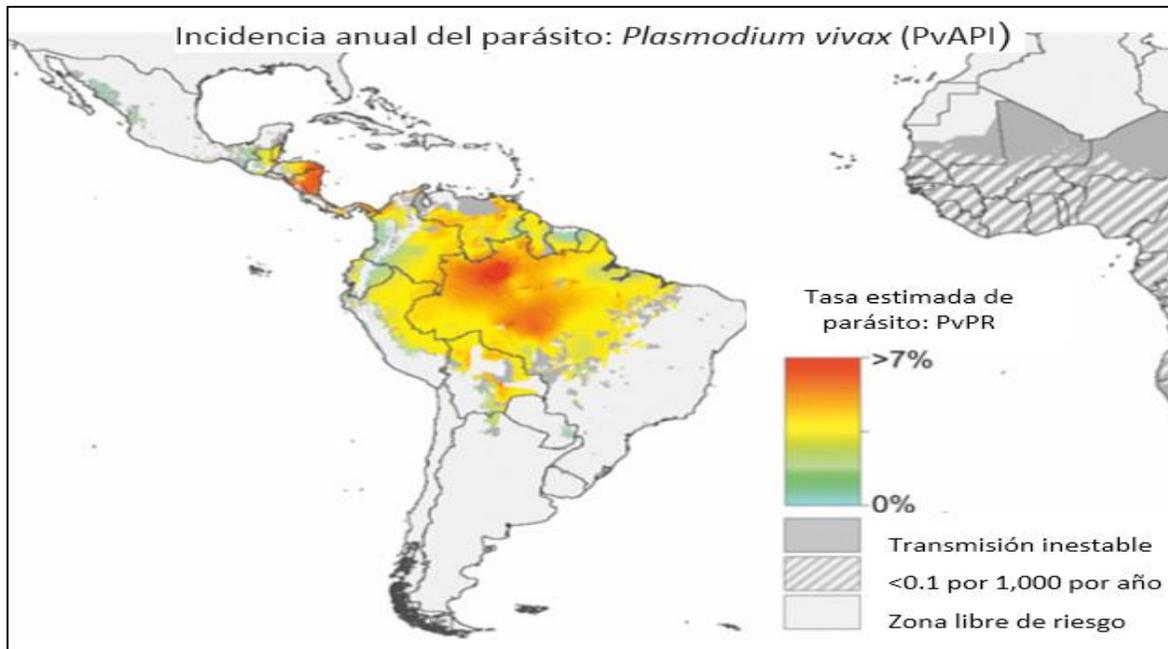


Figura 4. Áreas con transmisión de malaria en México y distribución espacial de *P. vivax* en el 2010. Imagen tomada y modificada de Howes RE. Hay SI *et al.* 2016.

### 1.6. Modelos animales empleados para el estudio de la malaria

El esclarecimiento de la patogénesis de la malaria en humanos requiere de un modelo animal que al ser infectado con el patógeno manifieste la evolución o desarrollo de la enfermedad; asimismo, que presente los cambios histopatológicos y de los mecanismos inmunológicos asociados con la fisiopatología; La similitud de la respuesta inmune entre ratones y humanos justifica el uso de estos modelos para estudiar malaria [17, 18]. Así, varias combinaciones de especies de *Plasmodium* y cepas de ratones se han utilizado para mimetizar la respuesta inmune de malaria en humanos (Cuadro 3).

Especie de <i>Plasmodium</i> :	Subespecie: Clona	Cepa de ratón susceptible a la anemia	Aplicación en la investigación
<b><i>P. berghei</i></b>	<i>P. berghei</i> ANKA	C57BL/6: Letal CD-1: Letal BALB/c : Letal	Se utiliza como modelo experimental de CM. Identificación de la variación genética en el desarrollo de CM.
	<i>P. berghei</i> K173	C57BL/6: Letal	Se utiliza para estudiar la patogénesis, difiere en algunos aspectos de la patogénesis, lo cual indica la influencia de la variación genética del parásito.
	<i>P. berghei</i> NK65	C57BL/6: Letal	Es usada como modelo de malaria no cerebral, induce un aumento progresivo de la parasitemia, inflamación hepática intensa y muerte.
	<i>P. berghei</i> XAT	Control espontáneo	Variante atenuada por irradiación de la cepa letal <i>Pb</i> NK65. Se utiliza para la comparación de la respuesta inmune y patogénesis entre parásitos letales y atenuados.
<b><i>P. yoelii</i></b>	<i>P. yoelii</i> 17 NXL	BALB/c: No letal	Se utiliza para estudiar los mecanismos inmunes y la patogénesis. <i>Py</i> A1 es una línea leve que está restringida a los reticulocitos.
	<i>P. yoelii</i> 17XL	BALB/c: Letal C57BL/6: Letal	Se utiliza en la identificación de posibles vacunas y la respuesta inmune.
	<i>P. yoelii</i> YM	CBA: Letal	<i>Py</i> línea YM genera una infección altamente virulenta que se multiplican tanto en reticulocitos como en eritrocitos.
	<i>P. yoelii</i> YA	CBA: No letal	<i>Py</i> línea YA es más virulenta que la línea leve YP y YM. Las líneas YM/A difieren adicionalmente en enzimas y marcadores de sensibilidad a fármacos.
<b><i>P. chabaudi</i></b>	<i>P. chabaudi</i> AS	A/J: Letal C57BL/6: No letal BALB/c: No letal	Se utiliza en el estudio de los mecanismos inmunes, la susceptibilidad y la inmunoregulación de las citocinas. Además, para identificar y estudiar loci de susceptibilidad y las bases inmunológicas de la patología.
	<i>P. chabaudi</i> AJ	BALB/c: No letal	Se utiliza para estudiar vacunas experimentales y procesos inmunológicos que controlan la hiperparasitemia.
	<i>P. chabaudi</i> Adami DS	C3H: Letal C57BL/6: No letal	Cepa de rápido crecimiento y alta patogenicidad. Causa una infección letal media, induce una anemia severa y pérdida de peso.
	<i>P. chabaudi</i> Adami DK	BALB/c: no letal C3H: no letal	Cepa de crecimiento más lento y menor patogenicidad.
<b><i>P. vinckei</i></b>	<i>P. vinckei</i> vinckei	BALB/c: Letal AKR: Letal	Se utiliza para estudios de quimioterapia y patogénesis. Causa una hiperparasitemia agresiva y descontrolada.
	<i>P. vinckei</i> petteri	AKR: Letal AKR: no letal	Se utiliza para la detección de drogas sensibles contra la malaria y estudios inmunológicos.

Cuadro 3. Especies de *Plasmodium* que causan la malaria en ratones. Abreviaciones: malaria cerebral (CM), *P. yoelii* (*Py*), *P. berghei* (*Pb*). Tabla tomada de Salazar *et. al.* 2014.

## 1.7. Respuesta inmune a malaria

La respuesta inmune hacia la malaria es compleja y poco entendida; la respuesta que se desarrolla hacia el parásito depende de la especie de *Plasmodium*, el estadio específico dentro del hospedero y del estado inmunológico del hospedero [19].

La respuesta inmune más estudiada en los modelos murinos es la que genera la infección no letal con *P. chabaudi* en las cepas de ratones BALB/c y C57BL/6, y la relacionada a la infección letal en las cepas de ratones A/J y DBA/2 [20]. La infección por *P. chabaudi* en ratones induce una rápida y marcada respuesta proinflamatoria, con producción de la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, que es eficiente para eliminar varias cepas de *Plasmodium* [21-23]. Cabe destacar, que después del pico de la parasitemia, la respuesta inmune celular cambia de una respuesta de células T colaboradoras (del inglés T helper -Th) tipo Th1 hacia un perfil tipo Th2 [24]. Este cambio de Th1 a Th2 es importante debido a que gran parte de la patogénesis de la malaria la origina la respuesta proinflamatoria excesiva [25, 26].

El ciclo de vida de este parásito atraviesa dos etapas principales, la que se presenta en el hígado (etapa exoeritrocítica) y la que se presenta en la sangre (intraeritrocítica), cada una con una respuesta inmune específica.

En la etapa exoeritrocítica, la inmunidad contra los esporozoítos depende de los anticuerpos contra proteínas de superficie, como la proteína de superficie del esporozoíto (circumsporozoite protein-2 [CSP-2]) [27] y contra antígenos específicos del estadio hepático (Liver Stage Antigen-1 [LSA-1]) [28]. Éstos antígenos inducen la síntesis de anticuerpos que neutralizan o bloquean la invasión de los hepatocitos. Una vez que los esporozoítos han entrado al hepatocito, la

eliminación del parásito requiere principalmente de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxicos, expresan en su superficie el correceptor dimerico CD8) [29], de las células citotóxicas naturales (NK), de las células T citotóxicas naturales (NKT) [20] y de las células T gamma delta (T $\gamma\delta$ ) [10] que producen IFN- $\gamma$  para eliminar a los hepatocitos infectados.

En la etapa intraeritrocítica, el parásito altera la fisiología y procesos bioquímicos de los eritrocitos, los cuales promueve la expresión de moléculas parasitarias en su superficie que más tarde afectarán la reología del eritrocito. La biomasa del parásito se incrementa rápidamente y activa a los mecanismos de la inmunidad innata, incluyendo a las células T $\gamma\delta$  y las NK [5].

Las células T $\gamma\delta$  son la principal fuente de IFN- $\gamma$ , y una fuente importante de TNF- $\alpha$  durante la fase temprana de la infección por *Plasmodium* [30]. La expansión de células T $\gamma\delta$  durante la infección con *P. chabaudi* o *P. falciparum*.se correlaciona con protección (disminución de la parasitemia y malaria no complicada) [30, 31]

Las células NK participan en la restricción de la replicación del parásito. La ausencia de las células NK se ha asociado con bajos niveles séricos de IFN- $\gamma$  y un incremento en los picos de parasitemia durante la infección por *P. chabaudi* [32]. Del mismo modo, diversos estudios en diferentes cepas de ratón, en combinación con diferentes cepas de *Plasmodium*, muestran claramente que la ausencia de IFN- $\gamma$  minimiza la capacidad de los ratones para controlar y eliminar al *Plasmodium*, lo que finalmente resulta en la muerte del hospedero [33, 34]. Cabe destacar, que estudios recientes demostraron que los macrófagos (M $\phi$ ), y no el IFN- $\gamma$ , juegan un papel importante en el control de los picos tempranos en la infección letal con *P. yoelii* 17XL [35]. No obstante, el IFN- $\gamma$  secretado por células T CD4<sup>+</sup> juega un papel

fundamental en la inmunidad protectora contra cepas no letales de *Plasmodium* [36]. Al contrario, durante la infección con la cepa letal *P. berghei* ANKA las concentraciones altas de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  tienen un efecto patogénico [25].

Los monocitos y los M $\phi$  son importantes en la eliminación de eritrocitos infectados, ya que los fagocitan en ausencia de anticuerpos citolíticos específicos para el parásito o bien porque los anticuerpos favorecen la opsonización. Asimismo, por el estímulo con IFN- $\gamma$ , los M $\phi$  funcionan como células efectoras que producen moléculas contra el parásito como el óxido nítrico [29, 35]. No obstante, los M $\phi$  también se han relacionado con resultados clínicos adversos [37].

Las células dendríticas (DC) fagocitan eritrocitos parasitados y se activan *in vivo* en el bazo, procesan y presentan los péptidos de las proteínas del parásito en un contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) [20]; concomitantemente, los antígenos estimulan el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras en las DC lo que induce la producción de citocinas proinflamatorias [20].

La internalización de los eritrocitos parasitados por las DC involucra el reconocimiento a través de receptores como TLR4, TLR9 y la participación de la proteína adaptadora MyD88 y en consecuencia la señalización vía NF-kappa B [38], que da como resultado la s de citosinas proinflamatorias, que contribuyen a la polarización de la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup>. No obstante, las DC pueden jugar un papel importante en la patogenia, debido a una subóptima respuesta inmune contra *Plasmodium*. Se sabe que *Plasmodium* modula la respuesta de las células presentadoras de antígeno como M $\phi$  y DC [39], suprimiendo su respuesta.

Este efecto se ha asociado con la inhibición de la respuesta a los ligandos para TLR2, TLR5, TLR7 y TLR9 en las DC [40]. Asimismo, el reconocimiento a través de TLR9/MyD88, de un pigmento del parásito (hemozoina), activa a las DC a través de TLR9/MyD88 y también induce la activación de los M $\phi$  vía ERK1/2, NF- $\kappa$ B [41, 42]. La respuesta a la activación por hemozoina da como resultado la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-12p40. Se ha sugerido que la función de las DC se afecta por la sobreproducción de TNF- $\alpha$  [23], en el daño a la actividad de las DC está involucrado un factor de virulencia presente en ciertas cepas de *Plasmodium*, cuando las DC de ratones infectados con una cepa “no letal” son transferidas a ratones infectados con una cepa “letal” de *Plasmodium*, estos ratones quedan protegidos [43].

Las células T CD8<sup>+</sup> tienen un papel importante en la eliminación de los parásitos en el hígado y en la etapa eritrocítica en los ratones C57BL/6 infectados con *Py* 17XL; las células T CD8<sup>+</sup> activan a los M $\phi$  por medio de la liberación de IFN- $\gamma$ . Éstos M $\phi$  pueden, potencialmente fagocitar eritrocitos infectados. Si el parásito no fuera completamente eliminado por este mecanismo, las células T CD8<sup>+</sup> podrían provocar la apoptosis vía el sistema Perforina-granzima B en los M $\phi$  infectados, para eliminar completamente al parásito, además de reclutar a M $\phi$  nuevos [29].

Las células T CD4<sup>+</sup> actúan como células colaboradoras para la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos. Además, el IFN- $\gamma$  secretado por las células TCD4<sup>+</sup> activa las respuestas mediadas por los M $\phi$  [44] y a las células T CD8<sup>+</sup> específicas contra el parásito. De este modo, las células T CD4<sup>+</sup>, junto con las células B, son importantes para desarrollar un eficiente control y eliminación de los eritrocitos y hepatocitos parasitados [45, 46]. Las células T CD4<sup>+</sup> activadas en la

infección por *Plasmodium* pueden sufrir una interconversión entre los subconjuntos de células definidas como Th1/Th2 en función de la dosis de antígeno, la célula presentadora de antígeno, la ubicación y el entorno de citocinas/quimiocina. De hecho, existen células T multifuncionales, como las células Th1 que bajo ciertas condiciones secretan conjuntamente IFN- $\gamma$  e IL-10 [47].

Las células B desempeñan un papel importante al producir anticuerpos específicos contra los merozoítos, que los opsonizan o inhiben la invasión de los eritrocitos por los parásitos [48]. Además, los anticuerpos contra los eritrocitos parasitados, promueven su fagocitosis o bien bloquean su adhesión al endotelio vascular y los anticuerpos anti-glicosilfosfatidinositol (GPI) neutralizan las toxinas del parásito [10]. La eliminación del parásito después del pico de la parasitemia requiere la participación de los anticuerpos. Los ratones knockout para células B ( $\mu$ MT) o sin células B, por tratamiento con anticuerpos anti- $\mu$ , son incapaces de eliminar la infección con *P. chabaudi* [49, 50]. Estos ratones presentan parasitemia crónica recurrente que no pueden eliminar. Sin embargo, la transferencia adoptiva de células B reduce la parasitemia [46].

Los anticuerpos principales involucrados en la eliminación del parásito son las subclases de IgG del tipo citofílico (IgG1 y IgG3) [46, 51]. Los altos niveles de estos anticuerpos en áreas endémicas se han asociado con una menor densidad de *Plasmodium* y con un menor riesgo de síntomas clínicos por malaria [52, 53]. Por otro lado, las concentraciones elevadas de anticuerpos del tipo no citofílico IgG2 e IgG4, se asocian con una bajo riesgo de infección o un aumento de los síntomas clínicos, respectivamente [54, 55]. Por otra parte, los anticuerpos tipo IgM complementan la respuesta humoral antimalaria mediada por IgG [56] ya que limitan

la replicación del parásito y se une a los eritrocitos parasitados [57], bloquean la invasión de los merozoítos a los eritrocitos. Además, contribuyen significativamente a la reducción del riesgo de malaria clínica y restringen la inflamación generada por TNF- $\alpha$  [58]. Por otra parte, las concentraciones altas de IgE correlacionan con protección contra malaria severa [59, 60].

Las células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) son importantes para el control del proceso inflamatorio en la malaria. No obstante, los ratones infectados con las cepas letales *Py* XL17 y *P. berghei* muestran un incremento en el número de células Treg y niveles más altos de IL-10 y TGF- $\beta$ , durante la fase aguda de la infección [61-63]. En los ratones infectados con la cepa no letal *Py* 17XNL, la presencia de IL-10 y TGF- $\beta$  solo se detecta durante la fase crónica de la infección [63]. De manera interesante, la neutralización con anticuerpos anti-TGF- $\beta$  y anti-IL-10 disminuyen la parasitemia y prolongan la supervivencia de los ratones infectados con la cepa letal *Py* 17XL [63]. Cabe destacar que, la principal fuente de IL-10 en la infección letal por *P. yoelii* son las células Treg [64]. Finalmente, la ablación de las células Treg en ratones DREG-BALB/c infectados con la cepa no letal *Py* 17XL incrementa significativamente la activación de las células T y disminuye la parasitemia [65]. En los humanos, la producción de TGF- $\beta$  y la presencia de las células Treg se ha asociado con parasitemias elevadas, lo que sugiere que la inducción de las células Treg podrían representar un factor específico de virulencia del parásito [66].

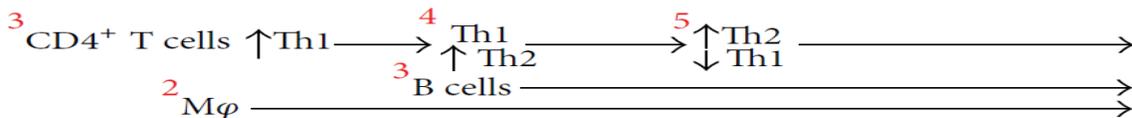
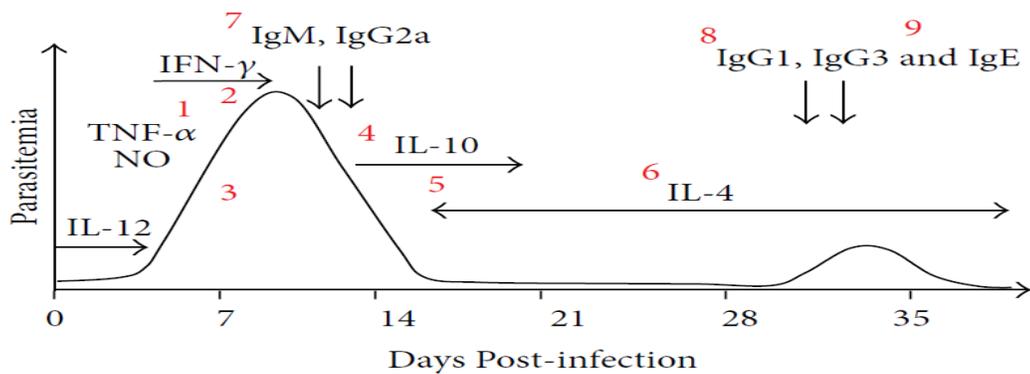


Figura 5. Diagrama que ilustra el posible mecanismo de la respuesta inmune en ratón durante la infección con *Plasmodium*. En la etapa eritrocítica, la infección aguda o primaria se caracteriza por una rápida y marcada respuesta proinflamatoria, con producción de IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Además, el óxido nítrico producido por los M $\phi$  participa en el control de la parasitemia (1). IFN- $\gamma$  activa la respuesta mediada por M $\phi$ , en particular la fagocitosis y la eliminación de eritrocitos parasitados (2). Las células T CD4<sup>+</sup>, en colaboración con las células B, son importantes para el desarrollo de una eficiente respuesta protectora (3). Después de la infección primaria, la respuesta inmune tipo Th1 se regula negativamente por un incremento de la respuesta inmune tipo Th2 (4). En la infección crónica, después de alcanzar el pico de parasitemia, las células T CD4<sup>+</sup> cambian de un perfil de citocinas Th1 a Th2 (5), este perfil inmune promueve la producción de anticuerpos por las células B (6). Los anticuerpos inhiben la invasión del parásito al eritrocito, opsonizan o bloquean la adhesión de los eritrocitos parasitados al endotelio vascular (7,8). Después de la fase aguda, ocurre el cambio de las subclases no citofílicas (IgM e IgG2a) (7) a las subclases citofílicas (IgG1 e IgG3) (8) que participan en la eliminación del parásito, y la correlación de IgE con la protección contra la malaria severa (9). Figura tomada y modificada de Langhorne et al. 2004 y Stevenson & Urban, 2006.

### 1.8. *Plasmodium yoelii* 17XL

*Plasmodium yoelii* 17XL es una cepa letal, clonada a partir de la cepa no letal Py 17NXL, aislada de la sangre de un ratón silvete (*Thamnomys rutilans*). La cepa Py 17XL no representa un riesgo para el ser humano, debido a que es específica. Es altamente virulenta y letal en la mayoría de las cepas de ratón. La infección con Py 17XL en el modelo murino, es útil para la investigación de la malaria severa

causada por *P. falciparum* en humanos. Los ratones BALB/c infectados con la cepa letal *Py* 17XL presentan hiperparasitemia, caquexia, esplenomegalia, anemia severa y muerte entre los días 7 a 11 post infección [67]. Durante la infección aguda hay una activación transitoria de los M $\phi$  con síntesis discreta de IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , supresión en la producción IL-4 e IL-12, y un incremento en la concentración sérica de IL-10 comparado con la infección con la cepa no letal *Py* 17NXL [68, 69]. Numerosos estudios han descrito que la infección inicial con *Py* 17XL no solo promueve la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), si no que también incrementa el número de las células Treg productoras de IL-10 en el bazo, lo que disminuye la respuesta protectora contra la *Py* 17XL [63, 70]. De manera interesante, esta respuesta también se asocia con el incremento en la tasa de replicación de *P. falciparum* [66].

### **1.9. Helmintos**

Los helmintos son gusanos multicelulares, algunos de los cuales se han adaptado exitosamente a la vida parasitaria. Al infectar animales domésticos y al hombre son médica y económicamente relevantes. Se clasifican en tres grupos taxonómicos: los nemátodos (e.g., *Ascaris lumbricoides*), los tremátodos (e.g., *Schistosoma mansoni*) y céstodos (e.g., *Taenia solium*). Los helmintos son extremadamente diversos biológicamente en términos de tamaño, ciclo de vida y enfermedades que causan. A pesar de su complejidad, todos ellos tienen una característica en común, la habilidad de causar infecciones crónicas y asintomáticas, lo que indudablemente refleja su capacidad de modular y suprimir la respuesta inmune del hospedero, y así promover su supervivencia [71]. Las infecciones por helmintos son muy comunes. Están entre los agentes infecciosos

más ampliamente distribuidos en las poblaciones humanas, especialmente en países en vías de desarrollo; afectando a más de una tercera parte de la población mundial y se considera que más de 20 especies infectan a los humanos (Tabla 4) [72].

Tipo de helminto	Helminto	Número estimado de personas infectadas
<b>Nemátodos</b>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1450 millones
	<i>Trichuris trichiura</i>	1050 millones
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	740 millones
	<i>Trichinella spiralis</i>	600 millones
	<i>Necator americanus</i>	576 millones
	<i>Brugia malayi</i>	157 millones
	<i>Wuchereria bancrofti</i>	120 millones
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	100 millones
	<i>Onchocerca volvulus</i>	37 millones
	<i>Loa loa</i>	13 millones
<b>Tremátodos</b>	<i>Schistosoma spp.</i>	207 millones
	<i>Fasciola hepática</i>	17 millones
<b>Céstodos</b>	<i>Hymenolepis nana</i>	75 millones
	<i>Echinococcus spp.</i>	3.6 millones
	<i>Taenia spp.</i>	0.4 millones

Tabla 4. Prevalencia de helmintos en el mundo. Estas son estimaciones del número de personas con infecciones activas. El número de personas potencialmente expuestas o con infecciones por helmintos subclínicas es mucho mayor. Tabla tomada de Salazar *et. al.* 2014.

### 1.10. Respuesta inmune a helmintos

Las infecciones por helmintos en mamíferos generalmente resultan en una polarización de la respuesta inmune hacia un perfil tipo Th2 a nivel sistémico y de mucosas, que se caracterizan por el aumento en la concentración de las citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, de IgE, el reclutamiento y activación de eosinófilos, basófilos, mastocitos, de la proliferación de células Treg, de la activación alternativa de macrófagos (AAM $\phi$ ) y de la presencia de células linfoides innatas tipo 2 (ILC2s) [73-75].

A pesar de esta fuerte respuesta Th2, la sobrevida prologada de los helmintos dentro del hospedero, al aparecer inmunocompetente, se facilita por la inducción de mecanismos inmunoreguladores ejercidos por el parásito [76, 77]. Estos mecanismos incluyen la capacidad de inducir respuestas reguladoras, mediadas por las células Treg, que expresan moléculas que inhiben la respuesta inmune, como la proteína GITR (glucocorticoid-induced TNF-R-related protein) y el CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) [78-81]. Las células Treg secretan citocinas IL-10 y TGF- $\beta$  con actividad supresora [82]. Las células B reguladoras (Bregs) participan en la inhibición de la respuesta proinflamatoria mediante la síntesis de IL-10 [83]. Los helmintos también promueven la diferenciación de M $\phi$  con propiedades antiinflamatorias, llamados AAM $\phi$  [84, 85], así como de las DC reguladoras (DCregs), que se caracterizan por la síntesis de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- $\beta$  [86, 87]. Esta respuesta antiinflamatoria y/o reguladora puede ser potencialmente perjudicial para el hospedero, si esta interfiere con el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra otras infecciones que requieren de una respuesta proinflamatoria.

### **1.11. Efecto de los helmintos en la respuesta inmune hacia vacunas y enfermedades inflamatorias**

Las infecciones con helmintos inducen una baja respuesta linfoproliferativa no solo hacia los antígenos del parásito si no también a otros antígenos. Varios estudios han examinado el efecto de los helmintos en la respuesta inmune hacia otros antígenos no relacionados. En particular, se ha demostrado que la respuesta a una vacuna se puede modificar por la presencia de una infección concomitante

por helminto. Por ejemplo, la infección crónica con *Onchocerca* [88] o *Schistosoma* [89] reduce la eficacia de la vacuna contra el tétanos. Del mismo modo, la infección crónica por *Onchocerca* afecta la eficacia de la vacuna BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) y de la Rubeola [90]. Asimismo, *Ascaris lumbricoides* reduce la respuesta protectora de la vacuna oral contra el cólera, cuya efectividad se restaura con albedazol. [91]. Sin embargo, también ha sido sugerido que las infecciones con los helmintos son benéficas en el control de reacciones inflamatorias excesivas, tales como la enfermedad de Crohn [92] y la colitis ulcerativa [93], así como en enfermedades autoinmunes, como la encefalomielitis [94, 95] y la artritis [96].

### **1.12. *Taenia crassiceps***

*Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) es un céstodo que, cuando es adulto vive en el lumen del intestino de algunas especies de carnívoros (i.e. zorros) (Fig. 6) así como en el tejido conectivo subcutáneo, pleural y en la cavidad peritoneal de roedores (i. e. ratones); en éstos se encuentra la etapa de metacéstodo (cisticercos) [97]. En los ratones de laboratorio, *T. crassiceps* ocasiona infecciones crónicas; el metacéstodo se multiplica en la cavidad peritoneal por reproducción asexual de manera aparentemente incontrolada y puede permanecer en su hospedero por largos períodos con un daño mínimo. En particular, el ratón BALB/c es sumamente susceptible a esta infección [98, 99].

### 1.13. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

Los zorros y los perros, entre otros carnívoros, portan el gusano adulto en el intestino delgado. Los huevos infectivos se liberan en el excremento y cuando los roedores salvajes los ingieren, la oncosfera atraviesa el epitelio intestinal y llega a los tejidos donde se diferencia a la etapa larval o cisticerco. En el hospedero definitivo (carnívoro) los gusanos planos crecen en el duodeno y liberarán huevos infectivos (Fig. 6). Morfológicamente la ultraestructura del estadio larval y el gusano plano de *T. crassiceps* no difiere significativamente del descrito para otros taénidos (Fig. 7)[97].

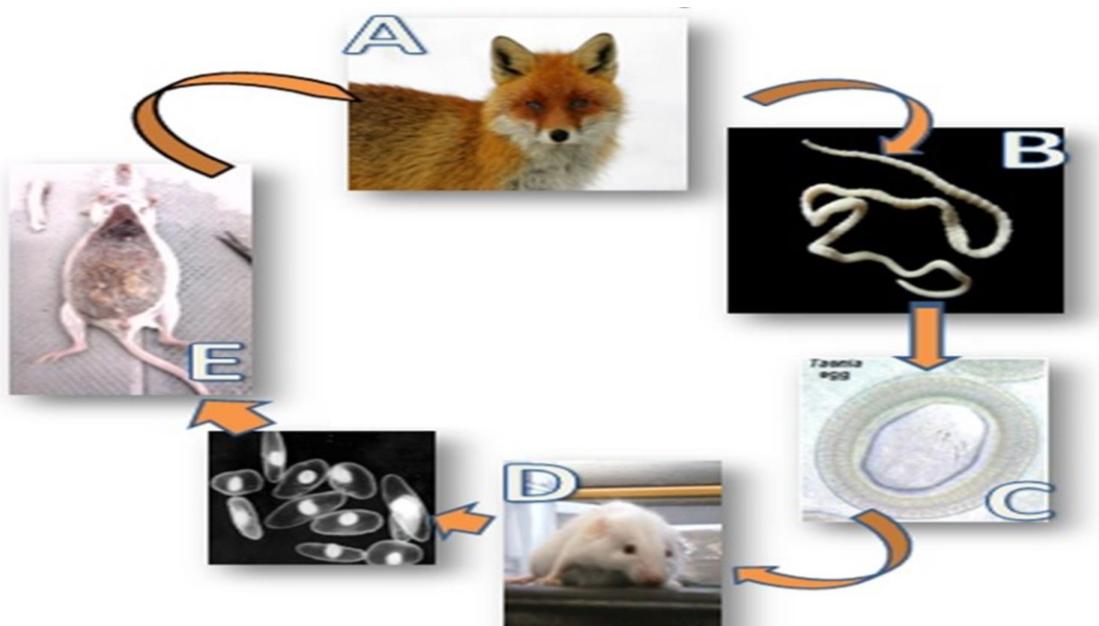


Figura 6. Ciclo de vida de *T. crassiceps*: A) hospedero definitivo (carnívoro); B) gusano adulto en el intestino del hospedero; C) huevos liberados en las heces; D) ingestión de huevos por el hospedero intermediario (roedores); E) crecimiento de la larva en el hospedero intermediario y cuando el carnívoro lo ingiere (hospedero definitivo) los gusanos planos crecen en el duodeno.

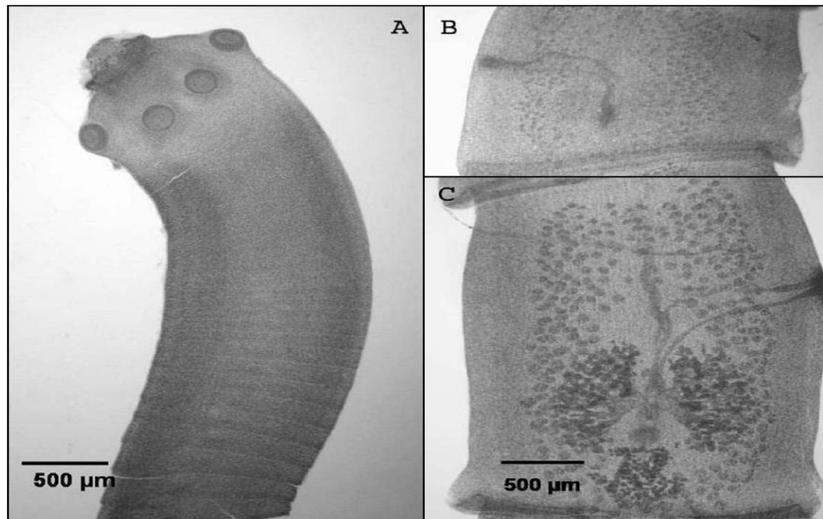


Fig. 7. Fotografía del Adulto de *T. crassiceps*: (A) Escólex donde se observan las ventosas y ganchos, (B) Proglotido inmaduro, (C) Proglotido maduro. Imagen tomada de Kaethe Willms y Rimma Zurabian 2009.

#### 1.14. Respuesta inmune a *Taenia crassiceps*

Los ratones con fondo genético BALB/c y H-2d desarrollan una gran carga de metacéstodos de *T. crassiceps* cepa ORF [100], mientras que en los ratones C57BL/6 se restringe la carga parasitaria [101]. Igualmente, se han observado diferencias en la actividad de los M $\phi$ : los M $\phi$  de los ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps* suprimen su actividad, al contrario de los M $\phi$  de ratones C57BL/6 infectados con *T. crassiceps* [102].

En la infección experimental por *T. crassiceps* la respuesta inmune en ratones BALB/c es inicialmente del tipo Th1 pero se polariza hacia el tipo Th2 a partir de la cuarta semana post infección. La resistencia a este parásito se ha asociado con una respuesta temprana del tipo Th1, mientras que una respuesta tipo Th2 (síntesis de las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13) se ha asociado con un aumento en la carga del parásito [103]. De manera interesante, los factores de transcripción STAT-4 y STAT-6 participan en la modulación de la respuesta inmune en los ratones infectados con

*T. crassiceps*. Los ratones deficientes en la funcionalidad del gen (STAT6<sup>-/-</sup>) controlaron la infección con *T. crassiceps*. Esta resistencia se asoció con una respuesta Th1 sostenida y una deficiente respuesta Th2 mediada por IL-4/IL-13 [104]. Esto se confirmó en ratones STAT-4 (-/-), los cuales resultaron altamente susceptibles a la infección debido a una deficiencia de la respuesta tipo Th1 lo que permitió concluir que la respuesta tipo Th1 es crítica para el desarrollo de una inmunidad protectora que restringe la replicación de *T. crassiceps* [105].

Estudios *in vitro* demostraron que los antígenos excretados/secretados por *T. crassiceps* (TcES) interfieren con la fosforilación de STAT-1 en respuesta a IFN- $\gamma$ , porque la infección afecta la vía de señalización intracelular que bloquea la respuesta a las citocinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  [106]. Al parecer, la presencia de una gran carga parasitaria en los ratones BALB/c está asociada con una respuesta inmune tipo Th2 con concentraciones altas de las citocinas IL-4 e IL-13 y , y modificación de la actividad de las DC debido a la exposición a TcES. En el sitio de infección hay un número elevado de AAM $\phi$ . Estos AAM $\phi$  expresaron los genes arginasa-1, ym-1, RELM- $\alpha$ , Chil3 y trem-2, y son deficientes en manifestar una respuesta proinflamatoria deficiente [102]. Además, los AAM $\phi$ s también expresan moléculas de superficie como MR (receptor de manosa), MGL1 (macrophage galactose-type lectin-1), y las moléculas supresoras PD-L1 y PD-L2 [107]

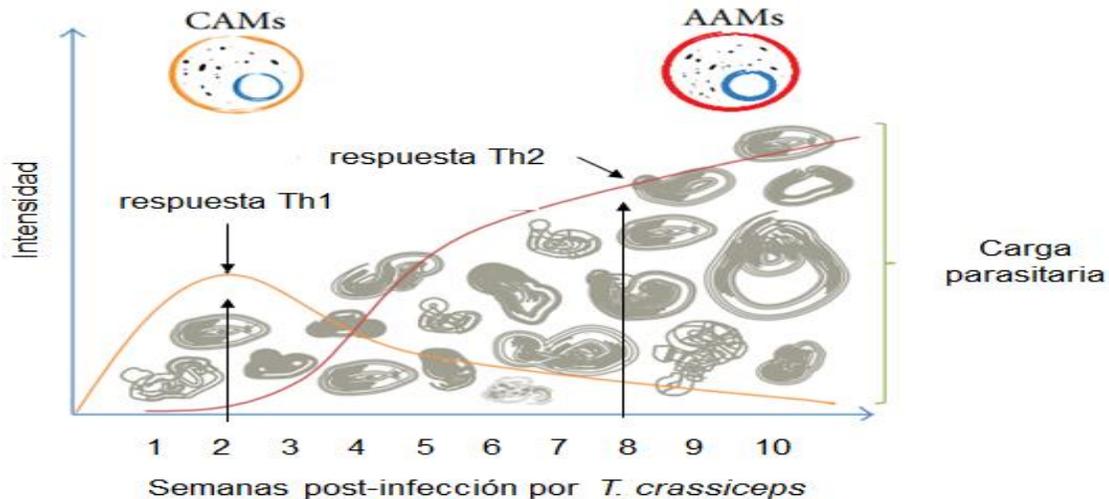


Figura 8. Polarización de la respuesta inmune en ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps*.

### 1.15. Coinfecciones parasitarias

Como parte de las actividades académicas durante mi formación de doctorado, realicé una revisión enfocada a establecer el conocimiento previo de la influencia de los parásitos helmintos sobre la respuesta inmune en la infección por *Plasmodium*. Se publicó en una revista indexada en el ICR, “Helminth parasites alter protection against *Plasmodium* infection”. *Biomed Res Int.*; 2014:913696. doi: 10.1155/2014/913696. ISSN: 2314-6133 (Print). ISSN: 2314-6141 (Online). Impact Factor: 2.476/Q 2. (APENDICE 1). A continuación abrevio el contenido de esta revisión.

Las infecciones parasitarias están ampliamente distribuidas en los trópicos y subtropicos. Estudios epidemiológicos han demostrado recientemente que la coinfección con múltiples especies de parásitos es la norma y no la excepción. Esto ocasiona una mayor intensidad en la infección de lo que se esperaría bajo los supuestos de infecciones independientes [108], de este modo, la coinfección puede

tener un mayor impacto en la morbilidad que la generada por la infección de una sola especie [109, 110].

La helmiantiosis se caracteriza por una infección de larga duración con una o, más de una de las especies de helmintos, lo que es frecuente. Este fenómeno, conocido como poliparasitismo o infección concomitante y es el resultado de interacciones ecológicas y ambientales. Las rutas de infección, la exposición y susceptibilidad del hospedero, así como factores de comportamiento, sociológicos y económicos permiten la coexistencia de múltiples sistemas de interacción parásito-hospedero [111]. En este contexto, los individuos que viven en las regiones de malaria endémica frecuentemente están infectados con otros patógenos, típicamente asociados a situación de pobreza. Actualmente, se estima que aproximadamente un tercio de los casi tres mil millones de personas que viven con menos de dos dólares por día están infectados con uno o más helmintos [112]. Asimismo, las infecciones con los helmintos son prevalentes en países en desarrollo, donde el parásito de la malaria es la principal causa de morbilidad [113]. En consecuencia, la coinfección con ambos parásitos, helmintos y *Plasmodium* ocurren con frecuencia [114].

Las interacciones entre dos parásitos pueden ser antagónicas, al menos para alguno de ellos, como resultado de la escasez de recursos, o bien puede darse una respuesta inmune cruzada. Pero también pueden ser benéficas para uno o ambos parásitos, como resultado de una inmunosupresión o regulación negativa de todo o parte del sistema inmune por uno o ambos parásitos [115]. Así, la coinfección con diferentes patógenos puede provocar a distintas escalas antagonismo o interacciones sinérgicas [116, 117]. A nivel inmunológico, el tipo de respuesta

inmune esta determinado por el tipo de parásito infectante. Los parásitos promueven la polarización de la respuesta inmunológica hacia un perfil de tipo Th1, Th2, Th17 o Treg. Dado que la polarización de la respuesta inmunológica a menudo suele tener un contra balance en el eje de Th1/Th2 o Th17/Treg, se postula que la infección con un parásito que induzca una clara polarización afectaría la respuesta inmune a un nuevo parásito coinfectante y, por lo tanto, puede tener consecuencias importantes en términos de susceptibilidad.

La respuesta protectora contra algunos agentes infecciosos, principalmente parásitos intracelulares, es mediada por células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 [118]; pero no por células Th2, productoras de IL-4, IL-5 e IL-10 [119]. En contraste, una respuesta Th2 puede proteger contra algunos parásitos extracelulares (e.g. *Trichuris muris*) [120]. La mayor parte de las infecciones por helmintos inducen fuertes respuestas de tipo de Th2/ regulador [121].

La coinfección puede alterar la transmisión, la susceptibilidad, la progresión o el resultado clínico y por ende el control de múltiples enfermedades infecciosas, como la malaria [72]. A pesar de que se estima que la prevalencia de las coinfecciones supera la sexta parte de la población mundial y con frecuencia involucra enfermedades infecciosas de importancia mundial [111], hasta hace poco, la mayoría de las investigaciones sobre enfermedades infecciosas se centraban en sistemas de un solo patógeno en un hospedero.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La malaria es una de las enfermedades infecciosas humanas más devastadoras y complejas en la interacción huésped-parásito. El multiparasitismo

del hospedero en las zonas de transmisión de la malaria es un hecho conocido desde hace décadas, aunque hay pocos estudios al respecto y sus implicaciones económicas y de salud pública aún son desconocidas.

El multiparasitismo es la regla en las poblaciones que viven en países tropicales y subtropicales. En particular, las infecciones por helmintos y *Plasmodium* spp coexisten en regiones endémicas de malaria, donde esta enfermedad es la principal causa de morbilidad y mortalidad [113]. Si bien, las co-infecciones helminto-*Plasmodium* son muy frecuentes [72, 114], no se consideran cuando se discute la respuesta inmunológica a la malaria. Del mismo modo, se desconoce la influencia de los helmintos en la duración de los episodios de malaria en humanos. Por lo tanto, las implicaciones de esta coexistencia en la respuesta inmune y la patología del hospedero no han sido claramente establecidas.

Estas interacciones podrían tener implicaciones potenciales en la capacidad fisiológica tanto para el hospedero (morbilidad y/o mortalidad) como para el parásito (transmisión). Varios estudios han demostrado que la capacidad de un parásito para establecer con éxito una infección dependerá de la respuesta inmune en el hospedero expuesto [122, 123]. Cuando ingresar al hospedero, el parásito experimentará un "ambiente inmunológico" potencialmente determinado por las infecciones previas o actuales [123-126]. La interacción que implica la respuesta inmunológica presente en infecciones entre protozoos unicelulares y helmintos multicelulares es compleja. Específicamente, esto se debe a que *Plasmodium* y los helmintos ocupan diferentes nichos en el hospedero y provocan diferentes tipos de respuesta inmune.

Los helmintos no solo son capaces de suprimir la respuesta inflamatoria mediante la inducción de células tipo Th2 sino que también por la inducción y activación de vías reguladoras caracterizadas por la hipo reactividad de las células T y la producción de citocinas antiinflamatorias [77, 127, 128], lo cual en conjunto favorecen un ambiente Th2/regulador. Así, la polarización hacia una respuesta inmune tipo Th2 podría afectar la respuesta Th1 protectora contra otros agentes infecciosos, como los protozoos intracelulares *Leshmania* [126, 129] y *Trypanosoma cruzi* [125]. Por lo tanto, es probable que la respuesta Th2 típica de hospederos infectados por los helmintos pudiera afectar la susceptibilidad a una infección posterior por un parásito intracelular no relacionado, como *Plasmodium*.

A pesar de que algunos estudios de coinfección sugieren que la respuesta inmunologica mostrada por los helmintos afecta el resultado de la infección por *Plasmodium*, los resultados de esta interacción son aun controversiales. Algunos estudios en humanos y animales han demostrado que las infecciones por helmintos reducen la gravedad de la infección por *Plasmodium* [130-137], mientras que otros resultados sugieren que se incrementa la severidad de la infección por *Plasmodium* [138-145]. Las explicaciones a estos hallazgos opuestos pudieran incluir no haber considerado las características críticas de la biología del parásito helminto, como el nicho biológico o el estadio del parásito dentro del hospedero, ni el tiempo previo de infección con el helminto; otra variable que pudiera influir en esta diferencia, es el perfil inmune que presenta el hospedero en el momento de adquirir la coinfección con *Plasmodium*. Si bien el perfil Th2 está presente en las infecciones con helmintos, en algunos casos la respuesta Th1 predomina sobre la respuesta Th2, dependiendo del tiempo de infección [146-148]. De este modo, el tiempo de

infección previo con un helminto (perfil inmunológico Th1 o Th2) podría modificar el curso y la patología de la infección con *Plasmodium*. Pero de qué manera influye, no está claramente establecido.

En este trabajo, se estudiamos el curso de la coinfección de *Py* 17XL en ratones BALB/c previamente infectados con *T. crassiceps* por dos u ocho semanas. Estudiamos como los cambios en el ambiente inmunológico generado por la primera infección (*T. crassiceps*), afecta la replicación del parásito *Py* 17XL, la susceptibilidad o el resultado clínico y la sobrevivencia de los ratones coinfectados. Los resultados obtenidos en este proyecto aportan conocimiento nuevo sobre los procesos inmunológicos asociados a la interacción helminto-*Plasmodium* en el hospedero murino; lo que tiene relevancia para futuras estrategias de salud pública (como los cuadros de vacunación y desparasitación).

### **3. HIPÓTESIS**

El perfil inmune tipo Th1 causado por la infección aguda o tipo Th2 causado por la infección crónica con *Taenia crassiceps*, modifica la respuesta inmune y el curso de la infección por *P. yoelii* 17XL.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. GENERAL**

Determinar la influencia de la infección aguda y crónica de *T. crassiceps* en el curso de la infección con *Py* 17XL en un modelo murino.

## 4.2. PARTICULARES

1. Determinar la resistencia o susceptibilidad de los ratones infectados con *Py* 17XL durante la co-infección aguda y crónica con *T. crassiceps*.
2. Evaluar la producción de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  al día 7 post coinfección, en suero de ratones coinfectados (2 u 8 semanas con *T. crassiceps* + *Py* 17XL )
3. Determinar el perfil de citocinas en sobrenadantes de cultivos de macrófagos en el día 7 posterior a la coinfección, estimulados con antígeno de *Py* 17XL<sub>7</sub>
4. Evaluar la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias de sobrenadante de cultivo de linfocitos de ratones, en el día 7 posterior a la coinfección.

## 5. MATERIALES Y METODOS

Material biológico de referencia

### 5.1. Animales

#### 5.1.1. Ratones

Se utilizaron ratones hembras de seis y ocho semanas de edad, con un fondo genético BALB/cAnN adquiridos en el laboratorio Harlan (Envigo, México) y mantenidos en reproducción bajo condiciones estándares en un ambiente libre de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES)-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

### **5.1.2. Declaración de Ética**

Este estudio fue aprobado y llevado a cabo estrictamente de acuerdo con los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio adoptadas por los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU. y el reglamento mexicano de cuidado y mantenimiento animal (NOM-062-ZOO-1999, 2001) y aprobado por el Comité de Ética en FES-Iztacala, UNAM (CE/FESI/ 032017/1154). La eutanasia se realizó mediante la inhalación en exceso de CO<sub>2</sub> / O<sub>2</sub> y se realizó todo esfuerzo para minimizar el sufrimiento.

## **5.2. Parásitos, infección y coinfección**

### **5.2.1. *T. crassiceps*.**

Los metacéstodos de *T. crassiceps* (cepa ORF) se extrajeron en condiciones estériles de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN hembras después de ocho semanas de infección. Los parásitos se lavaron cuatro veces con solución salina estéril (PBS; 0.15 M, pH 7.2). Para la infección experimental se seleccionaron los metacéstodos de acuerdo a su estadio (2mm de diámetro, sin gemas) y se inocularon vía intraperitoneal (i.p.), en una dosis de diez metacéstodos de *T. crassiceps* suspendidos en 0,3 ml de PBS por ratón. Posterior a la infección, se determinaron los cambios en la respuesta inmune y la carga parasitaria generada por la infección con *T. crassiceps*: los ratones no infectados (sanos) y los ratones infectados con *T. crassiceps*, se sometieron a eutanasia mediante una atmósfera con exceso de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, a las 0, 2 y 8 semanas post-infección con *T. crassiceps*, las muestras de sangre se colectaron mediante punción cardíaca y se centrifugaron para la obtención de suero. Las muestras de suero se almacenaron a -80 °C hasta

que se usaron para la cuantificación de citocinas. Los metacéstodos de la cavidad peritoneal se contaron en cada ratón.

### **5.2.2. *Plasmodium yoelii* 17XL (Py 17XL)**

*Py* 17XL fue amablemente donado por el Dr. W. Jarra del Instituto Nacional de Investigación Médica, Mill Hill, Londres, Inglaterra a la Dra. Martha Legorreta Herrera, quien cedió los parásitos para la realización del trabajo experimental. Estos parásitos se han criopreservado en nitrógeno líquido. Se utilizaron ratones hembras BALB/c para la infección solo con *Py* 17XL y la coinfección *Py* 17XL / *Tc* (después de dos u ocho semanas postinfección con *T. crassiceps*). Los ratones coinfectados se infectaron previamente vía intraperitoneal con diez metacéstodos de *T. crassiceps*; como vehículo se utilizó PBS. Después de dos y ocho semanas post infección con *T. crassiceps* los ratones se co-infectaron, como controles se infectaron ratones solo con *Py* 17XL por inyección intravenosa (i.v.) con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados en 0.1mL. de PBS. Los grupos experimentales (seis ratones por cada grupo) se dividieron en: I) ratones coinfectados con *Py* 17XL a las 2 semanas posteriores a la infección por *T. crassiceps* (*Tc*2+*Py*), II) ratones coinfectados con *Py* 17XL a las 8 semanas posteriores a la infección por *T. crassiceps* (*Tc*8+*Py*), III) ratones no infectados, IV) ratones infectados solo con *Py* 17XL, y V) infectados solo con *T. crassiceps* de 2 u 8 semanas (*Tc*2 u *Tc*8, respectivamente) (Fig. 10).

### **5.3. Severidad de la infección.**

La severidad de la infección por *Py* 17XL se cuantificó en términos de parasitemia, sobrevida, pérdida de masa corporal (caquexia) y pérdida de la concentración de hemoglobina (utilizada como indicador de anemia).

#### **5.4. Cinética de la parasitemia.**

Después de la infección, se cortó un mm de cola de los ratones coinfectados y se tomó una muestra de sangre diariamente postinfección. Se colocó una gota de sangre sobre un portaobjetos, y se extendió formando una capa delgada de células. Cada frotis se fijó con metanol absoluto y se tiñó con el colorante Giemsa (1:10) durante 30 min. La muestra se lavó a chorro de agua y se dejó secar, la parasitemia se evaluó con el microscopio óptico Zeiss Standard 20 con el objetivo de 100X (Carl Zeiss Ltd., Welwyn Garden City). La parasitemia (al menos 0.5%) se determinó al contar el número de eritrocitos parasitados presentes en un total de 200 eritrocitos (porcentaje de glóbulos rojos parasitados). En los niveles más bajos de parasitemia, se evaluó contando el número de eritrocitos parasitados presentes en 50 campos. El curso de la infección en cada grupo se presentó como la media geométrica del porcentaje de parasitemia.

#### **5.5. Sobrevida y peso de los ratones infectados**

La sobrevida de los ratones infectados y coinfectados se determinó mediante monitoreo visual diariamente durante los días posteriores a la infección con *Py* 17XL, se registró el deceso y se graficó (gráfico de sobrevida, GraphPath Prisma 7). Se documentó la pérdida de peso corporal utilizando una balanza electrónica (serie Citizen CX, Mumbai, India).

#### **5.6. Cuantificación de la concentración de hemoglobina**

La concentración de hemoglobina (Hb) se midió mediante espectrofotometría. Brevemente, cada día fueron tomados 2 µl de sangre de cada ratón infectado y coinfectado por corte de un mm de la cola. La sangre se adicionó a un tubo

Eppendorf que contenía 498 µl de reactivo de Drabkin (bicarbonato de sodio, ferricianuro de potasio y cianuro de potasio; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Posteriormente, se adicionaron 100 µl de ésta dilución en una placa de 96 pozos, la cual se analizó con un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek, Winooski USA) a 540 nm. Se calcularon los datos de la absorbancia y la concentración de Hb usando una curva estándar de Hb comercial.

### **5.7. Índice esplénico**

En el día 7 post infección con *Py* 17XL, se sacrificó a los ratones infectados y coinfectados, cada ratón se pesó, se extrajo el bazo y se pesó . El índice esplénico se calculó como la relación entre el peso del bazo y el peso corporal por ratón.

### **5.8. Obtención de antígeno soluble de *Plasmodium yoelii* 17XL (PyAg)**

El antígeno de *Py* 17XL se preparó de la forma descrita previamente [149]. Brevemente, los ratones infectados con *Py* 17XL con parasitemia entre el 20-30% recibieron eutanasia y las muestras de sangre se extrajeron mediante punción cardíaca, la sangre total se concentro en tubos heparinizados que contenían PBS 50 mM, pH 7,2. Posteriormente, la sangre se pasó a través de una columna de celulosa CF11 para eliminar los glóbulos blancos. Los glóbulos rojos fueron lavados dos veces con PBS, y luego fueron centrifugados durante 15 min a 750 g. Mediante un tratamiento con saponina al 0.06% (Merck, Alemania) en PBS, a temperatura ambiente durante 10 min, los eritrocitos fueron lisados para liberar los parásitos. Éstos fueron lavados dos veces con PBS, centrifugados durante 15 min a 18.000 g y los botones celulares fueron lisados en solución de lisis (TRITON X-100 1%, 100

mM TRIS-HCL pH 8, 5 mM EDTA). El antígeno soluble se separó por centrifugación durante 30 min a 20,000xg. y fue almacenado en condiciones estériles en alícuotas a -20 °C. La concentración de la proteína presente en el antígeno soluble se determinó con el reactivo Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA, EE. UU.), en el que se usó albumina sérica de suero como control estándar. El sobrenadante de glóbulos rojos de ratones no infectados se preparó y se usó como control.

### **5.9. Obtención de antígeno total de *T. crassiceps* (TcAg)**

El metacéstodo de *T. crassiceps* fue mantenido por pases seriados en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c hembras durante 6-8 semanas. Para la preparación del TcAg se obtuvieron los metacéstodos en condiciones de esterilidad, se suspendieron y se lavaron exhaustivamente con PBS estéril frío. Los metacéstodos completos se suspendieron en 10 mL de PBS, se sonicaron en hielo en dos rondas de 3 s cada una con el homogeneizador (Polytron PT 6100 Homogenizers, Kinematica, VWR, USA). Los homogeneizados se centrifugaron a 20 000 g durante 20 min a 4 °C, y se colectó el sobrenadante que contenía el antígeno soluble y se congeló a -80 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó utilizando el reactivo de Bradford protein kit assay (Bio-Rad).

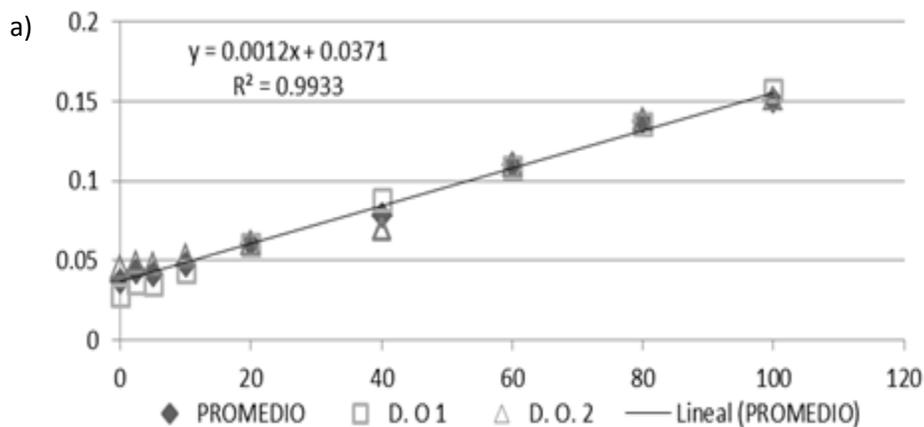
### **5.10. Cuantificación de proteínas totales de antígeno de PyAg y TcAg**

La determinación de la concentración de proteína total del Ag se realizó por el método de Lowry modificado. Brevemente, se preparó una curva patrón con albúmina sérica bovina (ICN, Biomedicals, Inc.) a partir de 100 µg para seguir

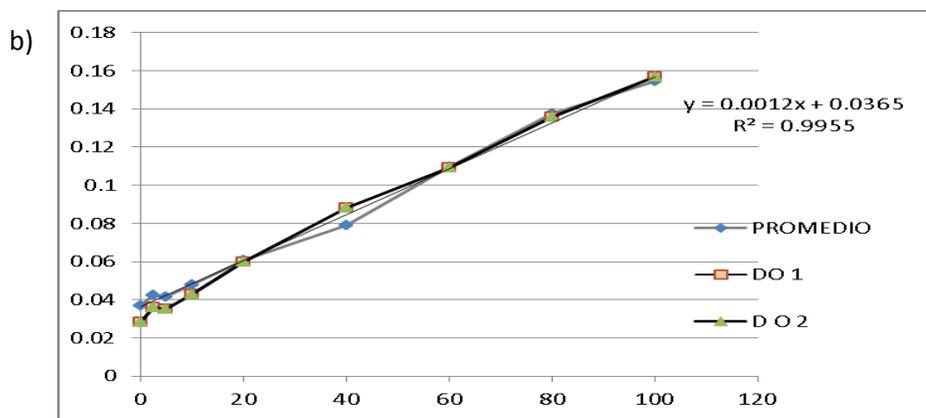
diluciones al doble (en un volumen final de 1 ml). A cada muestra obtenida de la lisis de los parásitos se le realizaron 5 diluciones diferentes en PBS: 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 y 1:50. Se preparó la solución A (Apéndice 3) y la solución B (Anexo 2). Una vez preparada la solución A se tomó 1ml de sulfato de cobre II más 1 ml de tartrato de Na y K y se agregó a la solución B y se mezclaron. Se tomaron 3 ml y se agregaron a cada tubo tanto de la curva patrón como de la muestra problema. Finalmente, a cada tubo se le adicionaron 0.4 ml del reactivo Folin Cilcateau (J.T. Baker) diluido 1:2 en agua destilada, se agitó y dejó reposar durante 30 minutos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 500 nm, se utilizó como blanco PBS. La dilución se leyó en un espectrofotómetro (epoch) utilizando el factor 1 densidad óptica (D.O.)= 40 µg.

Para la curva se utilizó la D.O. de la lectura, el promedio, la intersección y la pendiente obtenidos del programa Excel (Microsoft) y se aplicó la fórmula de la recta:  $Y = mx + b$ .

En donde  $Y = D.O.$ ,  $m =$  pendiente,  $x =$  concentración y  $b =$  intersección. Se despejó  $x = (y-b)/m$  para obtener la concentración de la dilución de cada muestra de Ag de *T. crassiceps* y de *Py 17XL*. De las concentraciones obtenidas de las 5 diluciones se calculó el promedio como la cantidad de antígeno obtenido.



Albúmina (µg/ml) <sup>b)</sup>	D. O. 1	D. O. 2	Promedio	Concentración	Dilución	mg/mL
100	0.15	0.151	0.151	72.42	50	3621
80	0.136	0.139	0.138	36.58	100	3658
40	0.109	0.110	0.110	24.92	200	4984
20	0.088	0.070	0.079	12.42	400	4968
10	0.06	0.061	0.061	10.75	800	4088
Antígeno total de <i>Taenia crassiceps</i> 4.2 mg/mL						



Albúmina (µg/ml)	D. O. 1	D. O. 2	Promedio	Concentración	Dilución	mg/mL
100	0.15	0.151	0.151	72.42	50	712.5
80	0.109	0.11	0.109	47.91	100	23.95.8
40	0.088	0.070	0.079	31.25	200	3125
20	0.060	0.061	0.060	76.25	400	762.5
10	0.043	0.053	0.048	52.91	800	2645.8
AgPy 2.228 mg/mL						

Fig. 9.- Curva patrón de albúmina, se graficaron las dos densidades ópticas obtenidas y el promedio de estas contra la concentración de albúmina. a) concentración de AgTc y b) concentración de AgPy

### **5.11. Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal**

Para la obtención de los M $\phi$  de cavidad peritoneal de ratones, se utilizó el método básico de exudado peritoneal. Este método consiste en inyectar 10 ml de solución salina estéril (Pisa) en la cavidad peritoneal de los animales dando un ligero masaje a fin de remover la mayor cantidad de M $\phi$ . Posteriormente se realizó una pequeña incisión en la piel dejando expuesta la cavidad peritoneal para extraer los M $\phi$  contenidos en la solución salina. El exudado peritoneal obtenido se colocó en tubos Falcon estériles de 15 ml y se centrifugaron a 600 x g (3500 rpm) durante 10 min. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100UI de penicilina, estreptomycin y glutamina 100x GIBCO. Una vez que el botón se resuspendió, se filtró con una malla de Nylon de 70  $\mu$ m, se tomaron 10  $\mu$ l de la suspensión, se mezclaron con 10  $\mu$ l de azul tripano (Sigma-Aldrich) y se colocaron 10  $\mu$ l en la cámara de Neubauer para cuantificar los M $\phi$  vivos. Eventualmente, el número de M $\phi$  fue ajustado a  $1 \times 10^6$  células/ml y fueron sembradas en una placa de 24 pozos fondo plano (Corning para ser estimuladas con 250 ng de LPS (Sigma-Aldrich), 25  $\mu$ g de AgTc, 25  $\mu$ g de AgPy o la combinación de ambos (25  $\mu$ g de cada antígeno).

### **5.12. Proliferación celular**

El bazo se extirpo en condiciones estériles de cada uno de los ratones infectados y coinfectados para obtener células linfoides, se obtuvieron las células linfoides por la técnica de perfusión, inyectando 5 ml de solución de Hanks fría

(Sigma) a través del bazo. Las células obtenidas se depositaron sobre una caja Petri (Corning). Los eritrocitos se eliminaron con un choque osmótico con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (SIGMA), y las células restantes se centrifugaron durante 3 min a  $250 \times g$ , Posteriormente se lavaron tres veces con Hanks frío por centrifugación a  $520 g$  durante 5 min. Se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino/estreptomicina, 1% de aminoácidos esenciales. 25 mM de buffer Hepes, y 0.5% de L--Glutamina (marca Gibco). Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de esta suspensión celular para determinar el número total y la viabilidad por exclusión del colorante vital azul tripano en la cámara de Neubauer. Las células se ajustaron a  $5 \times 10^6/\text{ml}$  y se sembraron 100 $\mu\text{l}$  de cada muestra por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos (Costar). Posteriormente, se estimularon con 100 $\mu\text{l}$  de una solución de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Con-A (Sigma) disueltos en una solución saturada de NaCl, esterilizada por filtración y cuantificada por coeficiente de extinción con luz ultravioleta a 280 nm; otras células fueron estimuladas con el PyAg (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las placas se incubaron a 37 °C en 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72 h. Durante las últimas 18 h de cultivo las células se incubaron con 0.5 $\mu\text{Ci}$  de timidina tritiada ( $(\text{H}^3)$  TdR New England Nuclear) en 10 $\mu\text{l}$  de medio RPMI suplementado. Posteriormente, las células se cosecharon en papel de fibra de vidrio (Whatman), y se procesaron para determinar la incorporación de radioactividad tanto en las células estimuladas de los grupos infectados como en las de los grupos controles. El nivel de estimulación se determinó mediante la fórmula: cuentas por minuto (CPM) de las células estimuladas menos CPM de las células no estimuladas.

### **5.13. Obtención de esplenocitos**

A los 7 días postinfección, los ratones infectados y coinfectados se sacrificaron y en condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar, se extrajo el bazo y se depositó en una caja Petri estéril. Posteriormente, se separaron las células del tejido y se maceraron en separadores celulares (B.D. Falcon, cell strainer) con émbolos estériles de jeringas y fueron colectadas en tubos Falcon estériles de 15 ml (marca Nalgen, Nunc Int). Las células se centrifugaron a 250 g por 10 min y luego fueron incubadas en 5 ml de solución de lisis (Apéndice 5) durante 15 min para eliminar los eritrocitos restantes. Después de centrifugar durante 1 min a 1500 rpm el sobrenadante se decantó. A las células libres de eritrocitos se les agregaron 5 ml de medio D-MEM (Gibco, suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10 % SFB y streptomina) para homogeneizar. Para contar las células viables se adicionaron 10 µl de azul tripano a 10µl de la muestra. En la cámara de Neubauer se colocaron 10µl con micropipeta estéril del homogeneizado y se contaron cinco cuadrantes para obtener el número de células por mililitro, después se ajustó la suspensión células a  $5 \times 10^3$  células por pozo.

### **5.14. Obtención del suero.**

De los ratones infectados y coinfectados con *Plasmodium* se obtuvo sangre en los días 0 y 7 postinfección. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Philips), para inducir la dilatación en la vena caudal y de esta manera facilitar el sangrado. Se realizó un corte con un bisturí y se obtuvieron de 500 a 700 µL de sangre en tubos Eppendorf. La sangre se centrifugó durante 10 min a 420 g de 2 a

3 veces. Se obtuvo el suero, que se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para la determinación de citocinas.

#### **5.15. Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sandwich)**

La concentración de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  □ □ IL-4 e IL-10 en los sueros y sobrenadantes de los esplenocitos y de los M $\phi$  de los diferentes grupos de ratones se evaluó por medio de la técnica de ELISA sándwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Pharmingen, Peprotech y Biolegend). En todos los casos el procedimiento fue similar, se siguieron las especificaciones del proveedor descritas en [150]. Descripción general y breve del procedimiento.

**Sensibilización de la placa.** El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$  en amortiguador de fosfatos (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 9, J.T. Baker) para cada una de las citocinas (purified anti-mouse IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-12, TFN- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ ). Se adicionaron 100 $\mu\text{l}$ /pozo del anticuerpo de captura a cada placa de 96 pozos para ELISA (Nunc Maxisorp) y se incubó toda la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

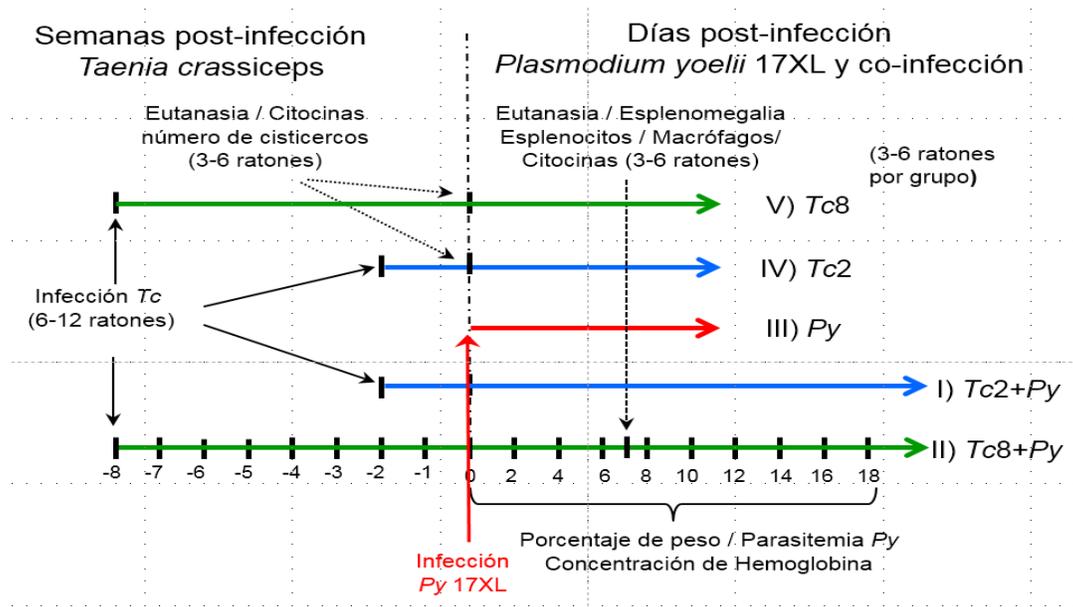
**Muestras y curva.** Posterior a la incubación, la placa se lavó 4 veces con solución de lavado (PBS-tween-20 al 0.05%, Sigma. Se le adicionaron 100 $\mu\text{l}$  por pozo de amortiguador de bloqueo (PBS-BSA 3%) se incubó a temperatura ambiente por 2 h y posteriormente se lavó cuatro veces con una solución de lavado (PBS-Tween), y se adicionaron 50  $\mu\text{l}$ /pozo de cada muestra a determinar por duplicado, se utilizó como control una curva de interleucinas recombinante murina en diluciones seriadas 1:2 en amortiguador de bloqueo iniciando con una concentración de 2000pg/ml (Phamingen). Cada placa se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

**Revelado.** Después de la incubación cada placa se lavó 4 veces con amortiguador de lavado (PBS-Tween), y se secó por aspiración. Se adicionó el anticuerpo de detección para cada citocina marcado con biotina correspondiente a una concentración de 2 µg/ml en amortiguador de bloqueo (Pharmingen). La placa se incubó a temperatura ambiente por 1 h y se lavó 5 veces con solución de lavado. Se adicionaron 6µl/pozo del conjugado de estreptavidina/peroxidasa (BioRad) a una dilución de 1:2000 en amortiguador de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente por 45 min. Posteriormente, se lavó cuatro veces con amortiguador de lavado y se adicionó 100 µl/pozo de sustrato ABTS recientemente preparado (Sigma) (0.5% ABTS en 0.1M ácido cítrico anhidro, pH 4.35 con NaOH más 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, todos los reactivos fueron de marca Sigma). La densidad óptica se determinó entre los primeros 30 min de iniciada la reacción en un lector de placas de ELISA (SpéctraMax 250, Molecular Devices) a 405nm.

#### **5.16. Análisis estadístico**

La normalidad se analizó con la prueba de Fisher-Pearson con el coeficiente del tercer momento estándar. La homogeneidad de los datos para el cálculo de la varianza se analizó con la prueba de Levene's. Cuando la heterogeneidad de la varianza fue detectada, se usó ANOVA con la prueba pos Welch's. La parasitemia, la masa corporal y los datos de concentración de hemoglobina analizaron con la prueba de ANOVA para mediciones repetidas. El índice esplénico y las diferencias en los niveles de citocinas y la proliferación celular de esplenocitos se analizaron mediante ANOVA y la prueba de Fisher's LSD se utilizó para múltiples comparaciones. Los datos de supervivencia se analizaron usando Log-rank Mantel-Cox

test. Un valor de  $p < 0.05$  se considero como estadísticamente significativo, (a) comparado con el grupo no infectado, (b) comparado con el grupo *Tc2*, (c) comparado con el grupo *Tc8*, (\*) comparado con el grupo infectado con *Py* 17XL, y (&) comparado con el grupo coinfectado *Tc2+Py* para hacer los cálculos se utilizó el software SAS 9.



**Fig. 10. Diseño experimental.** Ratones hembras BALB/cAnN de seis a ocho semanas fueron infectados por vía i.p. con 10 metacístodos de *T. crassiceps* (*Tc*). A las 2 (*Tc2*) o 8 (*Tc8*) semanas postinfección, los ratones se coinfectaron con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *Py* 17XL (*Tc2+Py* o *Tc8+Py*, respectivamente). *Py* 17XL, *Tc2*, *Tc8* y ratones no infectados se utilizaron como control. Para la cuantificación de los cisticercos de la cavidad peritoneal y de las citocinas en suero, grupos de ratones no infectados, ratones infectados con *Tc2* y *Tc8* fueron sacrificados y sangrados por punción cardíaca a las 2 y 8 semanas postinfección (3-5 ratones por grupo, dos experimentos independientes). Se determinó la sobrevivencia de todos los grupos de ratones *Tc2+Py*, *Tc8+Py*, y *Py* 17XL (3-5 ratones por grupo, dos experimentos independientes). La concentración de hemoglobina y el peso corporal de los ratones se determinó diariamente post infección con *Py* 17XL. Para determinar la concentración de citocinas en Mφ peritoneales y esplenocitos, así como la proliferación celular en los grupos de ratones *Tc2+Py*, *Tc8+Py*, *Py* 17XL, *Tc2*, *Tc8* y ratones no infectados, los

cultivos se realizaron el día 7 post infección con *Py* 17XL (tres experimentos independientes, 3-5 ratones por grupo).

## 6. RESULTADOS

Los resultados experimentales de este trabajo de tesis doctoral se publicaron en una revista internacional indexada en el ICR, "Co-infection: the outcome of *Plasmodium* infection differs according to the time of pre-existing helminth infection. **Parasitology Research**;117(9): 2767-2784.doi.org/10.1007/s00436-018-5965-9. ISSN: 0932-0113. Impact Factor: 2.558/Q 2. (Apéndice 2). Además anexamos resultados que no fueron publicados.

A continuación describo los resultados del artículo de investigación (Apéndice 2).

### **6.1. La infección aguda con *T. crassiceps* induce un perfil inmune del tipo Th1, mientras que la infección crónica genera un perfil inmune del tipo Th2.**

Determinamos los cambios en el perfil inmunológico *in vivo* presente durante la infección por *T. crassiceps*. Como se muestra en la tabla 6, los ratones infectados con *T. crassiceps* por 2 semanas (*Tc2*) mostraron una polarización de la respuesta inmune hacia un perfil tipo Th1, que se caracterizó por un incremento significativo en las concentraciones de las citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en comparación con los ratones no infectados (<sup>a</sup>p <0.05) o infectados con *Tc8* (<sup>c</sup>p <0.05), lo cual se asoció a una restricción en la replicación del metacestodo (Tabla 5). A medida que la infección progresa, los ratones infectados con *T. crassiceps* por 8 semanas (*Tc8*) mostraron un perfil inmune del tipo Th2, caracterizado por concentraciones elevadas de IL-4 e IL-10 en comparación con los ratones no infectados (<sup>a</sup>p <0.05) o

infectados con *Tc2* (<sup>b</sup>p <0.05), lo cual se asoció a una alta tasa de replicación del parásito de *T. crassiceps* en la cavidad peritoneal (<sup>b</sup>p <0,05). Con este resultado corroboramos que durante la infección por *T. crassiceps* se genera un switch de una respuesta inicial Th1 a una respuesta tardía Th2, el cual depende de la progresión de la infección.

Semanas post infección	Número de Parásitos	IL-12 pg/mL	TNF- $\alpha$ pg/mL	IFN- $\gamma$ pg/mL	IL-4 pg/mL	IL-10 pg/mL
0	0	203 $\pm$ 12	90 $\pm$ 24	32 $\pm$ 6	151 $\pm$ 16	154 $\pm$ 46
2	4 $\pm$ 2	1008 $\pm$ 298 <sup>a,c</sup>	214 $\pm$ 14 <sup>a,c</sup>	1193 $\pm$ 188 <sup>a,c</sup>	391 $\pm$ 185	1124 $\pm$ 578 <sup>a</sup>
8	440 $\pm$ 38 <sup>b</sup>	457 $\pm$ 81	146 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	241 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	4916 $\pm$ 563 <sup>a,b</sup>	4192 $\pm$ 423 <sup>a,b</sup>

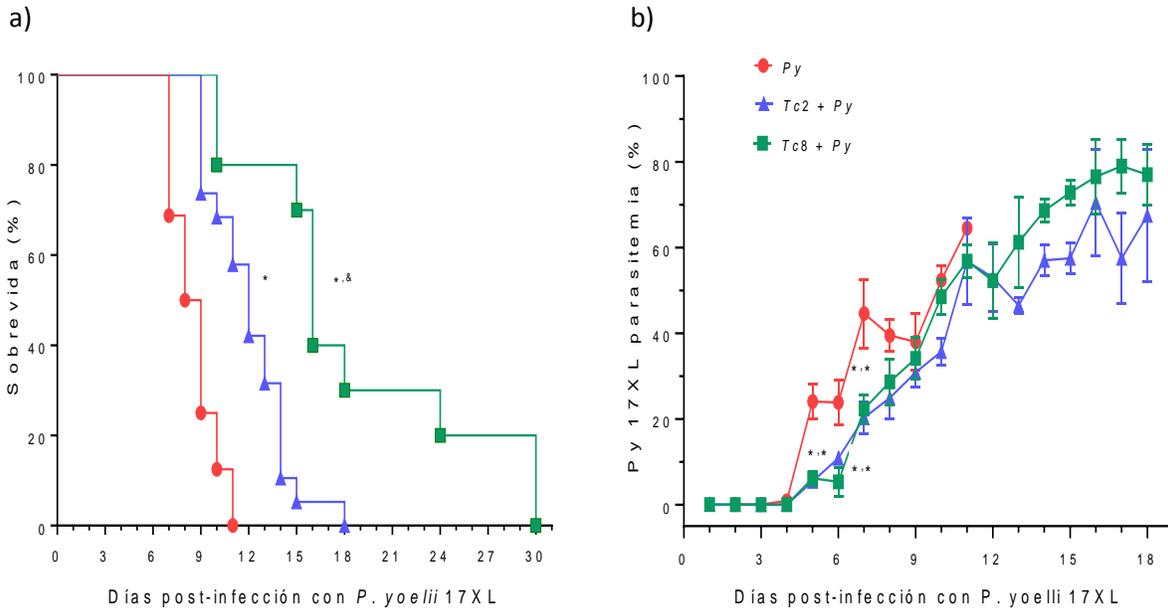
Tabla 5. Carga parasitaria y concentración de citocinas en suero (IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) a la semana 2 y 8 postinfección con *T. crassiceps*. La concentración de citocinas se evaluó en suero por la técnica de ELISA (O.D. 405 nm). Los valores representan la media  $\pm$  SEM y son representativos de 3 experimentos independientes, de al menos seis ratones por grupo. Los valores de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos, <sup>a</sup> comparado con el grupo no infectado, <sup>b</sup> comparado con el grupo *Tc2*, <sup>c</sup> comparado con el grupo *Tc8*.

## 6.2. La coinfección con *T. crassiceps* retrasa la replicación de *P. yoelii* 17XL y retrasa la mortalidad del hospedero

Una vez que los ratones infectados con *Tc2* y *Tc8* (perfil inmune del tipo Th1 o tipo Th2, respectivamente), se coinfectaron vía iv. con 10<sup>3</sup> eritrocitos parasitados con *Py* 17XL (*Tc2+Py* o *Tc8+Py*). Durante la evolución de la coinfección se evaluó la parasitemia por *Py* 17XL y la sobrevivencia en todos los grupos de ratones infectados. La severidad de la patología en la infección por *Plasmodium* depende de la densidad de la parasitemia [26]. La parasitemia se determinó con el propósito de analizar si una infección previa aguda o crónica con *T. crassiceps* afectaría el número de parásitos en sangre generado por *Py* 17XL. De manera interesante, en la Fig 11a se observa que en los ratones coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py* la parasitemia

disminuyó significativamente en los días 5, 6 y 7 postcofección en comparación con los ratones infectados únicamente con *Py* 17XL (\*p <0.5). Sin embargo, desde el día 8 hasta el día 11 postcofección, los ratones coinfectados desarrollaron niveles similares de parasitemia a los desarrollados en los ratones infectados solo con *Py* 17XL (Fig. 11a). Cabe destacar que los ratones infectados solo por *Py* 17XL desarrollaron un pico de parasitemia del 64.5% en el día 11, mientras que, los ratones coinfectados desarrollaron niveles más altos de parasitemia, es decir, los ratones coinfectados con *Tc2+Py* desarrollaron un pico máximo de parasitemia del 67.5% y los ratones coinfectados con *Tc8+Py* alcanzaron un pico de parasitemia del 77% en el día 18 postcofección pero sin diferencias estadísticas entre los dos grupos,. además, los ratones infectados solo con *Py* 17XL, empezaron a morir a partir del séptimo día postinfección, hasta llegar al deceso de todos los ratones en el día 11 (mediana = 8,5 días; IC del 95%). Por el contrario, la tasa de sobrevivida de los ratones coinfectados con *Tc2+Py* fue del 58% en el día 11 (\*p <0,05), en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (mediana = 12 días IC del 95%) (Fig. 11b); sin embargo, los ratones de este grupo no sobrevivieron después del día 18 postcofección. Sorprendentemente, los ratones coinfectados con *Tc8+Py* mostraron un incremento notable en la tasa de sobrevivida dado que el 80% de los ratones sobrevivieron el día 11 postcofección en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (\*p <0.05) y un incrementó en la sobrevivida del 30% comparado con los ratones coinfectados con *Tc2+Py* (&p < 0.05), (mediana= 12 días 95% CI). Notablemente, algunos de estos ratones sobrevivieron hasta el día 30 post cofección (Fig. 11b). Estos hallazgos demuestran que la presencia previa de *T. crassiceps* no solo retrasa la replicación de *Plasmodium* sino que también

retrasa la mortalidad temprana generada por la infección por *Py* 17XL. Además, la mortalidad es independiente de la replicación (porcentaje de parasitemia) de *Py* 17XL.



**Fig. 11. La infección con *T. crassiceps* retrasa la replicación del plasmodio y retrasa la letalidad de la infección con *P. yoelii* 17XL.** Los ratones BALB/c se infectaron vía i.p. con 10 metacístodos de *T. crassiceps*, después de 2 (*Tc2*) u 8 (*Tc8*) semanas de postinfección, se coinfectaron vía i.v con  $10^3$  eritrocitos parásitos con *Py* 17XL (*Tc2+Py* o *Tc8+Py*, respectivamente). La parasitemia *Py* 17XL a), se expresa en el porcentaje de eritrocitos parasitados con *Py* 17XL y los valores indican la media geométrica  $\pm$  DE. Mortalidad acumulada de cada grupo experimental b), los datos se expresan como mean  $\pm$  SEM y son representativos de 4 experimentos independientes (5 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. La comparación entre grupos se realizó con las pruebas “t” de student y con Log-rank (Mantel-Cox) Test, respectivamente, (\*) en comparación con el grupo infectado únicamente con *Py* 17XL y (&) comparado con el grupo *Tc2+Py*.

### 6.3. La infección crónica con *T. crassiceps* previene la caquexia y reduce la pérdida de hemoglobina asociada a la infección por *P. yoelii* 17XL

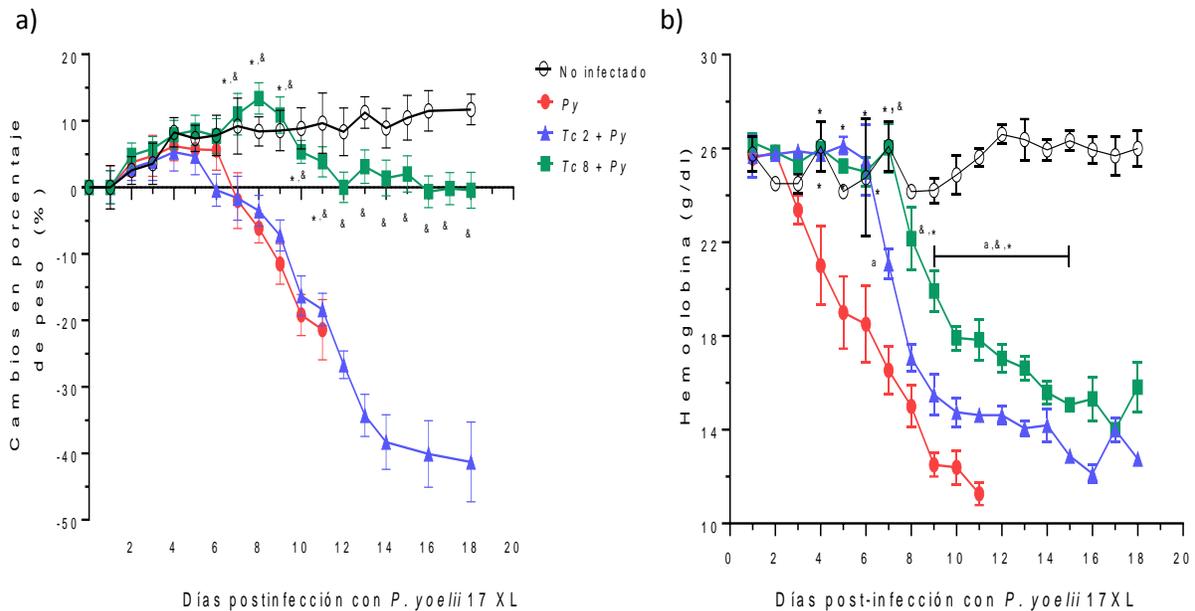
Para comprender cómo la infección previa por *T. crassiceps* incrementa la sobrevivida de los ratones infectados con *Py* 17XL, evaluamos algunos parámetros

relacionados con la patología y la severidad de la infección por *Plasmodium* como la caquexia [151] y la anemia postcofección [152].

Para determinar si la infección con *T. crassiceps* tendría efecto sobre la caquexia, se analizó la pérdida de peso corporal durante la cofección. Los ratones infectados solo con *Py* 17XL perdieron peso de forma gradual, desde el día 6 hasta el día 11 postcofección. Al momento de la muerte los ratones habían perdido aproximadamente el 21% de su peso (Fig. 12a). De la misma forma, en los ratones cofeccionados con *Tc2+Py* se observó un efecto similar al observado en el grupo infectado solo con *Py* 17XL, estos ratones perdieron aproximadamente el 20% de su peso desde el día 6 hasta el día 11 post cofección. Sin embargo, como se mostró antes, los ratones de este grupo no murieron en el día 11, a pesar de que continuaron perdiendo peso murieron hasta el día 18 postcofección (Fig. 12a). Sorprendentemente, los ratones cofeccionados con *Tc8+Py* no solo no perdieron peso, sino que además ganaron peso en los días 7-8 postcofección en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (\* $p < 0.05$ ) y los ratones cofeccionados con *Tc2+Py* (& $p < 0.05$ ). No obstante, después del día 9 postcofección, estos ratones comenzaron a perder peso, aunque significativamente menos en comparación con el grupo cofeccionado con *Tc2+Py* (& $p < 0.05$ ) (Fig. 12a).

La anemia severa es una de las principales causas de muerte en la infección con *Plasmodium* [153, 154]. Se cuantificó la concentración de Hb en los ratones infectados solo con *Py* 17XL y cofeccionados para determinar si la infección con *T. crasiceps* modifica la anemia generada por *Py* 17 XL.

Nuestros resultados demuestran que los ratones infectados solo con *Py* 17XL presentaron una disminución notable en los niveles de hb entre los días 3 y 11 postcoinfeción. En contraste, los ratones coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py* no redujeron la concentración de hb durante los primeros seis y siete días postcoinfeción, respectivamente (Fig. 12b). Sin embargo, después del día siete postcoinfeción, los ratones *Tc2+Py* disminuyeron significativamente su concentración de hb, de forma similar a lo observado en los ratones infectados solo con *Py* 17XL (Fig. 12b). Cabe destacar que a partir del día ocho postcoinfeción, los ratones coinfectados *Tc8+Py* mostraron una reducción progresiva y significativa de la concentración de Hb ( $p < 0.05$ ). No obstante, su concentración de hemoglobina fue significativamente mayor desde el día 8 al 16 en comparación con los ratones coinfectados *Tc2+Py* ( $p < 0.05$ ). Estos datos indican que una infección crónica con *T. crassiceps*, pero no la aguda, previene el desarrollo de la caquexia por *Py* 17XL y retrasa significativamente la anemia. Además, la anemia fue independiente de la parasitemia dado que todos los ratones desarrollan parasitemias similares pero la concentración de Hb fue distinta. Por lo tanto, estos datos apoyan la idea de que la infección crónica por *T. crassiceps* reduce la patología causada por la infección con *Py* 17XL.



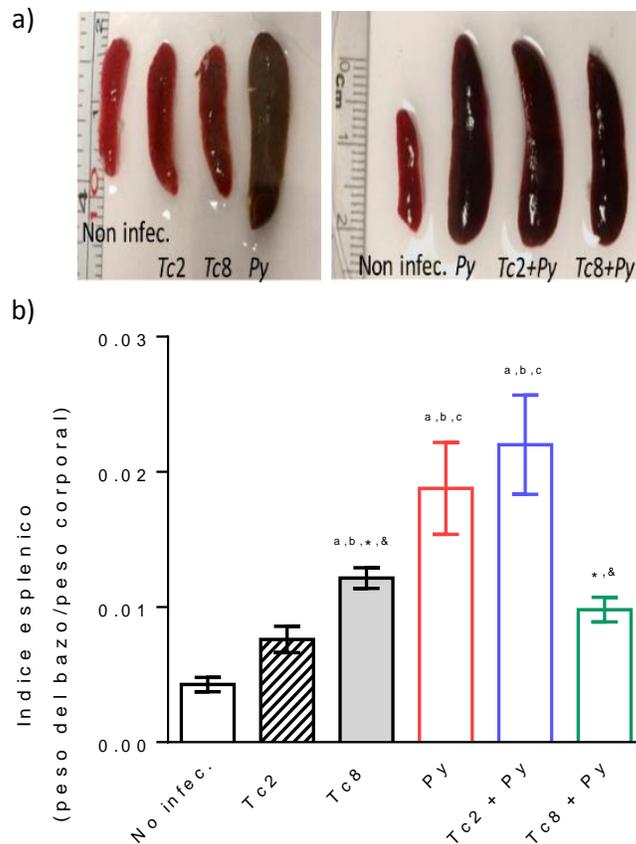
**Fig. 12. La infección crónica con *Taenia crassiceps* reduce la patología de la infección por *P. yoelii* 17XL.** Los ratones BALB/c se infectaron vía i.p. con 10 metacístodos de *T. crassiceps*, después de 2 (*Tc2*) u 8 (*Tc8*) semanas post infección, se coinfectaron vía i.v. con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *Py* 17XL (*Tc2+Py* o *Tc8+Py*, respectivamente). Porcentaje de peso corporal a), El peso inicial de cada ratón se consideró como el 100%, el cambio en el porcentaje de peso se calculó en relación al peso inicial de cada animal en el día 0. La concentración de hemoglobina b) se cuantificó por el método de la cianometahemoglobina y los resultados se expresan en g/dL. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM y son representativos de 4 experimentos independientes (5 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (\*) o con el grupo infectado únicamente con *Py* 17XL, y (&) en comparación con el grupo *Tc2+Py*.

#### 6.4. La infección crónica con *T. crassiceps* reduce el desarrollo de esplenomegalia durante la infección por *P. yoelii* 17XL

La excesiva respuesta proinflamatoria generada por la infección con *Plasmodium* puede promover el desarrollo del Síndrome de esplenomegalia hiperreactiva (HMS) y con ello el desarrollo de anemia [155]. Nos preguntamos

entonces si la infección con *T. crassiceps* modifica la esplenomegalia inducida por *Py* 17XL, determinada a través del índice esplénico en el día 7 postcofección en todos los grupos experimentales.

Los ratones infectados solo con *Py* 17XL y los coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py* desarrollaron un aumento significativo en el tamaño del bazo en comparación con los ratones infectados solo con *Tc2*, *Tc8* (Fig. 13a). Cuando se calculó el índice esplénico, los ratones coinfectados con *Tc2+Py* presentaron un índice esplénico similar al de los ratones infectados solo con *Py* 17XL, y ambos desarrollaron esplenomegalia significativamente mas severa en comparación con los ratones infectados solo con *Tc2* y *Tc8*. De manera notable, los ratones coinfectados con *Tc8+Py* desarrollaron una esplenomegalia significativamente menor que los ratones infectados solo con *Py* 17XL y coinfectados con *Tc2+Py* (Fig. 13b; \*,&p < 0.05). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la infección crónica con *T. crassiceps* reduce el desarrollo de esplenomegalia causada por la infección con *Py* 17XL.



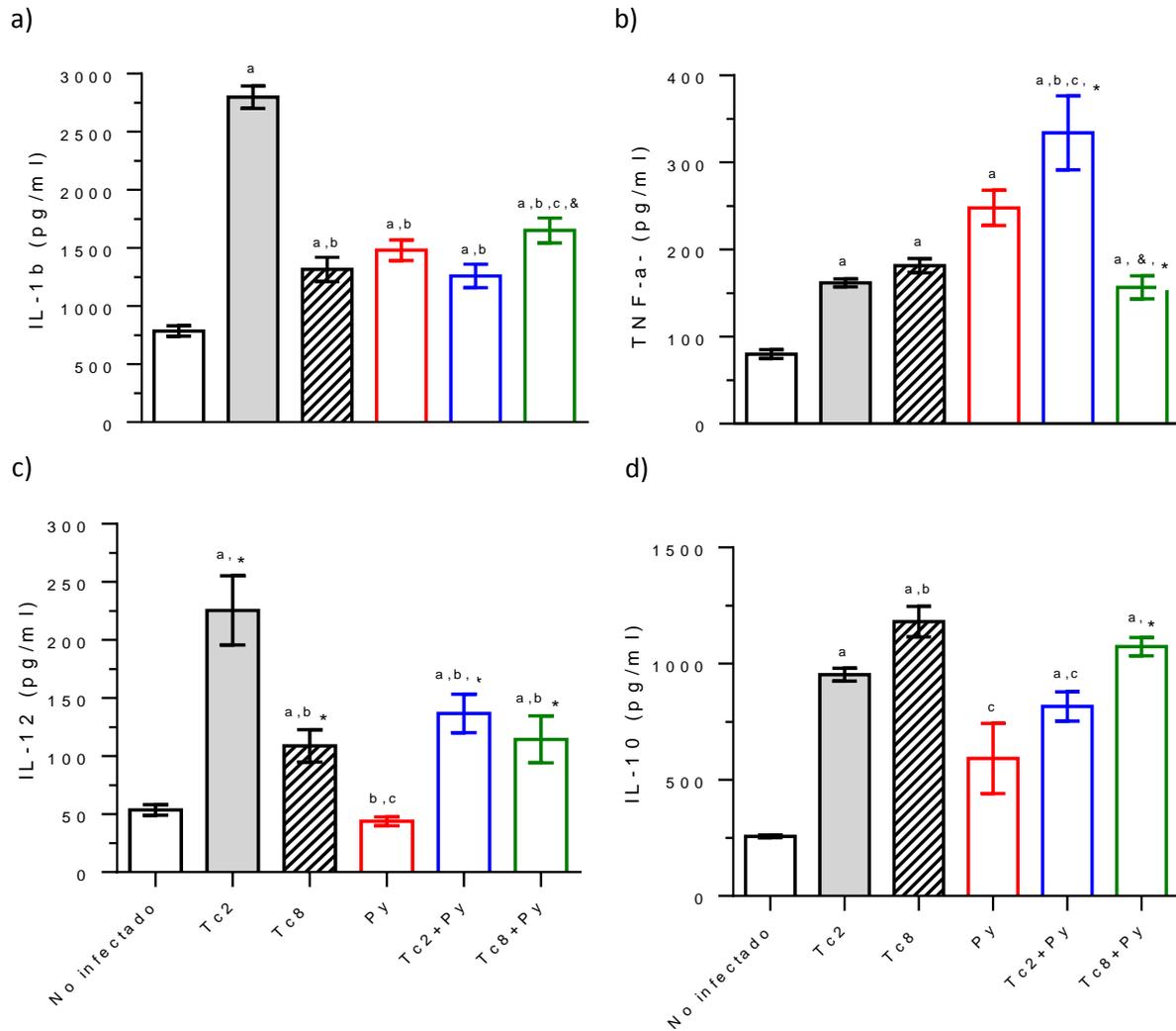
**Fig. 13. La infección crónica con *T. crassiceps* reduce el desarrollo de esplenomegalia por la infección con *Py. 17XL*.** Los ratones BALB/c se infectaron vía i.p. con 10 metacístodos de *T. crassiceps*, después de 2 (*Tc2*) u 8 (*Tc8*) semanas de infección, se coinfectaron vía i.v con  $1 \times 10^3$  eritrocitos parasitados con *Py 17XL* (*Tc2+Py* o *Tc8+Py*, respectivamente). Fotografía de bazos representativos a), y el índice esplénico b) de ratones infectados por *Py 17XL* y coinfectados por *Tc2+Py* o *Tc8+Py* a los 7 días post coinfección. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM y son representativos de tres experimentos independientes (5 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación contra el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo *Tc2*, (c) en comparación con el grupo *Tc8*, (\*) en comparación con el grupo *Py 17XL*, y (&) y comparado con el grupo *Tc2+Py*.

### 6.5. La coinfección crónica con *T. crassiceps* + *P. yoelii 17XL* promueve la producción de la IL-12 e IL-10, y disminuye la producción de TNF- $\alpha$ de los macrófagos estimulados con el *PyAg*

La respuesta inmune innata mediada por los M $\phi$  juega un papel importante en el control de la replicación de *Plasmodium* y la anemia durante la infección aguda

por *Py* 17XL [35]. Para determinar si la infección con *T. crassiceps* podría modificar la respuesta inmune de los M $\phi$  a la infección por *Py* 17XL, los M $\phi$  peritoneales se aislaron a los 7 días postco infección y se restimularon *in vitro* con *Py*Ag, y se evaluó la concentración de citocinas.

El análisis de citocinas en sobrenadantes M $\phi$ , reveló que los M $\phi$  de los ratones infectados solo con *Py* 17XL producen concentraciones significativamente más altas de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , pero concentraciones similares de IL-12 e IL-10 en comparación con los M $\phi$  de ratones no infectados (Fig. 14a, b, c d; <sup>a</sup>p < 0.05). Cuando se analizó el efecto de la coinfección, se observó que los M $\phi$  de los ratones coinfectados *Tc8+Py* producen significativamente menos TNF- $\alpha$  que los M $\phi$  de los ratones coinfectados con *Tc2+Py* (<sup>&</sup>p < 0.05) y los M $\phi$  de los ratones infectados solo con *Py* 17XL (Fig. 14b; \*p < 0.05). De manera interesante, la deficiencia en la síntesis de IL-12 de los M $\phi$  de ratones infectados solo con *Py* 17XL, se restauró en los M $\phi$  de ratones coinfectados *Tc2+Py* y *Tc8+Py* (Fig. 14c, \*p < 0.05). Además, la concentración de IL-10 en ratones coinfectados *Tc8+Py* aumentó significativamente en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (Fig. 14d; \*p < 0.05). Estos resultados demuestran que la coinfección con *Tc8+Py* favoreció la síntesis de IL-12 y de IL-10, y disminuyó la síntesis de TNF- $\alpha$  en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL.



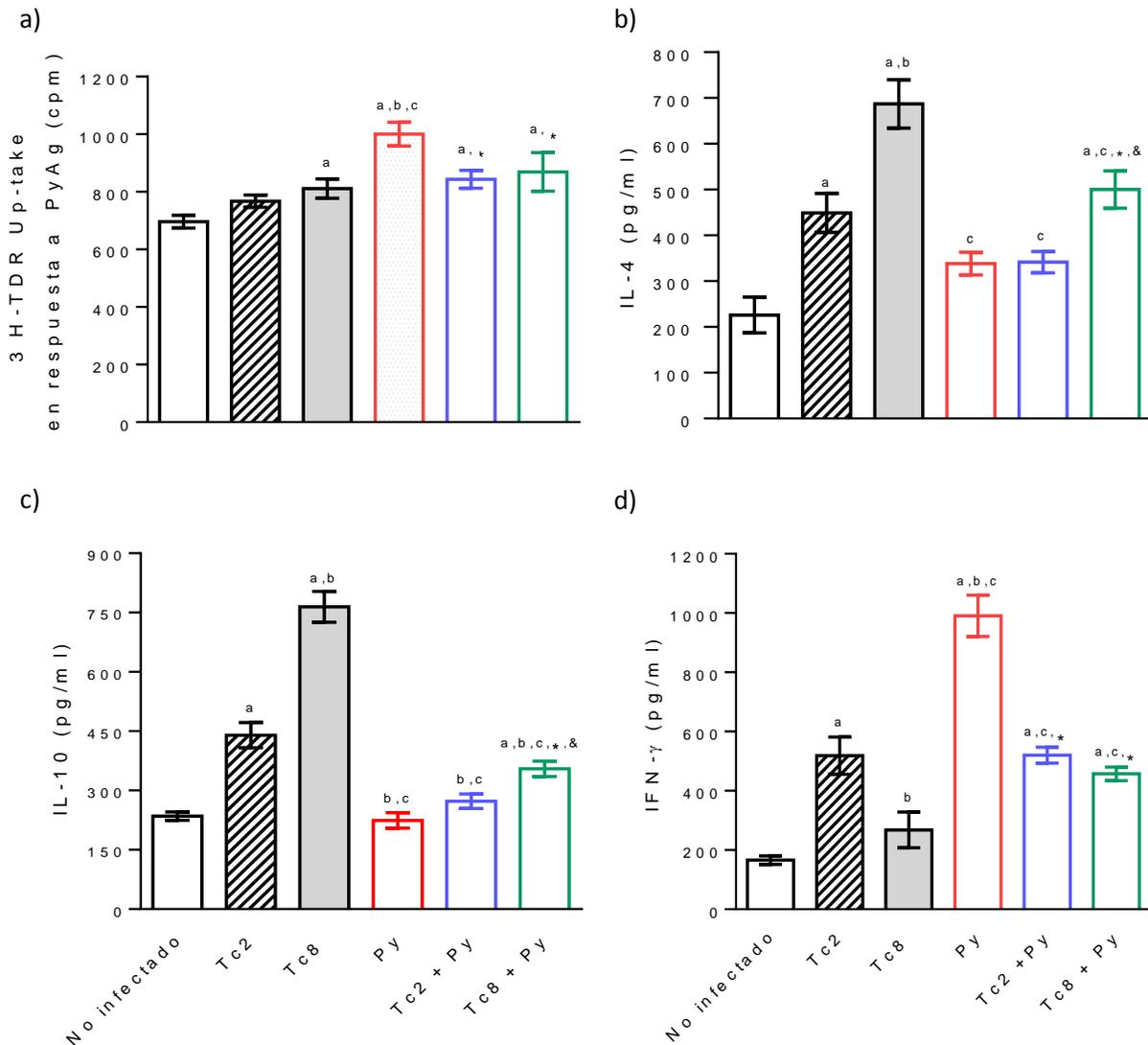
**Fig. 14** La coinfección crónica con *T. crassiceps*/*P. yoelii* 17XL promueve la síntesis de IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-10 y disminuye la síntesis de citocinas en macrófagos estimulados con PyAg. Los M $\phi$  peritoneales de ratones infectados solo con Py 17XL, Tc2, Tc8 o coinfectados con Tc2+Py y Tc8+Py fueron aislados y estimulados con el PyAg (25  $\mu$ g/mL) en el día siete post coinfección. Se cuantificó la concentración de citocinas: a) IL-1 $\beta$ , b) TNF- $\alpha$ , c) IL-12 y d) IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de M $\phi$ . Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM y son representativos de tres experimentos independientes (5 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo Tc2, (c) en comparación con el grupo Tc8, (\*) en comparación con el grupo infectado únicamente con Py 17XL, y (&) comparado con el grupo Tc2+Py.

**6.6. La coinfección crónica con *T. crassiceps* + *P. yoelii* 17XL afecta la respuesta linfoproliferativa, pero promueve la síntesis de IL-4 e IL-10 específicos a PyAg.**

Para determinar si la infección previa con *T. crassiceps* modula la respuesta linfoproliferativa durante la coinfección, los esplenocitos de ratones coinfectados con *Tc2*+Py o *Tc8*+Py se obtuvieron en el día 7 post coinfección con *Py* 17XL, los esplenocitos de ratones no infectados e infectados solo con *Py* 17XL, *Tc2* y *Tc8* se utilizaron como control. Los esplenocitos se estimularon con el *PyAg* o con Con-A, posteriormente, se midió la respuesta linfoproliferativa por incorporación de Timidina tritiada ( $^3\text{H-TdR}$ ), a las 72 h o 5 días del cultivo celular, respectivamente; se cuantificó la concentración de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos.

Los esplenocitos de ratones infectados solo con *Py* 17XL presentaron una respuesta proliferativa a *PyAg* significativamente mayor que los esplenocitos de los ratones no infectados ( $^a\text{p} < 0.05$ ), *Tc2* ( $^b\text{p} < 0.05$ ) y *Tc8* ( $^c\text{p} < 0.05$ ). Es importante destacar que no se detectaron diferencias significativas en la respuesta proliferativa entre los ratones coinfectados con *Tc2*+Py, *Tc8*+Py y los ratones infectados solo con *Tc2* y *Tc8* (Fig. 15a). Sin embargo, se detectaron diferencias en la concentración de citocinas; los esplenocitos de los ratones coinfectados solo con *Py* 17XL y estimulados con *PyAg* presentaron concentraciones significativamente más elevadas de IFN- $\gamma$  que los esplenocitos de los ratones no infectados (Fig. 15d;  $^a\text{p} < 0.05$ ), pero presentaron concentraciones similares de IL-4 e IL-10 en comparación con los ratones no infectados (Fig. 15b, c). Los esplenocitos de los

ratones coinfectados con *Tc2+Py* también presentaron niveles similares de IL-4 e IL-10 que los que se detectaron en los esplenocitos de los ratones no infectados (Fig. 15b, c). Sin embargo, presentaron menor concentración de IFN- $\gamma$  que los esplenocitos de los ratones infectados solo con *Py* 17XL (Fig. 15d; \*p < 0.05). De manera interesante, los esplenocitos de los ratones coinfectados con *Tc8+Py* produjeron concentraciones más altas de IL-4 e IL-10 (Fig. 15b c, \*p < 0.05) y una marcada disminución en la concentración de IFN- $\gamma$  que los ratones infectados únicamente con *Py* 17XL (Fig. 15d; \*p < 0.05). Estos resultados demuestran la coinfección con *Tc8+Py* disminuyó la respuesta proliferativa de los esplenocitos pero sintetizaron sintetizaron IL-4 e IL-10 en respuesta al estímulo con el *PyAg*.



**Fig. 15 La coinfección crónica con *T. crassiceps* / *P. yoelii* 17XL promueve la síntesis de IL-4 e IL-10 en los esplenocitos estimulados con PyAg.** Los esplenocitos de los ratones infectados solo con *Py* 17XL, *Tc2*, *Tc8* o coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py* se obtuvieron y se estimularon con *PyAg* (25 µg/mL) en el día 7 postcoinfección. La proliferación celular (a), los esplenocitos fueron aislados y estimulados con *PyAg* por 5 días. La concentración de citocinas: IL-4 (b), IL-10 (c), IFN-γ (d) en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos se midió mediante ELISA. Las barras representan la media ± SEM de la incorporación de 3H-TDR de dos experimentos independientes. En b), c), y d) los datos se expresan como la media ± SEM y son representativos de tres experimentos independientes con al menos 5 ratones, por grupo. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo *Tc2*, (c) en comparación con el grupo *Tc8*, (\*) en comparación con el grupo *Py* 17XL, y (&) comparado con el grupo *Tc2+Py*.

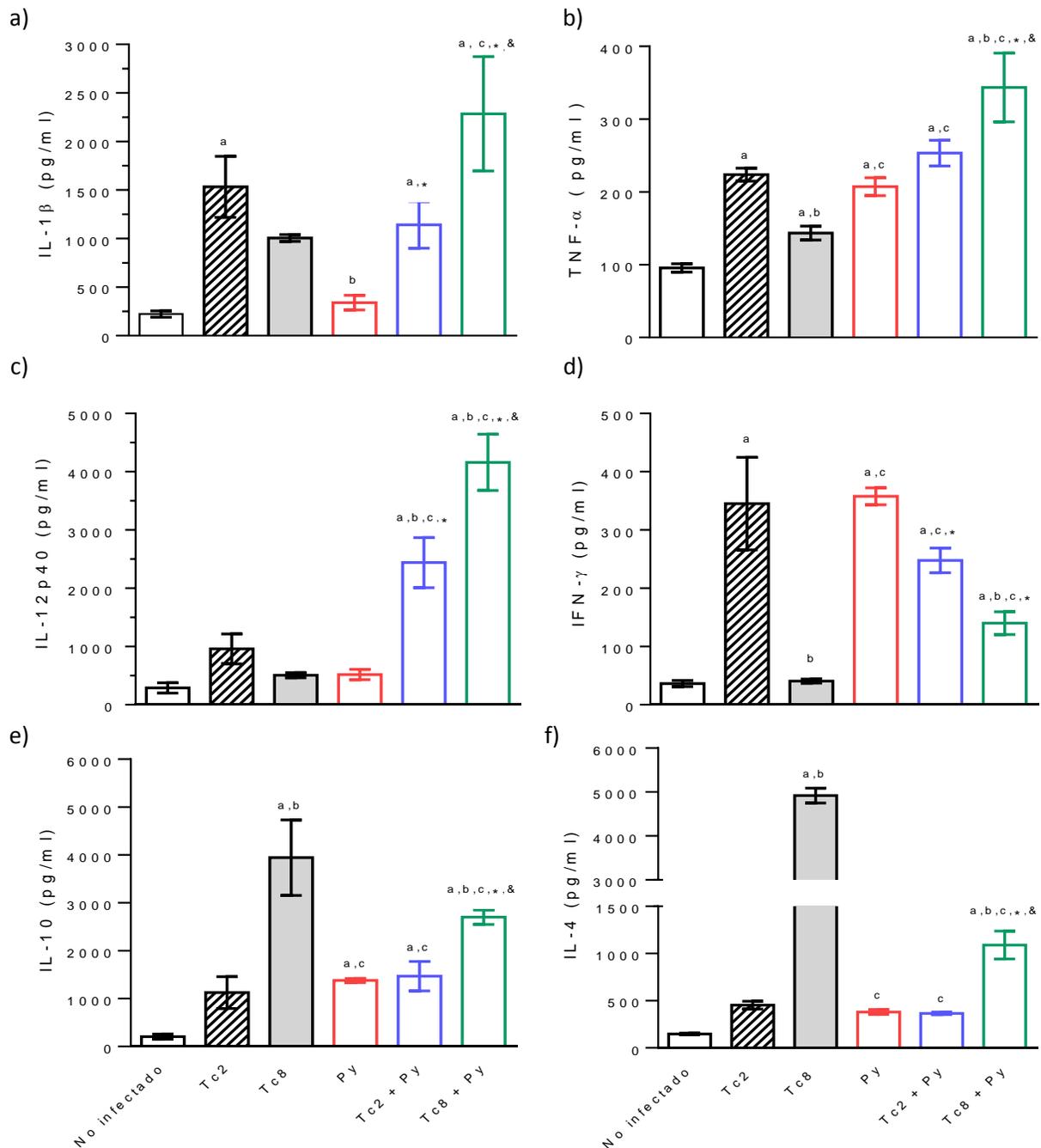
### **6.7. La coinfección crónica con *T. crassiceps* - *P. yoelii* 17XL incrementó la síntesis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 e IL-10 y redujó la síntesis de IFN- $\gamma$**

Para determinar si la infección previa con *T. crassiceps* modificó a nivel sistémico la concentración de citocinas por la infección con *Py* 17XL, evaluamos la concentración sérica de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$  y de las citocinas anti inflamatorias IL-4 y IL-10 en el día 7 postcoinfección.

Los ratones infectados solo con *Py* 17XL desarrollaron concentraciones significativamente más altas de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Fig. 16b, d;  $^a p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-4 (Fig. 16a, c, e). De manera interesante, la infección previa de *T. crassiceps* tuvo un efecto sinérgico en la producción de citocinas. Durante la coinfección con *Tc2+Py* se detectaron concentraciones más altas de IL-1 $\beta$  e IL-12 (Fig. 16a, c;  $*p < 0.05$ ), una ligera reducción significativa de la concentración de IFN- $\gamma$  (Fig. 16,  $*p < 0.05$ ) y concentraciones similares de las citocinas antiinflamatorias IL-4 and IL-10 (Fig. 16e, f), en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL.

De manera notable, los ratones coinfectados *Tc8+Py* produjeron significativamente más IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p40 que los ratones infectados solo *Py* 17XL ( $*p < 0.05$ ) y que los ratones coinfectados *Tc2+Py* (Fig. 16 a, b, c;  $^b p < 0.05$ ). Es importante destacar que el grupo coinfectado *Tc8+Py* sintetizó significativamente menos IFN- $\gamma$  que los ratones infectados solo con *Py* 17XL, y que los ratones coinfectados *Tc2+Py* (Fig. 7d $^b p < 0.05$ ). Del mismo modo, los ratones coinfectados *Tc2+Py* desarrollaron concentraciones significativamente más altas de IL-4 e IL-10

en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (\*p < 0.05) y con los ratones coinfectados *Tc2+Py* (&p < 0.05) (Fig. 16). Estos datos sugieren que el perfil de citocinas, originado por la infección crónica con *T. crassiceps* podría reducir los niveles de IFN- $\gamma$  y promover la síntesis de IL-4 e IL-10 en los ratones coinfectados *Tc8+Py*.



**Fig. 16 La coinfección crónica con *T. crassiceps* / *P. yoelii* 17XL incrementó la síntesis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 e IL-10 y disminuyó la síntesis de IFN- $\gamma$  a nivel sistémico.** A los ratones infectados solo con *Tc2*, *Tc8*, *Py* 17XL, y los coinfectados con *Tc2+Py*, *Tc8+Py*, el séptimo día post coinfección, se les tomó muestra de sangre y en el suero, se analizó la concentración de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) TNF- $\alpha$ , c) IL-12, d) IFN- $\gamma$ , e) IL-4 y f) IL-10 mediante la técnica de ELISA. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM y son representativos de tres experimentos independientes con al menos 5 ratones por grupo. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo *Tc2*, (c) en comparación con el grupo *Tc8*, (\*) en comparación con el grupo *Py* 17XL, y (&) en comparación con el grupo *Tc2+Py*.

## 7. DISCUSIÓN

La malaria es la principal causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo. A pesar de los grandes esfuerzos realizados para eliminarla. Algunas posibles causas de esto son que la respuesta inmune contra malaria no es esterilizante y no se conoce con precisión, no existen vacunas que puedan eliminar al parásito, el parásito ha desarrollado resistencia a todos los medicamentos antimaláricos existentes y el mosquito vector ha desarrollado resistencia a todos los insecticidas conocido.

La malaria necesita de una respuesta inmune proinflamatoria capaz de controlar la replicación del parásito; pero al mismo tiempo, ésta respuesta debe regularse, ya que el proceso inflamatorio exacerbado compromete la vida del hospedero. Por el contrario, las infecciones por helmintos son bien toleradas y prevalecen por largos periodos, debido a la capacidad que tienen para evadir y suprimir la respuesta inmune inflamatoria, lo cual le permite sobrevivir y mantener la integridad de su hospedero [127].

El helminto *T. crassiceps* tiene la capacidad de modular el sistema inmune. En ratones BALB/c; la infección aguda genera una respuesta inmune proinflamatoria tipo Th1, mientras que la infección crónica genera una respuesta antiinflamatoria tipo Th2 [103]. Este fenómeno no solo ha sido utilizado para esclarecer cómo los parásitos helmintos son capaces de modular la respuesta inmune del hospedero ante las enfermedades inflamatorias [94, 156-158], si no que también, se ha demostrado que la infección por *T. crassiceps* afecta el establecimiento de las infecciones subsecuentes por parásitos no relacionados, como *Trypanosoma cruzi* [125] o *Leishmania major* y *Leishmania mexicana* [126].

*Py 17XL* es una cepa letal, en la mayoría de las cepas de ratón, y generalmente causa hiper parasitemia, caquexa, esplenomegalia, anemia y muerte aproximadamente entre los días 7 al 11 post infección [67].

En este estudio demostramos que el tiempo de infección con *T. crassiceps* modifica el curso de la infección con *Py 17XL*. La presencia previa de una infección aguda por *T. crassiceps* (2 semanas) incrementó significativamente en un 58 % la sobrevivida más que la de los ratones infectados por *Py 17XL*, Más aun, esta tasa de sobrevivida fue mayor (80 %) cuando los ratones presentaron una infección crónica por *T. crassiceps* (8 semanas). Esto podría sugerir que el perfil Th1 o Th2 generado previamente por la infección con *T. crassiceps* (Tabla 6) determina el incremento de la sobrevivida de los ratones infectados con *Py 17XL* (Figura 11b). Estos resultados son congruentes con otros estudios donde la coinfección con un helminto incrementa la sobrevivida de los ratones infectados con *Plasmodium: S. mansoni* (S.) (7 semanas) - *P. berghei* ANKA en ratones ICR [133] o *S. japonicum* (8 semanas) - *PbA* [136], *Nippostrongylus (N.) brasiliensis* (3 semanas) - *P. berghei*

ANKA en ratones C57BL/ [159]. Sin embargo, también se ha demostrado que la coinfección con un helminto aumenta la patología y la mortalidad por la infección con *Plasmodium*. Estos estudios incluyen: la coinfección simultánea con *Heligmosomoides polygyrus*- *P. chabaudi* en ratones C57BL/6 [141], la coinfección con *S. mansoni* (2 ó 4 semanas)-*P. yoelii* NXL en ratones BALB/c [160], la coinfección con *S. mansoni* (8 o 9 semanas) - *P. berghei* ANKA en ratones C57BL6 [161] y en Swiss albino [139], la coinfección con *N. brasiliensis* (día 9) - *P. berghei* ANKA en ratones BALB/c [162]. Es posible que el microambiente o perfil inmunológico del hospedero infectado por helmintos en el momento de la coinfección esté determinando los resultados reportados. Asimismo, el fondo genético del ratón, así como de la cepa de *Plasmodium* o del helminto utilizado, pueden modificar la patología y la letalidad. Cabe destacar, que la cepa *Py* 17XL utilizada en este estudio es letal en la mayoría de las cepas de ratón [163]. Por lo tanto, los cambios en el microambiente de las citocinas generadas por el helminto son importantes para la modulación de la respuesta inmune en la coinfección con *Plasmodium*.

De la misma forma, durante la coinfección *Tc2+Py* y *Tc8+Py* se detectó disminución en la parasitemia durante la fase temprana de la infección por *Py* 17XL. De manera interesante, *Plasmodium* continuó replicándose de manera gradual en los grupos coinfectados con *Tc2+ Py* y *Tc8+Py* después de 11 días de coinfección, alcanzando niveles más altos de parasitemia que el del grupo infectado solo con *Py* 17XL. Sin embargo, esta replicación no resultó determinante para la mortalidad en la infección con *Py* 17XL (Figura 6a y 6b). Este resultado es similar al observado por Lamb et al, quienes demostraron que en la infección con *Plasmodium*, la

mortalidad es independiente de la carga parasitaria [164]. Por lo que, la infección *T. crassiceps* retrasa la mortalidad temprana postcofección con *Py* 17XL y si bien se restringe la replicación de *Py* 17XL en la fase temprana de la infección, esta no es determinante para la sobrevida.

De manera general la investigación en malaria ha demostrado que el riesgo de muerte por malaria severa no está directamente relacionado con el riesgo de infección, reinfección o la frecuencia de exposición...No obstante, existe clara evidencia de que la malaria severa y la muerte se deben en gran parte a la inmunopatología, asociada a una excesiva reacción de la respuesta inmune del hospedero en contra del parásito [165]. Nosotros pensamos que la diferencia en el tiempo de sobrevida entre las coinfecciones *Tc2+Py* y *Tc8+Py* podría estar asociado con la inmunopatología, como la caquexia [166, 167] y la anemia [153, 154].

La caquexia es un mal pronóstico para la sobrevida de los pacientes, en muchas enfermedades crónicas, incluida la malaria [168]. En este estudio, nosotros demostramos que la coinfección con *Tc2+Py* no alteró el desarrollo de la caquexia aunque se observó una discreta reducción en la anemia, esto explicaría quizás su menor sobrevida. Por el contrario, la coinfección con *Tc8+Py* inhibió el desarrollo de la caquexia (Figura 12a) y retrasó el desarrollo de la anemia (Figura 12b). Este hallazgo es similar al descrito en otro modelo de coinfección con *Nippostrongylus brasiliensis*-*P. chabaudi*, en la que la coinfección redujo el nivel de anemia [169], aunque la coinfección con *L. sigmodontis*-*P. chabaudi* mostró un incremento en la severidad de la anemia [170]. A pesar de estos resultados contradictorios, la anemia por *P. chabaudi* no promueve la mortalidad. En contraste con esto, la anemia generada por la infección con *Py* 17XL induce mortalidad temprana [165]. Estos

datos sugieren que la anemia no depende en su totalidad de la replicación de *Plasmodium*, si no que interviene el tiempo previo de infección con *T. crassiceps* en el grado de protección contra la anemia. Por lo tanto, la coinfección con *Tc8* promovió la supervivencia de los ratones mediante la inhibición de la caquexia y la reducción temporal de la anemia.

Dado que el bazo participa en la activación de la respuesta inmune y la protección contra la anemia [171], determinamos el índice esplénico y encontramos que los ratones infectados por *Py* 17XL desarrollan una marcada esplenomegalia, que podría explicar los niveles más altos de anemia y de parasitemia por *Py* en este grupo de ratones. De manera interesante, los ratones coinfectados *Tc8+Py* desarrollaron un índice esplénico más bajo en comparación con los ratones coinfectados *Tc2+Py* y los ratones infectados solo con *Py* 17XL, lo que sugiere que la infección previa crónica por *T. crassiceps* (*Tc8*) moduló negativamente la proliferación celular en el bazo, a pesar de los altos niveles de ambos parásitos. Por el contrario, los ratones coinfectados *Tc2+Py* presentaron un incremento en la esplenomegalia generada por *Py* 17XL. De manera similar, la coinfección con *S. mansoni-P. yoelii* NXL incrementó la esplenomegalia, el daño al bazo se ha asociado al incremento incontrolado del perfil inflamatorio Th1 [160, 172]. Lo anterior definitivamente sugiere que una respuesta inmune altamente polarizada del tipo Th1, pudiera promover el desarrollo de esplenomegalia, la activación de las células fagocíticas del bazo y como consecuencia una mayor destrucción de eritrocitos lo que incrementó la anemia en los ratones coinfectados con *Tc2+Py*. Además, la esplenomegalia se ha asociado con el resultado de la enfermedad y se ha utilizado como un indicador de la virulencia [173] y más aun, la esplenomegalia también se

ha asociado con hematopoyesis extramedular [174, 175]. Por lo tanto, el bajo índice esplénico en los ratones coinfectados *Tc8+Py* podría representar una respuesta protectora contra la anemia, una eficiente respuesta inmune y dirigir el resultado clínico en estos ratones, lo cual explicaría su mayor sobrevivencia.

En la malaria, los procesos patológicos son en general consecuencia de la desregulación de la respuesta inmune. Una óptima respuesta inmune a la infección por *Plasmodium* se caracteriza por una rápida y marcada respuesta inmune tipo Th1 (IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) para el control del pico primario de la parasitemia, una vez que la replicación del parásito se ha controlado. Esta respuesta proinflamatoria se debe regular o modular con la misma rapidez por una respuesta antiinflamatoria. Es decir, el éxito en la resolución de la infección por malaria requiere de una regulación paulatina de un tipo de respuesta inmune hacia otra, de forma coordinada y controlada para evitar daños colaterales por el parásito o por la inmunopatogénesis.

La activación de varios subconjuntos de las células T, de los M $\phi$ , y su secreción de citocinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , son críticas para la protección; Sin embargo, la excesiva activación de células T y la sobreproducción de estas citocinas también pueden conducir a una malaria severa [47].

De acuerdo con la teoría de la inmunosupresión, cualquier infección por un nuevo parásito concomitante debería establecerse más fácilmente y volverse más virulenta o patógena cuando el hospedero experimenta una fase de inmunodepresión inducida por un parásito preexistente [176]. Sin embargo, aquí mostramos que este fenómeno no es una regla; en nuestro modelo experimental, la patología originada por *Py* 17XL disminuyó cuando los ratones presentan una

infección crónica por *T. crassiceps* (*Tc8*). Esta protección podría estar asociada a los cambios inmunológicos generados por *Tc8*, presentes al momento de la coinfección por *Py* 17XL, caracterizados por un incremento significativo de la IL-12 e IL-10, y una menor concentración de TNF- $\alpha$ , como sugiere el resultado obtenido con M $\phi$  peritoneales estimulados con *PyAg*.

A pesar de que los esplenocitos de los ratones coinfectados con *Tc8+Py* no mostraron diferencias significativas en la respuesta linfoproliferativa ante el estímulo con *PyAg*, si se redujo significativamente la linfoproliferación *in vitro* ante el estímulo con Con-A, incluso en mayor medida que los ratones infectados solo por *T. crassiceps*, *Py* 17XL o coinfectados *Tc2+Py*. Los esplenocitos fueron capaces de producir concentraciones altas de IL-4 e IL-10 y disminución en la concentración de IFN- $\gamma$  ante el estímulo específico de *PyAg*. Nuestros resultados son consistentes con los de Lacerda Queiroz, quienes demuestran que los ratones deficientes en IFN- $\gamma$  así como los ratones con depleción de IFN- $\gamma$  desarrollaron un peso corporal más alto, reducción del daño esplénico y mayor tiempo de supervivencia que los ratones WT infectados con *Py* N67C [177]. Estos hallazgos se correlacionaron con un índice esplénico más bajo, concentraciones más altas de hemoglobina y un peso corporal mejor conservado en nuestro grupo de ratones coinfectados *Tc8+Py*.

En este trabajo demostramos que la coinfección *Tc2+Py* y *Tc8+Py* incrementa la concentración de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 (Figura 5 A, B y C). Aunque se ha reconocido que estas citocinas son importantes para el control de la replicación del parásito y protección contra la infección por *Plasmodium* [32, 178], también las altas concentraciones de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en suero se han asociado con anemia grave [179-181], caquexia [182, 183] y patología asociada a *Plasmodium* [184, 185].

Tratando de explicar el posible mecanismo implicado en esta protección se cuantificó la concentración de citocinas. Aquí, encontramos que los ratones coinfectados *Tc2+Py* y *Tc8+Py* generaron concentraciones más altas de TNF- $\alpha$  e IL-12, pero también disminuyeron su concentración de IFN- $\gamma$  en suero en comparación con los ratones infectados solo por *Py* 17XL. Es importante destacar que a pesar de que los ratones coinfectados presentaron una reducción en la concentración de IFN- $\gamma$ , no solo no se afectó el control de la carga parasitaria, como ha sido descrito previamente, si no que además se retrasó la replicación de *Plasmodium* durante la fase temprana de la coinfección. Este fenómeno se disipó después del día 8 de coinfección y *Py* 17XL continuó replicándose hasta infectar a casi el 80% de los glóbulos rojos en estos grupos (Fig 11a).

A pesar de las altas parasitemias que alcanzaron los ratones coinfectados *Tc8+Py*, aumentó su supervivencia y presentaron menos anemia, lo anterior podría asociarse con las concentraciones elevadas en suero de la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  e IL-12. Esto está respaldado por una investigación previa que demostró que al incrementarse la concentración de IL- $\beta$  se induce una moderada protección contra la anemia severa [186]. Además, la deficiencia de IL-12 se correlaciona con la anemia severa y la mortalidad [180, 187-189]. Esta deficiencia de IL-12 explicaría la alta mortalidad y la anemia en los ratones infectados solo con *Py* 17XL, lo cual es acorde con que los ratones IL-12KO infectados con *P. chabaudi* son incapaces de controlar la infección [21], mientras que la administración de IL-12 recombinante (rIL-12) confirió protección contra la parasitemia, la anemia grave y disminuyó la mortalidad por *P. chabaudi* [190]. De manera interesante, la administración de anticuerpos monoclonales neutralizantes (mAb) anti-TNF- $\alpha$  e anti-IFN- $\gamma$  eliminan la

protección de la rIL-12, dando como resultado un 100% de mortalidad, [178]. Asimismo, IL-12 e IL-1 $\beta$  redujeron la anemia al promover la eritropoyesis y la formación de los precursores hematopoyéticos.[190, 191]. Estos datos apoyan la idea de que un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-12 en los ratones coinfectados *Tc2+Py* y *Tc8+Py* redujeron la anemia y restringieron la replicación de *Py* 17XL. Así, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  son necesarias para la protección contra *Plasmodium* durante la fase temprana de la infección.

En este estudio la disminución en la concentración de IFN- $\gamma$  en suero y en los los esplenocitos en cultivo, se asoció a una menor patología y una mayor tasa de sobrevivida. Este hallazgo está en concordancia con el desarrollo de una menor patología y una mayor sobrevivida en los ratones knockout para IFN- $\gamma$   $\gamma^{-/-}$  y WT tratados con mAb anti-IFN- $\gamma$  infectados con *P. yoelii nigeriensis* N67C [177]. Más aún, observamos que la disminución en la producción de TNF- $\alpha$  por los M $\phi$  peritoneales, limita la progresión de complicaciones graves que ponen en peligro la vida en ratones infectados *Tc8+Py*. Una posible preocupación de este resultado es por qué los ratones coinfectados *Tc8+Py* no desarrollaron caquexia, si estos producen también altos niveles de TNF- $\alpha$ , mediador de la caquexia, es probable que el perfil Th2 generado por *Tc8* antes de la coinfección podría inducir una disminución de la inflamación, de hecho, una estrategia terapéutica contra la caquexia es la administración de citocinas antiinflamatorias [192]. Así mismo, la administración de anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$  (o en combinación con anti-IFN- $\gamma$ ) redujo la esplenomegalia en ratones infectados con *P. chabaudi* [193]. Estos resultados sugieren que la protección contra la patología observada en los ratones con coinfección *Tc8+Py* podría estar relacionada a la mejor regulación de la inflamación

mediada por el incremento en la producción de IL-4 e IL-10 y menor producción de IFN- $\gamma$ . Refuerza esta discusión el hecho de que los ratones coinfectados *Tc2+Py*, con un perfil de citocinas distinto y contrario a los *Tc8+Py*, mostraron un curso de la infección y de la malaria más severo y muerte. Adicionalmente, nuestros resultados son consistentes con los reportados en los ratones infectados con la cepa no letal *Py* 17NXL, los cuales mostraron que la reducción de IFN- $\gamma$  y el aumento de la concentración sérica de IL-4 e IL-10 fueron importantes para la prevención de la patología y la sobrevida [194]. En la malaria no severa existe una relación directa del cociente en las concentraciones de IL-10/TNF- $\alpha$ , por el contrario, la reducción en la concentración de IL-10 y el incremento en la concentración de TNF- $\alpha$  se asociaron con complicaciones graves, como anemia y caquexia [179, 195]. Más aún, los ratones IL-10KO infectados con *P. chabaudi* desarrollan una patología severa y muerte [196] pero la administración de anticuerpos monoclonales anti-IFN- $\gamma$  o anti-TNF- $\alpha$  reduce la patología y la mortalidad [196, 197].

Los hallazgos en la concentración de las citocinas IL-4 e IL-10, así como la reducción de la concentración de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantea de los esplenocitos y M $\phi$  peritoneales estimulados con *Py*Ag de los ratones coinfectados *Tc8+Py*. Estos resultados explican por qué los ratones co-infectados *Tc8+Py* mostraron una mayor sobrevida, asociada con la reducción de la caquexia, esplenomegalia y retraso en el desarrollo de anemia y en comparación con los ratones coinfectados por *Tc2+Py* o infectados solo por *Py* 17XL.

Por todo lo anterior, proponemos un modelo hipotético para explicar el efecto de la infección por helmintos en la respuesta inmune en diferentes momentos de coinfección con *Py* 17XL (Fig. 17). La infección aguda con *T. crassiceps* induce un

perfil inmune de tipo 1 caracterizado por niveles elevados de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 en el suero. Este perfil de citocinas previamente establecidos influyen en la respuesta inmune y en el curso de la infección durante la coinfección con *Tc2+Py*: retrasa la replicación del parásito *Py* 17XL y favorece la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12 por M $\phi$ , así como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 en suero, y la baja síntesis de IFN- $\gamma$  por esplenocitos. Aunque este perfil de citocinas aumenta la sobrevida hasta el día 18 y tiene un papel limitado en la regulación de la patología y la mortalidad (Fig. 17a). En contraste, en la infección crónica por *T. crassiceps* se induce un perfil inmune del tipo 2 caracterizado por concentraciones bajas de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ ; y concentraciones altas de IL-4 e IL-10 en el suero. Este perfil de citocinas previamente establecidos influyen en la respuesta inmune y en el curso de la infección por *Py* XL, durante la coinfección con *Tc2+Py*: se favorece una respuesta inmune proinflamatoria / antiinflamatoria (Th1/Th2) caracterizada por la producción de concentraciones altas de IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-10 por los M $\phi$ , así como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 en suero. Es importante destacar que se producen concentraciones altas de IL-4 e IL-10 y bajas de IFN- $\gamma$  por los esplenocitos. Este perfil mixto de citocinas retrasa la replicación del parásito *Py* 17XL, reduce la patología e incrementa la sobrevida de los ratones hasta 30 días por coinfección (Fig. 17b).

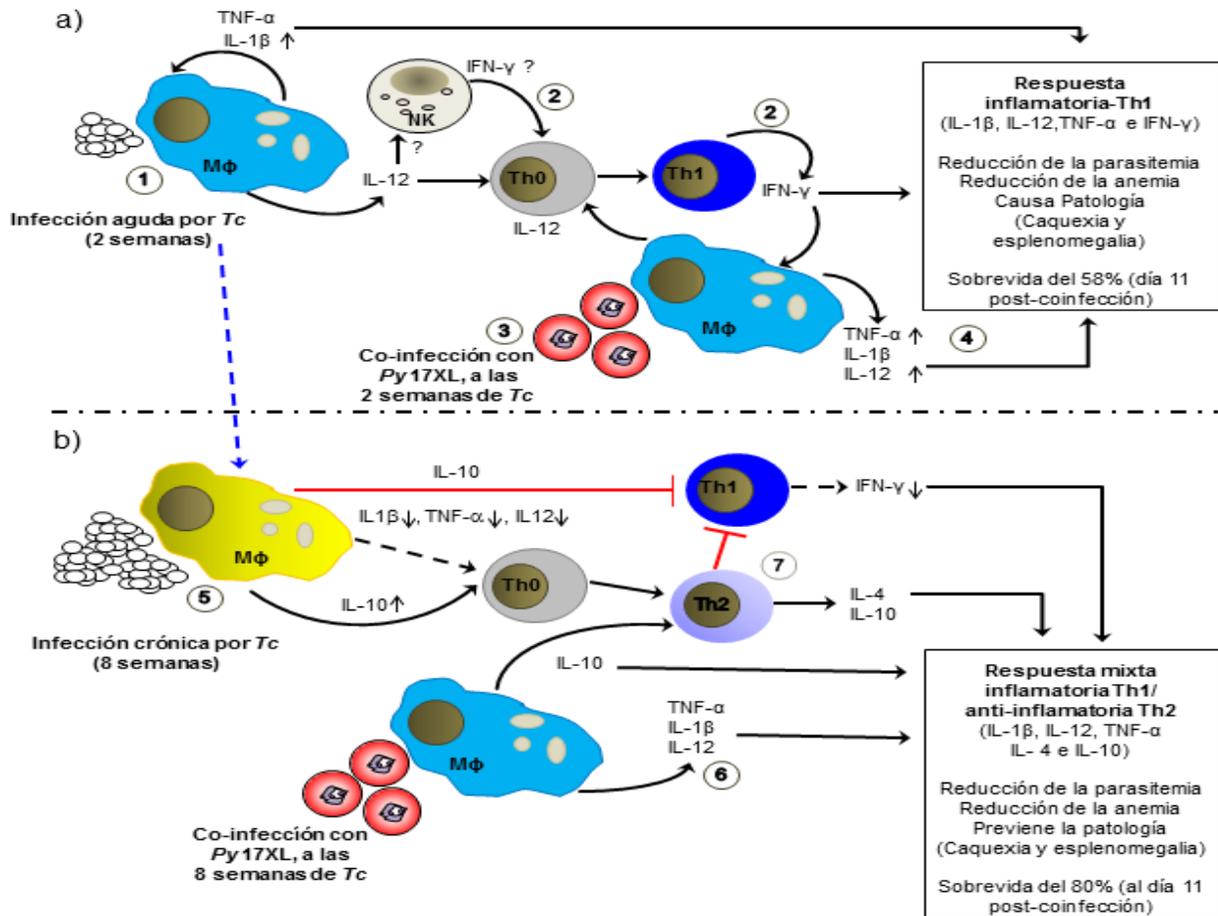


Fig. 17. Modelo hipotético: la preexistencia de una infección aguda o crónica por *T. crassiceps* modifica diferencialmente la respuesta inmune del hospedero a la coinfección por *Py* 17XL (*Py*). La infección aguda con *T. crassiceps* (*Tc*2) (a) favorece el desarrollo de una respuesta inmune proinflamatoria (Th1), que se caracteriza por la síntesis de concentraciones altas de IL-1β, IL-12 y TNF-α producidas por los Mφ (1), y de IFN-γ sintetizado por las células T, entre otras células (2). Durante esta etapa, la coinfección *Py*+*Tc*2 (3) incrementa la síntesis de TNF-α e IL-12 en Mφ, aunque la producción de IFN-γ disminuye ligeramente por los esplenocitos. Esta respuesta se asocia con una restricción inicial de la replicación de *Py* 17XL y una reducción de la anemia; sin embargo, la infección por *Tc*2 tiene una participación muy limitada en la regulación de la respuesta proinflamatoria, la patología y la mortalidad (4). A medida que la infección por *T. crassiceps* progresa (b, línea azul punteada), se presenta un cambio de una respuesta inmune proinflamatoria del tipo 1 hacia una respuesta antiinflamatoria del tipo 2 (b), que se caracteriza por las concentraciones bajas de las citocinas: IL-1β, TNF-α e IL-12, y concentraciones altas de IL-10 sintetizadas por Mφ (5), y concentraciones altas de IL-4 e IL-10 producidas por las células T (6). En este punto, la coinfección *Py*+*Tc*8 favorece una respuesta inmune proinflamatoria / antiinflamatoria caracterizada por la síntesis de concentraciones elevadas de IL-12 e IL-10 por Mφ (6) y concentraciones altas de IL-4 e IL-10 pero bajas de IFN-γ por esplenocitos (7). Este perfil mixto de citocinas retrasa la replicación del parásito *Py* 17XL, reduce la patología e incrementa la sobrevida de los ratones hasta 30 días por coinfección.

## 8. RESUMEN DE RESULTADOS

Con base a los resultados anteriormente descritos y analizados, se puede resumir que:

- La letalidad de la infección por *Py 17XL*, podría atribuirse, al menos en parte por la patología severa (anemia, caquexia y esplenomegalia).
- El incremento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y la deficiencia de IL-4, IL-10 e IL-12 compromete la sobrevivencia de los ratones infectados solo con *Py 17XL*.
- La presencia de la infección con *T. crassiceps* modifica el curso de la infección con *Py 17XL*.
- El tiempo previo de la infección con *T. crassiceps* al momento de la coinfección determina el tiempo de sobrevivencia de los ratones.
- La mortalidad durante la coinfección es independiente de la carga parasitaria por *Py 17XL*.
- La infección con *T. crassiceps* retrasa la proliferación de *Py 17XL* durante la fase temprana de la coinfección.

Efecto de la infección aguda con *T. crassiceps* durante la coinfección (*Tc2 + Py 17XL*):

- Se incrementa un 58 % la sobrevivencia de los ratones durante la fase temprana de la coinfección.
- Se retrasa ligeramente el desarrollo de anemia.
- No modifica la caquexia ni la esplenomegalia en la coinfección.
- Incrementa el perfil Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

Efecto de la infección crónica con *T. crassiceps* durante la coinfección (*Tc8* + *Py17XL*):

- Aumenta la supervivencia 80% de los ratones durante la fase temprana de la coinfección.
- Reduce la patología (caquexia y anemia) de la coinfección.
- Reduce el desarrollo de esplenomegalia durante la coinfección.
- Promueve la síntesis de IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-10 y disminuye la síntesis de TNF- $\alpha$  en macrófagos
- Afecta la respuesta linfoproliferativa, pero promueve la síntesis de altos niveles de IL-4 e IL-10 en esplenocitos
- Incrementa la síntesis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4 y IL-10 y reduce la síntesis de IFN- $\gamma$  a nivel sistémico.
- Los hallazgos reportados aquí establecen claramente que el balance de una respuesta mixta Th1/Th2 generada por la coinfección *Tc8+Py*, es vital para el incremento de la supervivencia y la disminución de la patología.

## 9. CONCLUSIÓN

Nuestros datos demuestran que la infección crónica por el helminto *T. crassiceps* incrementa la supervivencia de los ratones infectados con *P. yoelii* 17XL, y este fenómeno depende de la modulación del perfil inmunológico preexistente generado por el helminto, es decir, el tiempo previo de la infección con el helminto es capaz de modular y modificar el curso de infección letal con *Plasmodium*.

La polarización de las células T hacia una respuesta mediada por células en la infección por *Plasmodium* puede ser modulada por la presencia de factores

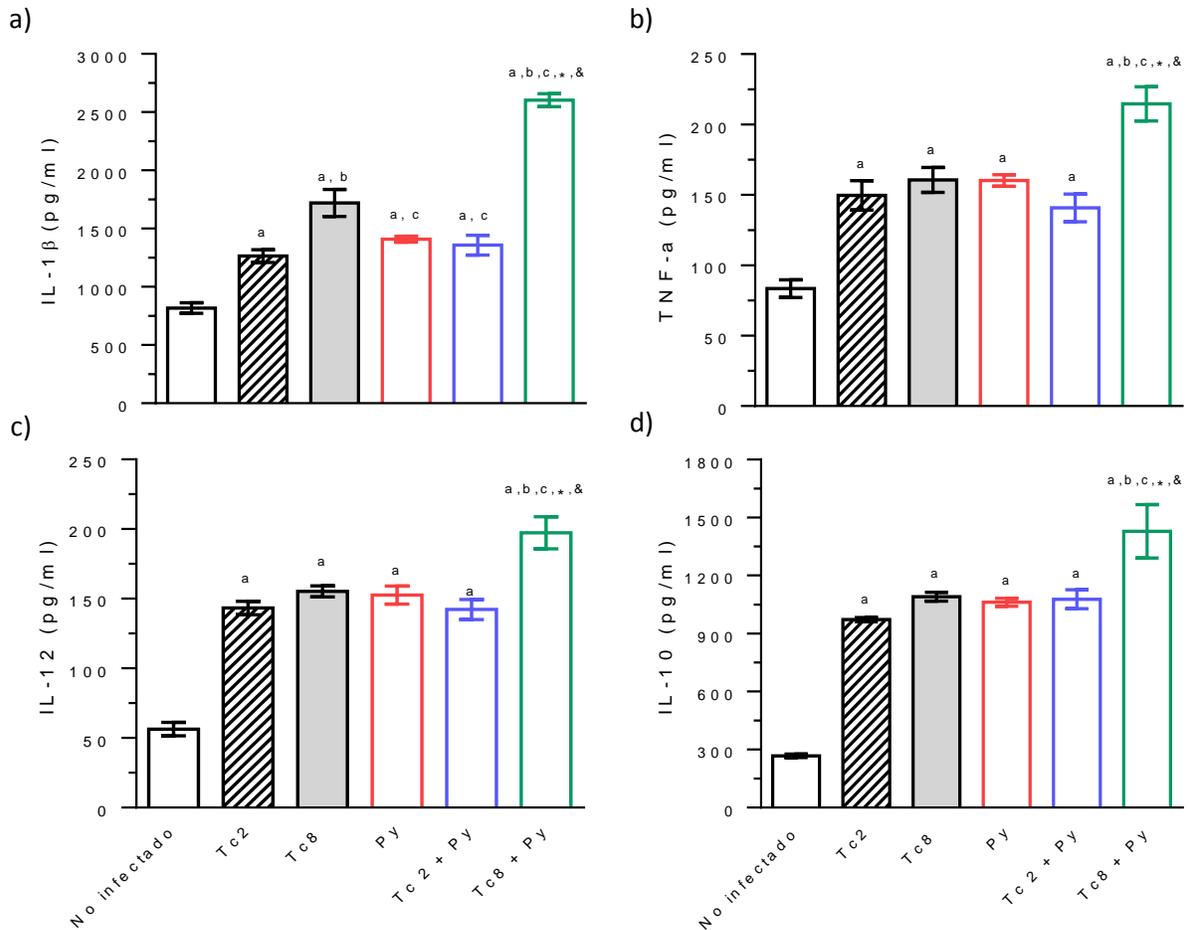
preexistentes, incluidas las citocinas y las células reguladoras generadas por el helminto. Sin embargo, futuros estudios son necesarios para lograr una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta celular anti inflamatoria o y/o reguladora inducida por el parásito helminto durante la coinfección por *Plasmodium*. Nuestros hallazgos deben tenerse en cuenta para el tratamiento de las manifestaciones clínicas de pacientes con malaria y para el desarrollo de estrategias de inmunización en zonas donde estos parásitos coexisten o son endémicos.

## 10. ANEXO 1

### RESULTADOS COMPLEMENTARIOS NO PUBLICADOS

**10.1. La coinfección crónica con *T. crassiceps* + *P. yoelii* 17XL promueve la producción de la IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$  en los macrófagos estimulados con el *PyTcAg*.**

Los M $\phi$  de la coinfección con *Tc8+Py* estimulados *in vitro* con *TcPyAg* aumentó significativamente la concentración de las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 en comparación con todos los otros grupos experimentales (18,  $p < 0.05$ ). En contraste, Los M $\phi$  de la coinfección con *Tc2+Py* generó concentraciones similares de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 en comparación con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (18). Por lo tanto, estos datos corroboran que los M $\phi$  provenientes de la coinfección con *Tc8+Py* producen tanto citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) como antiinflamatorias (IL-10).

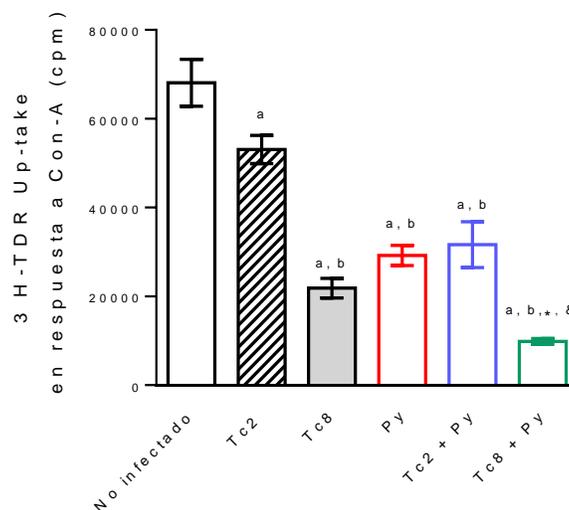


**Fig. 18. La coinfección crónica con *T. crassiceps* / *Py* 17XL promueve la producción de la IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados con el *TcPyAg*.** Los M $\phi$  peritoneales de ratones infectados solo con *Py* 17XL, *Tc2*, *Tc8* o coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py* fueron aislados y estimulados con *TcPyAg* (25  $\mu$ g/mL, de cada antígeno). La concentración de las citocinas: IL-1 $\beta$  (a), TNF- $\alpha$  (b), IL-12 (c) y IL-10 (d) en los sobrenadantes de cultivo de M $\phi$  se midió mediante ELISA. Los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM y son representativos de tres experimentos independientes (5 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo *Tc2*, (c) en comparación con el grupo *Tc8*, (\*) en comparación con el grupo *Py* 17XL, y (&) en comparación con el grupo *Tc2+Py*.

**10.2. La coinfección crónica con *T. crassiceps* + *P. yoelii* 17XL disminuye la respuesta linfoproliferativa, pero promueve la síntesis de IL-4 e IL-10 y disminuyen la síntesis de IFN- $\gamma$  e IL13 en los esplenocitos estimulados con Con-A**

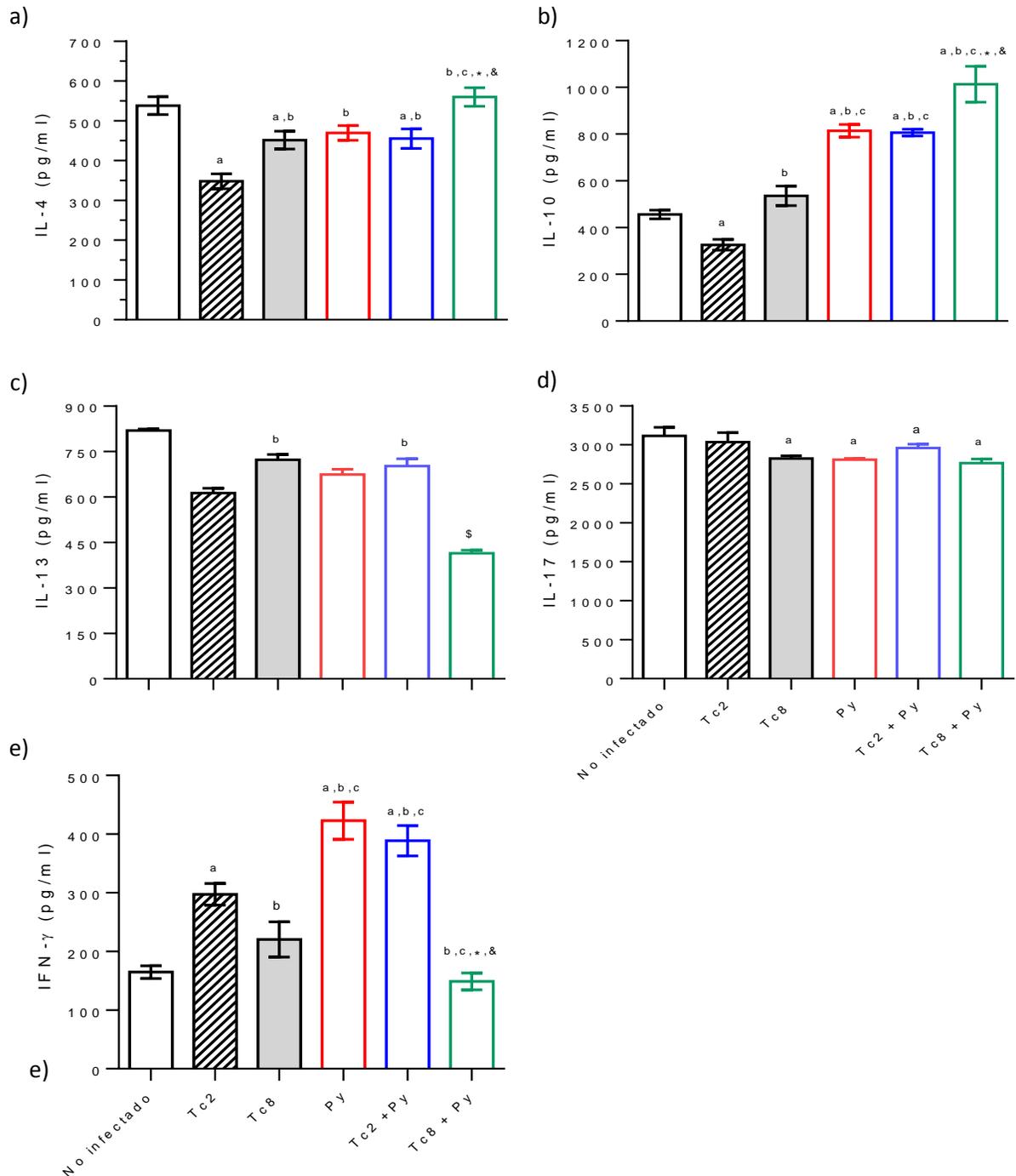
En respuesta a Con-A, los esplenocitos de los ratones infectados solo con *Py* 17XL presentaron una disminución significativa en la respuesta proliferativa en comparación con los ratones no infectados (Fig. 19, <sup>a</sup>p < 0.05). Del mismo modo, en los esplenocitos de los ratones coinfectados *Tc2+Py*, la respuesta proliferativa también mostró una disminución significativa en comparación con los ratones no infectados. (Fig. 19, <sup>a</sup>p < 0.05), similar a la observada en los ratones infectada solo con *Py* 17XL. Sin embargo, en los ratones coinfectados *Tc8+Py*, la respuesta de proliferación de los esplenocitos se redujo significativamente comparados con los ratones infectados solo con *Py* 17XL (Fig. 19, \*p < 0.05) y los ratones coinfectados con *Tc2+Py* (Fig. 19, &p < 0.05).

En la figura 20, se observó que los esplenocitos de los ratones coinfectados *Tc8+Py*, estimulados con Con-A produjeron niveles más altos de IL-4 (\*p < 0.05) e IL-10 ( #p < 0.05); y niveles más bajos de IFN- $\gamma$  e IL-13 (\*p < 0.05) comparados con los ratones infectados solo *Py* 17XL y los coinfectados *Tc2+Py* (&p < 0.05) (Fig. 20).



**Fig. 19. La coinfección crónica con *T. crassiceps* / *P. yoelii* 17XL disminuye la respuesta linfoproliferativa.** Los ratones infectados con *T. crassiceps* por 2 (*Tc2*) u 8 (*Tc8*) semanas, se coinfectaron con *Py* 17XL (*Tc2+Py* y *Tc8+Py*, respectivamente). En el día 7 post coinfección, los

esplencitos de los ratones infectados y coinfectados se aislaron y se estimularon con Con-A por 72 h. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de la incorporación de 3H-TDR de tres ensayos independientes. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM y son representativos de tres experimentos independientes con al menos 5 ratones, por grupo. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo *Tc2*, (c) en comparación con el grupo *Tc8*, (\*) en comparación con el grupo *Py* 17XL, y (&) en comparación con el grupo *Tc2+Py*.



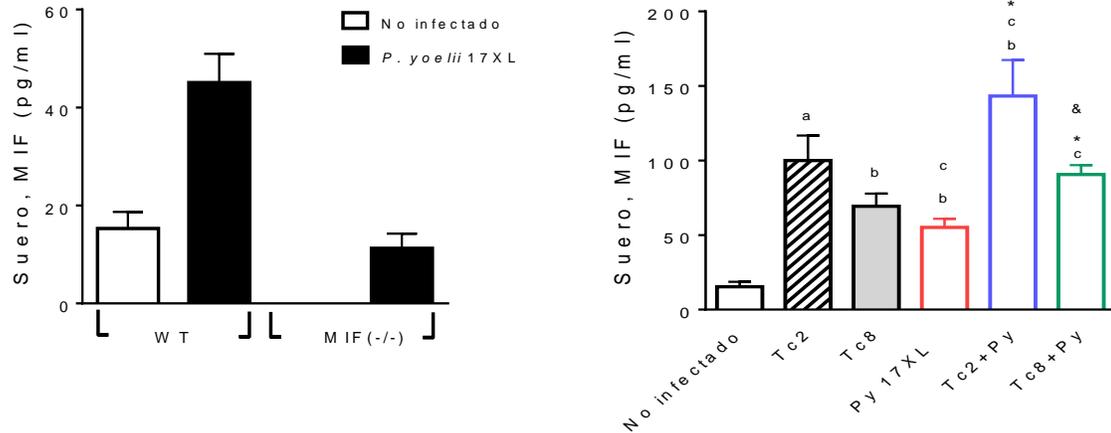
**Fig. 20. La coinfección crónica con *T. crassiceps* / *P. yoelii* 17XL promueve la síntesis de IL-4 e IL-10 y disminuye la síntesis de IL-13 e IFN- $\gamma$  en los esplenocitos estimulados con Con-A.** Los esplenocitos de los ratones infectados solo con *Py* 17XL, *Tc2*, *Tc8* o coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py* fueron aislados y estimulados con Con-A, en el día 7 post coinfección. Después de 72 h del estímulo la concentración de citocinas: IL-4 (a), IL-10 (b), IL-13 (c), IL-17 (d) e IFN- $\gamma$  (e) se midió en los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos. Las barras representan la media  $\pm$  SEM y son representativas de tres experimentos independientes (5 ratos por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo, (a) comparado con el grupo no infectado, (b) comparado con el grupo *Tc2*, (c) comparado con el grupo *Tc8*, (\*) comparado con el grupo *Py* 17XL, y (&) comparado con el grupo *Tc2+Py*.

### **10.3. La coinfección por *T. crassiceps*-*P. yoelii* 17XL aumenta la síntesis de MIF en suero**

Dado que se ha descrito que el factor inhibidor de la migración (MIF) suprime la síntesis de eritropoyetina y tiene un efecto sinérgico con el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  para antagonizar con la hematopoyesis [198], decidimos analizar si esta molécula está involucrada en la sobrevida y la patología que presentan los ratones infectados con *Py* 17XL, coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+Py*.

Los niveles de MIF se evaluaron en el suero de ratones infectados solo con *Py* 17XL y coinfectados con *Tc2+Py* y *Tc8+P*, en el séptimo día post infección con *Py* 17XL. En la figura 21a se observó que la infección por *P. yoelii* 17XL promueve la producción de MIF. De manera interesante, los niveles de MIF se incrementaron aún más en los ratones coinfectados en comparación con aquellos que sólo se infectaron con *Tc2*, *Tc8* y *Py* 17XL (21b). Cabe destacar que la infección previa con *Tc2* presentó el mayor incremento en la producción de MIF y resultó estadísticamente significativo en comparación con nuestros grupos experimentales.

Lo cual sugiere que la coinfección con *T. crassiceps* tiene un efecto sinérgico en la producción de MIF.

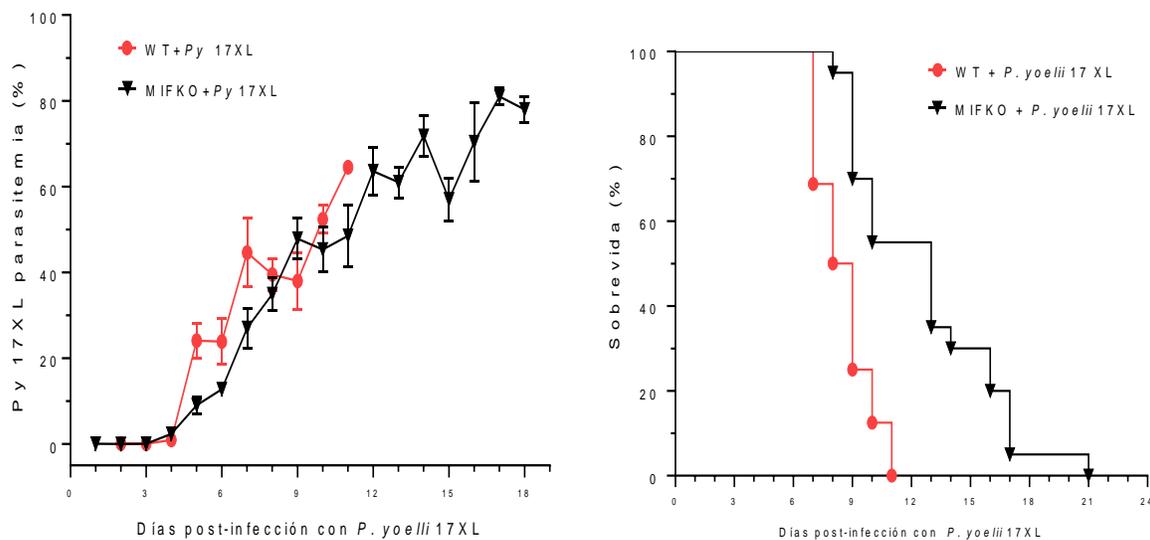


**Figura 21. La coinfección por *T. crassiceps* / *P. yoelii* 17XL aumenta la producción de MIF en suero.** A) Niveles de MIF en suero a los 7 días post infección con *P. yoelii* 17XL en ratones BALB/c, B) ratones coinfectados con *P. yoelii* 17XL, después de dos semanas u ocho semanas de infección previa con diez cisticercos vía i.p. de *T. crassiceps*. Las barras representan la media  $\pm$  SEM y son representativas de tres experimentos independientes (5 ratos por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (a) en comparación con el grupo no infectado, (b) en comparación con el grupo *Tc2*, (c) en comparación con el grupo *Tc8*, (\*) en comparación con el grupo *Py* 17XL, y (&) en comparación con el grupo *Tc2+Py*.

#### 10.4. La ausencia de MIF retrasa la replicación de *P. yoelii* 17XL y aumenta la sobrevivencia de los ratones infectados

Con el fin de determinar la participación de MIF en la respuesta inmune a la infección por *Py* 17XL, se monitoreo la sobrevivencia en ratones WT y MIFKO de 6-9 semanas de edad, infectados con  $10^3$  eritrocitos parásitos con *Py* 17XL vía i.v. y se evaluó el porcentaje de eritrocitos parasitados, con el propósito de analizar si la ausencia de MIF afectaría el número de parásitos en sangre generado por *Py* 17XL.

Los ratones MIFKO infectados con *Py* 17XL presentaron significativamente menor porcentaje de eritrocitos parasitados, en los días 5, 6 y 7 p.i. en comparación con los ratones WT infectados con *Py* 17XL (Fig. 22a, \*  $p < 0.5$ ). No obstante, los ratones MIFKO desarrollaron altos niveles de parasitemia después del día 8 p.i., similares a los presentados por los ratones WT infectados con *Py* 17XL (Fig. 22a) así mismo, los ratones MIFKO mostraron un incremento significativo en la tasa de supervivencia, dado que el 55% de los ratones MIFKO sobreviven después del día 11 p.i. en comparación con los ratones WT infectados con *Py* 17XL (Fig. 22b, \* $p < 0.05$ ). Es importante destacar que algunas ratones MIFKO sobrevivieron casi el doble (21 días) que los ratones WT infectados con *Py* 17XL (Fig. 22b). Estos hallazgos soportan la idea que MIF podría promover la mortalidad temprana y un ineficiente control del parásito, a pesar de que se sabe que MIF induce una respuesta proinflamatoria necesaria para controlar la replicación de *Plasmodium*. Es posible que MIF participe en la mayor mortalidad, al promover una respuesta proinflamatoria excesiva generando patología severa, como la anemia o la esplenomegalia.



**Fig. 22. La ausencia de MIF retrasa la replicación de *P. yoelii* 17XL y aumenta la supervivencia.**

Los ratones BALB/c MIFKO y WT se infectaron vía i.v con  $10^3$  eritrocitos parásitos con *Py* 17XL. Como control se utilizaron ratones no infectados. La parasitemia *Py* 17XL a), se expresa en el porcentaje de eritrocitos parasitados con *Py* 17XL y los valores indican la media geométrica  $\pm$  DE. Mortalidad acumulada de cada grupo experimental b), los datos se expresan como el valor promedio  $\pm$  SEM y son representativos de 4 experimentos independientes (7-10 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativo, Se compararon con las pruebas “t” de student y con Log-rank (Mantel-Cox) Test, respectivamente, (\*) comparado con el grupo *Py* 17XL.

### 10.5. MIF promueve la patología de la infección por *Plasmodium yoelii* 17XL

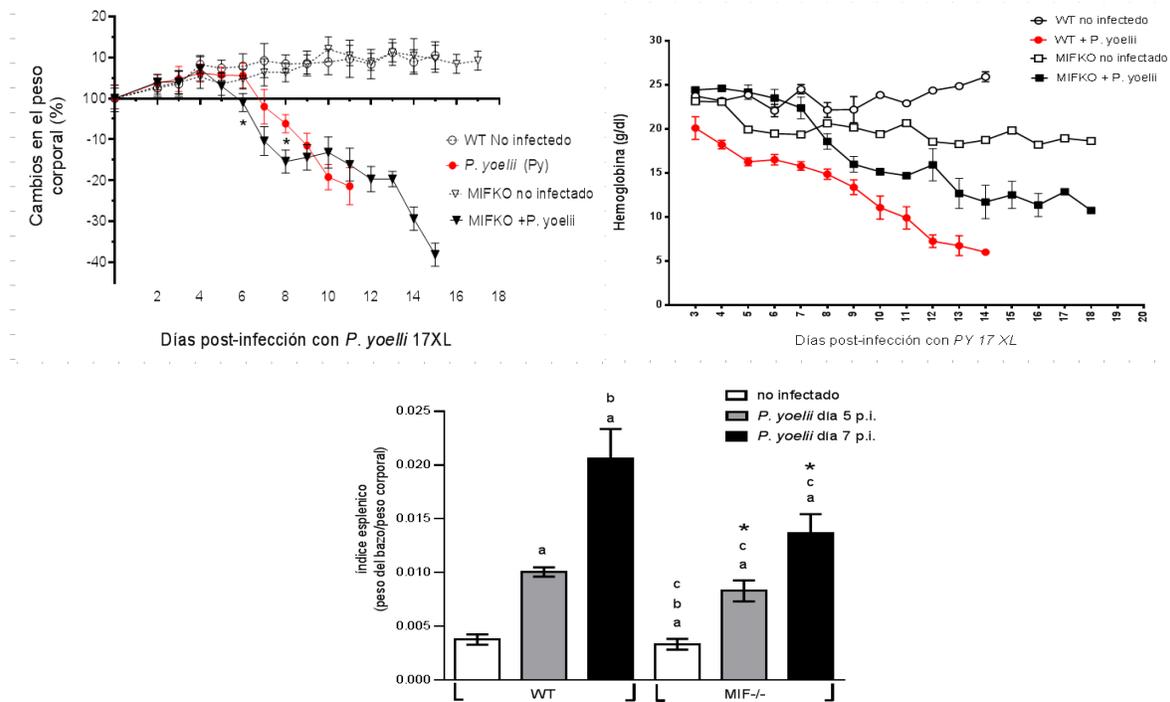
Es ampliamente aceptado que la desregulación de citocinas liberadas por hospedero durante la infección por *Plasmodium* contribuye a la malaria severa. Por ejemplo, la alta concentración de MIF en suero se ha asociado con anemia severa [199] y daño tisular, debido a la inflamación excesiva [200]. Dado que MIF podría estar estrechamente correlacionado con la inmunopatología durante la infección por

*Plasmodium*, decidimos analizar si MIF participa en el desarrollo de la caquexia, la anemia y la esplenomegalia en los ratones infectados con *Py* 17XL.

Primero, se analizó la pérdida de peso corporal durante la infección por *Py* 17XL, para determinar si MIF promueve el desarrollo de la caquexia. En la figura 23a, se observa que los ratones WT perdieron peso de forma gradual, desde el día 7 hasta el día 11 p.i. por *Py* 17XL, cuando los ratones murieron habían perdido aproximadamente el 22 % de su peso (Fig. 23a). De la misma forma, en los ratones MIFKO mostraron un efecto similar en la pérdida de peso pero se observó una pérdida significativa de peso en los días 6 y 8 p.i. comparado al observado en los ratones WT infectado por *Py* 17XL, estos ratones perdieron aproximadamente el 38% de su peso al momento de perecer. No obstante, como fue descrito previamente su tasa de supervivencia fue más alta que la de los ratones WT infectados por *Py* 17XL. Entonces, MIF no participa en el desarrollo de caquexia.

Posteriormente, se cuantificó la concentración de hemoglobina, para determinar si MIF participa en la anemia generada por *Py* 17XL. Nuestros resultados mostraron que los ratones WT presentaron una disminución drástica, progresiva de los niveles de hemoglobina en la concentración de hemoglobina entre los días 4 y 14 p.i. por *Py* 17XL. De manera similar, los ratones MIFKO mostraron una disminución en los niveles de hemoglobina después del día ocho p.i. *Py* 17 XL (Fig. 23b), aunque cabe destacar que los niveles de hemoglobina de los ratones MIFKO fueron significativamente mayores que los niveles observado en los ratones WT (Fig. 23b). Estos datos indican por primera vez que efectivamente MIF favorece la anemia severa durante la infección por *Py* 17XL.

Finalmente, dado que MIF promueve la respuesta proinflamatoria y el exceso de esta ha sido asociado con el desarrollo de la HMS y la patología de HMS está asociada a anemia severa. Para evaluar si MIF podría modular el desarrollo de HMS, se determinó el índice esplénico en el día 5 y 7 p.i. por *Py* 17XL. Los ratones WT y MIFKO infectados por *Py* 17XL desarrollaron un aumento significativo en el tamaño del bazo en comparación a los no infectados, y su índice esplénico fue similar en el día 5 p.i. con *Py* 17XL. De manera notable, Los ratones MIFKO desarrollaron una esplenomegalia significativamente menor que los ratones WT infectados por *Py* 17XL (Fig. 23c). Por lo tanto, estos resultados demuestran que la MIF participa en el desarrollo de esplenomegalia causada por la infección con *Py* 17XL. Entonces, la ausencia de MIF disminuye la patología asociada a anemia y esplenomegalia pero no participa en la caquexia.



**Fig. 23. MIF promueve la patología de la infección por *P. yoelii* 17XL.** Los ratones BALB/c MIFKO y WT se infectaron vía i.v con  $10^3$  eritrocitos parásitos con *Py* 17XL. Como control se utilizaron

ratones no infectados. Porcentaje de peso corporal a), El peso inicial de cada ratón se consideró como el 100%, el cambio en el porcentaje de peso se calculó utilizando el peso inicial de cada ratón en el día 0. Concentración de hemoglobina b), se cuantificó por el método de la cianometahemoglobina y se expresan en g/dL, 1  $\mu$ L de sangre se adicionó a 250  $\mu$ L of Drabkin, la concentración se analizó por espectrofotometría a 540 nm. c) Índice esplénico. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM y son representativos de 4 experimentos independientes (5 ratones, por grupo). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos, (<sup>a</sup>) en comparación con el grupo WT no infectado, (<sup>b</sup>) en comparación con el grupo MIFKO *Py* 17XL día 5 p.i. y (<sup>c</sup>) en comparación con el grupo MIFKO *Py* 17XL día 7p.i. (\*) en comparación con el grupo MIFKO no infectado

## 11. PERSPECTIVAS

En conjunto los datos demuestran que los ratones co-infectados con *T. crassiceps* no solo podrían usarse como modelo para investigar los mecanismo de susceptibilidad durante la interacción con *Plasmodium*, sino también como un modelo alternativo para estudiar los mecanismos inmunopatogénicos, como la anemia, caquexia y la esplenomegalia.

Estos datos también respaldan el papel de MIF en la malaria. Nuestro resultados ilustran que la producción de MIF en respuesta a la malaria participa en el desarrollo de la inmunopatogenesis. Éstos datos son importante para una futura publicación ya que proporcionan más evidencia de que la respuesta proinflamatoria debe ser regulada durante la infección por *Plasmodium*.

## 12. ANEXO 2

### Preparación de reactivos y soluciones empleadas

**Solución A.** Sulfato de Cu al 1% (1gr de  $\text{CuSO}_4$  y llevar a 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada).....1ml

Tartrato de Na y K al 2% (2gr de tartrato de Na y K y llevarlo a 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada).....1ml

**Solución B.** carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.01 N.....98ml

## 13. ANEXO 3

### Solución hemolizante

Tris base 0.17 M (ICN Biomedicals Inc.)

$\text{NH}_4\text{Cl}$  0.16 M (J.T Baker)

Se prepara para 300 ml

## **14. APÉNDICE**

### **14.1 Apéndice 1**

Artículo de revisión

**Helminth parasites alter protection against Plasmodium infection**

**Salazar-Castañon VH, Legorreta-Herrera M, Rodriguez-Sosa M**

## Review Article

# Helminth Parasites Alter Protection against *Plasmodium* Infection

Victor H. Salazar-Castañón,<sup>1</sup> Martha Legorreta-Herrera,<sup>2</sup> and Miriam Rodríguez-Sosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

<sup>2</sup>Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla 5 de Mayo esquina Fuerte de Loreto, 09230 Iztapalapa, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Miriam Rodríguez-Sosa; [rodriguezmi@campus.iztacala.unam.mx](mailto:rodriguezmi@campus.iztacala.unam.mx)

Received 6 June 2014; Accepted 6 August 2014; Published 8 September 2014

Academic Editor: Abraham Landa-Piedra

Copyright © 2014 Víctor H. Salazar-Castañón et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

More than one-third of the world's population is infected with one or more helminthic parasites. Helminth infections are prevalent throughout tropical and subtropical regions where malaria pathogens are transmitted. Malaria is the most widespread and deadliest parasitic disease. The severity of the disease is strongly related to parasite density and the host's immune responses. Furthermore, coinfections between both parasites occur frequently. However, little is known regarding how concomitant infection with helminths and *Plasmodium* affects the host's immune response. Helminthic infections are frequently massive, chronic, and strong inducers of a Th2-type response. This implies that infection by such parasites could alter the host's susceptibility to subsequent infections by *Plasmodium*. There are a number of reports on the interactions between helminths and *Plasmodium*; in some, the burden of *Plasmodium* parasites increased, but others reported a reduction in the parasite. This review focuses on explaining many of these discrepancies regarding helminth-*Plasmodium* coinfections in terms of the effects that helminths have on the immune system. In particular, it focuses on helminth-induced immunosuppression and the effects of cytokines controlling polarization toward the Th1 or Th2 arms of the immune response.

## 1. Introduction

Currently, it is estimated that approximately one-third of the almost three billion people who live on less than two US dollars per day are infected with one or more helminths [1]. Human infections with these organisms remain prevalent in countries where the malaria parasite is also endemic [2]. Consequently, coinfections with both parasites occur frequently [3, 4]. These interactions could have potential fitness implications for both the host (morbidity and/or mortality) and the parasite (transmission). Several studies have shown that the ability of a parasite to successfully establish an infection will depend on the initial immune response of the exposed host [5, 6]. When entering the host, a parasite will experience an "immune environment" potentially determined by both previous and current infections [7–9]. It is widely recognized that, in the presence of Th2 effector response, Th1 response

is suppressed and vice versa [10]. Thus, Th2-type response evoked in response to helminth infection would in theory have the ability to suppress proinflammatory Th1 response that generates immunopathology in *Plasmodium* infection.

Despite the fact that helminth parasites cause widespread, persistent human infection that results in a Th2 immune response, the influence of helminths on the duration of episodes of malaria in humans is not clear. The questions of how the coexistence of helminths and *Plasmodium* parasites within the same host might influence the immunological responses to each species and whether interactions affect resistance, susceptibility, and the clinical outcome of malaria has yet to be answered.

In this review, we attempt to answer these questions and particularly address whether the preexistence of a Th2/T regulatory response induced by helminths could affect the immune response against *Plasmodium*.

Before analyzing the influence of helminths infection on malaria, we must first briefly outline the immune response to *Plasmodium* infection and later outline the immune response to helminths parasites, as this is important to subsequent analyses of how malaria can be modified by the helminths.

## 2. *Plasmodium*

Malaria is caused by protozoan parasites belonging to the genus *Plasmodium*; it is transmitted by female *Anopheles* mosquitoes. *Plasmodium* is still one of the most successful pathogens in the world and is a major cause of morbidity and mortality in tropical countries. Five species of *Plasmodium* (i.e., *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi*) are responsible for all human infections [11, 12].

*Plasmodium* parasites have a complicated, multistage life-cycle involving an *Anopheline* mosquito vector and a vertebrate host. The parasite develops in two stages in its human host: in the liver (the exoerythrocytic stage) and in the blood (the intraerythrocytic stage). The most characteristic features of malaria in humans are a fever that occurs every 48 to 72 h depending on the species of *Plasmodium*, chills, headache, and gastrointestinal symptoms. In a naive, untreated individual, these can rapidly escalate into cerebral malaria (CM), anemia, severe organ failure, and death [13].

**2.1. Immune Response during *Plasmodium* Infection.** The immune response to *Plasmodium* is poorly understood; it depends on the parasite species and the specific stage within the host [12]. In addition, it is dichotomized into the preerythrocytic response, which is directed against the sporozoite and liver-stage parasites, and the blood stage response, which is directed against merozoites and intraerythrocytic parasites.

Although animal models do not fully replicate human malaria, they are invaluable tools for elucidating immune processes that can cause pathology and death [14]. Several mouse strains have been used to study the immune response to different combinations of *Plasmodium* species, such as *P. berghei* [15–20], *P. yoelii* [15, 21–24], *P. chabaudi* [25–30], and *P. vinckei* [31] (Table 1). These malarial models suggest that the efficiency of parasite control requires both a humoral and a cellular immune response, most likely in cooperation, although the importance of each is not entirely clear. For example, immunity to the sporozoite depends on antibodies to surface proteins, such as CSP-2 [32, 33] and liver-stage antigen (LSA-1) [34]; these antigens induce the production of antibodies that neutralize or block the invasion of hepatocytes [35]. Once sporozoites have entered the hepatocyte, the parasite clearance in mice requires CD8<sup>+</sup> T cells [36], natural killer cells (NK), and NKT and  $\gamma\delta$  T cells that produce IFN- $\gamma$  to eliminate infected hepatocytes [35]. When the parasite invades red blood cells (RBC), it dramatically alters the physiological and biochemical processes of its host cell. Parasite-infected RBCs (pRBC) express parasite-encoded molecules on their surface that affects the RBCs' mobility and trafficking within the body. The parasite biomass increases very rapidly and activates innate immune mechanisms, including NK cells and  $\gamma\delta$  T cells [13].

NK cells play an important role in restricting parasite replication. The absence of NK cells is associated with low IFN- $\gamma$  serum levels and increased parasitemia in mice infected with *P. chabaudi* [37]. Likewise, the absence of IFN- $\gamma$  reduces the ability of mice to control and eliminate parasites, eventually resulting in the death of the animals [38, 39]. Interestingly, macrophages (M $\phi$ ), but not IFN- $\gamma$ , play a major role in the control of early peaks in lethal infections with *P. yoelii* [40]. In addition, IFN- $\gamma$  produced by CD4<sup>+</sup> T cells plays a pivotal role in protective immunity against non-lethal strains of *Plasmodium* [41, 42]. In contrast, the infection with *P. berghei* ANKA induces high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  which are associated with cerebral malaria [43]. However, the peak of parasitemia in athymic mice tends to be similar to the peak in WT mice. These results suggest that extrathymic T cells are the major lymphocyte subset associated with protection against malaria [44].

In a resistant strain of mice, the presence of the parasite induces the production of proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . Furthermore, IL-12 is also necessary for elimination of *P. chabaudi* AS [45], *P. berghei* XAT [20], and *P. yoelii* XNL [46].

Besides, the inflammatory cytokine MIF (macrophage migration inhibitory factor) induces pathogenesis and susceptibility on BALB/c mice infected with *P. chabaudi*, high serum levels of MIF correlated with severity of disease [47]. In addition, infection of MIF knockout mice with *P. chabaudi* increases survival [48].

CD4<sup>+</sup> T cells, together with B cells, are crucial to develop efficient protection in murine experimental models [49, 50]. Whereas IFN- $\gamma$ , produced by TCD4<sup>+</sup>, activates M $\phi$ -mediated responses [51], the antibodies produced by B cells inhibit invasion of RBCs by the parasites [52], opsonize parasitized RBCs, block pRBC adhesion to the vascular endothelium, and neutralize parasite toxins [35]. In addition, mice rendered B cell deficient by treatment with anti- $\mu$  antibodies or B cell knockout mice ( $\mu$ MT) are unable to clear the erythrocytic infection of *P. chabaudi* [50, 53, 54]. Specifically, the early acute infection is controlled to some extent, giving rise to chronic relapsing parasitemia that cannot be cleared. Finally, parasitemia can be reduced by adoptive transfer of B cells [50].

Antibodies also induce pathology due to parasite antigens that are freed and adhere to healthy erythrocytes; this generates anemia or autoimmune reactions that cause damage to the kidneys and other tissues [55–58]. For example, pathogenesis of malaria nephropathy is linked to subendothelial deposits of immune complexes containing IgG and IgM [59, 60]. The antibodies involved in the elimination of the parasite mainly belong to cytophilic subclasses (IgG1 and IgG3) [50, 61]. In addition, high levels of immunoglobulin E (IgE) correlate with protection against severe malaria [62–64].

Interestingly, after the peak of parasitemia, cellular immune responses should switch from Th1- to Th2-type response in *P. chabaudi* infected mice [65], because the malaria pathogenesis is caused by inappropriate or excessive inflammatory responses to eliminate the parasite [43, 66].

TABLE 1: Mouse models of malaria infection. ECM: experimental cerebral malaria, PvAS: *P. vinckei* petteri arteether resistant, Py: *P. yoelii*, and KO: knockout.

Species	Subspecies/clone	Mouse strain and a nemia	Mouse strain and CM	Useful in research	Ref.
<i>P. berghei</i>	<i>P. berghei</i> ANKA	C57BL/6: lethal	C57BL/6: susceptible	Used as a model of ECM; there is genetic variation in the development of ECM between inbred strains	[15–17]
		CD-1: lethal	CBA: susceptible		
		C57BL/6J: non-lethal	BALB/c: resistant		
	<i>P. berghei</i> KI73	BALB/c: lethal	C57BL/6: lethal	Used to study pathogenesis, differs in some aspects of pathogenesis, indicating the influence of parasite genetic variation	[18]
<i>P. berghei</i> NK65	C57BL/6: lethal	C57BL/6: lethal	Is a murine noncerebral malaria strain; induces a progressive increase in parasitemia, intense hepatic inflammation, and death	[19]	
<i>P. berghei</i> XAT	Spontaneously cleared in immune competent mice		Irradiation-induced attenuated variant from lethal strain <i>Pb</i> NK65; comparison of immune responses induced by these lethal and attenuated parasites lead us to elucidate the mechanisms of protective immunity and pathogenesis	[20]	
<i>P. yoelii</i>	<i>P. yoelii</i> 17 NXZ	BALB/c: non-lethal	Most strains resistant	Used to study immune mechanisms and pathogenesis; <i>Py</i> ; line A1 is a mild line which is restricted to reticulocytes	[15]
	<i>P. yoelii</i> 17XL	BALB/c: lethal	Most strains susceptible	Used to identify vaccine-induced immune response	[21, 22]
	<i>P. yoelii</i> YM	C57BL/6: lethal		<i>Py</i> -YM is virulent infection which multiplies in both immature and mature erythrocytes	[23]
	<i>P. yoelii</i> YA	CBA: lethal		YM parasites are responsible for normocyte invasion, increased virulence compared to mild line <i>Py</i> YA parasites; lines YM and A/C differed additionally in enzyme and drug-sensitivity markers	[24]
<i>P. chabaudi</i>	<i>P. chabaudi</i> AS	A/J: lethal	C57BL/6JL-10KO: susceptible	Used to study immune mechanisms and immunoregulation by cytokines, to identify susceptibility loci, and to study the immune basis of pathology	[25–28]
		C57BL/6: non-lethal			
		BALB/c: non-lethal			
	<i>P. chabaudi</i> AJ	BALB/c: non-lethal		Used to study experimental vaccines and immunological processes that control hyperparasitaemia	[25, 27]
	<i>P. chabaudi</i> C3H	C3H: lethal		Is fast-growing and high pathogenicity, induces more anemia, weight loss, and is less infective to mosquitoes than DK strain	[29, 30]
	<i>P. chabaudi</i> adami DS	C57BL/6: non-lethal		Is slower growing and less pathogenic and more selective in its invasion of subset of RBCs than DK	[29, 30]
<i>P. chabaudi</i> adami DK	BALB/c: non-lethal				
<i>P. vinckei</i>	<i>P. vinckei</i> vinckei	BALB/c: lethal		Used to study pathogenesis and for chemotherapy studies; it causes aggressive, overwhelming hyperparasitaemia	[31]
	<i>P. vinckei</i> petteri	AKR: lethal			
	<i>P. vinckei</i> petteri	AKR: lethal (PvAS) AKR: non-lethal (PvAR)		Used for drug screening and immunological studies	[31]

Interestingly, *Plasmodium* can modulate the response of antigen presenting cells, such as M $\phi$  and dendritic cells (DC), which leads to suppression of the immune response [67]. In the infection with *P. yoelii* YM, the DC function is affected by the presence of TNF- $\alpha$  [68]. Wykes et al. suggested that damage to the activity of DCs is due to a virulence factor that is present in certain parasite strains because, when DCs were transferred from mice infected with a "nonlethal" strain to mice infected with a "lethal" parasite strain, the mice were protected [46].

The regulatory T cells are extremely important to control the inflammatory process in malaria, the number of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) increases in mice infected with *P. yoelii* [69] or *P. berghei* [70]. In addition, mice infected with the lethal *P. yoelii* XLI7 show higher levels of IL-10 and TGF- $\beta$  compared to mice infected with the nonlethal strain *P. yoelii* XNL, at early time points during infection [71]. Furthermore, the suppression of T cells induces lethality in mice infected with *P. yoelii*, while neutralization of TGF- $\beta$  and IL-10 decreases parasitemia and prolongs the survival of infected mice [71, 72]. Accordingly, Couper et al. reported that the main sources of IL-10 in lethal infection with *P. yoelii* are Treg cells [73]. Finally, the ablation of Treg cells from *P. yoelii*-infected DREG-BALB/c mice significantly increases T cell activation and decreases parasitemia [74]. In addition, in mice infected with nonlethal strains of *P. yoelii*, the presence of cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  during the chronic phase of infection was detected [71]. Thus, these data together suggest that the outcome of malaria infection could be determined by the balance of proinflammatory and regulatory immune responses, which could inhibit pathology (Figure 1).

### 3. Helminths

Helminths are multicellular worms, some of which have adapted successfully to a parasitic lifestyle. They can be classified into three taxonomic groups: cestodes (e.g., *Taenia solium*), nematodes (e.g., *Ascaris lumbricoides*), and trematodes (e.g., *Schistosoma mansoni*). Helminths vary in their biology in terms of size, lifecycle, and the diseases they cause. However, despite this complexity, helminths usually cause asymptomatic and chronic infections [76]. Helminths are among the most widespread infectious agents in human populations, especially in developing countries; they affect more than a third of the world's population, and more than 20 species infect humans (Table 2) [1, 77–83].

**3.1. Immune Response during Helminth Infections.** Infection of mammals by helminth parasites typically results in a conserved series of immune events that are orchestrated and dominated by T helper cell type (Th2) events, characterized by the activation of eosinophils, basophils, and mast cells; high levels of immunoglobulin E (IgE); and the proliferation of T cells that secrete IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 [84, 85]. Despite this response, helminths are able to modulate and suppress the host immune response to promote their own survival and their persistence in the host for a long time,

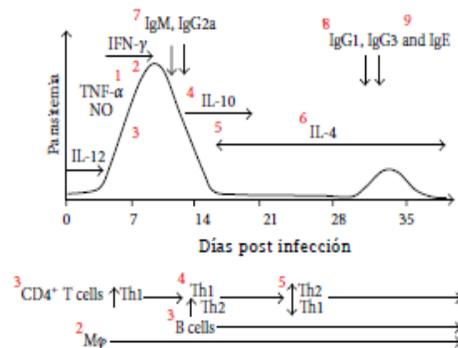


FIGURE 1: Representation of the course of *Plasmodium chabaudi* infection. Early infection with the erythrocytic stage is characterized by the production of proinflammatory cytokines, such as IL-12 and TNF- $\alpha$ , and a pronounced IFN- $\gamma$  response. In addition, NO produced by M $\phi$  helped control parasitemia (1). IFN- $\gamma$  activates M $\phi$ -mediated responses, in particular phagocytosis and elimination of pRBC (2). CD4<sup>+</sup> T cells, together with B cells, are crucial for developing efficient protection (3). Th1 production is downregulated later by an increased Th2-type immune response following primary infection (4). In a later stage of infection, after the peak parasitemia has been reached, CD4 T cells switch from a Th1 to a Th2 cytokine profile (5). This switch helps B cells produce antibodies (6). The antibodies inhibit the invasion of RBCs by the parasites, opsonize parasitized RBCs, or block pRBC adhesion to the vascular endothelium (7, 8). The slow late switch from noncytotoxic (IgM and IgG2a) (7) to cytotoxic subclasses (i.e., IgG1 and IgG3) (8) is involved in parasite elimination (9). However, IgE correlates with protection against severe malaria. Figure modified from Langhorne et al. 2004 [75] and Stevenson and Urban 2006 [67].

resulting in chronic infection [76, 86, 87]. These mechanisms include the ability to induce regulatory responses via regulatory T cells (Treg) which express molecules that inhibit the immune response, such as glucocorticoid-induced TNF-R-related protein (GITR) and the receptor cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) [88–91]. Treg cells also secrete suppressive cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$  [92]. On the other hand, B regulatory cells (Breg) also contribute to immune modulation and can release IL-10 and restrict proinflammatory responses [93]. Helminths also induce the differentiation of anti-inflammatory M $\phi$ , called alternatively activated M $\phi$  (AAM $\phi$ ) [94, 95], as well as regulatory dendritic cells (DCreg), which are characterized by the expression of the regulatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  [96, 97] (Figure 2).

This anti-inflammatory or regulatory response could be potentially detrimental to the host if it interferes with the development of protection against other infections that require an inflammatory response, such as *Leishmania major* [9, 98] or *Trypanosoma cruzi* [8].

The hyporesponsive immune response induced during chronic helminth infection affects not only the response to helminth antigens but also to other antigens. Several studies have examined the effect of infections on the immune response to other unrelated antigens. In particular, it has been

TABLE 2: Prevalence of common helminths in the world. These are estimates of the number of people with active infections. The number of people potentially exposed or with subclinical helminthic infections is much higher.

	Helminth	Estimated number of infected people	Ref.
Nematodes	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1450 billion	[77]
	<i>Trichuris trichiura</i>	1050 million	[77]
	<i>Ancylostoma duodenale</i>	740 million	[78]
	<i>Trichinella spiralis</i>	600 million	
	<i>Necator americanus</i>	576 million	[1]
	<i>Brugia malayi</i>	157 million	[1]
	<i>Wuchereria bancrofti</i> and <i>Brugia malayi</i>	120 million	[79]
	<i>Strongyloides stercoralis</i>	100 million	[80]
	<i>Onchocerca volvulus</i>	37 million	[81]
	<i>Loa loa</i>	13 million	[1]
Trematodes	<i>Schistosoma spp.</i>	207 million	[82]
	<i>Fasciola hepatica</i>	17 million	
	<i>Taenia spp.</i>	0.4 million	[81]
Cestodes	<i>Hymenolepis nana</i>	75 million	
	<i>Echinococcus spp.</i>	2–3.6 million	[83]

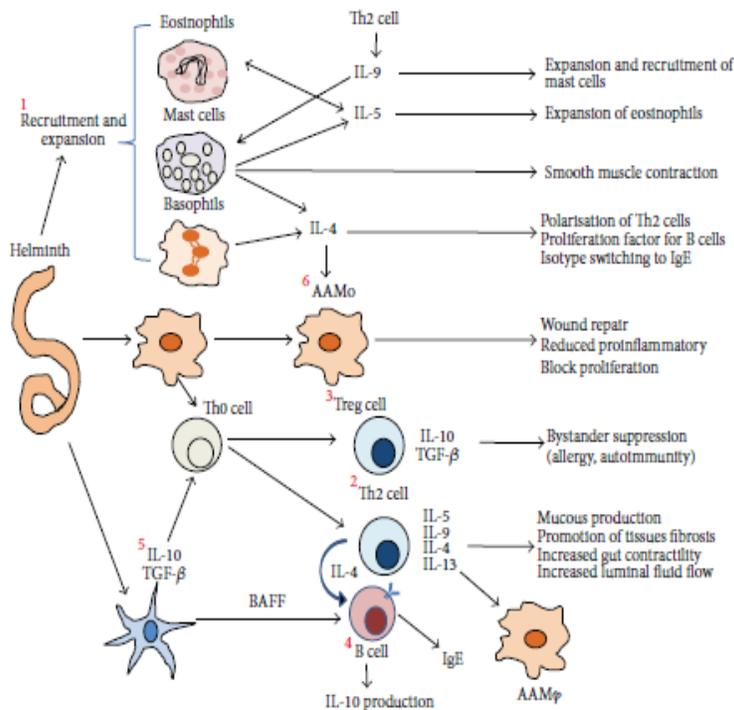


FIGURE 2: Helminth infections are strong inducers of a Th2-type immune response. These infections are characterized by the expansion and activation of eosinophils, basophils, and mast cells (1). Their upregulation due to high levels of immunoglobulin E (IgE) and the proliferation of T cells that secrete IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 are part of the host immune response against the parasite (2). However, helminth infections tend to be long-lived and largely asymptomatic because helminth infections are sustained through a parasite-induced immunomodulatory network, in particular through activation of regulatory T cells (3) and systemically elevated levels of IL-10 produced by B regulatory cells (4). They are additionally affected by the expression of the regulatory cytokines IL-10 and TGF-β, produced by regulatory dendritic cells (5) and alternatively activated Mφ (AAMφ) (6).

shown that the response to vaccines can be modified by the presence of concomitant helminth infection. For example, chronic *Onchocerca* infection [99], *Lymphatic filariasis* [42], or *Schistosoma* [100] reduces the effectiveness of the tetanus vaccine. Likewise, chronic *Onchocerca* infection affects *Bacillus Calmette-Guérin* and *Rubella* vaccinations [101]. Similarly, *Ascaris lumbricoides* reduces the response to the oral cholera vaccine, which can be restored by albendazole treatment [102]. However, helminthic infections are beneficial in the control of excessive inflammatory reactions, such as Crohn's disease [103] and ulcerative colitis [104], as well as in allergic diseases [105–107] and autoimmune diseases, such as encephalomyelitis [108, 109] and arthritis [110].

Despite the widespread acceptance that helminthic infections influence each other directly or indirectly, little attention has been paid to helminth-*Plasmodium* coinfections. One reason is that the interactions involved are complex and difficult to understand. Here, we will try to discuss several reports about helminth-malaria coinfections to clarify the consequences of this interaction.

#### 4. Human *Plasmodium*-Helminth Coinfection

*Plasmodium* spp. infect between 349 and 552 million people and kill over one million each year; approximately 40% of the world's population is at risk of being infected [2, 111]. Importantly, people living in malaria-endemic regions are exposed to other pathogens, especially those associated with poverty, such as helminths.

Several studies have been carried out to explore the influence of helminths on *Plasmodium* infection in humans (Table 3). However, the evidences described in these researches are controversial. While some studies have reported that helminth infection favors protection because reduces the *Plasmodium* parasite density [112], promotes protection against clinical malaria [113, 114], reduces anemia [113, 115, 116], cerebral malaria [117] and renal failure [118] (Table 3(a)). Other studies showed no influence of helminths on the course of *Plasmodium* infection [119–121] (Table 3(b)). In contrast, others showed an increased susceptibility to *Plasmodium* infection [114, 122], increased risk of complications [123–125], anemia [125, 126], hepatosplenomegaly [127, 128], and increased *Plasmodium* parasite load [129, 130] (Table 3(c)).

Although a Th2 phenotype is a conserved response to helminth infection in human and mice, the nature of the host immune response varies considerably between species of helminths; in some cases Th1 immune response predominates, depending on both the time of infection and the helminth development stage [131, 132]. The time that Th1 immune response is sustained until it polarizes toward Th2, could vary between species [133–135]. Thus, the controversial results related to helminth-*Plasmodium* coinfection in humans could be explained because many studies did not consider critical features of the helminth parasite biology. For example, the biological niche or parasite stage within the host. Neither the previous time of infection with the helminth nor the nutrition state and age of the host were taken into account.

Because all of these variables were not considered in existing studies in humans and in order to establish a possible consensus, we review in detail the murine *Plasmodium*-helminth coinfections, which in theory, controlled variables more rigorously.

#### 5. Experimental Models of Coinfection

Although helminth infections in mice are a questionable model for chronic helminth infections in humans, the fact is that many intractable helminths can reach large biomass which can change the cytokine environment and therefore the possible mechanisms of response. By establishing chronic infections and inducing strong Th2-type responses, helminths could have a potentially significant influence on the nature of the immune response in infected individuals and hence modify their susceptibility to subsequent infections with other important pathogens, at least those that require a Th1-type or mixed Th1-/Th2-type immune response, such as *Plasmodium* sp.

**5.1. *Schistosoma*-*Plasmodium* Coinfection.** According to the theory that Th2-type response evoked in response to helminth infection would have the ability to suppress proinflammatory Th1 response that generates immunopathology in *Plasmodium*-infected individuals, there are some reports of experimental models of coinfection with *Plasmodium berghei* ANKA (*Pb*) after *Schistosoma mansoni* (*Sm*) infection in ICR mice or with *Schistosoma japonicum*- (*Sj*-) *Pb* in C57BL/6 mice 7 or 8 weeks after helminthic infection, respectively; both coinfections showed a delay in death of mice [136, 137]. Interestingly, there was a reduction in the brain pathology associated with high levels of the anti-inflammatory cytokines IL-5, IL-10, and IL-13 [136–138].

In contrast, similar coinfection with *Pb* 7 or 8 weeks after *Sm* infection showed an increase in mortality and parasitemia in Swiss albino and C57BL/6 mice [138, 139]. Moreover, the coinfections in Swiss albino mice reduced the effectiveness of antimalarial treatments and delayed elimination of the parasite [139] (Table 4(a)). In these reports neither evidence of immune response nor pathology data were shown. Thus, we speculate that increase parasite load was probably due to the presence of helminth than inhibited Th1-type immune response which was able to contain the replication of *Plasmodium*, and the increased mortality was due to parasite load rather than a pathological Th1-state dependent. In line with this hypothesis, coinfection with *Plasmodium chabaudi* (*Pc*) at 8 weeks after *Sm* infection in C57BL/6 mice allowed high *Pc* replication. This increase was associated with low levels of the proinflammatory TNF- $\alpha$  [140].

It is known that the immune response against *Schistosoma* shifts from an early helminth-protective Th1-type immune response to a late helminth-permissive Th2-type response during the course of infection [134]. Thus, the moment when the second infection is acquired (2, 4 and 6 weeks post-helminth infection) would be critical for disease outcome and pathology [141]. These findings could be supported by the fact that chronically *Sm*-infected BALB/c mice coinfecting (6 weeks) with the nonlethal strain *Plasmodium yoelii* NXL

TABLE 3: Human studies of coinfection. ARF: acute renal failure, MSM: moderately severe malaria, *S. Schistosoma*, *A. Ascariis*, and *T. Trichurias*.

Study area	Age of group	Sample (size)	Study design	Helminth type	Outcome for malaria diseases in coinfection	R.d.
Senegal (Niakhar)	Children	178	Over a 2-year followup period	<i>S. haematobium</i>	Children with a light <i>S. haematobium</i> infection presented lower <i>P. falciparum</i> parasite densities than children not infected by <i>S. haematobium</i>	[112]
Mali (Tieneguebougou and Bougoudiana)	Children and young adults	62	Followed prospectively through a malaria transmission season	<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Mansonella persians</i>	Pre-existent filarial infection attenuates immune responses associated with severe malaria and protects against anemia, but has little effect on susceptibility to or severity of acute malaria infection	[113]
Southern Ethiopia	1 to 82 years Mean 18.6 years	1,065 febrile patients	Cross-sectional	<i>A. lambricoides</i> <i>Trichium</i> , <i>S. mansoni</i> , and hookworm	The chance of developing non-severe malaria were 2.6–3.3 times higher in individuals infected with helminth, compared to intestinal helminth-free individuals	[114]
South-central Côte d'Ivoire	Infants (6–23 months), children (6–8 year), and young women (15–25 years)	732 subjects	Cross-sectional survey	Soil-transmitted helminth	The odds ratio for being infected with non-severe <i>P. falciparum</i> increased with the number of intestinal helminth species	[115]
Brazil (Cairo)	School children 5 to 14 years	236	Cohort and cross-sectional	<i>A. lambricoides</i> hookworm and <i>T. trichium</i>	Coinfected children had lower odds of anemia and iron deficiency. Interaction between <i>P. falciparum</i> and light-intensity hookworm infections vary with age.	[116]
Thailand (Bangkok)	Mean 24 years (range 15–62)	537 files	Retrospective case-control	<i>A. lambricoides</i>	Helminthes protect against hemoglobin decrease during an acute malarial attack by <i>Plasmodium</i> . Percentage protection for mild controls against cerebral malaria ranged from 40% for <i>Ascaris</i> (present/absent) to 70% for <i>Ascaris</i> medium infection. For intermediate controls protection against cerebral malaria was 75% for <i>Ascaris</i> (present/absent).	[117]
Thailand (Bangkok)	19–37 years 22 patients with malaria-associated ARF and 157 patients with MSM	179	Retrospective case-control	<i>A. lambricoides</i> , <i>T. trichium</i> , hookworm, and <i>Strongyloides stercoralis</i>	Helminthes were associated with protection from renal failure. Helminth-infected controls were less likely to have jaundice or to have peripheral mature schizonts than controls without helminths	[118]
Kenya (Kisumu)	Age of group 8 years and older	561	cross-sectional	<i>S. haematobium</i>	Outcome for malaria diseases in coinfection. Children had 9.3 times the odds of coinfection compared to adults	[119]
Nigeria (Osun)	preschool children (6–59 months)	690	Double-blind and randomized	<i>A. lambricoides</i>	There was no significant difference in the severity of anaemia.	[120]

(b) Continued.

Study area	Age of group	Sample (size)	Study design	Helminth type	Outcome for malaria diseases in coinfection	Ref.
Kabale, Uganda	All ages (856)	856	Retrospective; 18 months	<i>A. lumbricooides</i> , <i>T. trichiura</i> , and hookworm	Non evidence for an association and risk of malaria	[121]
(c)						
Study area	Age of group	Sample (size)	Study design	Helminth type	Outcome for malaria diseases in coinfection	Ref.
Senegal (Niakhar and Bambié)	Children, mean 6.6 years	105	Prospective case-control	<i>A. lumbricooides</i>	Prevalence of <i>A. lumbricooides</i> infection was higher in cases of severe malaria	[123]
Northern Senegal	Children aged 6–15 years	512	Cohort	<i>S. mansoni</i>	The incidence rate of malaria attacks was higher among <i>S. mansoni</i> -infected individuals carrying the highest worm loads. In contrast, the rate of malaria attacks were lower in medium grade <i>S. mansoni</i> infections	[124]
Ghana (Kumasi)	Women (15–48 years) mean 26.8 years Children <5 years, children 5–14 years, and adults ≥15 years	746	Cross-sectional	<i>A. lumbricooides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>S. stercoralis</i> , and <i>E. vermicularis</i>	Coinfection resulted in increased risks of anemia, low birth weight, and small for gestational age infants	[125]
Ethiopia (Alaba Kulito)	Primary school children 4–17 years	1802 acute febrile patients	case-control	Hookworm, <i>A. lumbricooides</i> , and <i>T. trichiura</i>	Coinfection is associated with higher anaemia prevalence and low weight status than single infection with <i>Plasmodium</i> in children	[126]
Kenya (Makueni)	Primary school children 4–17 years	(221 and 228)	Cross-sectional	<i>S. mansoni</i>	Hepatosplenomegaly due to proinflammatory mechanism exacerbated by schistosomiasis	[127]
Kenya (Mangakete)	Children 4–17 years	79	Cross-sectional	<i>S. mansoni</i>	Hepatosplenomegaly is associated with low regulatory and Th2 response to <i>Schistosoma</i> antigens	[128]
Zimbabwe (Burma Valley)	Children 6–17 years	605	12-month followup of a cohort of children	Schistosome	Increased prevalence of malaria parasites and had higher sexual stage malaria parasite in children coinfecting with schistosomiasis	[129]
Cameroon (Bollimba)	9 months to 14 years	425 children		<i>A. lumbricooides</i> , <i>T. trichiura</i> , and hookworm	Coinfections in which heavy helminth loads showed high <i>P. falciparum</i> parasite loads compared with coinfections involving light helminth burden	[130]

TABLE 4: Helminthic infection drives immune response to challenge with *Plasmodium*. \*The time after helminth infection when the *Plasmodium* challenge was performed. ND: non-determined, wks: weeks, KO: knockout, ECM: experimental cerebral malaria.

(a)					(b)						
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.	Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
ICR HSD	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>S. mansoni</i>	7 wks	Low rates of ECM (30%), delay in death associated with high levels of IL-4, IL-10	[136]	C57BL/6	<i>P. chabaudi</i>	<i>H. polygyrus</i>	2, 3, or 5 wks	Increased parasitemia and mortality associated with low levels of IFN- $\gamma$ and high levels of TGF- $\beta$ , IL-10	[143]
C57BL/6	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>S. japonicum</i>	8 wks	Increased survival rate and reduction of the brain pathology. Th2 response induced by worm plays an important role in protecting against ECM	[137]	C57BL/6	<i>P. chabaudi</i> AS	<i>H. polygyrus</i>	2 wks	Increased parasitemia; however, it a melioides severe hypothermia and hypoglycaemia; besides this, it induced earlier reticulocytosis than <i>Pc</i> -infected WT mice	[144]
C57BL/6	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>S. mansoni</i>	8-9 wks	Increased parasitemia, mortality, weight loss, and hypothermia; decreased pathology in the brain associated with high levels of IL-5, IL-13 and low serum IFN- $\gamma$	[138]	IFN- $\gamma$ IL-1 $\gamma$ IL-23 $\gamma$	<i>P. chabaudi</i> AS	<i>H. polygyrus</i>	At the same time	Increased mortality and severe liver disease, associated with increased IFN- $\gamma$ , IL-1 $\gamma$ , and IL-22 in the liver. The coinfecting IFN- $\gamma$ and IL-23 $\gamma$ mice survive	[145]
Swiss albino	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>S. mansoni</i>	7 wks	Increased parasitemia and mortality	[139]	C57BL/6	<i>P. chabaudi</i> AS	<i>H. polygyrus</i>	2 wks with AgPc + adjuvant	Suppresses the protective efficacy of the malaria vaccine. Deworming treatment before antimalarial immunization restored the protective immunity to malaria challenge	[146]
C57BL/6	<i>P. chabaudi</i>	<i>S. mansoni</i>	8 wks	Delayed reduction/elimination of the parasite followed by administration of antimalarial treatment	[140]	C57BL/6	<i>P. yoelii</i> 17 XNL	<i>H. polygyrus</i>	2 wks	Increased pathology due to reduced response against <i>Py</i> (low levels of IFN- $\gamma$ ) in the spleen cells, as a result of higher activation of Treg	[147]
BALB/c	<i>P. yoelii</i> NXL (non-lethal)	<i>S. mansoni</i>	2, 4, and 6 wks	Increased parasitemia associated with a deficiency in the production of TNF- $\alpha$	[141]	BALB/c	<i>P. yoelii</i> 17 NXL	<i>H. polygyrus</i>	3 wks	Reduction of pathology, low levels of IFN- $\gamma$ , and high levels of IL-4 induced by helminthes	[148]
A/J	<i>P. chabaudi</i>	<i>S. mansoni</i>	8 wks	Hepato splenomegaly was more marked in coinfecting mice compared to either disease separately	[142]	C57BL/6	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>H. polygyrus</i>	2 wks	<i>Hp</i> infection did not alter ECM development, despite accelerated <i>P. berghei</i> growth <i>in vitro</i>	[149]

(b) Continued.

Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
C57BL/6	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>H. polygyrus</i>	2wks	No differences	[150]
(c)					
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
BALB/c	<i>P. yoelii</i> 17NXL	<i>E. caproni</i>	3wks	<i>Ec</i> showed counterregulatory antiparasite cytokine responses to non-lethal strain PyNXL (less IFN- $\gamma$ and high IL-4 levels induced by <i>Ec</i> )	[148]
BALB/c	<i>P. yoelii</i> 17NXL	<i>E. caproni</i>	5wks	Increased mortality and pathology; the pathology was reversible through clearance of <i>Ec</i> by praziquantel treatment	[151]
BALB/c	<i>P. yoelii</i> 17XL	<i>E. caproni</i>	5wks	<i>Ec</i> does not alter the course of Pyl7XL infection	[151]
(d)					
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
C57BL/6	<i>P. yoelii</i> 17NXL	<i>Strongyloides natii</i>	1wk	Did not alter cytokine response	[152]
BALB/c	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>Strongyloides natii</i>	1wk	The coinfection did not change the efficacy of vaccination against <i>Pb</i>	[153]
(e)					
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
BALB/c	<i>P. chabaudi</i>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	Same day	Reduction of anemia and parasitemia. Th2 response was inhibited by <i>Plasmodium</i>	[154]
C57BL/6	<i>P. berghei</i>	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	3wks	Delayed peak parasitemia, increased survival	[155]
(f)					
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
BALB/c	<i>P. chabaudi</i>	<i>L. sigmodontis</i>	8 wks	Increased severity of the anemia and weight loss associated with increased IFN- $\gamma$	[156]
C57BL/6 IL-10KO	<i>P. berghei</i> (ANKA)	<i>L. sigmodontis</i>	8 wks	Reduction of ECM associated with increased IL-10	[157]
BALB/c	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>L. sigmodontis</i>	2wks	Reduced protection against <i>P. berghei</i> challenge infection for low frequencies of CSP-specific CD8 T cells, CSP-specific IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ production	[153]
(g)					
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
CBA	<i>P. berghei</i> (ANKA)	<i>Brugia pahangi</i> irradiated attenuated	1wk	Increased survival and protected them against the ECM development; increase synthesis of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, and IgE	[158]
(h)					
Background mouse	<i>Plasmodium</i> strain	Helminth type	Coinfection time*	Malaria disease outcome	Ref.
C57BL/6	<i>P. berghei</i>	<i>Trichinella spiralis</i>	1-4 wks	Partially subdued parasitaemia and prolonged survival	[159]

(PyNXI) showed high mortality. In contrast, no mortality was observed in acutely (2 or 4 weeks) coinfecting mice, although they developed high parasitemia and hepatomegaly was higher in coinfecting mice compared with mice infected with each parasite separately [141] (Table 3(a)). Therefore, the time of previous infection may influence the response against *Plasmodium*.

Together, these reports suggested that the Th2 response, induced by *Schistosoma*, plays an important role in protecting against immunopathology in cerebral malaria. However, the presence of *Schistosoma* does not appear to modify the virulence of *Pb* and, consequently, it does not alter the lethality of *Plasmodium* infection.

Finally, one report supports the theory that Th2-type immune response evoked by the helminth infection would possess the ability to suppress the proinflammatory Th1-type response in its host. *Sm*-infected *A/J* mice coinfecting at 8 weeks with *Pc* were protected by the presence of concomitant *Sm* infection. The mice escaped death due to malaria; this effect was accompanied by enhanced levels of IFN- $\gamma$  [142] (Table 4(a)).

**5.2. Heligmosomoides polygyrus-Plasmodium Coinfection.** Several studies used mice of the same genetic background. Additionally, equivalent helminth and *Plasmodium* strains have been used to explain whether previous helminth infection plays an important role in the immune response against *Plasmodium*. Su et al. showed that C57BL/6 mice previously infected with *Heligmosomoides polygyrus* (*Hp*) and challenged with *Pc* either 3 or 5 weeks after helminthic infections developed high *Pc*-parasitemia and mortality, which was associated with low levels of IFN- $\gamma$  and high levels of TGF- $\beta$  and IL-10 [143]. However, *Hp-Pc* coinfection at 2 weeks resulted in less severe pathology (i.e., less hypothermia and hypoglycemia) and induced earlier reticulocytosis compared with mice infected only with *Pc* [144] (Table 4(b)).

Helmby in 2009 showed that mice developed high mortality in the *Hp-Pc* model when the two infections were introduced simultaneously. The mortality was due to severe liver pathology associated with increased IFN- $\gamma$ , IL-17, and IL-22. Interestingly, when using an IFN- $\gamma$  and IL-23 knockout strain, the mice survived the coinfection [145]. Thus, simultaneous *Hp-Pc* coinfection increased mortality, which may be a consequence of a synergistic effect that increased the inflammatory response (Table 4(b)).

In fact, in the first case, in which *Hp-Pc* coinfection was performed at 3 or 5 weeks after the initial helminthic infection, the high mortality observed may have been due to the anti-inflammatory response generated by the previous helminthic infection, which inhibited the inflammatory response necessary for control of the *Plasmodium* infection. However, when the coinfection was performed at the same time, mice developed a stronger inflammatory response, which generated greater pathology and mortality. This susceptibility is supported by the observation that chronic helminthic infection suppresses effective vaccine-induced protection against *Plasmodium*. However, when mice were administered with antihelminthic *Hp* treatment before malaria vaccination, the protective immunity against

*Pc* was restored [146]. Therefore, the timing of the infection with *Hp* plays an important role in the type of immune response that is generated within the host, and it determines the susceptibility following challenge with *Plasmodium*.

The genetic background of mice infected with helminths has a crucial role in the outcome of the immune response to *Plasmodium*. For example, coinfection with the nonlethal PyNXI strain at 2 weeks after *Hp* infection in C57BL/6 mice resulted in exacerbated pathology and poor survival of mice. This susceptibility was associated with a reduced response against PyNXI (i.e., low levels of IFN- $\gamma$ ) in the spleen cells. As a consequence, it increased the activation of Treg cells [147]. However, the same coinfection at 3 weeks in BALB/c mice decreased the pathology associated with low levels of IFN- $\gamma$  and increased levels of IL-4, but not IL-10 [148]. Therefore, the genetic background of mice infected with the helminth determines the outcome of PyNXI infection (Table 4(b)).

What happens when a lethal strain of *Plasmodium* was used in coinfection with *Hp*? The *Pb* ANKA infection in C57BL/6 mice induced typical symptoms of ECM [160, 161]. Coinfection with *Hp-Pb* ANKA 2 weeks after initial helminthic infection did not modify the development of ECM despite accelerated *Pb* growth *in vivo* [149]. Likewise, other results from the same model of coinfection in BALB/c and C57BL/6 mice showed no differences in parasitemia, anemia, or body weight in relation to mice infected only with *Plasmodium* [150]. Therefore, *Hp* infection does not affect the outcome of *Pb* ANKA (Table 4(b)).

**5.3. Echinostoma caproni-Plasmodium Coinfection.** Studies in BALB/c mice infected for 3 weeks with *E. caproni* (*Ec*) and then coinfecting with the nonlethal strain PyNXI showed that exacerbation of *Plasmodium*-induced pathology was associated with a deficit in IFN- $\gamma$  production [148]. Similarly, when *Ec*-infected mice were coinfecting at 5 weeks, increased mortality was observed. The exacerbated pathology was reversible through the clearance of *Ec* worms via praziquantel treatment [151]. However, coinfection at 5 weeks with the lethal PyXI strain did not alter the course of infection; all mice infected with PyXI (i.e., alone, in combination with *E. caproni*, or praziquantel treated) died on day 10 after infection [151] (Table 4(c)). Therefore, *Ec* infection does not affect the outcome of lethal PyXI, but *Ec* infection affects the protective response against a nonlethal *Plasmodium* strain.

**5.4. Strongyloides ratti-Plasmodium Coinfection.** Murine *Strongyloides ratti* (*Sr*) infection is a transient helminthic infection that is resolved spontaneously within 3-4 weeks. This infection induces a strong Th2-type immune response at day 6 after infection [135]. When BALB/c mice were coinfecting with the nonlethal strain PyNXI at day 6 after *Sr* infection, *Sr* induced a slightly enhanced peak of *Plasmodium* parasitemia and loss of body weight. In contrast, in C57BL/6 mice coinfecting at day 6, parasitemia level and body weight were not altered. Interestingly, the Th2-type immune response induced by *Sr* was significantly reduced upon PyNXI coinfection [152]. In addition, PyNXI clearance was not affected by previous infection with *Sr* in either C57BL/6 or BALB/c mice. Moreover, infection with *Sr* in BALB/c

mice did not change the efficacy of vaccination against *Pb* ANKA [153]. Therefore, infection with *Sr* does not affect the protective response against *Plasmodium*, although it generates small changes in parasitemia levels; which is not decisive for the outcome of *Plasmodium* infection (Table 4(d)).

**5.5. *Nippostrongylus brasiliensis*-*Plasmodium* Coinfection.** BALB/c mice infected with *Nippostrongylus brasiliensis* (*Nb*) exhibit a strong Th2-type immune response [162]. Even so, when BALB/c mice were coinfecting with *Nb* and *Pc* simultaneously, the Th2 response against *Nb* was impaired by *Plasmodium*. Interestingly, the *Nb*-*Pc* coinfection had a beneficial effect; it slightly ameliorated the severity of malarial anemia (SMA) and decreased parasitemia levels [154]. Similarly, C57BL/6 mice infected for 3 weeks with *Nb* and then coinfecting with *Pb* showed a delayed peak parasitemia and an increased survival time [155]. Thus, the presence of concomitant *Nb* infection plays an important role in inhibiting pathology associated with a challenge with *Pc* or *Pb* (Table 4(e)).

**5.6. Coinfection with Other Helminths.** Experimental models of coinfection with *Litomosoides sigmodontis* (*Ls*) 8 weeks and *Pc* infection in BALB/c mice showed increased SMA and weight loss associated with increased levels of IFN- $\gamma$  [156]. In contrast, coinfection with *Ls* 8 weeks and *Pb* infection in C57BL/6 mice showed significantly reduced ECM rates associated with increased levels of IL-10. This protection was inhibited in IL-10 KO mice [157]. High levels of IL-10 were important in reducing pathology but also interfered with the protective response to *Plasmodium* in the liver. In particular, chronic infection with *Ls* interfered with the protective efficacy of a vaccine against sporozoite *Pb* in the liver [153]. Therefore, infection with *Ls* exacerbates the pathology of a *Pc* infection. In contrast, infection with *Ls* inhibits pathology in *Pb* infection due to an anti-inflammatory cytokine response (Table 4(f)).

In addition, CBA/J mice infected with *Brugia pahangi* (*Bp*) for 1 week and then coinfecting with *Pb* displayed a low mortality rate, and mice were protected against the development of ECM. This protection was associated with increased serum IgE levels and Th2 cytokine production [158] (Table 4(g)). Similarly, infection with *Trichinella spiralis* (*Ts*) for 1 or 4 weeks in C57BL/6 mice greatly enhanced their resistance against the fatal coinfection with *Pb* [159]. Therefore, these observations suggest that the Th2-type immune response reduces brain pathology and increases survival in *Bp*- or *Ts*-*Pb* coinfection, perhaps due to the anti-inflammatory environment generated by the previous helminth infection (Table 4(h)).

The studies described above lead to different conclusions, while some of them suggest that prior infection with helminths induces resistance to *Plasmodium* [136, 137, 142, 148, 154, 155, 157–159], other studies do not show effects [149–153] and finally some others demonstrated an increased susceptibility to *Plasmodium* infection [138–141, 143–148, 151, 153, 156]. These contrasting results may partially be explained because this interaction is affected by the timing between the

hosts' exposure to the helminth and *Plasmodium*. In addition, the strain of each parasite is also important, coinfection with nonlethal *Plasmodium* strains in the early stages of a helminthic infection delayed the onset of parasitemia due to early, specific high production of IFN- $\gamma$ , but this response increased pathology. In contrast, a significant increase in susceptibility to nonlethal *Plasmodium* was observed when mice were coinfecting with *Plasmodium* in the late stages of helminthic infection, when the Th2-type immune response is predominant.

Coinfection with lethal strains of *Plasmodium* in the late stages of a helminthic infection inhibits severe pathology and increases the survival of mice due to a decrease inflammatory response (mainly IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ). In addition, the presence of a late anti-inflammatory Th2-type immune response induced by helminthic infection extended the survival of mice susceptible to *Plasmodium* infection; this may be due to a reduced pathological Th1-type immune response or may be due to induction of protective mix of Th1 and Th2 immune response. Recruitment and activation of M $\phi$  are essential for the clearance of malaria infections, but these have also been associated with adverse clinical outcomes [163]. Specifically, immunopathology of severe malaria is often originated from an excessive inflammatory Th1-type immune response. The expansion of Treg cells and the alternative activation of M $\phi$  by helminth infections may modulate the excessive inflammatory response to *Plasmodium*. Therefore, the chronic helminth infections inhibited pathology and increased survival in the challenge with lethal strains of *Plasmodium*.

## 6. Conclusions

The findings in this review demonstrate that the immune environment generated by a previous helminthic infection influences the response against *Plasmodium*. A helminth that persists in its host is able to significantly modify the host's susceptibility to or protection from *Plasmodium*. These modifications are dependent on the genetic background of mice, the type of helminth, and the time-course of the initial helminthic infection, which is crucial to the resulting immune response to *Plasmodium*.

The impact of helminth-*Plasmodium* coinfection on acute helminthic infection increased or synergized the Th1-type immune response. This might be successful in inducing a response that inhibits *Plasmodium* replication, but it increases the pathology and mortality in the host. Alternatively, chronically helminth-infected mice showed a shift toward Th2-type immune responses. This could render the host more susceptible to *Plasmodium* infection and favor their replication; however, this response protected the host from severe malaria (Figure 3). Overall, these results suggest that malarial immunity is influenced by helminth infections. Therefore, the study and manipulation of antimalarial immunity seems difficult in the absence of any information concerning the effects of helminths on this response.

## 7. Perspectives

The helminth-*Plasmodium* interaction may have undesirable implications for global public health; for example, malaria

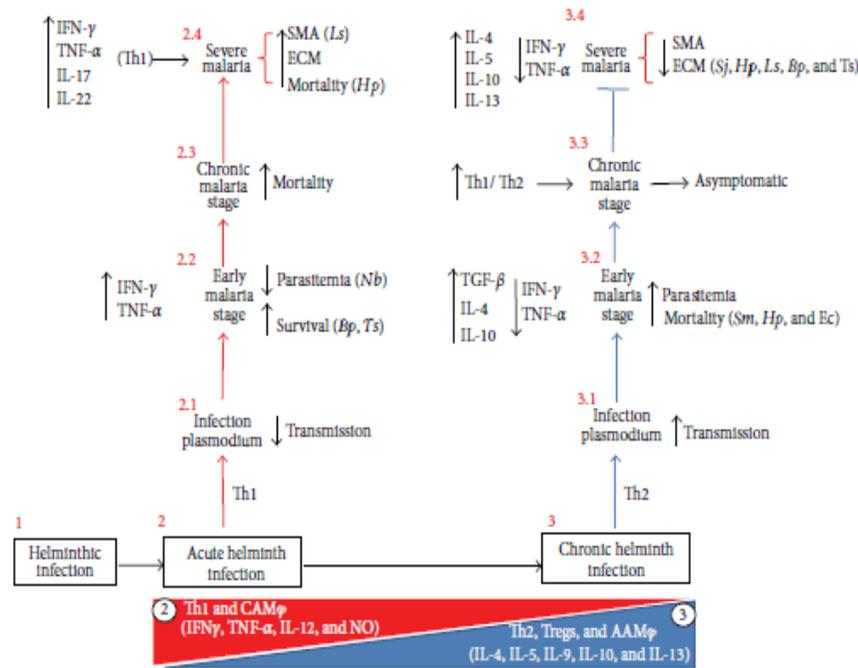


FIGURE 3: Concomitant helminth infection modified the immune response and susceptibility to *Plasmodium* infection. Helminth parasites have developed complicated strategies to infect and successfully colonize their host. (1) In an acute helminth infection, an initial Th1-like immune response (i.e., IFN- $\gamma$ , IL-12, and classical activation macrophage (CAM $\phi$ )) is associated with low parasite growth. (2) However, as the parasite colonizes the host, the immune response rapidly shifts toward a Th2-dominant response (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, and AAM $\phi$ ) in parallel with increased helminth parasitemia. (3) This "immune environment" determined by helminth infection modifies the immune response and the susceptibility to *Plasmodium*. That is, acutely helminth-infected mice exhibited (2) decreased transmission of *Plasmodium* (2.1), decreased parasitemia and increased survival (2.2) due to high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the early stage. However, this immune response increased mortality during the chronic stage of malaria (2.3) and increased severe pathology, such as ECM and severe malaria anemia (SMA) (2.4). In contrast, chronically helminth-infected mice (3) increased the transmission of *Plasmodium* (3.1), parasitemia and mortality (3.2) due to high levels of IL-4, IL-10, and TGF- $\beta$  and low levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . However, during the course of the coinfection, the Th1 response against *Plasmodium* was increased. In fact, a mixed Th1/Th2 response during the chronic stage induced low levels of parasitemia and was asymptomatic (3.3). Interestingly, chronic helminth infections inhibited severe pathologies caused by *Plasmodium*, such as ECM and SMA (3.4), and increased the survival due to a decreased inflammatory response. Abbreviations: *Schistosoma mansoni* (Sm), *Heligmosomoides polygyrus* (Hp), *Echinostoma caproni* (Ec), *Strongyloides ratti* (Sr), *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb), *Litomosoides sigmodontis* (Ls), *Brugia pahangi* (Bp), and *Trichinella spiralis* (Ts).

vaccines trials do not consider the immune response to helminths, and this could result in decreased performance or cause adverse effects. Thus, a better understanding of helminth-induced regulation in the antimalarial response is indispensable for the rational development of effective antimalarial vaccines and novel therapies to alleviate or prevent the symptoms of severe malaria. The risk that entire populations may have an increased susceptibility to *Plasmodium* should invite study regarding the possible epidemiological relevance of helminth infections and the impact of controlling them on malaria incidence. The presence of helminth infections could represent a much more important challenge for public health than previously recognized. Therefore, we would emphasize that it is extremely important to carry out experiments in animal models that use more rigorous criteria to define exhaustively all the ramifications of immune

regulation and potential side effects of helminth infection in the context of malaria. These results would allow extrapolate the observation in human populations presenting malaria.

### Conflict of Interests

The authors have no financial or other conflicts to declare.

### Acknowledgments

The authors thank Dr. Pascal Héron for critical review of the paper. They also thank CONACYT-México no. 0443480 for supported Ph.D. fellowship for the first author, Víctor H. Salazar-Castañón, to obtain his degree in biomedical sciences, UNAM. This work was supported by Grants 152224 from CONACYT and IN212412 from UNAM-DGAPA-PAPIIT.

## References

- [1] P. J. Hotez, P. J. Brindley, J. M. Bethony, C. H. King, E. J. Pearce, and J. Jacobson, "Helminth infections: the great neglected tropical diseases," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 4, pp. 1311–1321, 2008.
- [2] S. I. Hay, E. A. Okiro, P. W. Gething et al., "Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007," *PLoS Medicine*, vol. 7, no. 6, Article ID e1000290, 2010.
- [3] L. E. G. Mboera, K. P. Senkoro, S. F. Rumisha, B. K. Mayala, E. H. Shayo, and M. R. S. Mlozi, "*Plasmodium falciparum* and helminth coinfections among schoolchildren in relation to agro-ecosystems in Mvomero District, Tanzania," *Acta Tropica*, vol. 120, no. 1-2, pp. 95–102, 2011.
- [4] S. Brooker, W. Akhwale, R. Pullan et al., "Epidemiology of *Plasmodium*-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 77, no. 6, pp. 88–98, 2007.
- [5] S. Telfer, R. Birtles, M. Bennett, X. Lambin, S. Paterson, and M. Begon, "Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data," *Parasitology*, vol. 135, no. 7, pp. 767–781, 2008.
- [6] S. Telfer, X. Lambin, R. Birtles et al., "Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population," *Science*, vol. 330, no. 6001, pp. 243–246, 2010.
- [7] A. J. Marshall, L. R. Brunet, Y. Van Gessel et al., "*Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF- $\alpha$  and early death in C57BL/6 mice," *Journal of Immunology*, vol. 163, no. 4, pp. 2089–2097, 1999.
- [8] M. Rodríguez, L. I. Terrazas, R. Márquez, and R. Bojalil, "Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection," *Parasite Immunology*, vol. 21, no. 4, pp. 177–185, 1999.
- [9] M. Rodríguez-Sosa, I. Rivera-Montoya, A. Espinoza et al., "Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages," *Cellular Immunology*, vol. 242, no. 2, pp. 61–71, 2006.
- [10] C. E. Matisz, J. J. McDougall, K. A. Sharkey, and D. M. McKay, "Helminth parasites and the modulation of joint inflammation," *Journal of Parasitology Research*, vol. 2011, Article ID 942616, 8 pages, 2011.
- [11] S. Jeremiah, A. B. Janagond, and S. C. Parija, "Challenges in diagnosis of *Plasmodium knowlesi* infections," *Tropical Parasitology*, vol. 4, no. 1, pp. 25–30, 2014.
- [12] M. M. Stevenson and E. M. Riley, "Innate immunity to malaria," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 3, pp. 169–180, 2004.
- [13] M. F. Good, H. Xu, M. Wykes, and C. R. Engwerda, "Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research," *Annual Review of Immunology*, vol. 23, pp. 69–99, 2005.
- [14] M. Hernandez-Valladares, J. Naessens, and F. A. Iraqi, "Genetic resistance to malaria in mouse models," *Trends in Parasitology*, vol. 21, no. 8, pp. 352–355, 2005.
- [15] M. Asami, M. Owhashi, T. Abe, and Y. Nawa, "A comparative study of the kinetic changes of hemopoietic stem cells in mice infected with lethal and non-lethal malaria," *International Journal for Parasitology*, vol. 22, no. 1, pp. 43–47, 1992.
- [16] N. J. White, G. D. H. Turner, I. M. Medana, A. M. Dondorp, and N. P. J. Day, "The murine cerebral malaria phenomenon," *Trends in Parasitology*, vol. 26, no. 1, pp. 11–15, 2010.
- [17] C. R. Engwerda, L. Beattie, and F. H. Amante, "The importance of the spleen in malaria," *Trends in Parasitology*, vol. 21, no. 2, pp. 75–80, 2005.
- [18] O. C. Oliveira-Lima, D. Bernardes, M. C. Xavier Pinto, R. M. Esteves Arantes, and J. Carvalho-Tavares, "Mice lacking inducible nitric oxide synthase develop exacerbated hepatic inflammatory responses induced by *Plasmodium berghei* NK65 infection," *Microbes and Infection*, vol. 15, no. 13, pp. 903–910, 2013.
- [19] T. Yoshimoto, Y. Takahama, C. Wang, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi, "A pathogenic role of IL-12 in blood-stage murine malaria lethal strain *Plasmodium berghei* NK65 infection," *Journal of Immunology*, vol. 160, no. 11, pp. 5500–5505, 1998.
- [20] T. Yoshimoto, T. Yoneto, S. Waki, and H. Nariuchi, "Interleukin-12-dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria parasite *Plasmodium berghei* XAT, an attenuated variant of *P. berghei* NK65," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 177, no. 6, pp. 1674–1681, 1998.
- [21] L. Weiss, J. Johnson, and W. Weidanz, "Mechanisms of splenic control of murine malaria: tissue culture studies of the erythropoietic interplay of spleen, bone marrow, and blood in lethal (strain 17XL) *Plasmodium yoelii* malaria in BALB/c mice," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 41, no. 2, pp. 135–143, 1989.
- [22] P. R. R. Totino, A. D. Magalhães, L. A. Silva, D. M. Banic, C. T. Daniel-Ribeiro, and M. D. F. Ferreira-Da-Cruz, "Apoptosis of non-parasitized red blood cells in malaria: a putative mechanism involved in the pathogenesis of anaemia," *Malaria Journal*, vol. 9, no. 1, article 350, 2010.
- [23] L. J. Panton, G. Knowles, and D. Walliker, "Studies of antigens in *Plasmodium yoelii*. I. Antigenic differences between parasite lines detected by crossed immunoelectrophoresis," *Parasitology*, vol. 89, no. 1, pp. 17–26, 1984.
- [24] W. Jarra and K. N. Brown, "Protective immunity to malaria: studies with cloned lines of rodent malaria in CBA/Ca mice. IV. The specificity of mechanisms resulting in crisis and resolution of the primary acute phase parasitaemia of *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *P. yoelii yoelii*," *Parasite Immunology*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 1989.
- [25] G. S. Yap and M. M. Stevenson, "*Plasmodium chabaudi* AS: erythropoietic responses during infection in resistant and susceptible mice," *Experimental Parasitology*, vol. 75, no. 3, pp. 340–352, 1992.
- [26] T. J. Lamb and J. Langhorne, "The severity of malarial anaemia in *Plasmodium chabaudi* infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites," *Malaria Journal*, vol. 7, article 68, 2008.
- [27] A. Fortin, M. M. Stevenson, and P. Gros, "Complex genetic control of susceptibility to malaria in mice," *Genes and Immunity*, vol. 3, no. 4, pp. 177–186, 2002.
- [28] L. A. Sanni, W. Jarra, C. Li, and J. Langhorne, "Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*," *Infection and Immunity*, vol. 72, no. 5, pp. 3054–3058, 2004.
- [29] J. L. Villeval, A. Lew, and D. Metcalf, "Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. I. Erythropoietic populations," *Experimental Parasitology*, vol. 71, no. 4, pp. 364–374, 1990.
- [30] N. Gadsby, R. Lawrence, and R. Carter, "A study on pathogenicity and mosquito transmission success in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi* adami," *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 3, pp. 347–354, 2009.

- [31] A. J. Siddiqui, J. Bhardwaj, and S. K. Puri, "mRNA expression of cytokines and its impact on outcomes after infection with lethal and nonlethal *Plasmodium vinckei* parasites," *Parasitology Research*, vol. 110, no. 4, pp. 1517–1524, 2012.
- [32] B. J. Sina, C. Wright, C. T. Atkinson, R. Ballou, M. Aikawa, and M. Hollingdale, "Characterization of a sporozoite antigen common to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 69, no. 2, pp. 239–246, 1995.
- [33] A. P. Almeida, M. O. Dias, A. A. F. Vieira et al., "Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein," *Vaccine*, vol. 32, no. 19, pp. 2181–2187, 2014.
- [34] B. Ferraro, K. T. Talbotta, A. Balakrishna et al., "Inducing humoral and cellular responses to multiple sporozoite and liver-stage malaria antigens using exogenous plasmid DNA," *Infection and Immunity*, vol. 81, no. 10, pp. 3709–3720, 2013.
- [35] J. Langhorne, F. M. Ndungu, A. Sponaas, and K. Marsh, "Immunity to malaria: more questions than answers," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 7, pp. 725–732, 2008.
- [36] T. Imai, J. Shen, B. Chou et al., "Involvement of CD8<sup>+</sup> T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain," *European Journal of Immunology*, vol. 40, no. 4, pp. 1053–1061, 2010.
- [37] K. Mohan, P. Moulin, and M. M. Stevenson, "Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection," *Journal of Immunology*, vol. 159, no. 10, pp. 4990–4998, 1997.
- [38] H. R. Choudhury, N. A. Sheikh, G. J. Bancroft, D. R. Katz, and J. B. De Souza, "Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal *Plasmodium yoelii* malaria," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 11, pp. 6127–6132, 2000.
- [39] A. Fortin, M. M. Stevenson, and P. Gros, "Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature," *Human Molecular Genetics*, vol. 11, no. 20, pp. 2469–2478, 2002.
- [40] K. N. Couper, D. G. Blount, J. C. R. Hafalla, N. van Rooijen, J. B. de Souza, and E. M. Riley, "Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia," *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 12, pp. 5806–5818, 2007.
- [41] I. A. Clark, N. H. Hunt, G. A. Butcher, and W. B. Cowden, "Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon- $\gamma$  or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole," *The Journal of Immunology*, vol. 139, no. 10, pp. 3493–3496, 1987.
- [42] F. Kobayashi, T. Morii, T. Matsui et al., "Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of *Plasmodium yoelii yoelii*," *Parasitology Research*, vol. 82, no. 5, pp. 385–391, 1996.
- [43] N. H. Hunt and G. E. Grau, "Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria," *Trends in Immunology*, vol. 24, no. 9, pp. 491–499, 2003.
- [44] M. K. Manno, R. C. Halder, S. R. M. Morshed et al., "Essential role of extrathymic T cells in protection against malaria," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 1, pp. 301–306, 2002.
- [45] Z. Su and M. M. Stevenson, "IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 3, pp. 1348–1355, 2002.
- [46] M. N. Wykes, X. Q. Liu, L. Beattie et al., "*Plasmodium* strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria," *PLoS Pathogens*, vol. 3, no. 7, article e96, 2007.
- [47] J. A. Martiney, B. Sherry, C. N. Metz et al., "Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia," *Infection and Immunity*, vol. 68, no. 4, pp. 2259–2267, 2000.
- [48] M. A. McDevitt, J. Xie, G. Shanmugasundaram et al., "A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 5, pp. 1185–1196, 2006.
- [49] T. von der Weid, N. Honarvar, and J. Langhorne, "Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection," *Journal of Immunology*, vol. 156, no. 7, pp. 2510–2516, 1996.
- [50] J. Langhorne, C. Cross, E. Seixas, C. Li, and T. Von Der Weid, "A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 4, pp. 1730–1734, 1998.
- [51] M. Moser and K. M. Murphy, "Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development," *Nature Immunology*, vol. 1, no. 3, pp. 199–205, 2000.
- [52] M. Lazarou, J. A. Guevara Patiño, R. M. Jennings et al., "Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies," *Infection and Immunity*, vol. 77, no. 12, pp. 5659–5667, 2009.
- [53] T. von der Weid and J. Langhorne, "Altered response of CD4<sup>+</sup> T cell subsets to *Plasmodium chabaudi chabaudi* in B cell-deficient mice," *International Immunology*, vol. 5, no. 10, pp. 1343–1348, 1993.
- [54] A. W. Taylor-Robinson and R. S. Phillips, "Reconstitution of B-cell-depleted mice with B cells restores Th2-type immune responses during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection," *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 1, pp. 366–370, 1996.
- [55] K. Halder and N. Mohandas, "Malaria, erythrocytic infection, and anemia," *American Society of Hematology: Education Program*, pp. 87–93, 2009.
- [56] G. Pasvol, B. Clough, and J. Carlsson, "Malaria and the red cell membrane," *Blood Reviews*, vol. 6, no. 4, pp. 183–192, 1992.
- [57] P. A. Buffet, I. Safeukui, G. Milon, O. Mercereau-Pujalon, and P. H. David, "Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria," *Current Opinion in Hematology*, vol. 16, no. 3, pp. 157–164, 2009.
- [58] C. V. Nweneke, C. P. Doherty, S. Cox, and A. Prentice, "Iron delocalisation in the pathogenesis of malarial anaemia," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 104, no. 3, pp. 175–184, 2010.
- [59] R. S. Barsoum, "Malarial nephropathies," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 13, no. 6, pp. 1588–1597, 1998.
- [60] J. H. H. Ehrlich and F. U. Eke, "Malaria-induced renal damage: facts and myths," *Pediatric Nephrology*, vol. 22, no. 5, pp. 626–637, 2007.
- [61] M. Troye-Blomberg and K. Berzins, "Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions," *Microbes and Infection*, vol. 10, no. 9, pp. 948–952, 2008.

- [62] S. Berezcky, S. M. Montgomery, M. Troye-Blomberg, I. Rooth, M. Shaw, and A. Färnert, "Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria," *International Journal for Parasitology*, vol. 34, no. 8, pp. 935–942, 2004.
- [63] I. Safeukui, R. Vatan, M. Dethoua et al., "A role of IgE and CD23/NO immune pathway in age-related resistance of Lewis rats to *Plasmodium berghei* ANKA?" *Microbes and Infection*, vol. 10, no. 12–13, pp. 1411–1416, 2008.
- [64] J. Duarte, F. Herbert, V. Guiyedi et al., "High levels of immunoglobulin E autoantibody to 14-3-3 epsilon protein correlate with protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 206, no. 11, pp. 1781–1789, 2012.
- [65] J. Langhorne, S. J. Quin, and L. A. Sanni, "Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology," *Chemical Immunology*, vol. 80, pp. 204–228, 2002.
- [66] T. J. Lamb, D. E. Brown, A. J. Potocnik, and J. Langhorne, "Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 8, no. 6, pp. 1–22, 2006.
- [67] M. M. Stevenson and B. C. Urban, "Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria," *Parasite Immunology*, vol. 28, no. 1–2, pp. 5–14, 2006.
- [68] M. N. Wykes, X. Q. Liu, S. Jiang, C. Hirunpetcharat, and M. F. Good, "Systemic tumor necrosis factor generated during lethal *Plasmodium* infections impairs dendritic cell function," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 6, pp. 3982–3987, 2007.
- [69] H. Hisaeda, S. Hamano, C. Mitoma-Obata et al., "Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection," *European Journal of Immunology*, vol. 35, no. 12, pp. 3516–3524, 2005.
- [70] A. M. Vigário, O. Gorgette, H. C. Dujardin et al., "Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells expand during experimental *Plasmodium* infection but do not prevent cerebral malaria," *International Journal for Parasitology*, vol. 37, no. 8–9, pp. 963–973, 2007.
- [71] F. M. Omer, J. B. de Souza, and E. M. Riley, "Differential induction of TGF- $\beta$  regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections," *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 10, pp. 5430–5436, 2003.
- [72] F. Kobayashi, H. Ishida, T. Matsui, and M. Tsuji, "Effects of in vivo administration of anti-IL-10 or anti-IFN- $\gamma$  monoclonal antibody on the host defense mechanism against *Plasmodium yoelii* infection," *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 62, no. 6, pp. 583–587, 2000.
- [73] K. N. Couper, D. G. Blount, M. S. Wilson et al., "IL-10 from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection," *PLoS Pathogens*, vol. 4, no. 2, Article ID e1000004, 2008.
- [74] S. Abel, N. Lückheide, A. M. Westendorf et al., "Strong impact of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and limited effect of T cell-derived IL-10 on pathogen clearance during *Plasmodium yoelii* infection," *The Journal of Immunology*, vol. 188, no. 11, pp. 5467–5477, 2012.
- [75] J. Langhorne, F. R. Albano, M. Hensmann et al., "Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection," *Immunological Reviews*, vol. 201, pp. 35–47, 2004.
- [76] E. Moreau and A. Chauvin, "Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 428593, 9 pages, 2010.
- [77] L. Savioli and M. Albonico, "Soil-transmitted helminthiasis," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 8, pp. 618–619, 2004.
- [78] S. Brooker, A. C. A. Clements, and D. A. P. Bundy, "Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections," *Advances in Parasitology*, vol. 62, pp. 221–261, 2006.
- [79] E. A. Ottesen, "Lymphatic filariasis: treatment, control and elimination," *Advances in Parasitology*, vol. 61, pp. 395–441, 2006.
- [80] A. Olsen, L. van Lieshout, H. Marti et al., "Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases?" *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 103, no. 10, pp. 967–972, 2009.
- [81] S. Lustigman, R. K. Prichard, A. Gazzinelli et al., "A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 4, p. e1582, 2012.
- [82] L. Chitsulo, D. Engels, A. Montresor, and L. Savioli, "The global status of schistosomiasis and its control," *Acta Tropica*, vol. 77, no. 1, pp. 41–51, 2000.
- [83] S. Giri and S. C. Parija, "A review on diagnostic and preventive aspects of cystic echinococcosis and human cysticercosis," *Tropical Parasitology*, vol. 2, no. 2, pp. 99–108, 2012.
- [84] R. M. Maizels and M. Yazdanbakhsh, "Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms," *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 9, pp. 733–744, 2003.
- [85] R. M. Anthony, L. I. Rutitzky, J. F. Urban Jr., M. J. Stadecker, and W. C. Gause, "Protective immune mechanisms in helminth infection," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 12, pp. 975–987, 2007.
- [86] R. M. Maizels, A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M. D. Taylor, and J. E. Allen, "Helminth parasites—masters of regulation," *Immunological Reviews*, vol. 201, pp. 89–116, 2004.
- [87] G. Borkow, Q. Leng, Z. Weisman et al., "Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 8, pp. 1053–1060, 2000.
- [88] S. Sakaguchi, T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono, "Regulatory T cells and immune tolerance," *Cell*, vol. 133, no. 5, pp. 775–787, 2008.
- [89] B. Blankenhau, U. Klemm, M. Eschbach et al., "Strongyloides ratti infection induces expansion of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c Mice," *Journal of Immunology*, vol. 186, no. 7, pp. 4295–4305, 2011.
- [90] M. D. Taylor, N. van der Werf, A. Harris et al., "Early recruitment of natural CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection," *European Journal of Immunology*, vol. 39, no. 1, pp. 192–206, 2009.
- [91] C. A. M. Finney, M. D. Taylor, M. S. Wilson, and R. M. Maizels, "Expansion and activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 7, pp. 1874–1886, 2007.
- [92] R. Maizels and M. Yazdanbakhsh, "T-cell regulation in helminth parasite infections: implications for inflammatory diseases," *Chemical Immunology and Allergy*, vol. 94, pp. 112–123, 2008.

- [93] L. Husaarts, L. E. P. M. van der Vlugt, M. Yazdanbakhsh, and H. H. Smits, "Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 128, no. 4, pp. 733–739, 2011.
- [94] O. Atochina, T. Daly-Engel, D. Piskorska, E. McGuire, and D. A. Harn, "A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1+ macrophages that suppress naive CD4+ T cell proliferation via an IFN- $\gamma$  and nitric oxide-dependent mechanism," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 8, pp. 4293–4302, 2001.
- [95] S. J. Jenkins and J. E. Allen, "Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 262609, 14 pages, 2010.
- [96] B. Everts, H. H. Smits, C. H. Hokke, and M. Yazdanbakhsh, "Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses," *European Journal of Immunology*, vol. 40, no. 6, pp. 1525–1537, 2010.
- [97] C. A. Terrazas, L. Gómez-García, and L. I. Terrazas, "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*, vol. 40, no. 9, pp. 1051–1062, 2010.
- [98] A. C. La Flamme, P. Scott, and E. J. Pearce, "Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages," *Parasite Immunology*, vol. 24, no. 7, pp. 339–345, 2002.
- [99] P. J. Cooper, I. Espinel, W. Paredes, R. H. Guderian, and T. B. Nutman, "Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 178, no. 4, pp. 1133–1138, 1998.
- [100] D. Elias, H. Akuffo, A. Pawlowski, M. Haile, T. Schön, and S. Britton, "*Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*," *Vaccine*, vol. 23, no. 11, pp. 1326–1334, 2005.
- [101] H. D. Kilian and G. Nielsen, "Cell-mediated and humoral immune responses to BCG and rubella vaccinations and to recall antigens in onchocerciasis patients," *Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 40, no. 4, pp. 445–453, 1989.
- [102] P. J. Cooper, M. Chico, C. Sandoval et al., "Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR," *Infection and Immunity*, vol. 69, no. 3, pp. 1574–1580, 2001.
- [103] R. W. Summers, D. E. Elliott, J. F. Urban Jr., R. Thompson, and J. V. Weinstock, "*Trichuris suis* therapy in Crohn's disease," *Gut*, vol. 54, no. 1, pp. 87–90, 2005.
- [104] R. W. Summers, D. E. Elliott, J. F. Urban Jr., R. A. Thompson, and J. V. Weinstock, "*Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial," *Gastroenterology*, vol. 128, no. 4, pp. 825–832, 2005.
- [105] H. H. Smits and M. Yazdanbakhsh, "Chronic helminth infections modulate allergen-specific immune responses: protection against development of allergic disorders?" *Annals of Medicine*, vol. 39, no. 6, pp. 428–439, 2007.
- [106] H. H. Smits, H. Hammad, M. van Nimwegen et al., "Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 120, no. 4, pp. 932–940, 2007.
- [107] M. S. Wilson and R. M. Maizels, "Regulation of allergy and autoimmunity in helminth infection," *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, vol. 26, no. 1, pp. 35–50, 2004.
- [108] J. L. Reyes, A. F. Espinoza-Jiménez, M. I. González, L. Verdín, and L. I. Terrazas, "*Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis," *Cellular Immunology*, vol. 267, no. 2, pp. 77–87, 2011.
- [109] A. Gruden-Movsesijan, N. Ilic, M. Mostarica-Stojkovic, S. Stosic-Grujicic, M. Milic, and L. Sofronic-Milosavljevic, "*Trichinella spiralis*: modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats," *Experimental Parasitology*, vol. 118, no. 4, pp. 641–647, 2008.
- [110] F. A. C. Rocha, A. K. R. M. Leite, M. M. L. Pompeu et al., "Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models," *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 6, pp. 2736–2745, 2008.
- [111] S. I. Hay, C. A. Guerra, P. W. Gething et al., "A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007," *PLoS Medicine*, vol. 6, no. 3, Article ID e1000048, 2007.
- [112] M. Lemaître, L. Watier, V. Briand, A. Garcia, J. Y. Le Hesran, and M. Cot, "Coinfection with *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma haematobium*: additional evidence of the protective effect of Schistosomiasis on malaria in Senegalese children," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 90, no. 2, pp. 329–334, 2014.
- [113] H. Dolo, Y. I. Coulibaly, B. Dembele et al., "Filariasis attenuates anemia and proinflammatory responses associated with clinical malaria: a matched prospective study in children and young adults," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 11, Article ID e1890, 2012.
- [114] A. Degarege, M. Legesse, G. Medhin, A. Animut, and B. Erko, "Malaria and related outcomes in patients with intestinal helminths: a cross-sectional study," *BMC Infectious Diseases*, vol. 12, article 291, 2012.
- [115] A. A. Righetti, D. Glinz, L. G. Adiossan et al., "Interactions and potential implications of *Plasmodium falciparum*-hookworm coinfection in different age groups in South-central Cote d'Ivoire," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 11, Article ID e1889, 2012.
- [116] G. C. Melo, R. C. Reyes-Lecca, S. Vitor-Silva et al., "Concurrent helminthic infection protects schoolchildren with *Plasmodium vivax* from anemia," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 6, Article ID e11206, 2010.
- [117] M. Nacher, F. Gay, P. Singhasivanon et al., "*Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria," *Parasite Immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 107–113, 2000.
- [118] M. Nacher, P. Singhasivanon, U. Silachamroon et al., "Helminth infections are associated with protection from malaria-related acute renal failure and jaundice in Thailand," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 65, no. 6, pp. 834–836, 2001.
- [119] L. S. Florey, C. H. King, M. K. van Dyke et al., "Partnering parasites: evidence of synergism between heavy *Schistosoma haematobium* and *plasmodium* species infections in Kenyan children," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 7, Article ID e1723, 2012.
- [120] F. A. Abanyie, C. McCracken, P. Kirwan et al., "*Ascaris* coinfection does not alter malaria-induced anaemia in a cohort of Nigerian preschool children," *Malaria Journal*, vol. 12, no. 1, article 1, 2013.

- [121] A. E. Shapiro, E. M. Tukahebwa, J. Kasten et al., "Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 99, no. 1, pp. 18–24, 2005.
- [122] M. Nacher, P. Singhasivanon, S. Yimsamran et al., "Intestinal helminth infections are associated with increased incidence of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand," *Journal of Parasitology*, vol. 88, no. 1, pp. 55–58, 2002.
- [123] J. Le Hesran, J. Akiana, E. H. M. Ndiaye, M. Dia, P. Senghor, and L. Konate, "Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 98, no. 7, pp. 397–399, 2004.
- [124] C. Sokhna, J. Le Hesran, P. A. Mbaye et al., "Increase of malaria attacks among children presenting concomitant infection by *Schistosoma mansoni* in Senegal," *Malaria Journal*, vol. 3, article 43, 2004.
- [125] N. J. Yatich, P. E. Jolly, E. Funkhouser et al., "The effect of malaria and intestinal helminth coinfection on birth outcomes in Kumasi, Ghana," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 82, no. 1, pp. 28–34, 2010.
- [126] A. Degarege, A. Animut, M. Legesse, and B. Erko, "Malaria and helminth co-infections in outpatients of Alaba Kulito Health Center, southern Ethiopia: a cross sectional study," *BMC Research Notes*, vol. 3, article 143, 2010.
- [127] S. Wilson, F. M. Jones, J. K. Mwatha et al., "Hepatosplenomegaly associated with chronic malaria exposure: evidence for a pro-inflammatory mechanism exacerbated by schistosomiasis," *Parasite Immunology*, vol. 31, no. 2, pp. 64–71, 2009.
- [128] S. Wilson, F. M. Jones, J. K. Mwatha et al., "Hepatosplenomegaly is associated with low regulatory and Th2 responses to schistosome antigens in childhood schistosomiasis and malaria coinfection," *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 5, pp. 2212–2218, 2008.
- [129] D. T. Sangweme, N. Midzi, S. Zinyowera-Mutapuri, T. Mdu-luza, M. Diener-West, and N. Kumar, "Impact of schistosome infection on *Plasmodium falciparum* Malariometric indices and immune correlates in school age children in Burma valley, Zimbabwe," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 11, article e882, 2010.
- [130] T. K. Nkuo-Akenji, P. C. Chi, J. F. Cho, K. K. J. Ndamukong, and I. Sumbele, "Malaria and helminth co-infection in children living in a malaria endemic setting of Mount Cameroon and predictors of anemia," *Journal of Parasitology*, vol. 92, no. 6, pp. 1191–1195, 2006.
- [131] N. Ishikawa, P. K. Goyal, Y. R. Mahida, K. Li, and D. Wakelin, "Early cytokine responses during intestinal parasitic infections," *Immunology*, vol. 93, no. 2, pp. 257–263, 1998.
- [132] G. L. Stewart, H. Na, L. Smart, and L. L. Seelig Jr., "The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with *Trichinella spiralis*," *Parasitology Research*, vol. 85, no. 8–9, pp. 672–677, 1999.
- [133] L. I. Terrazas, R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde, "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*, vol. 84, no. 1, pp. 74–81, 1998.
- [134] E. J. Pearce and A. S. MacDonald, "The immunobiology of schistosomiasis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 7, pp. 499–511, 2002.
- [135] M. L. Eschbach, U. Klemm, J. Kolbaum, B. Blankenhaus, N. Brattig, and M. Breloer, "Strongyloides ratti infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN- $\gamma$  production in mice," *Parasite Immunology*, vol. 32, no. 5, pp. 370–383, 2010.
- [136] J. H. Wankine-Grinberg, D. Gold, A. Ohayon et al., "*Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria," *Malaria Journal*, vol. 9, no. 1, article 5, 2010.
- [137] M. L. Wang, Y. M. Cao, E. J. Luo, Y. Zhang, and Y. J. Guo, "Pre-existing *Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to *Plasmodium berghei* infection in C57BL/6 mice," *Malaria Journal*, vol. 12, article 322, 2013.
- [138] K. Bucher, K. Dietz, P. Lackner et al., "*Schistosoma* co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria," *International Journal for Parasitology*, vol. 41, no. 1, pp. 21–31, 2011.
- [139] M. Legesse, B. Erko, and F. Balcha, "Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium berghei* co-infected mice," *Acta Tropica*, vol. 91, no. 2, pp. 161–166, 2004.
- [140] H. Helmbj, M. Kullberg, and M. Troye-Blomberg, "Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections," *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 11, pp. 5167–5174, 1998.
- [141] D. Sangweme, C. Shiff, and N. Kumar, "*Plasmodium yoelii*: adverse outcome of non-lethal *P. yoelii* malaria during co-infection with *Schistosoma mansoni* in BALB/c mouse model," *Experimental Parasitology*, vol. 122, no. 3, pp. 254–259, 2009.
- [142] A. Yoshida, H. Maruyama, T. Kumagai et al., "*Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice," *International Immunology*, vol. 12, no. 8, pp. 1117–1125, 2000.
- [143] Z. Su, M. Segura, K. Morgan, J. C. Loredó-Osti, and M. M. Stevenson, "Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection," *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 6, pp. 3531–3539, 2005.
- [144] M. Segura, C. Matte, N. Thawani, Z. Su, and M. M. Stevenson, "Modulation of malaria-induced immunopathology by concurrent gastrointestinal nematode infection in mice," *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 14, pp. 1525–1532, 2009.
- [145] H. Helmbj, "Gastrointestinal nematode infection exacerbates malaria-induced liver pathology," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 9, pp. 5663–5671, 2009.
- [146] Z. Su, M. Segura, and M. M. Stevenson, "Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 4, pp. 2138–2144, 2006.
- [147] K. Tetsutani, K. Ishiwata, H. Ishida et al., "Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4 + CD25 + Foxp3 + Treg in mice," *European Journal of Immunology*, vol. 39, no. 10, pp. 2822–2830, 2009.
- [148] G. S. Noland, J. F. Urban Jr., B. Fried, and N. Kumar, "Counter-regulatory anti-parasite cytokine responses during concurrent *Plasmodium yoelii* and intestinal helminth infections in mice," *Experimental Parasitology*, vol. 119, no. 2, pp. 272–278, 2008.
- [149] K. Tetsutani, K. Ishiwata, M. Torii, S. Hamano, H. Hisaeda, and K. Himeno, "Short report: concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* modulates murine host response against *Plasmodium berghei* ANKA infection," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 79, no. 6, pp. 819–822, 2008.

- [150] B. de Souza and H. Helmby, "Concurrent gastro-intestinal nematode infection does not alter the development of experimental cerebral malaria," *Microbes and Infection*, vol. 10, no. 8, pp. 916–921, 2008.
- [151] G. S. Noland, T. K. Graczyk, B. Fried, E. J. Fitzgerald, and N. Kumar, "Exacerbation of *Plasmodium yoelii* malaria in *Echinostoma caproni* infected mice and abatement through anthelmintic treatment," *Journal of Parasitology*, vol. 91, no. 4, pp. 944–948, 2005.
- [152] J. Kolbaum, M.-L. Eschbach, C. Steeg, T. Jacobs, B. Fleischer, and M. Breloer, "Efficient control of *Plasmodium yoelii* infection in BALB/c and C57BL/6 mice with pre-existing *Strongyloides rattii* infection," *Parasite Immunology*, vol. 34, no. 7, pp. 388–393, 2012.
- [153] J. Kolbaum, S. Tartz, W. Hartmann et al., "Nematode-induced interference with the anti-*Plasmodium* CD8+ T-cell response can be overcome by optimizing antigen administration," *European Journal of Immunology*, vol. 42, no. 4, pp. 890–900, 2012.
- [154] M. A. Hoeve, K. J. Mylonas, K. J. Fairlie-Clarke, S. M. Mahajan, J. E. Allen, and A. L. Graham, "*Plasmodium chabaudi* limits early *Nippostrongylus brasiliensis*-induced pulmonary immune activation and Th2 polarization in co-infected mice," *BMC Immunology*, vol. 10, article 60, 2009.
- [155] N. Xiao, T. Furuta, T. Kiguchi, and S. Kojima, "Effect of *Nippostrongylus brasiliensis* induced alterations in T helper cell subsets on *Plasmodium berghei* infection in mice," *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases*, vol. 18, no. 5, pp. 286–290, 2000.
- [156] A. L. Graham, T. J. Lamb, A. F. Read, and J. E. Allen, "Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 191, no. 3, pp. 410–421, 2005.
- [157] S. Specht, D. F. Ruiz, B. Dubben, S. Deininger, and A. Hoerauf, "Filaria-induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria," *Microbes and Infection*, vol. 12, no. 8–9, pp. 635–642, 2010.
- [158] Y. Yan, G. Inuo, N. Akao, S. Tsukidate, and K. Fujita, "Down-regulation of murine susceptibility to cerebral malaria by inoculation with third-stage larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*," *Parasitology*, vol. 114, no. 4, pp. 333–338, 1997.
- [159] B. Z. Ngwenya, "Enhanced resistance to *Plasmodium berghei* in mice previously infected with *Trichinella spiralis*," *Parasite Immunology*, vol. 4, no. 3, pp. 197–267, 1982.
- [160] C. Engwerda, E. Belnoue, A. C. Grüner, and L. Réna, "Experimental models of cerebral malaria," *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 297, pp. 103–143, 2005.
- [161] C. Hermsen, T. Van De Wiel, E. Mommers, R. Sauerwein, and W. Eling, "Depletion of CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T-cells prevents *Plasmodium berghei* induced cerebral malaria in end-stage disease," *Parasitology*, vol. 114, no. 1, pp. 7–12, 1997.
- [162] B. Min, M. Prout, J. Hu-Li et al., "Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 200, no. 4, pp. 507–517, 2004.
- [163] C. L. L. Chua, G. Brown, J. A. Hamilton, S. Rogerson, and P. Boeuf, "Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?" *Trends in Parasitology*, vol. 29, no. 1, pp. 26–34, 2013.

## **14.2. Apéndice 2**

**Artículo experimental**

**Co-infection: the outcome of *Plasmodium* infection differs  
according to the time of pre-existing helminth infection**

**Víctor H. Salazar-Castañón, Martha Legorreta-Herrera, Miriam Rodríguez-Sosa**



## Co-infection: the outcome of *Plasmodium* infection differs according to the time of pre-existing helminth infection

Victor H. Salazar-Castañón<sup>1</sup> · Imelda Juárez-Avelar<sup>1</sup> · Martha Legorreta-Herrera<sup>2</sup> · Tzipe Govezensky<sup>3</sup> · Miriam Rodríguez-Sosa<sup>1</sup>

Received: 7 November 2017 / Accepted: 7 June 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Although helminth-*Plasmodium* coinfections are common in tropical regions, the implications of this co-existence for the host immune response are poorly understood. In order to understand the effect of helminth infection at different times of coinfection on the immune response against *Plasmodium* infection, BALB/c mice were intraperitoneally infected with *Taenia crassiceps* (*Tc*). At 2 (*Tc*2) or 8 (*Tc*8) weeks post-infection, mice were intravenously infected with  $1 \times 10^3$  *Plasmodium yoelii* (*Py*) 17XL-parasitized red blood cells. *Py* 17XL-single-infected mice developed cachexia, splenomegaly, and anemia, and died at 11 days post-infection. Importantly, *Tc*2 + *Py*-coinfected mice showed increased survival of 58% on day 11, but developed pathology (cachexia and splenomegaly) and succumbed on day 18 post-coinfection, this latter associated with high levels of IL-1 $\beta$  and IL-12, and reduced IFN- $\gamma$  in serum compared with *Py* 17XL-single-infected mice. Interestingly, *Tc*8 + *Py*-coinfected mice showed increased survival up to 80% on day 11 and succumbed on day 30 post-coinfection. This increased survival rate conferred by chronic helminth infection was associated with a decreased pathology and mixed inflammatory-type 1/anti-inflammatory-type 2 immune profile as evidenced by the production of high levels of IL-12 and IL-10, and reduced TNF- $\alpha$  from macrophages, high levels of IL-4 and IL-10, and low levels of IFN- $\gamma$  from spleen cells. Also high serum levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4, and IL-10, but a significant reduction of IFN- $\gamma$  were observed. Together, these data indicate that polarization of the cell-mediated response modulated by a pre-existing helminth infection differentially impacts on the host immune response to *Py* 17XL in a time-dependent manner.

**Keywords** Co-infection · Mixed infections · Malaria · Helminths · *Taenia crassiceps* · *Plasmodium yoelii* 17XL · Host-pathogen interaction

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5965-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miriam Rodríguez-Sosa  
rodriguezsm@unam.mx

<sup>1</sup> Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenida de los Barrios Número 1, Colonia Los Reyes Iztacala, C.P. 54090 Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

<sup>2</sup> Laboratorio de Inmunología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Batalla 5 de mayo s/n, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa, C.P. 09230 Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, Mexico

### Introduction

Multiparasitism is the rule in populations living in tropical and subtropical countries. In particular, helminth and *Plasmodium* infections coexist in malaria-endemic regions, where this disease is the main cause of morbidity and mortality (Hay et al. 2010). Although helminth-*Plasmodium* coinfections are common (Brooker et al. 2007; Salazar-Castanón et al. 2014), the implications of this coexistence for the host immune response and disease outcome are poorly understood. The interaction involving immunological responses between single-celled protozoan and multicellular helminths is complex. Specifically, this is because *Plasmodium* and helminths occupy different niches in the host and elicit different types of immune responses.

Helminth parasites generally induce chronic and asymptomatic diseases, and they have developed complex strategies to escape or modulate the immune response of their hosts (Moreau and Chauvin 2010). These parasites suppress the inflammatory-Th1 response by eliciting polarized Th2 and/or regulatory immune responses characterized by high levels of IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, and IL-13 (Anthony et al. 2007); regulatory pathways (Rodríguez-Sosa et al. 2002; Rodríguez-Sosa et al. 2004); and the modulation of innate immune cells such as macrophages (M $\phi$ ) (Atochina et al. 2001; Jenkins and Allen 2010) and dendritic cells (DC) (Everts et al. 2010; Terrazas et al. 2010).

Resistance to *Plasmodium* infections has been associated with an early and pronounced inflammatory Th1-type immune response characterized by IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  production during the primary infection (Langhorne et al. 2004), followed by a regulatory Th2 (IL-4 and IL-10) immune response, which is required to control chronic parasitemia and avoid pathologic damage due to exacerbated Th1-type responses (Schofield and Grau 2005). Previous studies addressing helminth-*Plasmodium* coinfection have suggested that immunomodulatory responses displayed by helminths could affect the outcomes of *Plasmodium* infection; however, there is no consensus on the results of this interaction. While some human and animal observational studies have shown that helminth infections reduce the severity of *Plasmodium* infection (Dolo et al. 2012; Doumbo et al. 2014; Nacher et al. 2000; Righetti et al. 2012; Specht et al. 2010; Waknine-Grinberg et al. 2010; Wang et al. 2013; Yoshida et al. 2000), other studies have instead suggested that they increase the severity of *Plasmodium* infections (Anchang-Kimbi et al. 2017; Degarege et al. 2010; Getie et al. 2015; Helmsby 2009; Legesse et al. 2004; Sangweme et al. 2010; Su et al. 2005; Tetsutani et al. 2009). To understand the effect that helminths have on the immune response to *Plasmodium* at different times of coinfection, we developed a coinfection mouse model with *Taenia crassiceps*-*Plasmodium yoelii* 17XL.

*T. crassiceps* (*Tc*) is a helminth parasite that can be found in its adult form in the small bowel of canids, whereas the larval stage (metacystode) dwells within the peritoneal and pleural cavities of rodents. In the larval stage, *Tc* reproduces asexually through budding, and is able to remain in its hosts for long periods of time with minimal damage (Peon et al. 2013). Experimental murine *Tc* cysticercosis has been shown to elicit a rapid and transient Th1-type response mediated by the production of IFN- $\gamma$  and IL-12, which is associated with a restriction of metacystode growth (Rodríguez-Sosa et al. 2004; Terrazas et al. 1999). As the infection progresses, the Th1-inflammatory response is replaced with a Th2-type response characterized by IL-4, IL-5, and IL-10, which is associated with an increased burden of cysticerci (Rodríguez-Sosa et al. 2002). This permissive response has been associated with the

induction of myeloid suppressor innate cells (Gomez-Garcia et al. 2005), downregulation of dendritic cells (DC) (Reyes et al. 2009), and recruitment of alternatively activated M $\phi$  (M2) (Reyes et al. 2010).

*P. yoelii* 17XL strain (*Py* 17XL) is a mouse-specific protozoan parasite and does not pose a risk for human infection. The experimental murine infection with the *Py* 17XL strain is a useful laboratory model for severe malaria caused by *Plasmodium falciparum* in humans. *Py* 17XL is a highly virulent and lethal strain in most mouse genetic backgrounds. Infection with *Py* 17XL results in rapid parasite growth, body weight loss, splenomegaly, severe anemia, and death at 7 to 11 days post-infection (Fu et al. 2012b). During the early stage of infection with *Py* 17XL, BALB/c mice develop a transitory activation of M $\phi$ ; weak production of IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ; suppression of IL-4 and IL-12; and increased release of IL-10 compared with infection by the non-lethal *Py* 17 NL strain (Chen et al. 2010; Fu et al. 2012a). Numerous studies have documented early transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) production and regulatory Treg cell activation after infection (Abel et al. 2016; Omer et al. 2003). Interestingly, enhanced TGF- $\beta$  and Treg cell responses have also been associated with a faster growth rate of the human malaria parasite *P. falciparum* (Good 2005; Walther et al. 2005).

In this model of coinfection, we analyzed the following groups: (I) mice coinfecting with *Py* 17XL after 2 weeks of *Tc* infection (*Tc*2 + *Py*); (II) mice coinfecting with *Py* 17XL after 8 weeks of *Tc* infection (*Tc*8 + *Py*); and as controls, (III) *Py* 17XL-single-infected mice, (IV) *Tc*2-single-infected mice, (V) *Tc*8-single-infected mice, and non-infected mice. We showed that *Py* 17XL-single-infected mice succumbed at 11 days post-infection. In *Tc*2 + *Py*-coinfecting mice, the survival rate at 11 days was enhanced to 58%. This phenomenon was characterized by increased serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-12, and reduced IFN- $\gamma$  levels compared with *Py* 17XL-single-infected mice. Interestingly, survival at 11 days reached 80% in the *Tc*8 + *Py*-coinfecting mice. The increased survival was associated with a reduction in pathology based on a mixed inflammatory-type 1/anti-inflammatory-type 2 immune profile characterized by high levels of IL-12 and IL-10, and reduced TNF- $\alpha$  from M $\phi$ , high levels of IL-4 and IL-10, and low levels of IFN- $\gamma$  from spleen cells, and high serum levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4, and IL-10 but low levels of IFN- $\gamma$ , all compared with *Py* 17XL-single-infected mice. These data demonstrated that previous infection with the helminth *Tc* prolonged survival following *Py* 17XL infection. Importantly, the reduced pathology conferred by *Tc* increased according to the chronicity of the infection, demonstrating a modulation of the immune response to malaria following previous helminth infection.

## Materials and methods

### Mice

Six- to 8-week-old female BALB/cAnN mice were purchased from Harlan Laboratories (ENVIGO, Mexico) and maintained in a pathogen-free environment at the Facultad de Estudios Superiores (FES)-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.

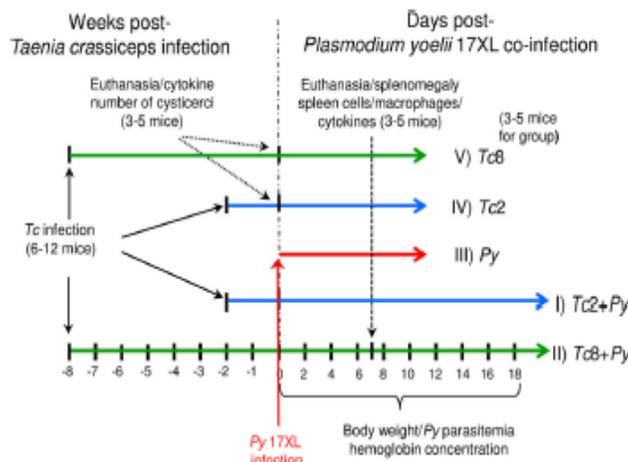
### Parasites and infections

a) Metacystodes of *T. crassiceps* (ORF strain) were harvested under sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/cAnN mice after 2 months of infection. The cysticerci were washed four times with sterile phosphate-buffered saline (PBS; 0.15 M, pH 7.2). Experimental infection was achieved by intraperitoneal (i.p.) injection with 10 small (2 mm in diameter) non-budding cysticerci of *Tc* suspended in 0.3 mL of PBS per mouse. To confirm the changes in the immune responses induced by *Tc* infection, non-infected and *Tc*-single-infected mice from 2 and 8 weeks post-infection were euthanized via an excess of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> and immediately bled by cardiac puncture, followed by centrifugation and sera collection. Serum samples were stored at -80 °C until used for cytokine quantification. Cysticerci from peritoneal cavity were enumerated for each mouse.

b) *P. yoelii* (Py) 17XL was kindly donated by Dr. W. Jara, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, England; these parasites have been cryopreserved in liquid nitrogen. Single infection and coinfection (2 or 8 weeks after *Tc* infection) were performed with this strain of *Plasmodium* by intravenous (i.v.) injection with  $1 \times 10^3$  Py 17XL-parasitized red blood cells (pRBC). Three–6 mice per group were coinfecting with Py 17XL at 2 or 8 weeks following *Tc* infection. Non-infected, Py 17XL single-infected mice, and *Tc*-infected mice were used as controls (Fig. 1). To follow the survival rate, two experiments were conducted (3–5 mice per group). For cytokine measurements and spleen analyses, the mice were euthanized under a CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> excess atmosphere at day 7 post-Py 17XL infection.

### Severity of the disease

The severity of the disease was quantified in terms of survival, parasitemia, loss of body mass (cachexia), and loss of hemoglobin concentration (used as an anemia indicator). After Py 17XL infection, the mice were monitored daily to document mortality and body weight loss on an electronic balance (Citizen CX series, Mumbai, India).



**Fig. 1** Experimental design. Six- to 8-week-old female BALB/cAnN mice were infected i.p. with 10 metacystodes of *Taenia crassiceps* (*Tc*). At 2 (*Tc2*) or 8 (*Tc8*) weeks post-infection, the mice were coinfecting with  $1 \times 10^3$  *Plasmodium yoelii* (Py)-17XL parasitized erythrocytes (*Tc2* + *Py* or *Tc8* + *Py*, respectively). Py 17XL, *Tc2*, and *Tc8*, or non-infected mice were used as controls. For quantification of peritoneal cysticerci and serum cytokine, non-infected, *Tc2*, and *Tc8* mice were euthanized and bled at 2 and 8 weeks postinfection (3–5 mice per group, two independent

experiments). To follow the survival rate in the *Tc2* + *Py*, *Tc8* + *Py*, and *Py* 17XL groups, two independent experiments were performed (3–5 mice per group). The hemoglobin concentration and body weight of the mice were monitored daily post-Py 17XL infection. To examine cytokine production by peritoneal Mφ and splenocytes, as well as cell proliferation in the *Tc2* + *Py*, *Tc8* + *Py*, *Py* 17XL, *Tc2*, *Tc8*, and non-infected groups, three independent experiments were performed at 7 days post-Py 17XL infection (3–5 mice per group)

### Parasitemia

Parasitemia was evaluated by daily examination of Giemsa-stained blood smears. Enumeration of parasitemia was performed under oil using a Zeiss Standard 20 microscope (Carl Zeiss Ltd., Welwyn Garden City). Parasitemia of at least 0.5% was determined by counting the number of parasitized erythrocytes present in a total of 200 red blood cells. Lower levels of parasitemia were assessed by counting the number of parasitized erythrocytes present in 50 fields. The course of infection in each group is presented as the geometric mean of the parasitemia percentage.

### Quantification of hemoglobin concentration

The hemoglobin (Hb) concentration was measured by the quantitative colorimetric method with dilution of 2  $\mu$ L of blood in 498  $\mu$ L of *Drabkin's* reagent (sodium bicarbonate, potassium ferricyanide, and potassium cyanide; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Next, 100  $\mu$ L of this dilution was added to a 96-well plate and analyzed by spectrophotometry at 540 nm using an Epoch microplate spectrophotometer (Biotek, Winooski, USA). The absorbance and hemoglobin concentration (Hb) were calculated using a commercial Hb standard curve.

### Spleen weight index

On day 7 after *Plasmodium* infection, the weights of the body and spleen were measured. The splenic index was calculated as the spleen weight to body weight ratio per mouse.

### Soluble *P. yoelii* 17XL antigen (PyAg)

PyAg was obtained as described elsewhere (Lucas et al. 1993). Briefly, mice with 20–30% parasitemia were euthanized and blood was collected by cardiac puncture and pooled in heparinized tubes containing 50 mM PBS, pH 7.2. The blood was then passed through a column of cellulose CF11 to eliminate white blood cells. The red cells were washed two times with PBS by centrifugation for 15 min at 750 g. Red blood cells were then lysed by treatment with 0.06% saponin (Merck, Germany) in PBS by incubating samples at room temperature for 10 min. After depletion of red blood cell, the liberated parasites were washed two times with PBS by centrifugation for 15 min at 18,000 $\times$ g, and the resulting pellet was lysed in lysis solution (TRITON X-100 1%, 100 mM TRIS-HCL pH 8, 5 mM EDTA). Non-soluble material was then separated by centrifugation for 30 min at 20,000 $\times$ g. The quantity of protein in soluble antigenic material was quantified with protein Bio-Rad reagent (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Red blood cell extract from non-infected mice were prepared and used as controls.

### Soluble *T. crassiceps* antigen (TcAg)

Metacystodes of *Tc* were harvested under sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2 months of infection and exhaustively washed with cold sterile PBS. TcAg was prepared by homogenization using whole metacystodes (10 mL volume) consisting of two rounds of 3 s each with a homogenizer (Polytron PT 6100 Homogenizers, Kinematica, VWR, USA). The homogenates were centrifuged at 20,000 $\times$ g for 20 min at 4  $^{\circ}$ C, and the supernatants containing PBS-soluble antigens were collected and frozen at  $-80^{\circ}$ C until use. The protein concentration was determined using the Bradford protein kit assay (Bio-Rad).

### Macrophage culture

Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from the peritoneal cavity at 7 days post-coinfection under sterile conditions using 10 mL of ice-cold Hank's balanced salt solution (Microlab, Mexico). Following two washes with Hank's balanced solution, red blood cells were lysed by resuspending the cells in Boyle's solution (0.17 M Tris and 0.16 M ammonium chloride, all from Sigma-Aldrich). After two washes with sterile PBS, the viable cells were counted using the trypan blue exclusion method (routinely exceeding 95%) with a Neubauer hemocytometer (Sigma-Aldrich). PECs were adjusted to  $5 \times 10^6$  cells/mL in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U of penicillin/streptomycin, and 2 mM glutamine (all from GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) and cultured in 24-well plates (Costar, Cambridge, MA, USA). After 2 h at 37  $^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub>, non-adherent cells were removed by washing with warm supplemented DMEM medium. Adherent cells (M $\phi$ ) were removed from the plate by washing with 5 mM EDTA in warm PBS and then adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/mL. These constituted >85% of the M $\phi$  according to flow cytometry analysis. Briefly, M $\phi$  were incubated with 10  $\mu$ g/mL anti-CD16/32 in stain buffer (1 $\times$  PBS, 2% FBS, 1% NaN<sub>3</sub>) for 15 min, followed by staining for 20 min with the M $\phi$  marker antibody (Ab) APC-conjugated anti-F4/80, as well as the isotype control Ab at the appropriate dilution previously determined by titration. M $\phi$  were washed three times with FACS buffer and fixed in 0.8% paraformaldehyde before acquisition and analysis (Attune NxT Applied Biosystems, Waltman, MA, USA; all antibodies were purchased from Biolegend). One million of M $\phi$  was plated in 12-well plates (Costar), left untreated or stimulated with total PyAg (25  $\mu$ g/mL) or combined TcAg + PyAg (TcPyAg, 25  $\mu$ g/mL for each antigen). M $\phi$  were incubated for 48 h at 37  $^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were collected and stored at  $-20^{\circ}$ C until use for quantification of cytokine production (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, and IL-10).

### Spleen-cell proliferation

Spleens were aseptically removed from infected, coinfecting, and control mice under sterile conditions. Spleen cells were obtained by mincing and filtering, and after washing cells were resuspended in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units of penicillin/streptomycin, and 2 mM glutamine (all from GIBCO). Splenocytes were then adjusted at a density of  $5 \times 10^6$  cells/mL in the same medium. One hundred microliters of the cell suspension were seeded in 96-well flat-bottom culture plates (Costar) and stimulated with either concanavalin-A (2  $\mu$ g/mL) (Con-A; Sigma-Aldrich) or *Py*Ag (25  $\mu$ g/mL). The plates were then incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 72 h or 5 days with Con-A or *Py*Ag, respectively. Eighteen hours prior to culture termination, 0.5  $\mu$ Ci of tritiated thymidine (Methyl-<sup>3</sup>H)-20 Ci/mmol (37 MBq/mmol) NET027E 20 Ci/mmol, METRIX Lab, CD MX) was added to each well. After further incubation for 18 h, the cells were harvested using a 96-well harvester (Tomtec, Hamden, USA) and then counted using a microplate counter (Trilux, Hamden, USA). The values are presented as counts per minute (CPM). Supernatants were collected and stored at -20 °C until use in cytokine assays to determine the IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 levels.

### Quantification of cytokines

The spleen cell and M $\phi$  cultures supernatants described above and serum samples from controls and experimental groups at 7 days post-coinfection with *Py* 17XL were collected and stored at -20 °C until used. The serum levels of pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-10) cytokines were analyzed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). The samples from spleen and M $\phi$  cultures were diluted 1:2 in PBS, whereas the serum samples were diluted 1:2 or 1:4 in PBS as necessary. The samples were tested according to the manufacturer's instructions (Peprotech-Mexico).

The optical density (OD) was measured using an Epoch microplate spectrophotometer (Biotek) at 405 nm.

### Statistical analysis

Normality was tested analyzing the Fisher-Pearson standardized third moment coefficient; homogeneity of variance was analyzed using Levene's test. When heterogeneity of variance was detected, Welch's ANOVA was used. Parasitemia, body mass, and hemoglobin concentration data were analyzed using ANOVA for repeated measurements. Splenic index, differences in cytokine levels, and spleen cell proliferation were analyzed using ANOVA, and Fisher's LSD procedure was used for multiple comparisons. The survival data were analyzed using the Log-rank Mantel-Cox test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, (a) compared with non-infected, (b) compared with *Tc*2, (c) compared with *Tc*8, (\*) compared with *Py* 17XL, and (&) compared with *Tc*2 + *Py* mice (SAS 9.0 software was used).

### Results

#### Acute infection with *T. crassiceps* induces a type 1 immune cytokine profile, while chronic infection generates a type 2 immune cytokine profile

To confirm the changes in the immune response elicited by both acute (2 weeks) and chronic (8 weeks) *Tc* infections, we infected BALB/cAnN mice with 10 cysticerci by i.p. injection and determined their serum cytokine profiles at *Tc*2 and *Tc*8 weeks post-infection. *Tc*2-infected mice showed a polarized Th-1 type immune response characterized by significantly increased levels of IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  compared to non-infected (<sup>a</sup> $p < 0.05$ ) or *Tc*8 mice (<sup>c</sup> $p < 0.05$ ), which were associated with a low number of parasites (Table 1). As infection progressed, *Tc*8-infected mice displayed a Th2-type profile characterized by higher levels of IL-4 and IL-10 compared to non-infected (<sup>a</sup> $p < 0.05$ ) or *Tc*2 mice (<sup>b</sup> $p < 0.05$ ) along with

**Table 1** Parasite burden and serum concentration of IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 at 0, 2 or 8 weeks after *Taenia crassiceps* infection

Weeks after infection	Number of parasites	IL-12 pg/mL	TNF- $\alpha$ pg/mL	IFN- $\gamma$ pg/mL	IL-4 pg/mL	IL-10 pg/mL
0	0	203 $\pm$ 12	90 $\pm$ 24	32 $\pm$ 6	151 $\pm$ 16	154 $\pm$ 46
2	4 $\pm$ 2	1008 $\pm$ 298 <sup>ac</sup>	214 $\pm$ 14 <sup>ac</sup>	1193 $\pm$ 188 <sup>ac</sup>	391 $\pm$ 185	1124 $\pm$ 578 <sup>a</sup>
8	440 $\pm$ 38 <sup>b</sup>	457 $\pm$ 81	146 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	241 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	4916 $\pm$ 563 <sup>ab</sup>	4192 $\pm$ 423 <sup>ab</sup>

BALB/c mice were i.p. infected with 10 metacestodes of *Taenia crassiceps* (ORF strain) and analyzed for parasitemia and serum levels of the cytokines IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, and IL-10 at 0, 2, and 8 weeks post-infection. The serum levels of cytokines were detected by ELISA (O.D. 405 nm). Values represent the mean  $\pm$  SEM. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant

<sup>a</sup> Compared with the non-infected

<sup>b</sup> Compared with *Tc*2

<sup>c</sup> Compared with the *Tc*8 group

abundant number of *Tc* parasites in the peritoneal cavity ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

### *T. crassiceps* coinfection delays the host mortality induced by *P. yoelii* 17XL infection

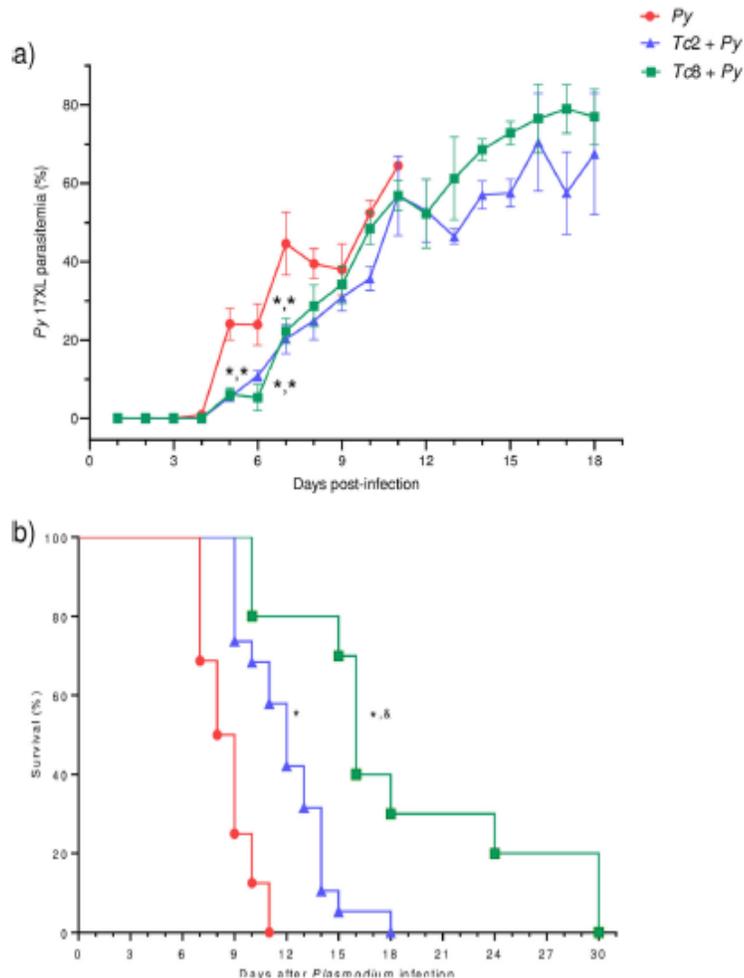
Once *Tc2*- and *Tc8*-infected mice developed type 1 or type 2 immune profiles, respectively, they were coinfecting with *Py* 17XL. We evaluated *Py* 17XL parasitemia and the survival rate in each coinfecting experimental group and *Py* 17XL-single-infected mice were used as controls (Fig. 1).

Interestingly, the number of plasmodium parasites found in both *Tc2* + *Py* and *Tc8* + *Py* groups was significantly reduced at 5, 6, and 7 days post-coinfection when compared with those found in *Py* 17XL-single-infected mice ( $p < 0.05$ ).

Nevertheless, from day 8 post-coinfection to 11 days, coinfecting mice reached similar levels of parasitemia as those of *Py* 17XL-single-infected mice (Fig. 2a). Importantly, the *Py* 17XL group reached a maximum of parasitemia of 64.5% on day 11, while the coinfecting groups reached parasitemia greater than this. The *Tc2* + *Py* group reached a maximum of 67.5% and the *Tc8* + *Py* group reached 77% of parasitemia on day 18 after coinfection.

Furthermore, all *Py* 17XL-single-infected mice were dead at day 11 post-infection (median = 8.5 days 95% CI 7 to 9 days), while 58% of *Tc2* + *Py*-coinfecting mice survived at day 11 ( $p < 0.05$ ) compared with *Py* 17XL (median = 12 days 95% CI 10 to 14 days) (Fig. 2b), although all these mice were dead at day 18 post-*Py* coinfection. Strikingly, *Tc8* + *Py*-coinfecting mice showed a dramatic increase in survival rates

**Fig. 2** Pre-infection with *Taenia crassiceps* promotes resistance against lethal *Plasmodium yoelii* 17XL infection. Mice were infected i.p. with 10 metacystodes of *Taenia crassiceps* for 2 (*Tc2*) or 8 (*Tc8*) weeks, and then they were coinfecting with  $1 \times 10^3$  *Py* 17XL-parasitized erythrocytes (*Tc2* + *Py* or *Tc8* + *Py*, respectively). *Py* 17XL-single-infected mice were used as controls. **a** Parasitemia expressed as the percent of *Py*-parasitized erythrocytes. **b** Cumulative mortality of each experimental group. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of two independent experiments with at least three-five mice per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, (\*) compared with *Py* 17XL and (&) compared with *Tc2* + *Py* mice



given 80% of mice comprising this group survived at day 11 as compared with *Py* 17XL-single-infected mice ( $^*p < 0.05$ ) or *Tc2* + *Py* groups ( $^*p < 0.05$ ), (median = 16 days 95% CI 15 to 24 days). Notably, some of these mice extended their lifespan until day 30 post-*Py* coinfection (Fig. 2b). Taken together, these findings demonstrate that the presence of *Tc* prevents severe pathology which leads to an important mortality as seen in *Py* 17XL infection, and this phenomenon was independent of *Py* 17XL replication.

### Chronic infection with *T. crassiceps* prevents cachexia and reduces the loss of hemoglobin after *P. yoelii* 17XL coinfection

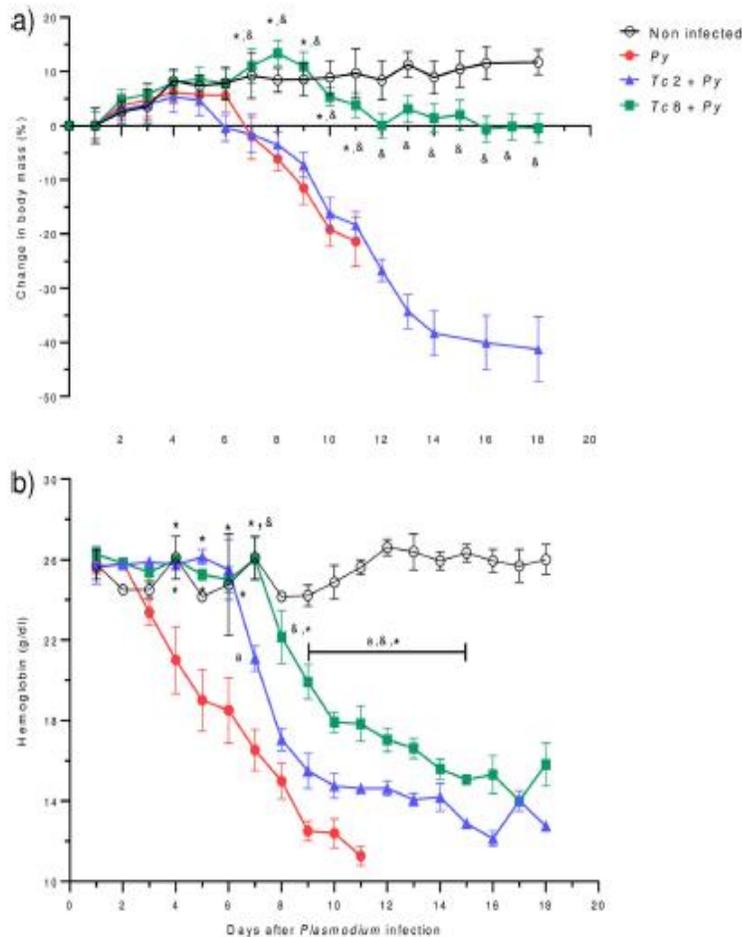
To understand how previous infection with *Tc* increases the survival of mice coinfecting with *Py* 17XL, we evaluated cachexia associated with weight loss and anemia daily post-

coinfection; both parameters are related to the pathology and severity of *Plasmodium* infection (Perkins et al. 2011).

*Py* 17XL single-infected mice gradually lost weight by approximately 21% from day 6 to day 11, when they died (Fig. 3a). *Tc2* + *Py*-coinfected mice lost weight at the same time and at a similar percentage of approximately 20% from day 6 to day 11. As shown before, they did not die at day 11; however, they continued to lose weight until they died on day 18 (Fig. 3a). Interestingly, *Tc8* + *Py*-coinfected mice gained weight on days 7–8 after *Py* 17XL coinfection compared with *Py* 17XL-single-infected ( $^*p < 0.05$ ) or *Tc2* + *Py* mice ( $^*p < 0.05$ ). However, after day 9 post-coinfection, these mice lost weight, although significantly less compared with *Tc2* + *Py* ( $^*p < 0.05$ ) (Fig. 3a).

*Py* 17XL infection resulted in decreased hemoglobin levels from days 4 to 11 post-infection. In contrast, *Tc2* + *Py* and *Tc8* + *Py* coinfecting groups showed no decrease in

**Fig. 3** Chronic infection with *Taenia crassiceps* reduces the pathology of *Plasmodium yoelii* 17XL infection. Mice were infected ip. with 10 metacystodes of *Taenia crassiceps* for 2 (*Tc2*) or 8 (*Tc8*) weeks, and then mice were coinfecting with  $1 \times 10^3$  *Py* 17XL-parasitized erythrocytes (*Tc2* + *Py* or *Tc8* + *Py*, respectively). *Py* 17XL-single-infected or non-infected mice were used as controls. **a** Percentage weight change was calculated using the weight of each animal at day 0. **b** Hemoglobin concentration. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of two independent experiments with at least three–five mice per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, (a) compared with the non-infected group, (\*) compared with the *Py* 17XL, and (k) compared with the *Tc2* + *Py* group



hemoglobin levels during the first 6 and 8 days post-coinfection, respectively (Fig. 3b). However, *Tc2 + Py* mice on day 7 showed a significant hemoglobin reduction compared with non-infected mice ( $^*p < 0.05$ ), and similar to *Py* 17XL single-infected mice (Fig. 3b). Remarkably, the *Tc8 + Py* group from day 9 onwards showed a progressive and significant reduction of hemoglobin levels compared with non-infected mice ( $^*p < 0.05$ ); however, these were significantly higher from days 8 to 15 compared with *Tc2 + Py* ( $^{**}p < 0.05$ ). Taken together, these data indicate that chronic, but not acute, infection with *Tc* prevented *Py* 17XL cachexia and favored a significant reduction in anemia, supporting the idea that chronic *Tc* infection decreased the pathology caused by *Py* 17XL infection.

#### Chronic *T. crassiceps* infection reduces the development of splenomegaly after *P. yoelii* 17XL coinfection

Spleen plays a key role in the activation of the innate immune response to malaria; it is involved in local expansion of monocytic cells, removal of pRBC, and resistance to severe anemia (Engwerda et al. 2005). However, excessive inflammatory responses triggered by *Plasmodium* infection can promote the development of splenomegaly. To evaluate whether *Tc* infection could modulate the development of splenomegaly after *Py* 17XL coinfection, we determined the splenic index at 7 days post-*Py* 17XL coinfection in all groups.

*Py* 17XL, *Tc2 + Py*, and *Tc8 + Py* groups exhibited a significant increase in spleen size compared to *Tc2*, *Tc8*, or non-infected mice (Fig. 4a). When the spleen index was calculated, *Tc2 + Py*-coinfected mice showed a similar spleen index to *Py* 17XL-single-infected, and both developed significantly higher splenomegaly compared with *Tc8 + Py* mice (Fig. 4b;  $^{**}p < 0.05$ ). These data demonstrate that chronic infection with *Tc* reduces splenic damage/splenomegaly caused by infection with *Py* 17XL.

#### *P. yoelii* 17XL coinfection with chronically *T. crassiceps*-infected promotes IL-12 and IL-10, but decreases TNF- $\alpha$ production by macrophages stimulated with the *PyAg*

The M $\phi$ -mediated innate immune response plays an important role in controlling parasite growth and anemia during acute *Py* 17XL infection (Couper et al. 2007). To investigate whether *Tc* could modify the response of M $\phi$  to *Py* 17XL, peritoneal M $\phi$  isolated at 7 days post-coinfection were re-stimulated in vitro with *PyAg* or *TcPyAg*, and cytokine production was determined.

M $\phi$  from single *Py* 17XL-infected mice displayed significantly higher levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , but similar level of IL-12 and IL-10 compared with M $\phi$  from non-infected mice

(Fig. 5a, b, c, d;  $^*p < 0.05$ ). When we analyzed the effect of the coinfection, we found that *Tc8 + Py* produced significantly less TNF- $\alpha$  than both the *Tc2 + Py* ( $^{**}p < 0.05$ ) and *Py* 17XL single-infected groups (Fig. 5b;  $^*p < 0.05$ ). Interestingly, the lack of IL-12 production by M $\phi$  from *Py* 17XL-single infected mice was restored in M $\phi$  from *Tc2 + Py* and *Tc8 + Py* coinfecting mice (Fig. 5c,  $^*p < 0.05$ ). Moreover, the magnitude of IL-10 production in *Tc8 + Py*-coinfecting mice was significantly increased compared with *Py* 17XL-single-infected mice (Fig. 5d;  $^*p < 0.05$ ). These results show that *Tc8 + Py* coinfection favored IL-12 and IL-10 production, and decreased TNF- $\alpha$  production compared with *Py* 17XL single-infected mice.

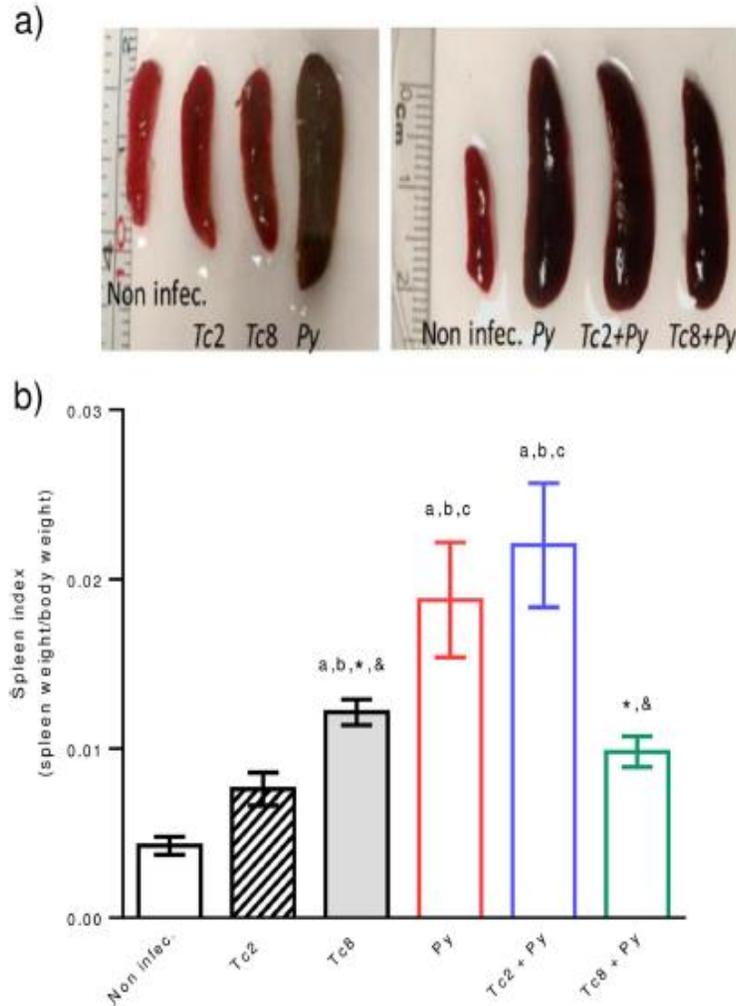
M $\phi$  from *Tc8 + Py* stimulated in vitro with *TcPyAg* displayed significantly higher levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-10 compared with all other experimental groups (S1  $p < 0.05$ ). In contrast, M $\phi$  from *Tc2 + Py* coinfection displayed similar levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-10 compared to *Py* 17XL-single-infected mice (S1). Taken together, these data support that M $\phi$  obtained from *Tc8 + Py* coinfection produce both pro-inflammatory (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) and anti-inflammatory cytokines (IL-10).

#### Chronic *T. crassiceps*-*P. yoelii* 17XL coinfection impairs the proliferative response in splenocytes but promotes high levels of *PyAg*-specific IL-4 and IL-10 production

To determine whether previous *Tc* infection modulates the cellular proliferative response during coinfection, spleen cells from *Tc2 + Py* or *Tc8 + Py* coinfecting mice were obtained on day 7 post-*Py* 17XL coinfection; spleen cells from non-infected, *Py* 17XL, *Tc2*, or *Tc8*-single-infected mice were used as controls. Spleen cells were stimulated with *PyAg* or Con-A, and the proliferative response was measured by tritiated thymidine uptake ( $^3\text{H-TdR}$ ) in a 72-h or 5-day culture, respectively; at these times, the cytokine production levels were also measured in the splenocytes cultures supernatants.

The proliferative response to *PyAg* was significantly higher in splenocytes from *Py* 17XL-single-infected mice compared to splenocytes from non-infected ( $^*p < 0.05$ ), *Tc2* ( $^b p < 0.05$ ), or *Tc8* ( $^c p < 0.05$ ) mice. Importantly, there were no significant differences in the proliferative response between *Tc2 + Py*, *Tc8 + Py*, and *Tc*-infected groups (Fig. 6a). However, differences in cytokine production were noticed; splenocytes from *Py* 17XL-single-infected mice stimulated with *PyAg* produced significantly high levels of IFN- $\gamma$  compared to non-infected mice (Fig. 6d;  $^*p < 0.05$ ). Similar levels of IL-4 and IL-10 compared with non-infected mice was observed (Fig. 6b, c). The *Tc2 + Py*-coinfecting group also produced IL-4 and IL-10 levels similar to those produced by non-infected mice (Fig. 6b, c); however, they produced lower IFN- $\gamma$  levels compared with *Py* 17XL-single-infected mice

**Fig. 4** *Taenia crassiceps* chronic infection reduces splenomegaly. Mice were infected with 10 metacystodes of *Taenia crassiceps* for 2 (*Tc2*) or 8 (*Tc8*) weeks, and then coinfectd with  $1 \times 10^3$  *Py* 17XL-parasitized erythrocytes (*Tc2* + *Py* or *Tc8* + *Py*, respectively). Non-infected mice, *Tc2*, *Tc8*, and *Py* 17XL-single-infected mice were used as controls. The splenic index was determined at 7 days post-*Py* 17XL-infection. **a** Representative spleens, and **b** the splenic index from infected and coinfectd mice at 7 days after *Py* 17XL-coinfection. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of three independent experiments with at least three-five mice per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, (a)  $p < 0.05$  compared with non-infected mice, (b)  $p < 0.05$  compared with the *Tc2* group, (c)  $p < 0.05$  compared with the *Tc8* group, (\*)  $p < 0.05$  compared with the *Py* 17XL group, and (&) compared with the *Tc2* + *Py* group



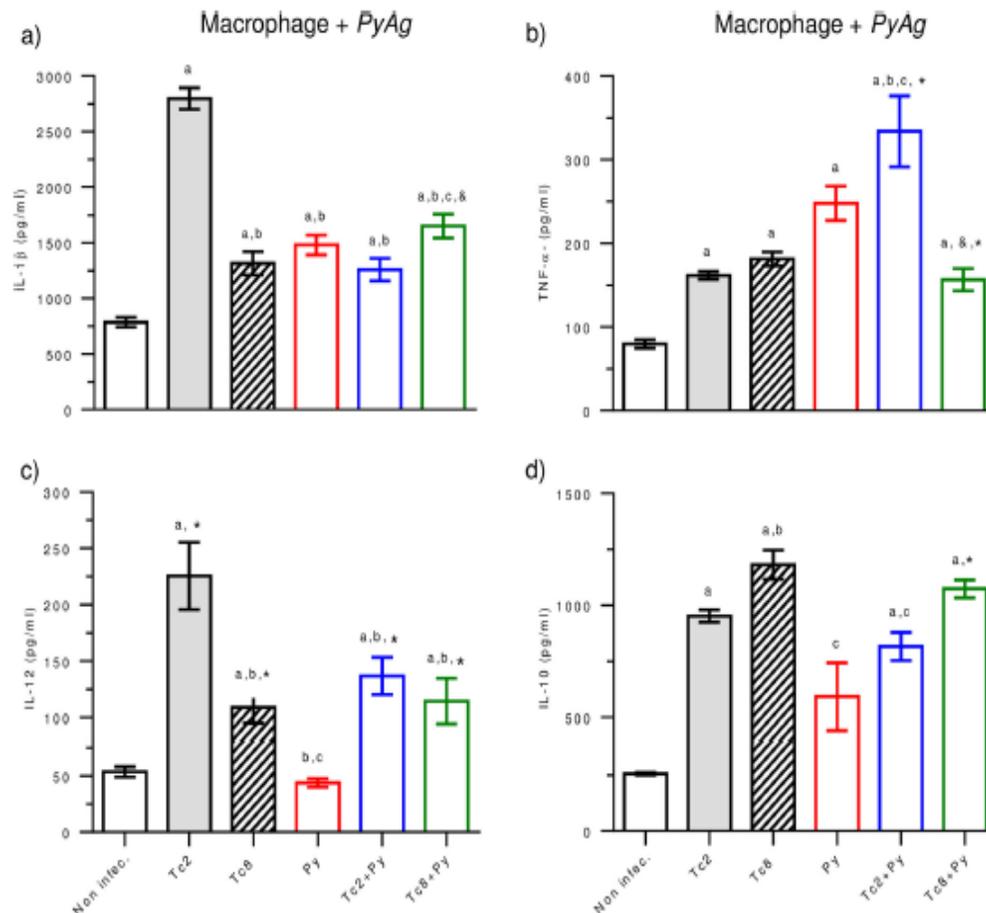
(Fig. 6d;  $*p < 0.05$ ). Interestingly, *Tc8* + *Py*-coinfectd mice produced higher levels of IL-4 and IL-10 (Fig. 6b, c,  $*p < 0.05$ ) and lower levels of IFN- $\gamma$  compared with *Py*17XL-single-infected mice (Fig. 5d;  $*p < 0.05$ ). These results showed that although *Tc8* + *Py* coinfection decreased the splenocyte proliferative response, these cells also produced IL-4 and IL-10 in response to *Py*Ag.

In response to Con-A, splenocytes from the acute phase of *Py* 17XL-single-infected mice displayed a significant decrease in the proliferative response compared with non-infected mice (S2,  $*p < 0.05$ ). In the *Tc2* + *Py* coinfection group, the splenocytes proliferative response also showed a significant decrease compared with non-infected mice (S2,  $*p < 0.05$ ), similar to *Py* 17XL-single-infected mice. However, in the *Tc8* + *Py* coinfection group, the splenocytes proliferation response was

significantly decreased compared with the *Py* 17XL-single-infected mice (S2,  $*p < 0.05$ ) and the *Tc2* + *Py*-coinfectd group ( $*p < 0.05$ ). Splenocytes stimulated with Con-A from *Tc8* + *Py*-coinfectd mice produced higher levels of IL-4 ( $*p < 0.05$ ) and IL-10 ( $*p < 0.05$ ); and lower levels of IFN- $\gamma$  ( $*p < 0.05$ ) compared to *Py* 17XL-single-infected or *Tc2* + *Py* groups ( $*p < 0.05$ , for each case) (S3).

#### ***T. crassiceps*-*P. yoelii* 17XL coinfection increases systemic IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4, and IL-10 but reduces IFN- $\gamma$ production**

To determine whether previous infection with *Tc* modified the systemic cytokine profile after coinfection, we evaluated the serum levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ ,



**Fig. 5** Late *Taenia crassiceps-Plasmodium yoelii* 17XL coinfection promotes IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-10 and decreases TNF- $\alpha$  production by macrophages stimulated with *PyAg*. Peritoneal M $\phi$  from *Py* 17XL-single-infected, *Tc2*, *Tc8*, *Tc2+Py*, *Tc8+Py* experimental groups were isolated at 7 days post-coinfection and stimulated with *PyAg* (25  $\mu$ g/mL). Cytokines a IL-1 $\beta$ , b TNF- $\alpha$ , c IL-12, and d IL-10 were measured in supernatants

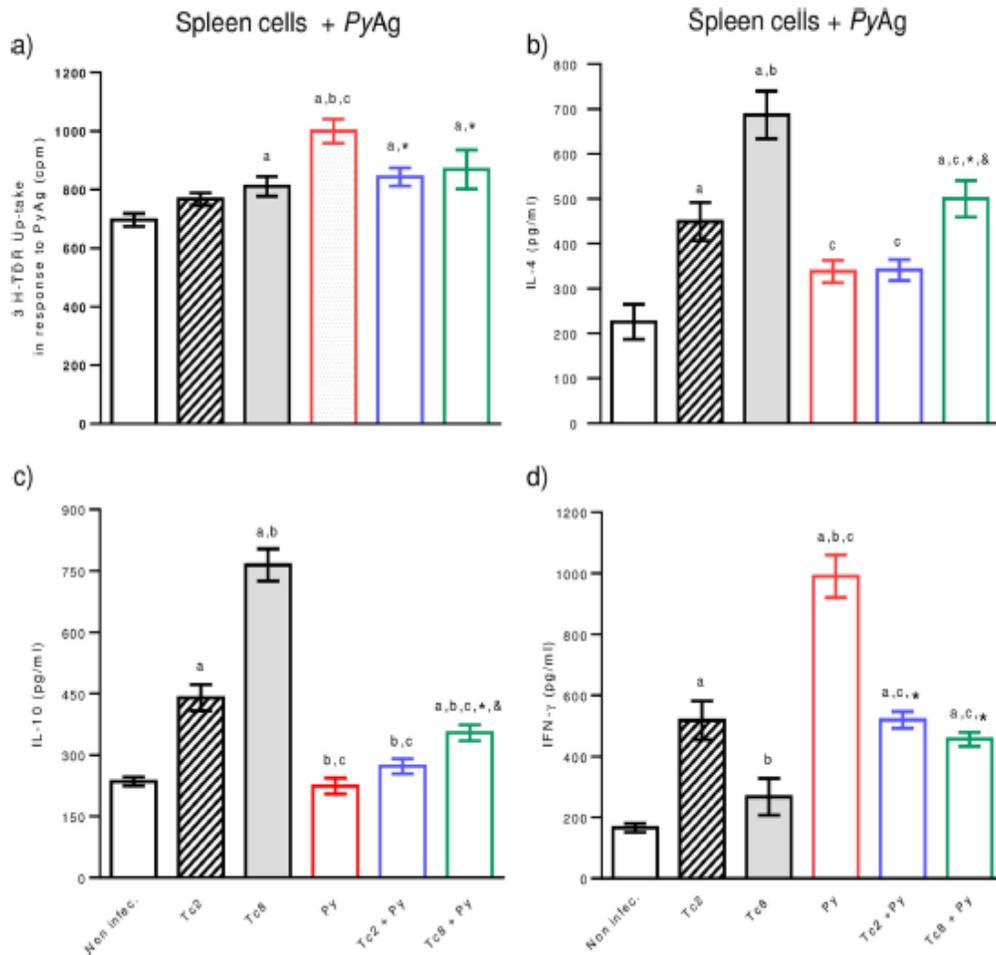
collected 24 h later. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of three independent experiments with at least three–five mice per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, (a) compared with the non-infected group, (b) compared with the *Tc2* group, (c) compared with the *Tc8* group, (\*) compared with the *Py* 17XL group, and (&) compared with the *Tc2+Py* group

TNF- $\alpha$ , IL-12, and IFN- $\gamma$  and anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 at 7 days after coinfection.

*Py* 17XL infection induced significantly higher levels of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  compared with non-infected mice (Fig. 7b, d;  $^{\#}p < 0.05$ ). In contrast, no significant changes in the IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-4 levels were observed compared to non-infected mice (Fig. 7a, c, e).

During *Tc2+Py* coinfection, higher levels of IL-1 $\beta$  and IL-12 were detected compared with *Py* 17XL-single-infected mice (Fig. 7a, c;  $^{\#}p < 0.05$ ). However, low level of IFN- $\gamma$  was observed compared with *Py* 17XL-single-infected mice (Fig. 7,  $^{\#}p < 0.05$ ). Similar levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 were detected compared to *Py* 17XL-single-infected mice (Fig. 7e, f).

*Tc8+Py*-coinfected mice produced significantly more IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12p40 compared with *Py* 17XL-single-infected mice ( $^{\#}p < 0.05$ ) as well as compared with *Tc2+Py*-coinfected mice (Fig. 7a, b, c;  $^{\&}p < 0.05$ ). Importantly, they produced significantly less IFN- $\gamma$  than *Py* 17XL-single-infected mice, similar to *Tc2+Py*-coinfected mice (Fig. 7d  $^{\#}p < 0.05$ ). Likewise, they showed significantly higher levels of IL-4 and IL-10 compared with *Py* 17XL-single-infected mice ( $^{\#}p < 0.05$ ) or *Tc2+Py*-coinfected mice ( $^{\&}p < 0.05$ ) (Fig. 7). These data suggest that the previous cytokine profile displayed by *Tc8* infection might reduce the levels of IFN- $\gamma$  and promote IL-4 and IL-10 production in the *Tc8+Py*-coinfected group.



**Fig. 6** Late *Taenia crassiceps*-*Plasmodium yoelii* 17XL coinfection promotes high IL-4 and IL-10 production by spleen cells after PyAg stimulation. Spleen cells from Py 17XL-single-infected, Tc2, Tc8, Tc2 + Py, and Tc8 + Py experimental groups were isolated at 7 days post-coinfection. **a** Proliferation was assayed in freshly isolated spleen cells upon stimulation with PyAg for 5 days. Cytokines **b** IL-4, **c** IL-10, and **d** IFN- $\gamma$  were measured in supernatants. The bars represent the mean  $\pm$  SEM

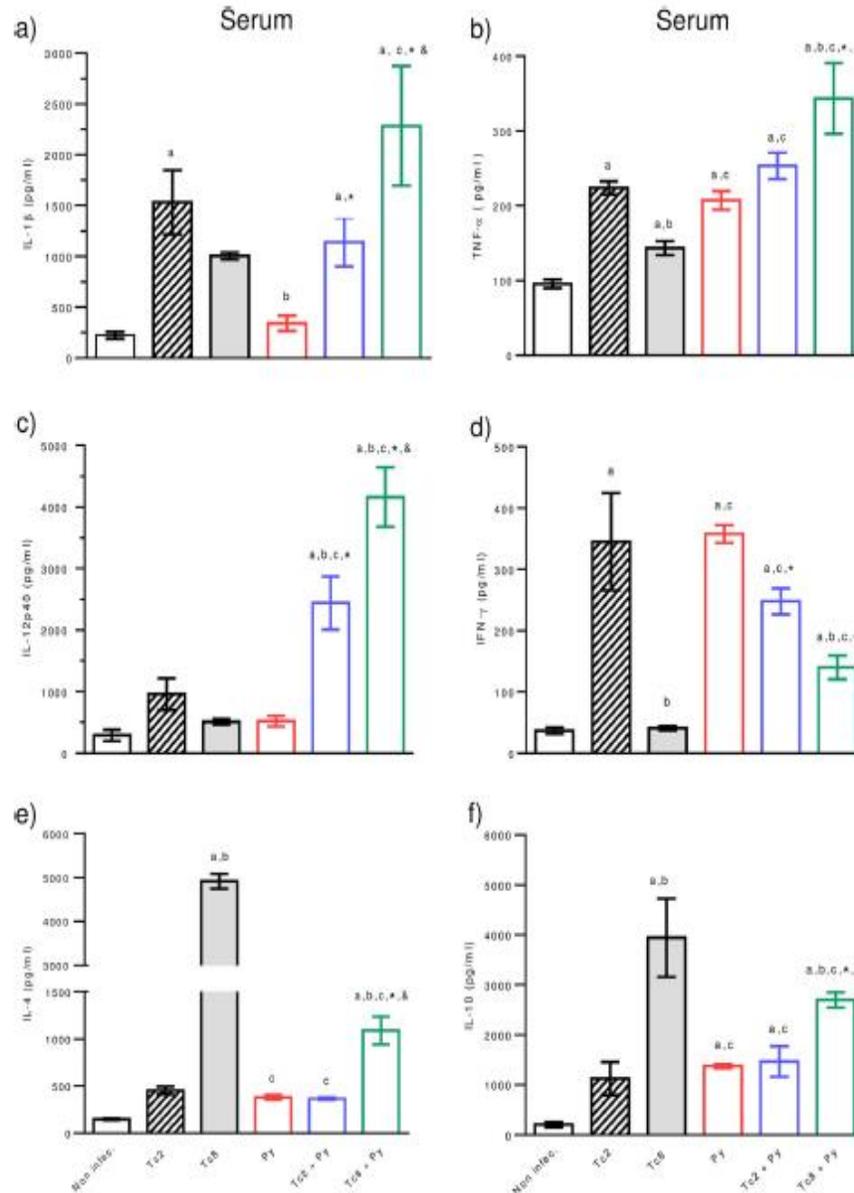
incorporation of 3H-TDR from two independent experiments. In **b**, **c**, and **d**, data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of three independent experiments with at least three mice per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. (a) compared with the non-infected group, (b) compared with the Tc2 group, (c) compared with the Tc8 group, (\*) compared with the Py 17XL group, and (&) compared with the Tc2 + Py group

## Discussion

The helminth *T. crassiceps* has the ability to modulate the immune system from an early pro-inflammatory-type 1 to a late anti-inflammatory type 2 immune response (Terrazas et al. 1998). This phenomenon has been used to determine how helminth parasites modulate the host immune response of several inflammatory diseases (Espinoza-Jimenez et al. 2010; Ledesma-Soto et al. 2015; Leon-Cabrera et al. 2014; Reyes et al. 2011). Moreover, Tc infection has also been shown to affect the success of subsequent infections in different ways

with non-related parasites, such as *Trypanosoma cruzi* (Rodríguez et al. 1999), *Leishmania major*, and *Leishmania mexicana* (Rodríguez-Sosa et al. 2006).

The Py 17XL strain is lethal to most mouse genetic backgrounds and typically cause high parasitemia, weight loss, splenomegaly, anemia, and death approximately 7 to 11 days post-infection (Chen et al. 2010; Fu et al. 2012b). In this study, we demonstrated that survival significantly improved when Py 17XL infection was performed 2 weeks after Tc-infection. In addition, the survival rate was even greater when the interval between two infections was 8 weeks compared with Py



**Fig. 7** Late *Taenia crassiceps*-*Plasmodium yoelii* 17XL coinfection favors systemic IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-4, and IL-10 but downregulate IFN- $\gamma$  production. *Py* 17XL-single-infected, *Tc2*, *Tc8*, *Tc2 + Py*, and *Tc8 + Py* experimental groups were bled 7 days post-coinfection and serum samples were obtained. Cytokines a IL-1 $\beta$ , b TNF- $\alpha$ , c IL-12, d IFN- $\gamma$ , e IL-4, and f IL-10 were measured in sera. Data are expressed as

the mean  $\pm$  SEM and are representative of three independent experiments with at least three-five mice per group. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant, (a) compared with the non-infected group, (b) compared with the *Tc2* group, (c) compared with the *Tc8* group, (\*) compared with the *Py* 17XL group, and (&) compared with the *Tc2 + Py* group

17XL-single infection. A reduction in *Py* 17XL parasitemia was detected in *Tc2 + Py*, which was similar to that observed in *Tc8 + Py*-coinfected mice during the early phase of *Py*

17XL infection. Interestingly, the *Py* 17XL parasite still replicated in *Tc2 + Py* and *Tc8 + Py* coinfecting groups after 11 days of coinfection, reaching higher levels of parasitic

burden than in *Py* 17XL-single-infected mice. Furthermore, the coinfecting groups survived longer than single *Py* 17XL-infected mice, suggesting that the increase in survival was independent of parasite *Py* 17XL replication.

These results differed from other reports showing an increased pathology and mortality in helminth-*Plasmodium* coinfection, including studies in C57BL/6 mice coinfecting simultaneously with *Heligmosomoides polygyrus-Plasmodium chabaudi* (Helmbj 2009), BALB/c mice coinfecting at 2–4 weeks with *Schistosoma mansoni-Plasmodium yoelii* NXL (Sangwame et al. 2009), C57BL/6 mice coinfecting at 8–9 weeks with *Schistosoma mansoni-Plasmodium berghei* ANKA (Bucher et al. 2011), and BALB/c coinfecting at days 9–10 with *Nippostrongylus brasiliensis-Plasmodium berghei* ANKA (Craig and Scott 2017). These contrasting results may be due to modulation of the immune response according to the time of pre-existing helminth infection. Moreover, the outcome of *Plasmodium* in coinfection could vary depending on the mice genetic background, as well as the strain of helminth or *Plasmodium*. Thus, several factors, including changes in the microenvironment of cytokines, are important for modulating the immune response to coinfection.

The exacerbated inflammatory Th1-type immune response in murine *Plasmodium* infection has been associated with splenomegaly, cachexia, anemia, and death (Chen et al. 2014). Cachexia is an independent prognostic marker of survival in many chronic diseases including malaria. Here, *Tc2 + Py*-coinfecting mice developed cachexia but delayed development of anemia, while the development of cachexia was prevented and, splenomegaly and severe anemia were delayed in *Tc8 + Py*-coinfecting mice. These findings were similar to results reported during *N. brasiliensis-P. chabaudi* coinfection (Hoeve et al. 2009). Similarly, *Tc8 + Py*-coinfecting mice showed a lower splenic index compared with *Tc2 + Py*-coinfecting mice and *Py* 17XL-single-infected mice, suggesting that previous chronic infection by *Tc8* negatively modulated cell proliferation in the spleen, despite the high levels of both parasites. Additionally, splenomegaly has been associated with disease outcome and is used as a robust indicator of virulence (Huang et al. 2016). Moreover, splenomegaly has also been associated with extramedullary hematopoiesis; thus, the lower splenic index may represent a protective response to the loss of erythrocytes and direct the clinical outcome in these mice.

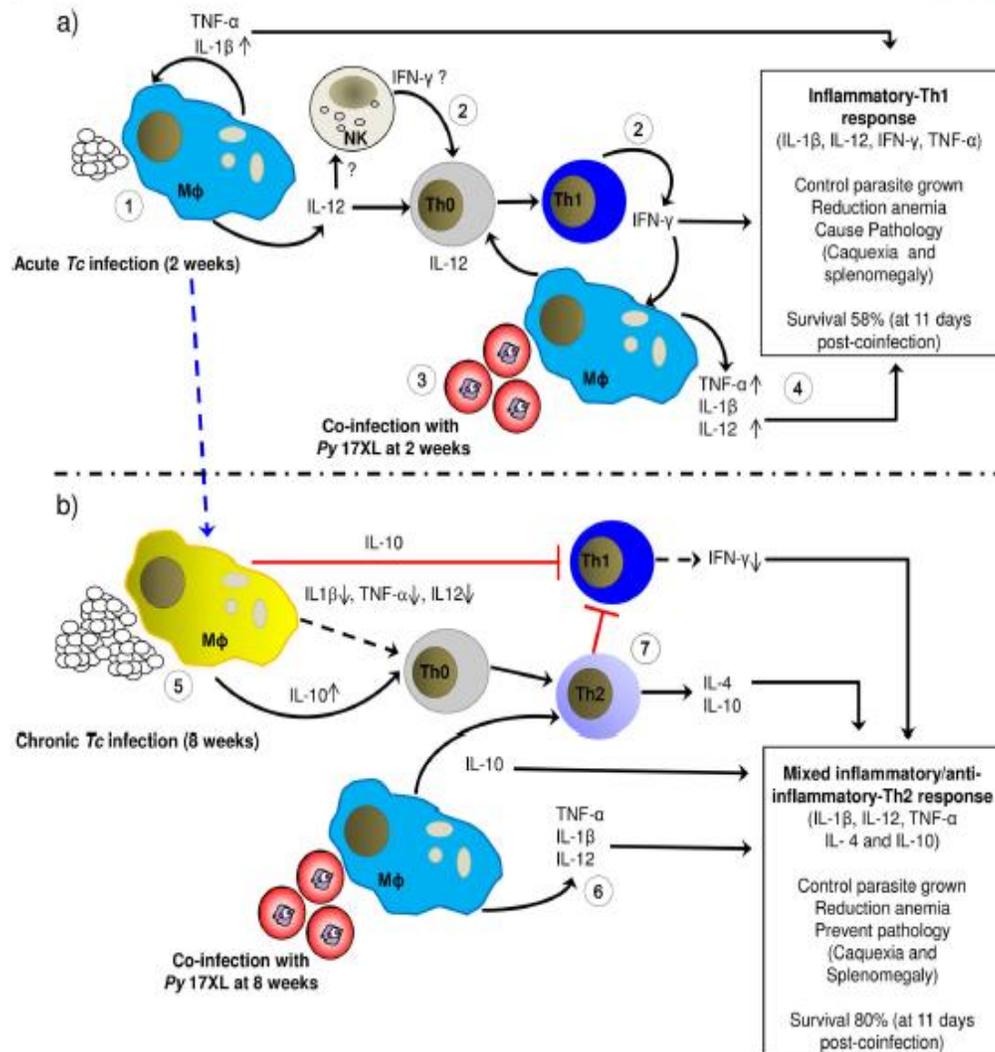
According to the theory of immunosuppression, any concomitant infection that is acquired while the host is experiencing a phase of parasite-induced immunodepression should be able to establish itself more readily and become more virulent or pathogenic (Cox 2001). However, here, we show that this phenomenon is not a rule; in our experimental model, the pathology originated by *Py* 17XL decreased in the *Tc8 + Py*-coinfecting group. This protection could be associated with a significant increment of IL-12 and IL-10, and decreased

TNF- $\alpha$  production by peritoneal M $\phi$  stimulated with *Py*Ag. Moreover, although splenocytes from *Tc8 + Py*-coinfecting mice showed no significant differences in the proliferative response to *Py*Ag but significantly reduced proliferation in vitro in response to Con-A, to an even greater extent than *Tc* or *Py* 17XL-single-infected or *Tc2 + Py*-coinfecting mice, these cells were able to produce high levels of *Py*Ag-specific IL-4 and IL-10 and reduced levels of IFN- $\gamma$ . These findings correlated with a lower splenic index, higher levels of hemoglobin and better-preserved body weight in *Tc8 + Py*-coinfecting mice. Our results are consistent with those of Lacerda-Queiroz et al., who showed that both IFN- $\gamma$ -deficient and IFN- $\gamma$ -depleted mice had higher body weights, reduced splenic damage, and longer survival time than *Py* N67C-infected WT mice (Lacerda-Queiroz et al. 2017).

Although IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 have been recognized to be important in restricting parasite replication and providing protection against *Plasmodium* infection (Mohan et al. 1997; Stevenson et al. 1995), high IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  levels in serum have also been associated with severe anemia (May et al. 2000; Perkins et al. 2000; Yap and Stevenson 1994), cachexia (Cannon et al. 2007; Remels et al. 2010), and pathology in response to *Plasmodium* infection (Prakash et al. 2006; Vogetseder et al. 2004). Here, we found that *Tc8 + Py*-coinfecting mice developed higher serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-12 but also lower serum levels of IFN- $\gamma$  compared with *Py* 17XL-single-infected mice. Importantly, despite the reduced IFN- $\gamma$  levels in the coinfecting groups, the parasitic burden was delayed during early coinfection in both coinfecting groups, although this phenomenon was lost after day 8 and the *Py* 17XL parasite continued to replicate to infect almost 80% of red cells in these groups.

Despite the high parasitemia that reached the *Tc8 + Py* group, it showed reduced anemia which could be associated with high serum levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12. This is supported by previous observations that showed that the administration of recombinant IL-12 (rIL-12) conferred protection against parasitemia, severe anemia, and mortality by *P. chabaudi* (Mohan and Stevenson 1998; Su and Stevenson 2002). Moreover, rIL-12 administration increased mice survival, and administration of the neutralizing monoclonal antibodies (mAb) anti-TNF- $\alpha$  resulted in 100% mortality (Stevenson et al. 1995). In addition, IL-12 and IL-1 $\beta$  reduced anemia by promoting erythropoiesis and its precursors (Bigildeev et al. 2015; Mohan and Stevenson 1998).

These data support the idea that an increase in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-12 levels in the *Tc2 + Py*- and *Tc8 + Py*-coinfecting mice reduced anemia and restricted *Py* 17XL replication during the acute phase of *Plasmodium* infection. In contrast, reduced IFN- $\gamma$  levels in serum and splenocytes as well as decreased TNF- $\alpha$  production by peritoneal M $\phi$  may limit the progression to severe life-threatening complications in *Tc8 + Py*-coinfecting mice.



**Fig. 8** Acute infection as a chronic stage of pre-existent helminth *Taenia crassiceps* infection differentially modifies the host immune response to *Py* 17XL coinfection. The acute stage of *Taenia crassiceps* infection (a) favors the development of the pro-inflammatory-type 1 immune response, which is characterized by increased levels of IL-12, TNF-α, and IL-1β produced by Mφ (1), and IFN-γ produced by T cells, among other cells (2). During this stage, coinfection with *Py* 17XL (*Py*) (3) reinforces the production of TNF-α and IL-12 by Mφ, although the IFN-γ produced by splenocytes is downregulated. This proinflammatory-type 1 immune response is associated with an initial restriction of *Py* parasite replication and a reduction of anemia; however, it plays a limited role in the regulation of the inflammatory response,

and mortality (4). As the *Tc* infection progresses (b, dotted blue line), a shift from a type pro-inflammatory-type 1 to anti-inflammatory type 2 immune response occurs (b), which is characterized by the production of low levels of IL-1β, TNF-α, and IL-12, and high levels of IL-10 by Mφ (5), and IL-4 and IL-10 by T cells (6). At this point, coinfection with *Py* favors an inflammatory/anti-inflammatory immune response characterized by the production of high levels of IL-12 and IL-10 by Mφ (6) and high levels of IL-4 and IL-10 but low levels of IFN-γ by splenocytes (7). This mixed profile of cytokines delays the replication of the *Py* 17XL parasite, reduces the early pathology, and increases survival until day 30 (b)

Our findings are consistent with results reported for non-lethal *Py* 17XNL-infected mice, which showed that reduced IFN-γ and increased IL-4 and IL-10 serum levels were important for the prevention of pathology (Bakir et al. 2011; Couper

et al. 2008). Moreover, low levels of IL-10 and high levels of TNF-α were associated with severe complications such as anemia and cachexia (Kurtzals et al. 1998; May et al. 2000). These findings are in agreement with the increased levels of

IL-4 and IL-10 as well as the reduced levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  detected in the supernatant of the splenocytes and peritoneal M $\phi$  stimulated with PyAg from the Tc8 + Py group. In contrast, Tc2 + Py-coinfected mice displayed lower levels of the anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10. These findings could explain why Tc8 + Py-coinfected mice showed significantly improved survival associated with reduced cachexia, anemia, and splenomegaly compared with the Tc2 + Py- or Py 17XL-single-infected mice.

Based on the results generated in this work, together with results previously reported for the immune response induced by Tc, we propose a hypothetical model to explain the effect of helminth infection on the immune response at different times of coinfection with Py 17XL (Fig. 8).

Acute infection with Tc induces a type 1 immune profile characterized by increased levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 in serum. This previously established cytokine profiles influence the immune response and the course of infection during Tc2 + Py coinfection: it delays replication of the Py 17XL parasite and favors the production of TNF- $\alpha$  and IL-12 by M $\phi$ , as well as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 in serum, and low levels of IFN- $\gamma$  production by splenocytes. Although this cytokine profile increases survival until day 18, it has a limited role in the regulation of pathology and mortality (Fig. 8a).

In contrast, in chronic infection with Tc, a type 2 immune profile characterized by low levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, and IFN- $\gamma$ , and high levels of IL-4 and IL-10 in the serum is established. This cytokine profile significantly influences the immune response and the course of infection during the Tc8 + Py coinfection: it favors an inflammatory/anti-inflammatory Th2 immune response characterized by high levels of IL-12 and IL-10 from M $\phi$ , as well as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 in serum. Importantly, high levels of IL-4 and IL-10 and low levels of IFN- $\gamma$  in splenocytes are produced. This mixed profile of cytokines delays the replication of the Py 17XL parasite, reduces early pathology, and increases survival until day 30 (Fig. 8b).

## Conclusion

Our data demonstrate that chronic helminth infection increases survival rates in *Plasmodium* coinfection, and that this phenomenon is dependent on the modulation of immunological profile elicited by helminths according to the time of pre-existing infection before infection with *Plasmodium*. The polarization of T cells towards cell-mediated responses in *Plasmodium* infections can be modulated by pre-existing factors including cytokines and regulatory cells induced by helminths. However, future studies are required to achieve a better understanding of the mechanisms involved in the anti-inflammatory regulatory cell response induced by helminth parasites during coinfection with *Plasmodium*. Our findings should be taken into account for the treatment of clinical

manifestations of malaria and for strategic immunization plans in zones where these parasites are endemic.

**Acknowledgments** This work is part of the requirements to obtain a PhD degree in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), for Victor H. Salazar Castañón, who received a fellowship No. 0443480 from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT). This study was supported in part by grants from the "Support Program for Research Projects and Technological Innovation" (PAPIIT) No. IN-209718 and IN-220417 to MRS and MLH, respectively.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Ethical approval** All procedures performed in these studies were in accordance with the ethical standards approved and carried out under strict accordance with the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals adopted by the U.S. National Institutes of Health, and the Mexican Regulation of Animal Care and maintenance (NOM-062-ZOO-1999, 2001). And it was revised and approved by the Ethics Committee at FES-Izacaala, UNAM (CE/FESI032017/1154).

## References

- Abel S, Ueffing K, Tatura R, Hutzler M, Hose M, Matuschewski K, Kehrman J, Westendorf AM, Buer J, Hansen W (2016) *Plasmodium yoelii* infection of BALB/c mice results in expansion rather than induction of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells. *Immunology* 148:197–205. <https://doi.org/10.1111/imm.12602>
- Anchang-Kimbi JK, Elad DM, Sotoing GT, Achidi EA (2017) Coinfection with *Schistosoma haematobium* and *Plasmodium falciparum* and anaemia severity among pregnant women in Munyenge, Mount Cameroon area: a cross-sectional study. *J Parasitol Res* 2017:6173465–6173412. <https://doi.org/10.1155/2017/6173465>
- Anthony RM, Rubitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7:975–987. <https://doi.org/10.1038/nri2199>
- Atochina O, Daly-Engel T, Piskorska D, McGuire E, Ham DA (2001) A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 167:4293–4302
- Bakir HY, Tomiyama C, Abo T (2011) Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Biomed Res* 32:203–208
- Bigildeev AE, Zezina EA, Shipounova IN, Drize NJ (2015) Interleukin-1 beta enhances human multipotent mesenchymal stromal cell proliferative potential and their ability to maintain hematopoietic precursor cells. *Cytokine* 71:246–254. <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2014.10.018>
- Brooker S, Akhwal W, Pullan R, Estambale B, Clarke SE, Snow RW, Hotez PJ (2007) Epidemiology of *Plasmodium*-helminth coinfection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *Am J Trop Med Hyg* 77:88–98
- Bucher K, Dietz K, Laekner P, Pasche B, Fendel R, Mordmüller B, Ben-Smih A, Hoffmann WH (2011) *Schistosoma* co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 41:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.06.008>

- Cannon T, Couch M, Yin X, Guttridge D, Lai V, Shores C (2007) Comparison of animal models for head and neck cancer cachexia. *Laryngoscope* 117:2152–2158. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e3181453658>
- Chen G, Feng H, Liu J, Qi ZM, Wu Y, Guo SY, Li DM, Wang JC, Cao YM (2010) Characterization of immune responses to single or mixed infections with *P. yoelii* 17XL and *P. chabaudi* AS in different strains of mice. *Parasitol Int* 59:400–406. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.05.005>
- Chen G, Liu L, Bi S, Luo L, Wang FF, Cai LS, Su JX, Dai Y (2014) The ratio of Treg/Th17 cells from mice infected with *Plasmodium yoelii* in the early stage of infection. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 32:425–429
- Couper KN, Blount DG, Hafalla JC, van Rooijen N, de Souza JB, Riley EM (2007) Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia. *Infect Immun* 75:5806–5818. <https://doi.org/10.1128/IAI.01005-07>
- Couper KN, Blount DG, Wilson MS, Hafalla JC, Bekaid Y, Kamanaka M, Flavell RA, de Souza JB, Riley EM (2008) IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathog* 4:e1000004. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000004>
- Cox FE (2001) Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122(Suppl):S23–S38
- Craig JM, Scott AL (2017) Antecedent *Nippostrongylus* infection alters the lung immune response to *Plasmodium berghei*. *Parasite Immunol* 39:e12441. <https://doi.org/10.1111/pim.12441>
- Degrege A, Anmut A, Legesse M, Erko B (2010) Malaria and helminth co-infections in outpatients of Alaba Kulito Health Center, southern Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Res Notes* 3:143. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-143>
- Dolo H, Coulibaly YI, Dembele B, Konate S, Coulibaly SY, Doumbia SS, Diallo AA, Soumaoro L, Coulibaly ME, Diakite SA, Guindo A, Fay MP, Metenous S, Nutman TB, Klion AD (2012) Filariasis attenuates anemia and proinflammatory responses associated with clinical malaria: a matched prospective study in children and young adults. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1890. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001890>
- Doumbo S, Tran TM, Sangala J, Li S, Doumbo D, Kone Y, Traore A, Bathily A, Sogoba N, Coulibaly ME, Huang CY, Ongoiba A, Kayentao K, Diallo M, Dramane Z, Nutman TB, Crompton PD, Doumbo OTB (2014) Co-infection of long-term carriers of *Plasmodium falciparum* with *Schistosoma haematobium* enhances protection from febrile malaria: a prospective cohort study in Mali. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3154. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003154>
- Engwerda CR, Beattie L, Amante FH (2005) The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol* 21:75–80. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.11.008>
- Espinoza-Jimenez A, Rivera-Montoya I, Cardenas-Arreola R, Moran L, Terrazas LI (2010) *Taenia crassiceps* infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *J Biomed Biotechnol* 2010:850541–850511. <https://doi.org/10.1155/2010/850541>
- Everts B, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M (2010) Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *Eur J Immunol* 40:1525–1537. <https://doi.org/10.1002/eji.200940109>
- Fu Y, Ding Y, Zhou T, Fu X, Xu W (2012a) *Plasmodium yoelii* blood-stage primes macrophage-mediated innate immune response through modulation of toll-like receptor signalling. *Malar J* 11:104. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-104>
- Fu Y, Ding Y, Zhou TL, Ou QY, Xu WY (2012b) Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of *Plasmodium yoelii*. *J Parasitol* 98:310–315. <https://doi.org/10.1645/GE-2825.1>
- Getie S, Wondimeneh Y, Getnet G, Workneh M, Worku L, Kassa A, Moges B (2015) Prevalence and clinical correlates of *Schistosoma mansoni* co-infection among malaria infected patients, Northwest Ethiopia. *BMC Res Notes* 8:480. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1468-2>
- Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI (2005) Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol* 27:395–405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00790.x>
- Good MF (2005) Identification of early cellular immune factors regulating growth of malaria parasites in humans. *Immunity* 23:241–242. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.011>
- Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW (2010) Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med* 7:e1000290. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000290>
- Helmby H (2009) Gastrointestinal nematode infection exacerbates malaria-induced liver pathology. *J Immunol* 182:5663–5671. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803790>
- Hoeve MA, Mylonas KJ, Fairlie-Clarke KJ, Mahajan SM, Allen JE, Graham AL (2009) *Plasmodium chabaudi* limits early *Nippostrongylus brasiliensis*-induced pulmonary immune activation and Th2 polarization in co-infected mice. *BMC Immunol* 10:60. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-60>
- Huang X, Huang S, Ong LC, Lim JC, Hurst RJ, Mushunje AT, Matsudaira PT, Han J, Preiser PR (2016) Differential spleen remodeling associated with different levels of parasite virulence controls disease outcome in malaria parasite infections. *mSphere* 1:e00018–e00015. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00018-15>
- Jenkins SJ, Allen JE (2010) Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *J Biomed Biotechnol* 2010:262609–262614. <https://doi.org/10.1155/2010/262609>
- Kurtzhals JA, Adabayeri V, Gola BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Behr C, Hviid L (1998) Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351:1768–1772. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)09439-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)09439-7)
- Lacerda-Queiroz N, Riteau N, Eastman RT, Bock KW, Orandle MS, Moore IN, Sher A, Long CA, Jankovic D, Su XZ (2017) Mechanism of splenic cell death and host mortality in a *Plasmodium yoelii* malaria model. *Sci Rep* 7:10438. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10776-2>
- Langhorne J, Albano FR, Hensmann M, Sanni L, Cadman E, Voisine C, Sponaas AM (2004) Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunol Rev* 201:35–47. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00182.x>
- Ledesma-Soto Y, Callejas BE, Terrazas CA, Reyes JL, Espinoza-Jimenez A, Gonzalez MI, Leon-Cabrera S, Morales R, Olguin JE, Saavedra R, Oghumu S, Santoskar AR, Terrazas LI (2015) Extraintestinal helminth infection limits pathology and proinflammatory cytokine expression during DSS-induced ulcerative colitis: a role for alternatively activated macrophages and prostaglandins. *Biomed Res Int* 2015:563425–563417. <https://doi.org/10.1155/2015/563425>
- Legesse M, Erko B, Balcha F (2004) Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium berghei* co-infected mice. *Acta Trop* 91:161–166. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.002>
- Leon-Cabrera S, Callejas BE, Ledesma-Soto Y, Coronel J, Perez-Plascencia C, Gutierrez-Carlos EB, Avila-Moreno F, Rodriguez-Sosa M, Hernandez-Pando R, Marquina-Castillo B, Chirino YI, Terrazas LI (2014) Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis. *Int J Biol Sci* 10:948–956. <https://doi.org/10.7150/ijbs.9033>

- Lucas B, Engel A, Camus D, Haque A (1993) *Plasmodium yoelii* in mice: antigen reactivity of CD4- and CD8-bearing T cells. *Cell Immunol* 150:59–71. <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1178>
- May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Krensmeyer PG (2000) Plasma interleukin-10: tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications. *J Infect Dis* 182:1570–1573. <https://doi.org/10.1086/315857>
- Mohan K, Stevenson MM (1998) Interleukin-12 corrects severe anemia during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS in susceptible A/J mice. *Exp Hematol* 26:45–52
- Mohan K, Moulin P, Stevenson MM (1997) Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol* 159:4990–4998
- Moreau E, Chauvin A (2010) Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections. *J Biomed Biotechnol* 2010:428593–428599. <https://doi.org/10.1155/2010/428593>
- Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, Krudsood S, Treeprasertsuk S, Mazier D, Vouldoukis I, Looareesuwan S (2000) *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. *Parasite Immunol* 22:107–113
- Omer FM, de Souza JB, Riley EM (2003) Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol* 171:5430–5436
- Peon AN, Espinoza-Jimenez A, Terrazas LI (2013) Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed Res Int* 2013:498583–498513. <https://doi.org/10.1155/2013/498583>
- Perkins DJ, Weinberg JB, Krensmeyer PG (2000) Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis* 182:988–992. <https://doi.org/10.1086/315762>
- Perkins DJ, Were T, Davenport GC, Kempaiah P, Hitner JB, Ong'echa JM (2011) Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int J Biol Sci* 7:1427–1442
- Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S (2006) Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis* 194:198–207. <https://doi.org/10.1086/504720>
- Remels AH, Gosker HR, Schrauwen P, Hommelberg PP, Sliwinski P, Polkey M, Galdiz J, Wouters EF, Langen RC, Schols AM (2010) TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia? *FASEB J* 24:5052–5062. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150714f.09-150714>
- Reyes JL, Terrazas CA, Vera-Arias L, Terrazas LI (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>
- Reyes JL, Terrazas CA, Alonso-Trujillo J, van Rooijen N, Satoskar AR, Terrazas LI (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>
- Reyes JL, Espinoza-Jimenez AF, Gonzalez MI, Verdin L, Terrazas LI (2011) *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 267:77–87. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.11.006>
- Righetti AA, Glinz D, Adiosan LG, Koua AY, Niamke S, Hurrell RF, Wegmüller R, N'Goran EK, Utzinger J (2012) Interactions and potential implications of *Plasmodium falciparum*-hookworm coinfection in different age groups in south-central Côte d'Ivoire. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1889. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001889>
- Rodríguez M, Terrazas LI, Márquez R, Bojalil R (1999) Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol* 21:177–185
- Rodríguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI (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
- Rodríguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI (2004) A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 72:4552–4560. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4552-4560.2004>
- Rodríguez-Sosa M, Rivera-Montoya I, Espinoza A, Romero-Grijalva M, Lopez-Flores R, Gonzalez J, Terrazas LI (2006) Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol* 242:61–71. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.09.006>
- Salazar-Castanon VH, Legorreta-Herrera M, Rodríguez-Sosa M (2014) Helminth parasites alter protection against Plasmodium infection. *Biomed Res Int* 2014:913696–913619. <https://doi.org/10.1155/2014/913696>
- Sangweme D, Shiff C, Kumar N (2009) *Plasmodium yoelii*: adverse outcome of non-lethal *P. yoelii* malaria during co-infection with *Schistosoma mansoni* in BALB/c mouse model. *Exp Parasitol* 122:254–259. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.003>
- Sangweme DT, Midzi N, Zinyowen-Mutapuri S, Mdluluzi T, Diener-West M, Kumar N (2010) Impact of schistosome infection on *Plasmodium falciparum* Malarimetric indices and immune correlates in school age children in Burma Valley, Zimbabwe. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e882. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000882>
- Schofield L, Grau GE (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 5:722–735. <https://doi.org/10.1038/nri1686>
- Specht S, Ruiz DF, Dubben B, Deininger S, Hoerauf A (2010) Filaria-induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria. *Microbes Infect* 12:635–642. <https://doi.org/10.1016/j.micimf.2010.04.006>
- Stevenson MM, Tam MF, Wolf SF, Sher A (1995) IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 155:2545–2556
- Su Z, Stevenson MM (2002) IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* 168:1348–1355
- Su Z, Segura M, Morgan K, Loredó-Ostí JC, Stevenson MM (2005) Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection. *Infect Immun* 73:3531–3539. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.6.3531-3539.2005>
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84:74–81
- Terrazas LI, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo F, Larralde C (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 85:135–141
- Terrazas CA, Gomez-Garcia L, Terrazas LI (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>
- Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, Himeno K, Hisaeda H (2009) Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. *Eur J Immunol* 39:2822–2830. <https://doi.org/10.1002/eji.200939433>
- Vogtseder A, Ospelt C, Reindl M, Schober M, Schmutzhard E (2004) Time course of coagulation parameters, cytokines and adhesion molecules in *Plasmodium falciparum* malaria. *Tropical Med Int Health* 9: 767–773. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2004.01265.x>

- Walkine-Grinberg JH, Gold D, Ohayon A, Flescher E, Heyfets A, Doenhoff MJ, Schramm G, Haas H, Golenser J (2010) *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. *Malar J* 9:5. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-5>
- Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korbel D, King E, Fletcher H, Andersen RF, Bejon P, Thompson F, Dunachie SJ, Edele F, de Souza JB, Sinden RE, Gilbert SC, Riley EM, Hill AV (2005) Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity* 23:287–296. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.006>
- Wang ML, Cao YM, Luo EJ, Zhang Y, Guo YJ (2013) Pre-existing *Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to *Plasmodium berghei* infection in C57BL/6 mice. *Malar J* 12:322. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-322>
- Yap GS, Stevenson MM (1994) Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in *Plasmodium chabaudi* AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon. *Infect Immun* 62:357–362
- Yoshida A, Maruyama H, Kumagai T, Amano T, Kobayashi F, Zhang M, Himeno K, Ohta N (2000) *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int Immunol* 12:1117–1125

## 15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jourdan, P.M., et al., *Soil-transmitted helminth infections*. Lancet, 2017.
2. Wright, J.E., et al., *Current epidemiological evidence for predisposition to high or low intensity human helminth infection: a systematic review*. Parasit Vectors, 2018. **11**(1): p. 65.
3. Dichiaro, M., et al., *Repurposing of Human Kinase Inhibitors in Neglected Protozoan Diseases*. ChemMedChem, 2017. **12**(16): p. 1235-1253.
4. Snow, R.W., J.F. Trape, and K. Marsh, *The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa*. Trends Parasitol, 2001. **17**(12): p. 593-7.
5. Good, M.F., et al., *Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 69-99.
6. Taylor-Robinson, A.W., *Regulation of immunity to Plasmodium: implications from mouse models for blood stage malaria vaccine design*. Exp Parasitol, 2010. **126**(3): p. 406-14.
7. Krampa, F.D., et al., *Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis*. Sensors (Basel), 2020. **20**(3).
8. Flores-Alanis, A., et al., *Temporal genetic changes in Plasmodium vivax apical membrane antigen 1 over 19 years of transmission in southern Mexico*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 217.
9. Antinori, S., et al., *Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2012. **4**(1): p. e2012013.
10. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
11. Wah, S.T., et al., *Molecular basis of human cerebral malaria development*. Trop Med Health, 2016. **44**: p. 33.
12. Hodgson, S.H. and B.J. Angus, *Malaria: fluid therapy in severe disease*. BMJ Clin Evid, 2016. **2016**.
13. Eikenberry, S.E. and A.B. Gumel, *Mathematical modeling of climate change and malaria transmission dynamics: a historical review*. J Math Biol, 2018.
14. Gething, P.W., et al., *A new world malaria map: Plasmodium falciparum endemicity in 2010*. Malar J, 2011. **10**: p. 378.
15. Gonzalez-Ceron, L., et al., *Diversity and evolutionary genetics of the three major Plasmodium vivax merozoite genes participating in reticulocyte invasion in southern Mexico*. Parasit Vectors, 2015. **8**: p. 651.
16. Howes, R.E., et al., *Global Epidemiology of Plasmodium vivax*. Am J Trop Med Hyg, 2016. **95**(6 Suppl): p. 15-34.
17. Huang, B.W., E. Pearman, and C.C. Kim, *Mouse Models of Uncomplicated and Fatal Malaria*. Bio Protoc, 2015. **5**(13).
18. Hernandez-Valladares, M., P. Rihet, and F.A. Iraqi, *Host susceptibility to malaria in human and mice: compatible approaches to identify potential resistant genes*. Physiol Genomics, 2014. **46**(1): p. 1-16.
19. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
20. Langhorne, J., et al., *Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection*. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 35-47.

21. Su, Z. and M.M. Stevenson, *IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria infection in mice*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1348-55.
22. Yoshimoto, T., et al., *Interleukin-12-dependent mechanisms in the clearance of blood-stage murine malaria parasite Plasmodium berghei XAT, an attenuated variant of P. berghei NK65*. J Infect Dis, 1998. **177**(6): p. 1674-81.
23. Wykes, M.N., et al., *Plasmodium strain determines dendritic cell function essential for survival from malaria*. PLoS Pathog, 2007. **3**(7): p. e96.
24. Langhorne, J., S.J. Quin, and L.A. Sanni, *Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology*. Chem Immunol, 2002. **80**: p. 204-28.
25. Hunt, N.H. and G.E. Grau, *Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria*. Trends Immunol, 2003. **24**(9): p. 491-9.
26. Lamb, T.J., et al., *Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models*. Expert Rev Mol Med, 2006. **8**(6): p. 1-22.
27. Almeida, A.P., et al., *Long-lasting humoral and cellular immune responses elicited by immunization with recombinant chimeras of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein*. Vaccine, 2014. **32**(19): p. 2181-7.
28. Ferraro, B., et al., *Inducing humoral and cellular responses to multiple sporozoite and liver-stage malaria antigens using exogenous plasmid DNA*. Infect Immun, 2013. **81**(10): p. 3709-20.
29. Imai, T., et al., *Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain*. Eur J Immunol, 2010. **40**(4): p. 1053-61.
30. Dantzler, K.W. and P. Jagannathan, *gammadelta T Cells in Antimalarial Immunity: New Insights Into Their Diverse Functions in Protection and Tolerance*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2445.
31. Jagannathan, P., et al., *Vdelta2+ T cell response to malaria correlates with protection from infection but is attenuated with repeated exposure*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 11487.
32. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4990-8.
33. Choudhury, H.R., et al., *Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal Plasmodium yoelii malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6127-32.
34. Fortin, A., M.M. Stevenson, and P. Gros, *Susceptibility to malaria as a complex trait: big pressure from a tiny creature*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(20): p. 2469-78.
35. Couper, K.N., et al., *Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of Plasmodium yoelii parasitemia*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5806-18.
36. Kobayashi, F., et al., *Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of Plasmodium yoelii yoelii*. Parasitol Res, 1996. **82**(5): p. 385-91.
37. Chua, C.L., et al., *Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?* Trends Parasitol, 2013. **29**(1): p. 26-34.
38. Seixas, E., et al., *The interaction between DC and Plasmodium berghei/chabaudi-infected erythrocytes in mice involves direct cell-to-cell contact, internalization and TLR*. Eur J Immunol, 2009. **39**(7): p. 1850-63.
39. Stevenson, M.M. and B.C. Urban, *Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 5-14.

40. Bettiol, E., et al., *Dual effect of Plasmodium-infected erythrocytes on dendritic cell maturation*. Malar J, 2010. **9**: p. 64.
41. Pichyangkul, S., et al., *Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4926-33.
42. Coban, C., et al., *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 19-25.
43. Wykes, M.N., et al., *Systemic tumor necrosis factor generated during lethal Plasmodium infections impairs dendritic cell function*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3982-7.
44. Moser, M. and K.M. Murphy, *Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development*. Nat Immunol, 2000. **1**(3): p. 199-205.
45. von der Weid, T., N. Honarvar, and J. Langhorne, *Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection*. J Immunol, 1996. **156**(7): p. 2510-6.
46. Langhorne, J., et al., *A role for B cells in the development of T cell helper function in a malaria infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(4): p. 1730-4.
47. Perez-Mazliah, D. and J. Langhorne, *CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 671.
48. Lazarou, M., et al., *Inhibition of erythrocyte invasion and Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies*. Infect Immun, 2009. **77**(12): p. 5659-67.
49. von der Weid, T. and J. Langhorne, *Altered response of CD4+ T cell subsets to Plasmodium chabaudi chabaudi in B cell-deficient mice*. Int Immunol, 1993. **5**(10): p. 1343-8.
50. Taylor-Robinson, A.W. and R.S. Phillips, *Reconstitution of B-cell-depleted mice with B cells restores Th2-type immune responses during Plasmodium chabaudi chabaudi infection*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 366-70.
51. Troye-Blomberg, M. and K. Berzins, *Immune interactions in malaria co-infections with other endemic infectious diseases: implications for the development of improved disease interventions*. Microbes Infect, 2008. **10**(9): p. 948-52.
52. Stanisic, D.I., et al., *Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness*. Infect Immun, 2009. **77**(3): p. 1165-74.
53. Richards, J.S., et al., *Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of Plasmodium falciparum and protection from malaria and high-density parasitemia*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(8): p. e50-60.
54. Aucan, C., et al., *High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1252-8.
55. Anchang-Kimbi, J.K., et al., *IgG isotypic antibodies to crude Plasmodium falciparum blood-stage antigen associated with placental malaria infection in parturient Cameroonian women*. Afr Health Sci, 2016. **16**(4): p. 1007-1017.
56. Adu, B., et al., *Antibody levels against GLURP R2, MSP1 block 2 hybrid and AS202.11 and the risk of malaria in children living in hyperendemic (Burkina Faso) and hypo-endemic (Ghana) areas*. Malar J, 2016. **15**: p. 123.
57. Rowe, J.A., et al., *Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(6): p. 692-9.
58. Pleass, R.J., et al., *Immunoglobulin M: Restrainer of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by Plasmodium falciparum Malaria*. Trends Parasitol, 2016. **32**(2): p. 108-119.

59. Berczky, S., et al., *Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria*. *Int J Parasitol*, 2004. **34**(8): p. 935-42.
60. Duarte, J., et al., *High levels of immunoglobulin E autoantibody to 14-3-3 epsilon protein correlate with protection against severe Plasmodium falciparum malaria*. *J Infect Dis*, 2012. **206**(11): p. 1781-9.
61. Hisaeda, H., et al., *Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during Plasmodium yoelii infection*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(12): p. 3516-24.
62. Vigario, A.M., et al., *Regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells expand during experimental Plasmodium infection but do not prevent cerebral malaria*. *Int J Parasitol*, 2007. **37**(8-9): p. 963-73.
63. Omer, F.M., J.B. de Souza, and E.M. Riley, *Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections*. *J Immunol*, 2003. **171**(10): p. 5430-6.
64. Couper, K.N., et al., *IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection*. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(2): p. e1000004.
65. Abel, S., et al., *Strong impact of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells and limited effect of T cell-derived IL-10 on pathogen clearance during Plasmodium yoelii infection*. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5467-77.
66. Walther, M., et al., *Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection*. *Immunity*, 2005. **23**(3): p. 287-96.
67. Fu, Y., et al., *Comparative histopathology of mice infected with the 17XL and 17XNL strains of Plasmodium yoelii*. *J Parasitol*, 2012. **98**(2): p. 310-5.
68. Chen, G., et al., *Characterization of immune responses to single or mixed infections with P. yoelii 17XL and P. chabaudi AS in different strains of mice*. *Parasitol Int*, 2010. **59**(3): p. 400-6.
69. Fu, Y., et al., *Plasmodium yoelii blood-stage primes macrophage-mediated innate immune response through modulation of toll-like receptor signalling*. *Malar J*, 2012. **11**: p. 104.
70. Abel, S., et al., *Plasmodium yoelii infection of BALB/c mice results in expansion rather than induction of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells*. *Immunology*, 2016. **148**(2): p. 197-205.
71. McSorley, H.J. and R.M. Maizels, *Helminth infections and host immune regulation*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(4): p. 585-608.
72. Salazar-Castanon, V.H., M. Legorreta-Herrera, and M. Rodriguez-Sosa, *Helminth parasites alter protection against Plasmodium infection*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 913696.
73. Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh, *Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 733-44.
74. Anthony, R.M., et al., *Protective immune mechanisms in helminth infection*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(12): p. 975-87.
75. Allen, J.E. and R.M. Maizels, *Diversity and dialogue in immunity to helminths*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(6): p. 375-88.
76. Borkow, G., et al., *Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(8): p. 1053-60.
77. Moreau, E. and A. Chauvin, *Immunity against helminths: interactions with the host and the intercurrent infections*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 428593.
78. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.

79. Blankenhaus, B., et al., *Strongyloides ratti* infection induces expansion of Foxp3+ regulatory T cells that interfere with immune response and parasite clearance in BALB/c mice. J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4295-305.
80. Taylor, M.D., et al., *Early recruitment of natural CD4+ Foxp3+ Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection.* Eur J Immunol, 2009. **39**(1): p. 192-206.
81. Finney, C.A., et al., *Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Heligmosomoides polygyrus infection.* Eur J Immunol, 2007. **37**(7): p. 1874-86.
82. Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh, *T-cell regulation in helminth parasite infections: implications for inflammatory diseases.* Chem Immunol Allergy, 2008. **94**: p. 112-23.
83. Husaarts, L., et al., *Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease.* J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(4): p. 733-9.
84. Atochina, O., et al., *A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism.* J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4293-302.
85. Jenkins, S.J. and J.E. Allen, *Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes.* J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 262609.
86. Everts, B., et al., *Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses.* Eur J Immunol, 2010. **40**(6): p. 1525-37.
87. Terrazas, C.A., L. Gomez-Garcia, and L.I. Terrazas, *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, 2010. **40**(9): p. 1051-62.
88. Cooper, P.J., et al., *Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10.* J Infect Dis, 1998. **178**(4): p. 1133-8.
89. Elias, D., et al., *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent Mycobacterium tuberculosis. Vaccine, 2005. **23**(11): p. 1326-34.
90. Kilian, H.D. and G. Nielsen, *Cell-mediated and humoral immune responses to BCG and rubella vaccinations and to recall antigens in onchocerciasis patients.* Trop Med Parasitol, 1989. **40**(4): p. 445-53.
91. Cooper, P.J., et al., *Human infection with Ascaris lumbricoides is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR.* Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1574-80.
92. Summers, R.W., et al., *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. Gut, 2005. **54**(1): p. 87-90.
93. Summers, R.W., et al., *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. Gastroenterology, 2005. **128**(4): p. 825-32.
94. Reyes, J.L., et al., *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. Cell Immunol, 2011. **267**(2): p. 77-87.
95. Gruden-Movsesijan, A., et al., *Trichinella spiralis: modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats.* Exp Parasitol, 2008. **118**(4): p. 641-7.
96. Rocha, F.A., et al., *Protective effect of an extract from Ascaris suum in experimental arthritis models.* Infect Immun, 2008. **76**(6): p. 2736-45.
97. Willms, K. and R. Zurabian, *Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models.* Parasitology, 2010. **137**(3): p. 335-46.
98. Sciutto, E., et al., *Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental Taenia crassiceps infection.* Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2277-81.

99. Peon, A.N., A. Espinoza-Jimenez, and L.I. Terrazas, *Immunoregulation by Taenia crassiceps and its antigens*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 498583.
100. Sciutto, E., et al., *Murine Taenia crassiceps cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility*. Parasitol Res, 1991. **77**(3): p. 243-6.
101. Fragoso, G., et al., *Preferential growth of Taenia crassiceps cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines*. J Parasitol, 2008. **94**(2): p. 551-3.
102. Reyes, J.L., et al., *Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to Taenia crassiceps infection*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(6): p. 1115-27.
103. Terrazas, L.I., et al., *Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps)*. J Parasitol, 1998. **84**(1): p. 74-81.
104. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite Taenia crassiceps is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3135-9.
105. Rodriguez-Sosa, M., et al., *A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite Taenia crassiceps*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4552-60.
106. Becerra-Diaz, M. and L.I. Terrazas, *Taenia crassiceps infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN-gamma*. Int J Parasitol, 2014. **44**(9): p. 613-23.
107. Terrazas, C., et al., *Helminth-induced Ly6C(hi) monocyte-derived alternatively activated macrophages suppress experimental autoimmune encephalomyelitis*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 40814.
108. Pullan, R. and S. Brooker, *The health impact of polyparasitism in humans: are we underestimating the burden of parasitic diseases?* Parasitology, 2008. **135**(7): p. 783-94.
109. Faulkner, H., et al., *Associations between filarial and gastrointestinal nematodes*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2005. **99**(4): p. 301-12.
110. Brooker, S., et al., *Epidemiology of single and multiple species of helminth infections among school children in Busia District, Kenya*. East Afr Med J, 2000. **77**(3): p. 157-61.
111. Griffiths, E.C., et al., *The nature and consequences of coinfection in humans*. J Infect, 2011. **63**(3): p. 200-6.
112. Hotez, P.J., et al., *Helminth infections: the great neglected tropical diseases*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1311-21.
113. Hay, S.I., et al., *Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum malaria in 2007*. PLoS Med, 2010. **7**(6): p. e1000290.
114. Brooker, S., et al., *Epidemiology of plasmodium-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control*. Am J Trop Med Hyg, 2007. **77**(6 Suppl): p. 88-98.
115. Telfer, S., et al., *Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population*. Science. **330**(6001): p. 243-6.
116. Druilhe, P., A. Tall, and C. Sokhna, *Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria?* Trends Parasitol, 2005. **21**(8): p. 359-62.
117. Borkow, G. and Z. Bentwich, *HIV and helminth co-infection: is deworming necessary?* Parasite Immunol, 2006. **28**(11): p. 605-12.
118. Pearce, E.J. and S.L. Reiner, *Induction of Th2 responses in infectious diseases*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(4): p. 497-504.
119. Hartgers, F.C. and M. Yazdanbakhsh, *Co-infection of helminths and malaria: modulation of the immune responses to malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(10): p. 497-506.

120. Antignano, F., et al., *Trichuris muris* infection: a model of type 2 immunity and inflammation in the gut. *J Vis Exp*, 2011(51).
121. Maizels, R.M. and H.J. McSorley, *Regulation of the host immune system by helminth parasites*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **138**(3): p. 666-675.
122. Telfer, S., et al., *Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data*. *Parasitology*, 2008. **135**(7): p. 767-81.
123. Telfer, S., et al., *Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population*. *Science*, 2010. **330**(6001): p. 243-6.
124. Marshall, A.J., et al., *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF-alpha and early death in C57BL/6 mice. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 2089-97.
125. Rodriguez, M., et al., *Susceptibility to Trypanosoma cruzi is modified by a previous non-related infection*. *Parasite Immunol*, 1999. **21**(4): p. 177-85.
126. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by Leishmania major and Leishmania mexicana infection, a role for alternatively activated macrophages*. *Cell Immunol*, 2006. **242**(2): p. 61-71.
127. Maizels, R.M., et al., *Helminth parasites--masters of regulation*. *Immunol Rev*, 2004. **201**: p. 89-116.
128. van Riet, E., F.C. Hartgers, and M. Yazdanbakhsh, *Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms*. *Immunobiology*, 2007. **212**(6): p. 475-90.
129. La Flamme, A.C., P. Scott, and E.J. Pearce, *Schistosomiasis delays lesion resolution during Leishmania major infection by impairing parasite killing by macrophages*. *Parasite Immunol*, 2002. **24**(7): p. 339-45.
130. Yoshida, A., et al., *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int Immunol*, 2000. **12**(8): p. 1117-25.
131. Nacher, M., et al., *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. *Parasite Immunol*, 2000. **22**(3): p. 107-13.
132. Specht, S., et al., *Filaria-induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria*. *Microbes Infect*, 2010. **12**(8-9): p. 635-42.
133. Waknine-Grinberg, J.H., et al., *Schistosoma mansoni* infection reduces the incidence of murine cerebral malaria. *Malar J*, 2010. **9**: p. 5.
134. Dolo, H., et al., *Filariasis attenuates anemia and proinflammatory responses associated with clinical malaria: a matched prospective study in children and young adults*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. **6**(11): p. e1890.
135. Righetti, A.A., et al., *Interactions and potential implications of Plasmodium falciparum-hookworm coinfection in different age groups in south-central Cote d'Ivoire*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012. **6**(11): p. e1889.
136. Wang, M.L., et al., *Pre-existing Schistosoma japonicum* infection alters the immune response to *Plasmodium berghei* infection in C57BL/6 mice. *Malar J*, 2013. **12**(1): p. 322.
137. Doumbo, S., et al., *Co-infection of long-term carriers of Plasmodium falciparum with Schistosoma haematobium enhances protection from febrile malaria: a prospective cohort study in Mali*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014. **8**(9): p. e3154.
138. Getie, S., et al., *Prevalence and clinical correlates of Schistosoma mansoni co-infection among malaria infected patients, Northwest Ethiopia*. *BMC Res Notes*, 2015. **8**: p. 480.

139. Legesse, M., B. Erko, and F. Balcha, *Increased parasitaemia and delayed parasite clearance in Schistosoma mansoni and Plasmodium berghei co-infected mice*. Acta Trop, 2004. **91**(2): p. 161-6.
140. Su, Z., et al., *Impairment of protective immunity to blood-stage malaria by concurrent nematode infection*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3531-9.
141. Helmby, H., *Gastrointestinal nematode infection exacerbates malaria-induced liver pathology*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5663-71.
142. Sangweme, D.T., et al., *Impact of schistosome infection on Plasmodium falciparum Malariaometric indices and immune correlates in school age children in Burma Valley, Zimbabwe*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(11): p. e882.
143. Degarege, A., et al., *Malaria and helminth co-infections in outpatients of Alaba Kulito Health Center, southern Ethiopia: a cross sectional study*. BMC Res Notes, 2010. **3**: p. 143.
144. Tetsutani, K., et al., *Concurrent infection with Heligmosomoides polygyrus suppresses anti-Plasmodium yoelii protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2822-30.
145. Anchang-Kimbi, J.K., et al., *Coinfection with Schistosoma haematobium and Plasmodium falciparum and Anaemia Severity among Pregnant Women in Munyenge, Mount Cameroon Area: A Cross-Sectional Study*. J Parasitol Res, 2017. **2017**: p. 6173465.
146. Ishikawa, N., et al., *Early cytokine responses during intestinal parasitic infections*. Immunology, 1998. **93**(2): p. 257-63.
147. Pearce, E.J. and A.S. MacDonald, *The immunobiology of schistosomiasis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 499-511.
148. Eschbach, M.L., et al., *Strongyloides ratti infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice*. Parasite Immunol, 2010. **32**(5): p. 370-83.
149. Lucas, B., et al., *Plasmodium yoelii in mice: antigen reactivity of CD4- and CD8-bearing T cells*. Cell Immunol, 1993. **150**(1): p. 59-71.
150. Satoskar, A.R., et al., *Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous Leishmania major infection*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 906-11.
151. Freitas do Rosario, A.P., et al., *IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1178-90.
152. Perkins, D.J., et al., *Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1427-42.
153. Lamikanra, A.A., et al., *Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8446.
154. Thawani, N., et al., *Plasmodium products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors*. J Infect Dis, 2014. **209**(1): p. 140-9.
155. McGregor, A., et al., *Hyperreactive Malarial Splenomegaly Syndrome--Can the Diagnostic Criteria Be Improved?* Am J Trop Med Hyg, 2015. **93**(3): p. 573-6.
156. Espinoza-Jimenez, A., et al., *Taenia crassiceps infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 850541.
157. Leon-Cabrera, S., et al., *Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis*. Int J Biol Sci, 2014. **10**(9): p. 948-56.
158. Ledesma-Soto, Y., et al., *Extraintestinal Helminth Infection Limits Pathology and Proinflammatory Cytokine Expression during DSS-Induced Ulcerative Colitis: A Role for*

- Alternatively Activated Macrophages and Prostaglandins*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 563425.
159. Xiao, N., et al., [*Effect of Nippostrongylus brasiliensis induced alterations in T helper cell subsets on Plasmodium berghei infection in mice*]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2000. **18**(5): p. 286-90.
  160. Sangweme, D., C. Shiff, and N. Kumar, *Plasmodium yoelii: adverse outcome of non-lethal P. yoelii malaria during co-infection with Schistosoma mansoni in BALB/c mouse model*. Exp Parasitol, 2009. **122**(3): p. 254-9.
  161. Bucher, K., et al., *Schistosoma co-infection protects against brain pathology but does not prevent severe disease and death in a murine model of cerebral malaria*. Int J Parasitol, 2011. **41**(1): p. 21-31.
  162. Craig, J.M. and A.L. Scott, *Antecedent Nippostrongylus infection alters the lung immune response to Plasmodium berghei*. Parasite Immunol, 2017. **39**(8).
  163. Legorreta-Herrera, M., et al., *Early treatment during a primary malaria infection modifies the development of cross immunity*. Parasite Immunol, 2004. **26**(1): p. 7-17.
  164. Lamb, T.J. and J. Langhorne, *The severity of malarial anaemia in Plasmodium chabaudi infections of BALB/c mice is determined independently of the number of circulating parasites*. Malar J, 2008. **7**: p. 68.
  165. Chen, G., et al., [*The ratio of Treg/Th17 cells from mice infected with Plasmodium yoelii in the early stage of infection*]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 2014. **32**(6): p. 425-9.
  166. Smith, M.A., et al., *IFN-gamma does not mimic the catabolic effects of TNF-alpha*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(6): p. C1947-52.
  167. Remels, A.H., et al., *The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD*. J Appl Physiol (1985), 2013. **114**(9): p. 1253-62.
  168. Onwuamaegbu, M.E., M. Henein, and A.J. Coats, *Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice*. Postgrad Med J, 2004. **80**(949): p. 642-9.
  169. Hoeve, M.A., et al., *Plasmodium chabaudi limits early Nippostrongylus brasiliensis-induced pulmonary immune activation and Th2 polarization in co-infected mice*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 60.
  170. Graham, A.L., et al., *Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency*. J Infect Dis, 2005. **191**(3): p. 410-21.
  171. Buffet, P.A., et al., *The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology*. Blood, 2011. **117**(2): p. 381-92.
  172. Choudhury, J., K.G. Uttam, and M. Mukhopadhyay, *Spontaneous rupture of malarial spleen*. Indian Pediatr, 2008. **45**(4): p. 327-8.
  173. Huang, X., et al., *Differential Spleen Remodeling Associated with Different Levels of Parasite Virulence Controls Disease Outcome in Malaria Parasite Infections*. mSphere, 2016. **1**(1).
  174. Leoni, S., et al., *The hyper-reactive malarial splenomegaly: a systematic review of the literature*. Malar J, 2015. **14**: p. 185.
  175. Del Portillo, H.A., et al., *The role of the spleen in malaria*. Cell Microbiol, 2012. **14**(3): p. 343-55.
  176. Cox, F.E., *Concomitant infections, parasites and immune responses*. Parasitology, 2001. **122** Suppl: p. S23-38.
  177. Lacerda-Queiroz, N., et al., *Mechanism of splenic cell death and host mortality in a Plasmodium yoelii malaria model*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10438.

178. Stevenson, M.M., et al., *IL-12-induced protection against blood-stage Plasmodium chabaudi AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 1995. **155**(5): p. 2545-56.
179. May, J., et al., *Plasma interleukin-10: Tumor necrosis factor (TNF)-alpha ratio is associated with TNF promoter variants and predicts malarial complications*. J Infect Dis, 2000. **182**(5): p. 1570-3.
180. Perkins, D.J., J.B. Weinberg, and P.G. Kremsner, *Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 988-92.
181. Yap, G.S. and M.M. Stevenson, *Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in Plasmodium chabaudi AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon*. Infect Immun, 1994. **62**(2): p. 357-62.
182. Remels, A.H., et al., *TNF-alpha impairs regulation of muscle oxidative phenotype: implications for cachexia?* FASEB J, 2010. **24**(12): p. 5052-62.
183. Cannon, T., et al., *Comparison of animal models for head and neck cancer cachexia*. Laryngoscope, 2007. **117**(12): p. 2152-8.
184. Vogetseder, A., et al., *Time course of coagulation parameters, cytokines and adhesion molecules in Plasmodium falciparum malaria*. Trop Med Int Health, 2004. **9**(7): p. 767-73.
185. Prakash, D., et al., *Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India*. J Infect Dis, 2006. **194**(2): p. 198-207.
186. Ouma, C., et al., *Polymorphic variability in the interleukin (IL)-1beta promoter conditions susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-1beta production*. J Infect Dis, 2008. **198**(8): p. 1219-26.
187. Ocana-Morgner, C., M.M. Mota, and A. Rodriguez, *Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 143-51.
188. Chaiyaroj, S.C., et al., *Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria*. Acta Trop, 2004. **89**(3): p. 319-27.
189. Luty, A.J., et al., *Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 3909-15.
190. Mohan, K. and M.M. Stevenson, *Interleukin-12 corrects severe anemia during blood-stage Plasmodium chabaudi AS in susceptible A/J mice*. Exp Hematol, 1998. **26**(1): p. 45-52.
191. Bigildeev, A.E., et al., *Interleukin-1 beta enhances human multipotent mesenchymal stromal cell proliferative potential and their ability to maintain hematopoietic precursor cells*. Cytokine, 2015. **71**(2): p. 246-54.
192. Argiles, J.M., S. Busquets, and F.J. Lopez-Soriano, *Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia*. Eur J Pharmacol, 2011. **668 Suppl 1**: p. S81-6.
193. Jacobs, P., D. Radzioch, and M.M. Stevenson, *In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 44-9.
194. Bakir, H.Y., C. Tomiyama, and T. Abo, *Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines*. Biomed Res, 2011. **32**(3): p. 203-8.
195. Kurtzhals, J.A., et al., *Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria*. Lancet, 1998. **351**(9118): p. 1768-72.

196. Sanni, L.A., et al., *Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun*, 2004. **72**(5): p. 3054-8.
197. Li, C., I. Corraliza, and J. Langhorne, *A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice*. *Infect Immun*, 1999. **67**(9): p. 4435-42.
198. McDevitt, M.A., et al., *A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia*. *The Journal of experimental medicine*, 2006. **203**(5): p. 1185-96.
199. Sun, T., et al., *A Plasmodium-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. E2117-26.
200. Han, C., et al., *Plasma concentration of malaria parasite-derived macrophage migration inhibitory factor in uncomplicated malaria patients correlates with parasitemia and disease severity*. *Clin Vaccine Immunol*, 2010. **17**(10): p. 1524-32.