



Universidad Nacional Autónoma de México
Doctorado en Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina

Estudio de la interacción de la calreticulina de *Taenia solium* con el sistema
inmunológico del hámster durante la teniosis experimental

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Doctora en Ciencias
Presenta

M. en C. Fela Mendlovic Pasol

Tutora Dra. Ana Flisser Steinbruch
Facultad de Medicina, UNAM

Comité Tutorial

Dr. Leopoldo Flores Romo

Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional (CINVESTAV)

Dr. Jorge Morales-Montor

Instituto de Investigaciones
Biomédicas, UNAM

México, D. F. Diciembre de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADACIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi *Alma Mater* y abrirme las puertas al conocimiento.

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas por el apoyo académico otorgado durante el programa de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico a través el Proyecto 129683 con el que se financió este trabajo.

A la Dra. Ana Flisser por apoyarme y alentarme incondicionalmente, por ser un ejemplo a seguir, transmitirme su convicción, tenacidad y pasión por la ciencia y especialmente por brindarme su amistad.

Al Dr. Leopoldo Flores y al Dr. Jorge Morales-Montor por sus asesorías durante la realización de este doctorado.

A la M. en C. Mayra Cruz por su valiosa compañía, ayuda, apoyo en el trabajo y por su amistad tan especial. Gracias por contagiarme de ánimos y de actitud positiva.

Al Dr. Gilberto Vaughan por su amistad, asesoría e interesantes discusiones a lo largo de este trabajo.

A la Dra. Guillermina Ávila por su asesoría, ayuda en el laboratorio y amistad.

A la Dra. Dolores Correa por su larga amistad, invaluable consejos y horas de desvelo durante mi candidatura.

A Fany, Karla, María, José Alfredo, Laura, Brenda y Pablo por su apoyo y hacer del laboratorio un lugar divertido y donde se trabaja con gusto.

A la Dra. Laila Gutiérrez, a la Dra. Cecilia Ximénez, al Dr. Juan Pedro Laclette y al Dr. Jesús Yamamoto por la revisión y comentarios a esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Alicia y Samuel por su amor, confianza y apoyo inagotable, sé que cuento con ustedes siempre. Les agradezco el haberme inculcado el gusto y satisfacción por aprender y la determinación por ser siempre mejor.

A mis hermanos y a sus familias por su cariño especial, por estar a mi lado, escucharme y apoyarme.

A Salomón por compartir tu vida conmigo, por tu amor, confianza, apoyo, aguante y empuje. Gracias por enseñarme a ver la vida con optimismo y creer en mi.

A mis hijos Enrique, Daniel y Nathan por alegrarme cada día y hacer mi vida plena y divertida. Por enseñarme a sentir el amor incondicional y el orgullo de ser mamá.

...Gracias

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 <i>Taenia solium</i>	4
3.2 Teniosis/Cisticercosis	5
3.3 Respuesta inmune contra parásitos intestinales	6
3.4 Inmunomodulación por helmintos	7
3.5 Respuesta inmune durante la infección con <i>T. solium</i>	8
3.6 Calreticulina	9
3.7 Calreticulina de parásitos	10
3.8 Calreticulina de <i>T. solium</i>	12
3.9 Células dendríticas en la respuesta inmune a parásitos	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
General	14
Específicos.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Diseño experimental	15
6.2 Consideraciones Éticas	15
6.3 Infección por <i>T. solium</i>	15
6.4 Expresión y purificación de rTsCRT	16
6.5 Extracto crudo de tenia (TsCE) y productos de excreción/secreción (E/S).....	17
6.6 Electroforesis y Western blot de los productos E/S.....	18
6.7 Western blot e inmunohistoquímica con tejidos de hámster	18
6.8 Anticuerpos anti-rTsCRT	19
6.9 ELISA para detección de anticuerpos	19
6.10 Ensayos de proliferación celular específica.....	20
6.11 Aislamiento de RNA y cuantificación de citocinas mediante RT-PCR cuantitativa.....	20
6.12 Inmunohistoquímica para detección de células dendríticas	22
6.13 Análisis Estadístico	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Infección por <i>T. solium</i>	24
7.2 Titulación de anticuerpos anti-rTsCRT	24
7.3 Determinación de la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-rTsCRT con órganos de hámster.....	25
7.4 Presencia de TsCRT de E/S de las tenias cultivadas.....	26
7.5 Respuesta inmune humoral específica.....	26
7.6 Respuestas linfoproliferativas locales y sistémicas.....	27
7.7 Perfil de citocinas inducida durante la teniosis	29
7.8 Identificación de células dendríticas en intestino de hámster.....	31

8. DISCUSIÓN	33
9. CONCLUSIONES	39
10. ANEXOS	41
10.1 Artículos publicados	41
10.2 Capítulos de libro.....	41
10.3 Patente.....	42
11. REFERENCIAS	43

1. RESUMEN

Taenia solium causa dos enfermedades importantes en los seres humanos: neurocisticercosis y teniosis. El portador de la tenia es el principal factor de riesgo para la adquisición de neurocisticercosis, que es una de las enfermedades parasitarias más prevalentes del sistema nervioso central. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la inmunidad inducida por el parásito adulto. Los helmintos intestinales pueden promover respuestas Th2 reguladoras que les permite la supervivencia y reproducción en el hospedero, sin embargo, se han identificado pocas moléculas que inducen este tipo de respuesta. La calreticulina es una proteína ubicua y multifuncional que participa en la homeostasis celular de Ca^{2+} . En los últimos años ha surgido evidencia de su papel en la regulación de la respuesta inmune. En esta tesis se reporta la evaluación del impacto de la calreticulina recombinante de *T. solium* (rTsCRT) en la respuesta inmune celular y humoral, que incluye el perfil de citocinas inducida durante la teniosis experimental. Se infectaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) con cisticercos de *T. solium*. Los hámsteres se sacrificaron a diferentes días después de la infección y se analizaron muestras de suero para determinar la presencia de anticuerpos anti-TsCRT específicos. Asimismo se investigó la respuesta linfoproliferativa específica sistémica y local y se utilizó RT-PCR cuantitativo para examinar el perfil de citocinas inducidas por los antígenos del parásito. Además, se analizaron los productos de excreción/secreción (E/S) de tenias cultivadas *in vitro* para determinar la presencia de la TsCRT. Los resultados muestran que la TsCRT está presente en los productos E/S y genera una respuesta de IgG específica en un tercio de los hámsteres 30 días después de la infección. Los linfocitos de los nódulos linfáticos mesentéricos y de bazo de hámsteres infectados no proliferaron tras la estimulación *in vitro* con la rTsCRT. En cambio, la rTsCRT estimuló los niveles de expresión de IL-10 en células de estos órganos linfoides, tanto de hámsteres infectados, como no infectados. La estimulación con un extracto crudo de tenia resultó en la expresión de IL-4 e IL-5, pero no IL-10. Los resultados sugieren que la rTsCRT favorece una respuesta inmune tipo Th2 caracterizada por la inducción de IL-10 en los órganos linfoides de la mucosa intestinal y a nivel sistémico en el modelo del hámster dorado.

2. ABSTRACT

Taenia solium causes two diseases in humans, cysticercosis and taeniosis. Tapeworm carriers are the main risk factor for neurocysticercosis. Limited information is available about the immune response elicited by the adult parasite, particularly the induction of Th2 responses, frequently associated to helminth infections. Calreticulin is a ubiquitous, multifunctional protein involved in cellular calcium homeostasis, which has been suggested to play a role in the regulation of immune responses. In this PhD thesis, we assessed the effect of recombinant *T. solium* calreticulin (rTsCRT) on the cytokine, humoral and cellular responses upon experimental infection in Syrian Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Animals were infected with *T. solium* cysticerci and euthanized at different times after infection. Specific serum antibodies, proliferative responses in mesenteric lymph nodes (MLN) and spleen cells, as well as cytokines messenger RNA (mRNA) were analyzed. The results showed that one third of the infected animals elicited anti-rTsCRT IgG antibodies. MLN cells from infected animals did not proliferate upon *in vitro* stimulation with rTsCRT. Instead, stimulation with a tapeworm crude extract resulted in increased expression of IL-4 and IL-5 mRNA and rTsCRT increased the expression levels of IL-10 in spleen and MLN cells from uninfected and infected hamsters. Here we provide the first data on the cytokine, antibody and cellular responses to rTsCRT upon *in vitro* stimulation during taeniosis and demonstrate that rTsCRT favors a Th2-biased immune response characterized by the induction of IL-10 in mucosal and systemic lymphoid organs.

3. INTRODUCCIÓN

T. solium es un céstodo responsable de dos parasitosis en el ser humano, cisticercosis y teniosis. Ambas son enfermedades de importancia para la salud pública. La primera se denomina neurocisticercosis cuando el parásito, en su forma larvaria o cisticerco, se alberga en el sistema nervioso central. La segunda, es cuando la forma adulta o tenia se desarrolla en el intestino delgado causando teniosis, que aunque es una infección, generalmente es asintomática. Sin embargo, se ha demostrado que la presencia del portador de la tenia en el hogar es el principal factor de riesgo para adquirir neurocisticercosis, ya que el parásito adulto grávido puede producir miles de huevos infectivos que se desarrollan en cisticercos en el ser humano o cerdo, si no existen medidas de higiene adecuadas (Flisser et al., 2003; Sarti-Gutierrez et al., 1988). Debido a que el ser humano es el único hospedero definitivo de este estadio del parásito se desconocen muchos aspectos de la relación hospedero-parásito, por lo que es necesario recurrir a los modelos experimentales para estudiarla. En el laboratorio se ha utilizado el modelo del hámster dorado para determinar parámetros del desarrollo de *T. solium* como: localización en el intestino delgado, tamaño de las tenias y grado de desarrollo (inmaduras, maduras o pregrávidas) (Flisser et al., 2010; Maravilla et al., 1998). Se han identificado también algunos componentes de la respuesta inflamatoria intestinal y humoral. Por ejemplo, se demostró la presencia de distintas poblaciones celulares en el sitio de anclaje y las citocinas que se producen, así como la respuesta humoral en suero de animales infectados, que mostró IgG específica que reconoce productos de excreción/secreción (E/S) desde la primera semana post-infección hasta la expulsión de las tenias (Avila et al., 2002; Avila et al., 2008; Avila et al., 2003; Cruz-Rivera et al., 2014). Los componentes de los E/S responsables de interaccionar con componentes de la respuesta inmune del hospedero no se han identificado.

En infecciones por helmintos, la respuesta inmune responsable de la expulsión de los parásitos es principalmente tipo Th2, en la que están involucrados diversos tipos celulares tales como células cebadas, eosinófilos, linfocitos B y células caliciformes, así como anticuerpos específicos IgE, IgG1 y citocinas como IL-4, IL-5, IL-13 que

participan en la expulsión del parásito (Allen and Maizels, 2011). Sin embargo, los helmintos han evolucionado para regular la respuesta inmune del hospedero asegurando así su supervivencia y fertilidad. Esto lo hacen por medio de la activación de componentes inmuno-reguladores que evitan una inflamación exacerbada (McSorley et al., 2013; McSorley and Maizels, 2012). Las moléculas responsables de esta regulación son poco conocidas.

La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional y altamente conservada en células eucariontes excepto en levaduras. Entre sus funciones principales destacan la homeostasis de Ca^{++} intracelular y su papel como chaperona involucrada en el plegamiento correcto de glicoproteínas (Michalak et al., 1999). En parásitos se han identificado homólogos de la CRT como componente de los E/S que interactúan con el sistema inmune del hospedero (El Gengehi et al., 2000; Rathore et al., 2006; Rzepecka et al., 2009). La identificación de la CRT en los E/S de *T. solium* y el estudio de los procesos inmunorreguladores que induce podría proveer información útil, tanto para el control de la teniosis como para su uso como terapéutico en el tratamiento de otras enfermedades de etiología inflamatoria. Estas enfermedades han incrementado en los países desarrollados y ciudades más industrializadas en las últimas décadas (Bach, 2002). Se ha sugerido que uno de los factores que contribuye a este aumento es la falta de exposición a helmintos intestinales en personas con predisposición genética en estas regiones.

3.1 *Taenia solium*

El ciclo de vida de *T. solium* comprende al ser humano como hospedero definitivo de la tenia y al cerdo como hospedero intermediario del cisticerco. La tenia se aloja en el intestino delgado de los seres humanos después de la ingestión de cisticercos vivos presentes en la carne de cerdo contaminada indebidamente cocida. Una vez en el sistema digestivo, el escólex y cuello evaginan y los cisticercos se anclan a la mucosa intestinal por medio del rostelo y cuatro ventosas. A partir del cuello, se desarrolla el cuerpo de la tenia llamado estróbilo formado por segmentos repetidos llamados proglótidos que se encuentran en diferentes estados de maduración, cada uno

desarrolla un aparato reproductor hermafrodita y llegan a la gravidez 4-6 meses después de la infección produciendo miles de huevos que son liberados en las heces. El ciclo de vida se completa cuando los cerdos ingieren heces contaminadas con huevos de los portadores de la tenia y desarrollan cisticercosis que se alojan en músculo esquelético o sistema nervioso central. Además, los seres humanos, con malos hábitos higiénicos y en condiciones sanitarias deficientes, pueden desarrollar neurocisticercosis o cisticercosis muscular después de ingerir huevos (Flisser et al., 2004).

3.2 Teniosis/Cisticercosis

La neurocisticercosis es un problema de salud en muchos países subdesarrollados y una enfermedad emergente en los EE.UU. (Sorvillo et al., 2007). Estudios epidemiológicos han demostrado que la presencia del portador de la tenia en casa o en el ambiente cercano es el principal factor de riesgo para adquirir la neurocisticercosis (Sarti-Gutierrez et al., 1988). Estudios epidemiológicos demostraron que hay un agrupamiento de pacientes con cisticercosis alrededor de portadores de tenia, lo que demuestra la importancia de la transmisión de persona a persona (Sarti-Gutierrez et al., 1988). Otros factores de riesgo asociados a la cisticercosis son el consumo de carne infectada con cisticercos, ya que esto puede resultar en el desarrollo de teniosis. El papel del cerdo infectado es perpetuar el ciclo de vida de *T. solium* y la cisticercosis porcina se asocia con la libre deambulacion de cerdos y el fecalismo al ras del suelo. Otros factores de riesgo incluyen: malos hábitos higiénicos, estado socioeconómico, falta de infraestructura y deficiencias en la educación para la salud (Flisser et al., 2006).

Debido a que los seres humanos son los únicos hospederos definitivos de *T. solium* es necesario usar modelos experimentales para estudiar los mecanismos implicados en la respuesta inmune inducida durante la teniosis (Flisser et al., 2010). En el laboratorio se evaluaron diferentes roedores como modelos de teniosis. Sin embargo, en ninguno de los roedores estudiados fue posible obtener tenias grávidas ya que se expulsan aproximadamente las 8 semanas después de la infección. Se probaron diferentes

dosis de inmunosupresores que resultaron en la recuperación de un número mayor de tenias, tenias más largas con mayor grado de madurez y que permanecen más tiempo en el hospedero, lo que indica que componentes del sistema inmune participan en la expulsión del parásito. El hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) es el hospedero más susceptible, ya que permite el desarrollo de tenias maduras sin necesidad de inmunosupresión (Avila et al., 2002; Maravilla et al., 1998). A pesar de que este modelo no permite el desarrollo de tenias grávidas, es factible analizar los mecanismos inmunológicos en las primeras etapas de la infección y la identificación de moléculas que participan en eventos de regulación inmune temprana.

3.3 Respuesta inmune contra parásitos intestinales

La mayoría de los estudios sobre mecanismos inmunológicos durante las helmintiasis intestinales se ha realizado principalmente en nemátodos como *Heligmosomoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Necator americanus* y solamente existen pocos estudios en céstodos como *Taenia crassiceps* e *Hymenolepis diminuta* (Allen and Maizels, 2011). Aunque las poblaciones celulares y los mecanismos específicos responsables de la respuesta inmune pueden diferir dependiendo del parásito, en general las helmintiasis inducen respuestas Th2 caracterizadas por la activación de células caliciformes, células cebadas, basófilos, eosinófilos, así como de células linfoides innatas tipo 2 (ILC-2) y linfocitos Th2 que producen citocinas que incluyen las interleucinas (IL)-4, IL-5, IL-9, IL-10 y la IL-13, además de linfocitos B que secretan isotipos de anticuerpos IgG1, IgG4 e IgE (Allen and Maizels, 2011; Maizels et al., 2012). Estos componentes celulares y humorales se activan por la producción de alarminas IL-25, IL-33 y TSLP producidas por células epiteliales que inducen la producción de IL-4 y de IL-13 inicialmente por las ILC-2 y más adelante por los linfocitos Th2. La IL-4 e IL-13 activan los receptores de estas dos citocinas que comparten la cadena α del receptor de IL-4 (IL-4R α) que se acopla a la cadena γ común o a la cadena α del receptor de IL-13 respectivamente, promoviendo así la inmunidad tipo 2 y la subsecuente expulsión de los helmintos a través de la contracción de músculo liso y producción de moco. Por ejemplo, la IL-13 estimula la diferenciación de células

caliciformes en la mucosa intestinal e induce la producción de mucinas y Relm- β (resistin-like molecule, por sus siglas en inglés) que promueven la eliminación y tienen propiedades anti-helmínticas (Hasnain et al., 2013; Herbert et al., 2009). Además, la IL-4 y la IL-13 activan la hipercontractibilidad muscular para promover que los parásitos no se puedan mantener adheridos a la pared intestinal (Akiho et al., 2002) y la IL-9 activa células cebadas para secretar proteasas que rompen las uniones interepiteliales y permiten el flujo de líquidos que ayudan a la eliminación de los parásitos (McDermott et al., 2003). Este tipo de respuesta estimula también la producción de IL-5 que activa eosinófilos capaces de atacar a los parásitos mediante la liberación de proteasas y proteínas catiónicas citotóxicas para los parásitos (Makepeace et al., 2012).

3.4 Inmunomodulación por helmintos

En la mayoría de las helmintiasis, la respuesta inmune tipo Th2, que incluye la respuesta inmune innata y adaptativa, es responsable de la expulsión de los helmintos; sin embargo, como resultado de la co-evolución con los hospederos mamíferos, los helmintos han desarrollado mecanismos reguladores que resultan en infecciones crónicas prolongadas sin causar daño considerable al hospedero y que le permiten al parásito completar su ciclo de vida (Allen and Maizels, 2011). Este tipo de respuesta conocida como “respuesta Th2 modificada” está caracterizada por la presencia de mecanismos reguladores que incluyen la presencia macrófagos activados alternativamente y células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) tolerogénicas, así como de linfocitos T reguladores (T regs), Tr1 y Th3 y de linfocitos B reguladores productores de IL-10 (B regs). Algunas de estas células a su vez están involucradas en la reparación del daño tisular, se ha demostrado una asociación entre la respuesta inmune tipo 2 y los procesos de cicatrización (Chen et al., 2012). La presencia de citocinas reguladoras tales como la IL-10 y la TGF- β que controlan la inmunopatología que resulta de procesos inflamatorios descontrolados, también ha sido documentada en helmintiasis tanto en modelos experimentales como en humanos (McSorley et al., 2013; McSorley and Maizels, 2012). Se ha demostrado que componentes de E/S son capaces de inducir el fenotipo Th2 regulador, aunque es escasa la información que

existe y además, se conoce poco acerca de la naturaleza de los productos y los receptores involucrados. En nemátodos y tremátodos se han identificado algunas proteínas en los E/S capaces de interactuar con el sistema inmunológico (Hewitson et al., 2009). Algunos ejemplos incluyen una glicoproteína que contiene fosforilcolina llamada ES-62 de *Ancanthocheilonema vitae*, una filaria murina, que tiene propiedades inmunomoduladoras (Harnett and Harnett, 2010) y las cistatinas de nemátodos y tremátodos que son inhibidores de proteasas con potencial inmunorregulador (Danilowicz-Luebert et al., 2013; Jang et al., 2011). Sin embargo, solamente con algunas excepciones, la mayoría de los estudios se han realizado en nemátodos y, aunque las infecciones por helmintos inducen generalmente respuestas inmunes tipo 2, los mecanismos específicos pueden diferir entre las especies de helmintos. En céstodos existen algunos reportes en *Taenia crassiceps*, ténido que se utiliza como modelo experimental murino de cisticercosis, en los que se ha demostrado la capacidad de los E/S de suprimir respuestas T *in vitro* (Spolski et al., 2000). En *Hymenolepis diminuta* los productos E/S inhiben la activación de macrófagos y disminuyen la inmunopatología en un modelo de colitis murina (Johnston et al., 2010).

3.5 Respuesta inmune durante la infección con *T. solium*

En el laboratorio se ha utilizado el modelo experimental del hámster dorado para analizar algunos parámetros del desarrollo de *T. solium* como: localización en el intestino delgado, tamaño de las tenias y grado de desarrollo (Maravilla et al., 1998) y ha sido posible identificar algunos componentes de la respuesta inflamatoria intestinal y humoral. En el sitio de anclaje de la tenia aumentan células caliciformes y plasmáticas y en menor grado eosinófilos y linfocitos (Avila et al., 2002); aún no se han identificado DC, que son las encargadas de la presentación antigénica y las que determinan el tipo de respuesta que se desencadena ante un estímulo. Se detectó también un perfil mixto de citocinas tipo Th1 y Th2 en el sitio de anclaje de las tenias en las primeras semanas post-infección, que se convierte en una respuesta predominantemente Th2 en las etapas posteriores (Avila et al., 2008; Cruz-Rivera et al., 2014). En etapas tempranas se observa la expresión de IFN- γ e IL-4, la primera

disminuye en días posteriores mientras que hay un aumento de IL-5 hacia los 16 días post infección en la mucosa intestinal (Avila et al., 2008). Asimismo, hay una disminución en la expresión de IL-12p40 (Cruz-Rivera et al., 2014), lo que sugiere una respuesta mixta Th1/Th2 que se polariza hacia una respuesta predominantemente Th2 como en otras helmintiasis (Ilic et al., 2011; Reyes et al., 2010). Además, se ha demostrado que la presencia de la tenia en el intestino resulta en la detección de antígenos circulantes en el suero de hámsteres infectados, que no están presentes cuando los animales se mantienen inmunodeprimidos durante la infección experimental, lo que sugiere que los parásitos son capaces de inducir una respuesta inmune y secretar antígenos que llegan a la circulación debido a la inflamación local y generan una respuesta humoral tipo IgG en el suero de animales infectados que reconoce los productos de E/S, aunque como se mencionó anteriormente, estos E/S no han sido identificados (Avila et al., 2003; Monroy-Ostria et al., 1993).

3.6 Calreticulina

La CRT fue inicialmente descrita en el lumen del retículo endoplásmico y su principal función es la regulación de la homeostasis de Ca^{++} que tiene influencia sobre diversos procesos celulares y además funciona como chaperona con actividad de lectina involucrada en el plegamiento correcto de glicoproteínas (Michalak et al., 2009). La CRT es una proteína multifuncional ubicua y altamente conservada. Estas características denotan su importancia fundamental en los sistemas biológicos. Se ha identificado en todas las células eucariontes, excepto levaduras y no se expresa en bacterias. A lo largo de la escala filogenética tiene una estructura secundaria similar que consta de tres dominios: en el extremo N-terminal se encuentra el dominio N, seguido por el dominio P, llamado así por ser rico en prolinas y finalmente el dominio C en la región C-terminal (Gold et al., 2010; Michalak et al., 1999). El dominio N de la CRT es globular, posee cisteínas involucradas en mantener la estructura terciaria de la proteína y contribuye a la función de chaperona. El dominio P es muy flexible y también actúa en la función de chaperona, además posee dos conjuntos de tres repeticiones de aminoácidos conservados involucrados en la unión a Ca^{++} de alta

afinidad. El dominio C está compuesto por aminoácidos ácidos y une Ca^{++} con alta capacidad y baja afinidad y por lo tanto es responsable de la capacidad amortiguadora de Ca^{++} del retículo endoplásmico. Los dominios N y P están muy conservados entre especies, mientras que el dominio C es más polimórfico. Aparentemente la presión selectiva es mayor en los primeros dos dominios posiblemente asociada a su importancia estructural y funcional (Wang et al., 2012).

Además de su localización en el retículo endoplásmico, la CRT de mamíferos se ha identificado en la superficie, en el citoplasma y núcleo de varios tipos celulares. Entre algunas de las funciones que cumple la CRT fuera del retículo endoplásmico, destacan la capacidad de potenciar la reparación tisular, la activación de la muerte inmunogénica, adhesión celular y expresión génica (Wang et al., 2012). La CRT de humano y ratón puede activar al sistema inmune y se han utilizado como adyuvante molecular para inducir respuestas inmunes contra células tumorales, ya que la CRT facilita la interacción con células dendríticas (Bajor et al., 2011). En contraste, otras funciones están ligadas a la regulación del sistema inmune. Por ejemplo, la CRT facilita la eliminación temprana de cuerpos apoptóticos y evita respuestas inflamatorias (Gardai et al., 2005), en el caso de la muerte inmunogénica, funciona como señal para la fagocitosis de células que han sido tratadas con algunos agentes quimioterapéuticos ayudando a la eliminación de células tumorales (Panaretakis et al., 2009). Asimismo, la CRT potencia la reparación tisular que está ligada a las respuestas Th2 (Allen and Wynn, 2011).

3.7 Calreticulina de parásitos

Se han descrito homólogos de CRT en parásitos, así como en sus productos de E/S, lo que indica su importancia en la relación hospedero-parásito ya que se ha demostrado que esta proteína es capaz de interactuar con el sistema inmune del hospedero (Cabezón et al., 2008; Guillou et al., 2007; Suchitra and Joshi, 2005). Un ejemplo de esto es la presencia de anticuerpos anti-CRT en pacientes con esquistosomosis y oncocercosis (Mutapi et al., 2011; Rokeach et al., 1994). Además, es un potente estimulador de linfocitos B y T, capaz de inducir la producción de IL-4

(El Gengehi et al., 2000). Asimismo, existe evidencia de que la CRT de parásitos regula la respuesta inmune del hospedero. Por ejemplo, la CRT de *Necator americanus*, *Haemonchus contortus* y *Brugia malayi* interactúa con el componente C1q del complemento y esta interacción le permite al parásito interferir con la etapa inicial de la activación del complemento del hospedero, lo que podría ser útil en su establecimiento (Kasper et al., 2001; Yadav et al., 2014). Asimismo, se ha demostrado que la CRT de *H. contortus* se une a la proteína C reactiva (CRP) del hospedero. La CRP daña el tegumento de helmintos como *H. diminuta* y *H. contortus*, por lo que la unión de CRT de *H. contortus* a la CRP del hospedero podría ser beneficiosa para el parásito contra el efecto lítico de la CRP, lo que implica una estrategia de supervivencia del parásito (Suchitra et al., 2008). En infecciones por *Heligmosomoides polygyrus*, la CRT del parásito es reconocida por anticuerpos IgG1 e IgE y estimula la degranulación de una línea celular de basófilos sensibilizados con estos anticuerpos (Rzepecka et al., 2006). En un análisis proteómico se demostró que la CRT se sobreexpresa en infecciones intestinales crónicas en ratones susceptibles en comparación con cepas de ratón que expulsan tempranamente al parásito (Morgan et al., 2006; Rzepecka et al., 2006). La CRT de *H. polygyrus*, además de ser secretada, se une a DC por medio del receptor carroñero A e induce la producción de IL-4 e IL-10 en linfocitos CD4⁺ de ratones infectados, lo que destaca la capacidad de la CRT de inducir respuestas inmunes Th2 (Rzepecka et al. 2009).

Cuadro 1. Interacción de la CRT de parásitos con el sistema inmune

Parásito	Interacción con el sistema inmune	Referencias
<i>Schistosoma mansoni</i> <i>Haemonchus contortus</i>	Presencia en productos de excreción/secreción	Guillou et al, 2007 Suchitra et al, 2005
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Sobre-expresión en parásitos de hospederos más susceptibles	Morgan et al, 2006
<i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Haemonchus contortus</i> <i>Necator americanus</i>	Inhibición de la cascada del complemento (interacción con C1q)	Ferreira et al, 2004 Suchitra et al, 2005 Kasper et al, 2001
<i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Onchocerca volvulus</i>	Inducción de anticuerpos anti-CRT	Marcelain et al, 2004 El Aswad et al, 2010 Rokeach et al, 1994
<i>Schistosoma mansoni</i> <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Inducción de IL-4 e IL-10 en CD4+	El Gengehi et al, 2000 Rzepecka et al, 2009
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Unión al receptor carroñero A (SR-A) en células dendríticas	Rzepecka et al, 2009

3.8 Calreticulina de *T. solium*

En nuestro laboratorio se aisló y caracterizó la calreticulina de *T. solium* (TsCRT) y se expresó en un sistema de *Escherichia coli* como proteína recombinante funcional (rTsCRT) capaz de unir Ca^{++} *in vitro* (Mendlovic et al., 2004). Mediante inmunohistoquímica, usando anticuerpos policlonales anti-rTsCRT, se demostró que en el cisticerco y en la tenia se localiza preferencialmente en el músculo de las ventosas y el rostelo, además de células tegumentarias. Asimismo, la TsCRT se expresa de manera diferencial durante la gametogénesis y la embriogénesis; si comparamos su expresión en la tenia y en el cisticerco a nivel de proteína, ésta es mayor en la tenia (Mendlovic et al., 2006). Recientemente se comprobó que la rTsCRT administrada oralmente con toxina colérica como adyuvante previene el establecimiento del parásito adulto en un 34% en el modelo experimental de teniosis en hámsteres (Leon-Cabrera et al., 2009). Además, la inmunización oral de ratones con rTsCRT y tóxina colérica como adyuvante induce IL-4 e IL-5, lo que sugiere que al igual que otras CRT, es capaz de inducir una respuesta Th2 (Fonseca-Coronado et al.,

2011). Sin embargo, la respuesta inmune a la rTsCRT durante la teniosis experimental no se ha estudiada. Esta proteína multifuncional representa un candidato interesante para tratar de identificarla en los productos de excreción/secreción de *T. solium*, así como analizar su papel en la interacción con el hospedero durante la teniosis experimental.

3.9 Células dendríticas en la respuesta inmune a parásitos

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno más eficientes, son esenciales para el inicio de la respuesta inmune y forman un eslabón entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. A pesar de que no se conocen todos los mecanismos que inducen las respuestas Th2, se sabe que las DC juegan un papel crucial en el inicio de este tipo de respuesta (Mendlovic and Flisser, 2010; Pulendran et al., 2010). Esto se ejemplifica en estudios en donde se demuestra que la ausencia de DC durante infecciones con *Schistosoma mansoni* y *H. polygyrus* interfiere con la inducción de la respuesta Th2 (Phythian-Adams et al., 2010; Smith et al., 2012). A lo largo del intestino delgado y grueso las DC están presentes en placas de Peyer, NLM, lamina propia y folículos linfoides aislados y se pueden identificar distintas subpoblaciones con características funcionales distintas que expresan marcadores de superficie diferentes (Coombes and Powrie, 2008; Iwasaki, 2007). Por ejemplo, en las placas de Peyer, las DC que se encuentran abajo del epitelio son principalmente DC inmaduras que expresan bajas cantidades de moléculas MHC II y coestimuladoras. Estas DC son altamente fagocíticas y expresan en su superficie receptores de reconocimiento de patrones incluyendo receptores Scavenger tipo A (SR-A) (Granucci et al., 2001). Las DC inmaduras están asociadas a la inducción de respuestas reguladoras. Además, muchas subpoblaciones de DC intestinales poseen la capacidad de inducir respuestas Th2 y reguladoras (Coombes and Powrie, 2008; Iwasaki, 2007). Existen pocas publicaciones que describen la interacción de helmintos con las DC intestinales. Por lo que resulta interesante estudiar la interacción de la TsCRT secretada por las tenias con las DC en la zona de anclaje en la mucosa intestinal.

4. HIPÓTESIS

La TsCRT es un componente de los productos de excreción/secreción de la tenia y activa al sistema inmunológico del hospedero generando una respuesta inmune que favorece un perfil Th2 durante la teniosis experimental.

5. OBJETIVOS

General

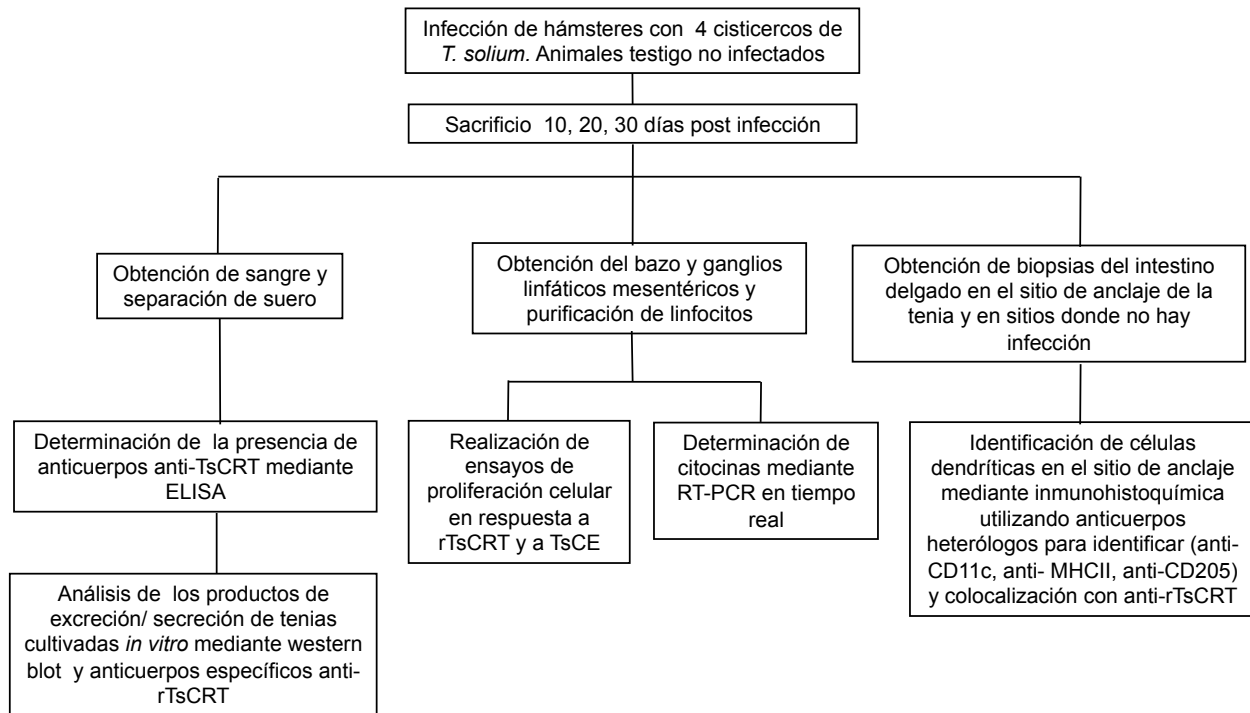
Demostrar si la TsCRT induce una respuesta inmune tipo Th2 durante la teniosis experimental en el hámster dorado.

Específicos

1. Identificar la TsCRT en los productos E/S de tenias cultivadas *in vitro*.
2. Determinar la presencia de anticuerpos anti-TsCRT en sueros de animales infectados con *T. solium*.
3. Analizar si la rTsCRT induce la proliferación de linfocitos en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) obtenidos de hámsteres con teniosis experimental.
4. Analizar la respuesta de citocinas inducidas en linfocitos en bazo y NLM en respuesta a la rTsCRT.
5. Identificar la TsCRT en células dendríticas en el sitio de anclaje de la tenia en la mucosa intestinal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental



6.2 Consideraciones Éticas

Las comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de México (UNAM), de conformidad con las Normas Oficiales Mexicanas (NOM-062-ZOO-1999) aprobaron todos los procedimientos con animales y el protocolo experimental (números de aprobación de experimentos de respuesta inmune: 004-2010 y de RT-PCR cuantitativa: 020-2011).

6.3 Infección por *T. solium*

Se emplearon hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras de 6 meses de edad. Los animales se mantuvieron en el bioterio bajo condiciones convencionales de 12:12h luz/oscuridad, se les proporcionó agua y alimento estériles *ad libitum* y dos semanas antes de la infección se desparasitaron por vía oral con 30 mg/kg de

albendazol (Sanfer) durante tres días además de una dosis única de 30 mg/kg de praziquantel (Merck). Se realizaron dos experimentos y en cada experimento se infectaron 20 hámsteres por vía oral con 4 cisticercos de *T. solium* obtenidos del músculo esquelético de un cerdo infectado naturalmente. Adicionalmente, 5 animales se dejaron sin infectar como grupo control. Para determinar la viabilidad de los cisticercos, se utilizó la prueba de evaginación *in vitro*. Se colocaron 10 cisticercos en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) adicionado con bilis porcina al 25%. Después de 2h de incubación se contó el número de cisticercos evaginados, se observó su motilidad macroscópicamente y se calculó en porcentaje de evaginación. Para las infecciones solamente se utilizaron cisticercos con porcentajes de evaginación del 98 a 100%. Todos los hámsteres en cada experimento se infectaron en el día 1 y se sacrificaron a los 10, 20 o 30 días post infección (DPI) por inhalación de sevoflurano (Svofast, Baxter Int., Deerfield, IL). Se obtuvieron los intestinos delgados, se abrieron longitudinalmente y las tenias obtenidas se contaron y midieron para determinar el porcentaje de infección y su longitud. Las células de los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y del bazo se colectaron para los ensayos de proliferación de linfocitos y la determinación de citocinas, mientras que la sangre se utilizó para la obtención de suero para los ELISAs, que se guardó a -20°C hasta su uso. Además se tomaron biopsias del sitio de anclaje de las tenias o del sitio equivalente en los animales del grupo control, se incluyeron en medio de inclusión Tissue-Tek y se congelaron a -70°C para los ensayos de inmunohistoquímica.

6.4 Expresión y purificación de rTsCRT

Se transformaron bacterias *Escherichia coli* BL21 con el plásmido pET-TsCRT que codifica para la rTsCRT madura sin la secuencia que codifica para el péptido señal (siguiendo la técnica de Mendlovic et al, 2004) y se indujeron con 0.75mM isopropil β -D-1-tiogalactopranosido (IPTG) para expresar la proteína. Los cultivos bacterianos que expresaron rTsCRT se trataron con buffer Tris-20% de sacarosa, se centrifugaron y se sonicaron 3 veces utilizando un sonicador Omni Ruptor 250 (Omni International Inc., Kennesaw, GA). El sonicado se sometió a geles preparativos de SDS-PAGE al 10%

que se tiñeron negativamente con Zn-imidazol, se cortó la banda de 53kDa y se electroeluyó utilizando un electroelutor (BioRad 422, Hercules, CA). El LPS residual se eliminó usando columnas de eliminación de endotoxinas Detoxi-Gel (Pierce Scientific, Thermo Fisher, Waltham, MA) las cuales se midieron utilizando un kit de determinación de endotoxinas (Pierce Scientific, Thermo Fisher, Waltham, MA) según las instrucciones del proveedor. La rTsCRT purificada se filtró usando un filtro de 0.2µm y se mantuvo a -70°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó utilizando el ensayo de proteínas de BioRad (BioRad, Hercules, CA), basado en el método descrito por Bradford (1976). Se usó albumina sérica bovina (BSA) en PBS como estándar y las muestras se leyeron a una OD 595 usando un espectrofotómetro.

6.5 Extracto crudo de tenia (TsCE) y productos de excreción/secreción (E/S)

Para la obtención de tenias para cultivo y sus productos E/S, un grupo de 10 hámsteres se inmunosuprimieron con 2 mg de metilprednisolona (Depo-Medrol, Pfizer, México) en el día 1, antes de infectarlos con 8 cisticercos y a los 14 y 28 DPI. La inmunosupresión de los hámsteres es necesaria para poder obtener un mayor número de tenias, más largas y con mayor grado de desarrollo (Maravilla et al., 1998). Las necropsias se realizaron a los 35 DPI y las tenias se lavaron 5 veces con buffer de fosfatos salina (PBS) estéril y se incubaron con RPMI estéril suplementado con antibióticos (Gibco, Grand Island, NY) durante 24 horas a 37°C. Para obtener los productos E/S, se colectó el medio de cultivo, se centrifugó a 3300xg durante 15 min y se concentró 100 veces utilizando un concentrador Millipore (Millipore Corp, Bedford, MA) con un poro de 10 kDa. Para la preparación de TsCE, las tenias se recuperaron, se lavaron con PBS y se homogeneizaron en un buffer de fosfatos 6.7 mM, 0.4 mM KCl y 1 mM MgCl₂, pH 7,4 usando un homogenizador (Power-Gen125, Fisher Scientific, Reino Unido). El homogenado se sonicó 3 veces (Omni International Inc., Kennesaw, GA), se centrifugó a 12000xg durante 30 minutos para eliminar cualquier material particulado y se filtró utilizando una membrana de 0.2 µm. Todas las soluciones de trabajo contenían inhibidores de proteasas Complete (Roche, Indianapolis, IN). La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de

Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) y las alícuotas de E/S y TsCE se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

6.6 Electroforesis y Western blot de los productos E/S

Para evaluar si la TsCRT es un producto E/S, 25µg del sobrenadante del medio de cultivo de las tenias se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 12% (PAGE, Laemmli, 1970). Se utilizó el sistema de Protean II (BioRad, Hercules, CA) con separadores de 0.75mm. Los geles se corrieron a 15mA/gel durante 1h aproximadamente y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (BioRad, Hercules, CA) o se incubaron en buffer de transferencia durante 5min para transferirlos a las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando la técnica de electrotransferencia descrita por Towbin y colaboradores (1979). La transferencia se realizó a temperatura ambiente, aplicando una corriente de 1 Amp durante 1h. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS-Tween 20 al 0.2% (PBS-T). Las diluciones de los sueros policlonales murinos anti-rTsCRT se prepararon con este mismo buffer y se incubaron con las membranas durante 1h a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados con PBS-T de 5 min cada uno antes de las incubaciones con el primer y segundo anticuerpo y previo a la adición del sustrato. Se utilizaron los sueros anti-rTsCRT de ratón o sueros control como primer anticuerpo a una dilución 1:5000. Se utilizó IgG de cabra anti-ratón marcado con HRP como anticuerpo secundario (Zymed, CA). El revelado se llevó a cabo en presencia de 3,3'-diaminobenzidina.

6.7 Western blot e inmunohistoquímica con tejidos de hámster

Con el propósito de descartar reacciones cruzadas de los anticuerpos anti-TsCRT con el tejido del hospedero se obtuvieron biopsias de tejidos de hámster (intestino, músculo, corazón e hígado), se lavaron con PBS y congelaron a -70°C. Los tejidos se homogenizaron en buffer de fosfatos 6.7mM adicionado con 0.04M KCl y 1mM MgCl₂, se agregaron inhibidores de proteasas Complete (Roche, Indianapolis, IN) y se centrifugaron a 1000xg durante 15min. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

Las proteínas se separaron por electroforesis (PAGE) en geles de SDS-poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970) utilizando el sistema de Protean II System (BioRad, Hercules, CA) y se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (BioRad, Hercules, CA) o se incubaron en buffer de transferencia durante 5' para transferirlos a las membranas de PVDF como se describió para los productos E/S.

6.8 Anticuerpos anti-rTsCRT

Se utilizaron anticuerpos anti-rTsCRT de ratón que se obtuvieron inmunizando ratones BALB/c con 25µg de rTsCRT junto con hidróxido de aluminio al 10% en 3 ocasiones con 14 días de diferencia. Los ratones se sangraron del corazón previa sedación, justo antes de la eutanasia acorde con la Norma Oficial Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Norma, 1999), se obtuvo el suero y se titularon los anticuerpos específicos mediante un ELISA indirecto utilizando rTsCRT como antígeno (Mendlovic et al, 2004).

6.9 ELISA para detección de anticuerpos

Las muestras de suero se analizaron por ELISA indirecto para la detección específica de anticuerpos IgG específicos para la rTsCRT y para el TsCE. Se incubaron 100µl de rTsCRT a una concentración de 5µg/ml en buffer de carbonatos pH 9.6 a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.05% y se bloquearon 1h con Blocking reagent (Roche, Indianápolis, IN). Los sueros de hámsteres controles o infectados que fueron obtenidos a diferentes DPI (1:400 para anti-rTsCRT y 1:800 para anti TsCE) se incubaron durante 2h a 37°C. Se utilizó un conjugado anti-IgG de hámster acoplado a biotina (eBioscience, San Diego, CA) a una dilución de 1.35µg/ml en PBS-BSA al 1% y 100µl/pozo estreptavidina-HRP y ABTS (Invitrogen, Carlsbad, CA) respectivamente. Todas las incubaciones fueron seguidas por tres lavados con PBS Tween 20 al 0.05%. Se midió la absorbancia a 405 nm. El valor de corte se definió como la media de la densidad óptica obtenida con el suero de animales no infectados más dos desviaciones estándar.

6.10 Ensayos de proliferación celular específica

Se obtuvieron las células de bazo y NLM a los 10, 20 y 30 DPI de hámsteres del grupo control y los grupos infectados experimentalmente. Los órganos se colocaron en RPMI suplementado con 2mM de L-glutamina, 1% de penicilina y estreptomicina. El tejido se maceró, se filtró a través de una malla de nylon de 70mm (BD Biosciences, San José, CA) y la suspensión celular resultante se concentró por centrifugación a 380xg a 4°C. Se realizaron 3 lavados por centrifugación con RPMI (Gibco, Grand Island, NY) y finalmente las células se resuspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado con 20% de suero fetal y se contaron en un hemocitómetro, analizando la viabilidad por exclusión de azul de tripano. En el caso del bazo, los eritrocitos presentes se lisaron utilizando una solución 0.15mM de cloruro de amonio antes de los lavados con RPMI con antibióticos. Las células se ajustaron a 2×10^5 células/pozo en 100µl de RPMI suplementado con 20% suero fetal y se sembraron por triplicado en placas de 96 pozos de fondo plano (Nalgen Nunc Int., Rochester, NY) en presencia de medio solo, 10 µg/ml de rTsCRT, 25 µg/ml TsCE, como control positivo específico o 2 µg/ml de concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) como control positivo. Las placas se incubaron 5 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Ocho horas antes de la cosecha, se añadió 1mCi por pozo de ³H timidina (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y la marca radiactiva se midió usando un recolector y contador de células (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer).

6.11 Aislamiento de RNA y cuantificación de citocinas mediante RT-PCR cuantitativa

Las células de bazo y NLM se aislaron y se estimularon como se describió en la sección anterior. La cantidad de célula se ajustó a 3×10^5 células/pozo en 100µl de RPMI suplementado con 20% suero fetal y se sembraron por triplicado en placas de 96 pozos de fondo plano (Nalgen Nunc Int., Rochester, NY) en presencia de medio solo, 10µg/ml de rTsCRT, 25µg/ml TsCE o 2µg/ml de concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) como control positivo. Las placas se incubaron 5 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Se aisló el RNA usando el reactivo Trizol (Invitrogen,

Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó a 260 nm utilizando un espectrofotómetro GeneQuant (BioRad, Hercules, CA). Las muestras de RNA se trataron con DNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó cDNA a partir de 1.2 µg de RNA mediante transcripción reversa usando Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras de cDNA se mantuvieron a -20°C hasta su uso. Los primers para la β-actina, IL-4 e IL-5 se diseñaron por TibMolbiol LLC (Adelphia, NJ) y los de IL-10 se sintetizaron de acuerdo a Espitia et al. (2010). Las secuencias de nucleótidos, los valores de T_m, las dimensiones de los amplificadores y los números de acceso de Genebank se muestran en el Cuadro 2. Para cada combinación de primers, se estandarizaron las concentraciones óptimas de los mismos, así como la concentración óptima de MgCl₂ y las temperaturas de alineamiento. La amplificación del cDNA se realizó utilizando el instrumento LightCycler 2.0 (Roche, Indianápolis IN). La mezcla de reacción consistió de 1µl cDNA, 3mM MgCl₂, 0.5µM de cada primer y 1µl de LightCycler FastStart DNA Master SYBR I Green (Roche, Indianápolis IN) en un volumen final de 10µl. Para el control sin templado, se añadió agua a la reacción en lugar de cDNA. Las condiciones de los ciclos de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos constituidos cada uno por desnaturalización a 95°C durante 10 s, hibridación a 60°C durante 5 s y extensión a 72°C durante 9s. La fluorescencia se detectó después de cada fase de extensión. Después de la amplificación se realizó una curva de disociación para corroborar la formación de un solo amplificado. La eficiencia de la PCR se determinó para cada par de primers a partir de la pendiente de una curva estándar construida mediante diluciones seriadas del cDNA utilizando el software LightCycler. Los cálculos de la cuantificación relativa se realizaron con el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Las células sin estimular se utilizaron como controles en todos los experimentos y el gen de β-actina como gen constitutivo.

Cuadro 2. Primers utilizados para los experimentos de RT-PCR cuantitativo

Citocinas	Secuencias de los iniciadores	Tm (°C)	Acceso en GenBank
β-Actin F	5' TGTACCCAGGCATTGCTGAC 3'	58.2	AF047041
β-Actin R	5' TCATCGTACTCCTGCTTGCTGA 3'	58.5	
IL-4 F	5' CTTCTAGCATGTACCGGGAAGT 3'	58.8	AF04621
IL-4 R	5' CTTCAAGCACAGGGTCACCTC 3'	58.8	
IL-5 F	5' GCCGTAGCCATGGAGATC 3'	54.6	JQ290352
IL-5 R	5' CGATGCACAGCTGGTGGTGAT 3'	55.4	
IL-10 F	5' GGTTGCCAAACCTTATCAGAAATG 3'	54.0	AF046210
IL-10 R	5' TTCACCTGTTCCACAGCCTTG 3'	54.4	

Tm: Melting temperature

6.12 Inmunohistoquímica para detección de células dendríticas

A pesar de que no se cuenta con anticuerpos específicos para la identificación de DC (anti-CD11c, anti-MHC II y anti-CD 205) en el modelo del hámster dorado, en este trabajo se propone probar anticuerpos heterólogos, dado el alto grado de homología de estos marcadores entre las especies. Los ensayos de inmunohistoquímica se realizaron utilizando cortes de tejido incluidos en Tissue Tek (Sakura Finetek Labware, Holanda). Se realizaron cortes de 4µm en laminillas con poli-L-lisina (Sigma). Los cortes se realizaron en un criostato (Leica) y se fijaron en acetona a -20°C durante 10min, después se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min a temperatura ambiente para bloquear las peroxidasas endógenas. Para prevenir el pegado inespecífico, los cortes se bloquearon con Power Block Universal Blocking Reagent (Biogenex) durante 10 min. La detección de los marcadores de DC se llevó a cabo utilizando el método de biotina-estreptavidina acoplada a peroxidasa (Invitrogen,

Carlsbad CA). Se utilizaron diferentes marcadores de DC de ratón, humano y de caballo. Se determinaron las concentraciones de anticuerpos y sueros control y las diluciones se realizaron en diluyente de anticuerpos (Dako, Dinamarca) durante 12h a 4°C. Se realizó una incubación con el segundo anticuerpo biotinilado y estreptavidina-HRP durante 10min. Todas las incubaciones se terminaron realizando lavados con PBS-Tween 20 al 0.5%. La detección se realizó con 3-3-diaminobenzidina (Dako, dinamarca). Se hizo una contra-tinción con hematoxilina (Sigma) y se tomaron micrografías en un microscopio Olympus BX-41 y cámara AX70.

6.13 Análisis Estadístico

Los datos se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con la post prueba de Dunn para datos no paramétricos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. El análisis estadístico se llevo a cabo utilizando el software Prism 5.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA).

7. RESULTADOS

7.1 Infección por *T. solium*

Los hámsteres se infectaron cada uno con 4 cisticercos obtenidos de un cerdo con infección natural por vía oral. Se realizaron dos infecciones, cada una con cisticercos de un cerdo diferente. El número de tenias de ambas infecciones que se recuperaron a los 10, 20, y 30 DPI se muestra en la figura 1A, el número de parásitos tendió a disminuir a los 20 y 30 DPI con respecto a los 10 DPI, sin embargo no alcanzó significancia estadística. Mientras que el promedio de la longitud de los parásitos que no son expulsados aumenta con el tiempo de infección (Figura 1B).

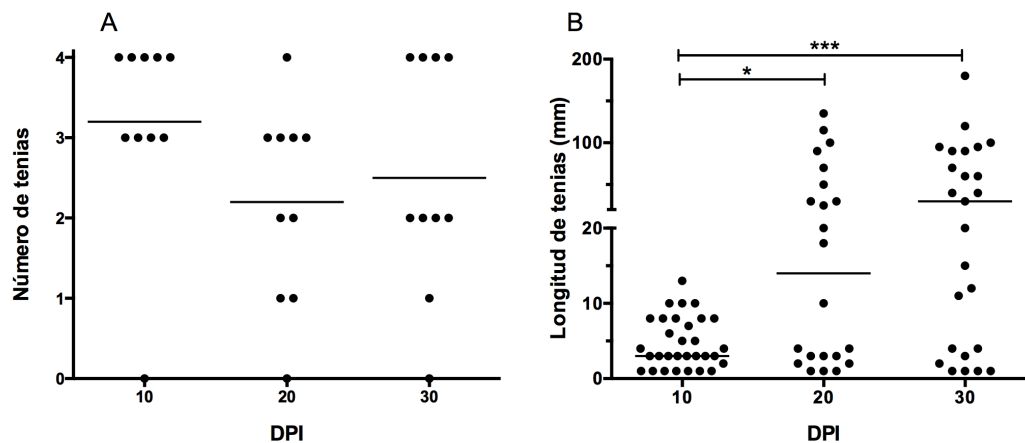


Figura 1. Características de la infección y longitud de tenias recuperadas de hámsteres infectados. A) Número de tenias recuperadas de hámsteres en diferentes días post infección (DPI). B) Longitud de las tenias recuperadas a los diferentes DPI, las barras horizontales muestran los valores promedio. Los valores son estadísticamente significativos comparados con 10 dpi: ** $p < 0.01$.

7.2 Titulación de anticuerpos anti-rTsCRT

Se realizó un ELISA con rTsCRT purificada para determinar la dilución óptima del suero hiper-inmune específico anti-rTsCRT (Figura 2). La dilución 1:10,000 se utilizó para realizar el Western blot para la identificación de la TsCRT nativa en los productos de E/S.

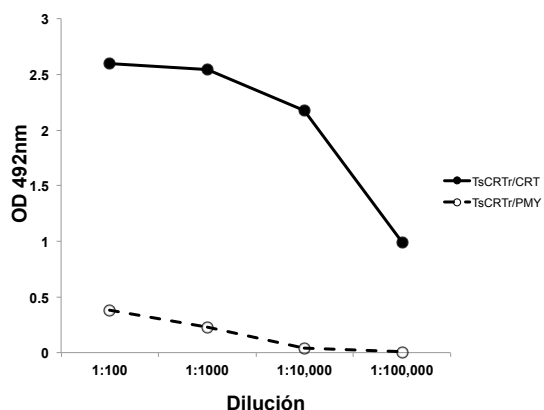


Figura 2. Titulación del suero hiperinmune anti rTsCRT de ratón. Se realizó un ELISA con rTsCRT y diferentes diluciones del suero obtenido de ratones inmunizados. Como suero control se utilizó un suero anti-paramiosina de *T. solium* para descartar reacciones cruzadas.

7.3 Determinación de la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-rTsCRT con órganos de hámster

Para corroborar la especificidad del suero anti-rTsCRT se utilizaron extractos de corazón, hígado, intestino y músculo de hámster (Figura 3, carriles 2 a 6), así como un extracto de tenia (Figura 3 carril 1). Los tejidos se sonicaron en presencia de inhibidores de proteasas y se realizó un Western blot. La figura 3 muestra que los anticuerpos anti-rTsCRT son específicos para *T. solium* y no dan reacción cruzada con los órganos del hámster, lo que indica que no hay anticuerpos inespecíficos en el suero anti-rTsCRT.

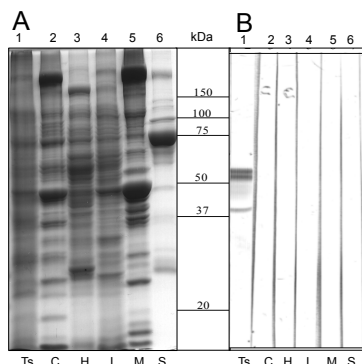


Figura 3. Western blot del sonicado de diferentes órganos de hámster (15µg/carril) para determinar si los anticuerpos anti-rTsCRT presentan una reacción cruzada con la CRT de hámster. A) Tinción con azul de Coomassie. B) Western blot. Tenias (Ts, carriles 1), corazón (C, 2), hígado (H, 3), intestino (I, 4), músculo (M, 5) y suero de hámster (S, 6). Se utilizó suero de un ratón sin inmunizar como control. Los marcadores de pesos moleculares se expresan en KDa.

7.4 Presencia de TsCRT de E/S de las tenias cultivadas

Se buscó la TsCRT nativa en los productos E/S de las tenias cultivadas durante 48h *in vitro* mediante Western blot utilizando los anticuerpos policlonales anti-rTsCRT específicos generados en ratón. Entre las proteínas presentes en los productos E/S separados por SDS-PAGE se identificó una banda de ~53 kDa que reaccionó con el suero anti-rTsCRT (Figura 4). Este peso molecular corresponde al tamaño esperado de la TsCRT.

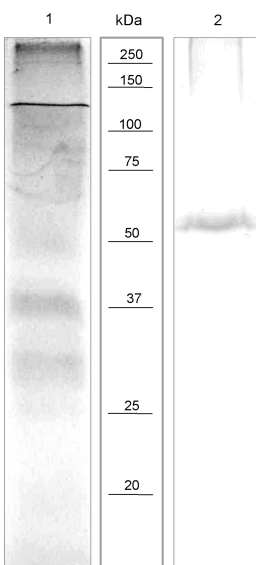


Figura 4. Análisis electroforético y Western Blot de los productos E/S de tenias cultivadas *in vitro*. SDS-PAGE de 15µg de productos E/S teñidos con azul de Coomassie (carril 1). Los E/S se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con suero anti-rTsCRT generado en ratón (carril 2) a una dilución 1:10000. Los marcadores de pesos moleculares se expresan en kDa.

7.5 Respuesta inmune humoral específica

Se investigó la capacidad del TsCE y la TsCRT para inducir una respuesta de IgG específica en animales infectados a los diferentes DPI mediante ELISA. La figura 5 muestra la presencia de anticuerpos IgG específicos contra TsCE (Figura 2A) y rTsCRT purificada (Figura 5B). Todos los hámsteres presentaron anticuerpos anti-TsCE a los 20 y 30 DPI ($P < 0.05$), mientras que 28 y 33% de los hámsteres mostraron anticuerpos específicos anti-rTsCRT a los 20 y 30 DPI respectivamente.

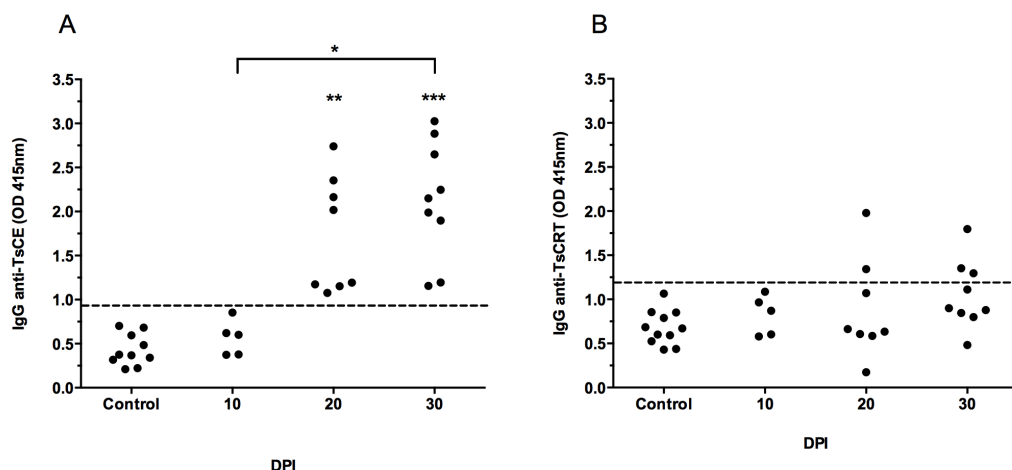


Figura 5. Presencia de anticuerpos IgG en suero de hámsteres infectados con *T. solium* utilizando ELISA. Los sueros son de animales no infectados (control) y obtenidos a los 10, 20 y 30 DPI. A) Anticuerpos anti-TsCE y B) Anticuerpos anti-rTsCRT. Cada punto se refiere a un hámster individual y las líneas discontinuas representan el valor de corte que se calculó como la media de la OD del grupo no infectado más 2 desviaciones estándar. Kruskal-Wallis: ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$ en comparación con los animales no infectados.

7.6 Respuestas linfoproliferativas locales y sistémicas

La capacidad del TsCE y la rTsCRT para inducir respuestas celulares *in vitro* durante la infección con *T. solium* se evaluó mediante ensayos de linfoproliferación en células de NLM (respuesta local) y de bazo (respuesta sistémica). La figura 6 muestra la proliferación en respuesta al TsCE y a la rTsCRT antes de la infección y a diferentes DPI. Las células de los NLM no mostraron niveles significativos de proliferación en respuesta a rTsCRT o TsCE (Figura 6A). En contraste, TsCE indujo una respuesta proliferativa significativa en células de bazo a los 20 y 30 DPI ($p < 0.05$) y rTsCRT mostró un aumento en los niveles de proliferación de células de bazo a los 20 DPI que no alcanzaron significancia estadística (Figura 6B). Se utilizó Con A como control positivo para todos los ensayos de proliferación. Todos los linfocitos de los NLM (Figura 7A) y bazo (Figura 7B) de animales infectados como controles proliferaron significativamente con respecto a los linfocitos sin estímulo. Sin embargo, los valores con la estimulación mitogénica fueron significativamente menores en los linfocitos obtenidos a los 30DPI.

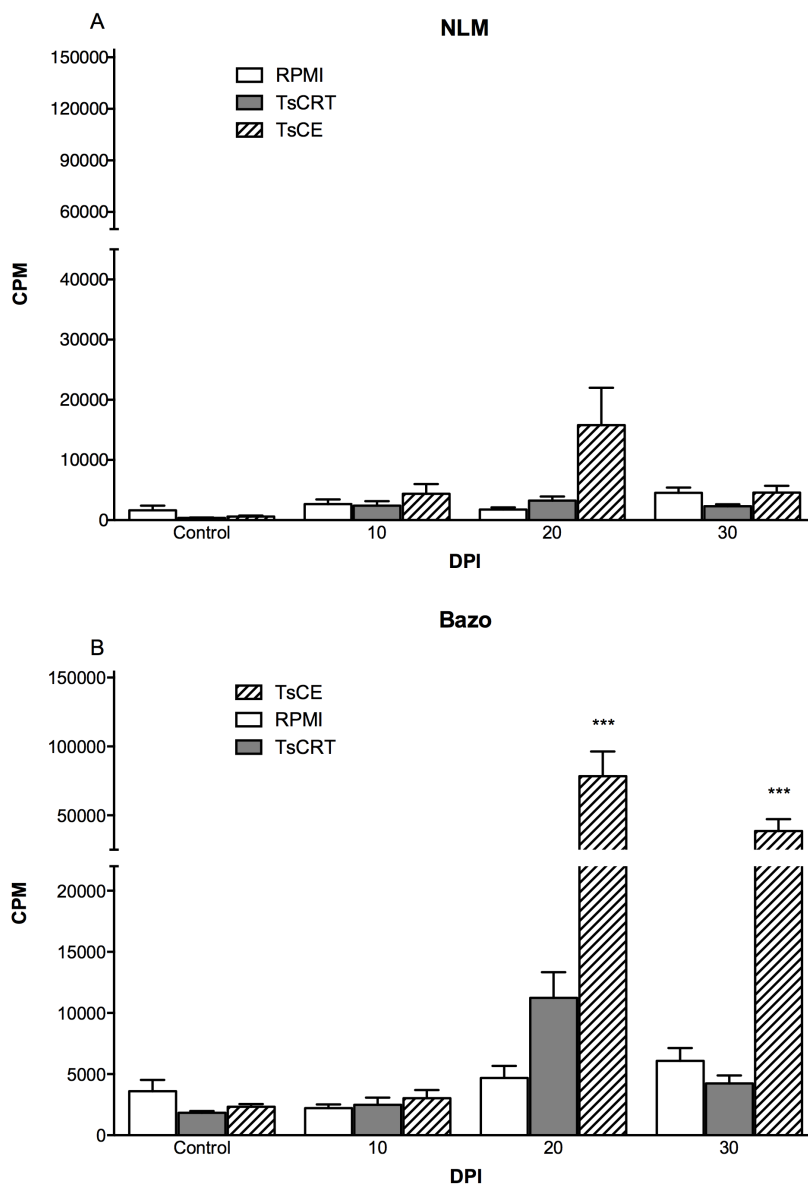


Figura 6. Respuesta proliferativa de células de los NLM (A) y del bazo (B) de hámsteres infectados y no infectados estimulados con la rTsCRT y el TsCE. Las barras blancas representan los datos de las células incubadas en RPMI, las barras grises datos de células incubadas con rTsCRT y las barras rayadas muestran la respuesta a TsCE. Las barras representan la media \pm SEM de la incorporación de timidina ^3H de los cultivos realizados por triplicado de células obtenidas de 6 animales de dos experimentos independientes. Kruskal-Wallis: *** $p < 0.001$ en comparación con el control de RPMI.

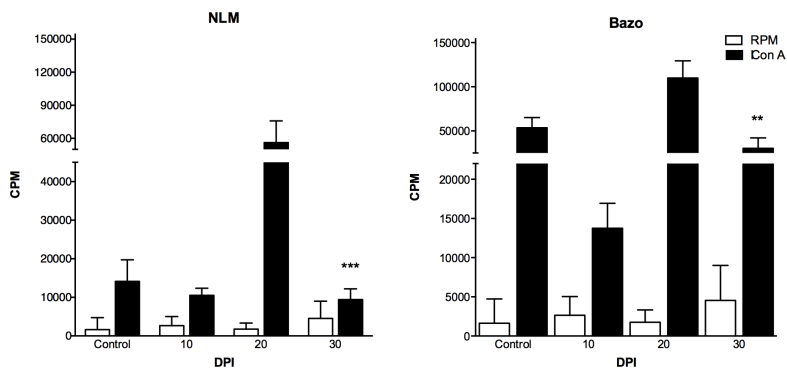


Figura 7. Respuesta proliferativa de células de los NLM (A) y de bazo (B) de hámsteres infectados y no infectados estimulados con Con A. Las barras blancas representan los datos de las células incubadas en RPMI y las barras negras corresponden a datos de células incubadas con Con A. Las barras representan la media \pm SEM de la incorporación de timidina ^3H de los cultivos realizados por triplicado de células obtenidas de 6 animales de dos experimentos independientes. Kruskal-Wallis: *** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ en comparación con las células estimuladas con Con A a los 20DPI.

7.7 Perfil de citocinas inducida durante la teniosis

Con el objetivo de analizar si el TsCE y la rTsCRT inducen una respuesta inmune Th2 durante la infección por *T. solium*, se evaluó la expresión relativa de IL-4, IL-5 e IL-10 en células de bazo y NLM de hámsteres no infectados e infectados y sacrificados a diferentes DPI en respuesta a la estimulación *in vitro* con respecto a las células sin estímulo mediante RT-PCR cuantitativo. La figura 6 muestra la expresión del mRNA para IL-4, IL-5 e IL-10 normalizada con respecto al gen constitutivo β -actina. La estimulación con TsCE resultó en un aumento de la expresión de IL-4 y IL-5 tanto en las células de NLM como de bazo a los 20 y 30 DPI en comparación con las células no estimuladas (Figura 8A, B, C, y D), mientras que la rTsCRT indujo un aumento significativo de los niveles del mRNA de IL-4 en células de NLM de hámsteres infectados ($p < 0.05$), pero no en las células de bazo (Figura 8A y B). La expresión de IL-5 en respuesta a la estimulación con rTsCRT solamente aumentó en células de NLM de hámsteres infectados a los 30 DPI ($p < 0.05$, Fig. 8D). La estimulación con rTsCRT indujo la expresión de IL-10 tanto en las células de animales infectados, como no infectados, con la excepción de las células de NLM a los 20 DPI. La estimulación con

TsCE no resultó en un aumento significativo de los niveles de transcripción de la citocina inmunorreguladora IL-10 en los órganos linfoides analizados (Figura 8E y F).

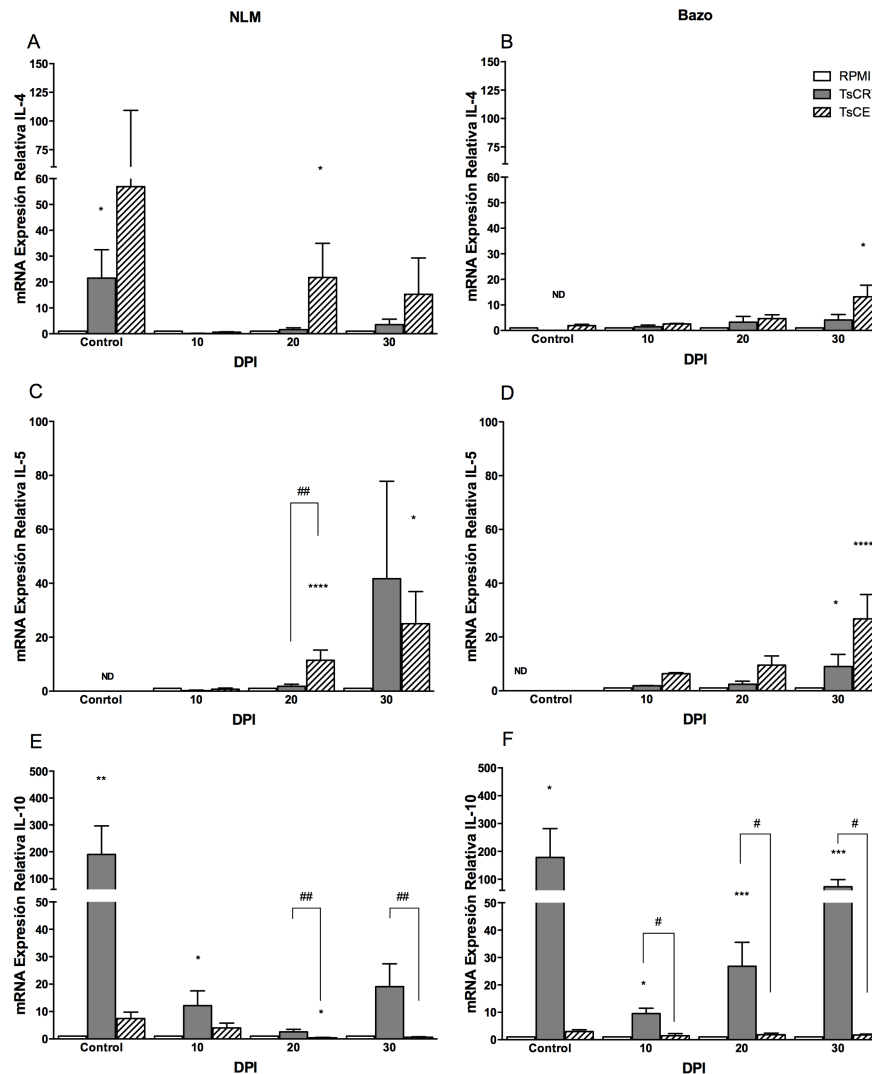


Figura 8. Expresión relativa de mRNA de citocinas en células de NLM y de bazo después de la estimulación *in vitro* con TsCE o con rTsCRT. Se preparó cDNA a partir de mRNA obtenido de NLM (A, C, D) o bazo (B, D, E). Los niveles del mRNA se determinaron por RT-PCR cuantitativo para IL-4 (A, B) IL-5 (C, D) e IL-10 (E, F). Los datos se expresan como la media de la relación de cada citocina con respecto a β -actina (gen constitutivo). Las barras blancas representan los datos de las células incubadas en RPMI solas, las barras grises de las células incubadas con rTsCRT y las barras rayadas de las células incubadas con TsCE. Las barras representan la media \pm SEM de expresión relativa de los cultivos por triplicado de células obtenidas de 6 animales de dos experimentos independientes. Kruskal-Wallis: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ expresión inducida en comparación con el control de RPMI. # $P < 0,05$, ## $P < 0.01$ expresión inducida en comparación con TsCE. ND, no detectado.

7.8 Identificación de células dendríticas en intestino de hámster

Debido a que no existen anticuerpos específicos contra marcadores de DC de hámster, se evaluaron anticuerpos heterólogos de diferentes mamíferos en biopsias de intestinos de hámster infectados. Los anticuerpos utilizados y sus características se refieren en la Cuadro 3. Ninguno de los anticuerpos utilizados reaccionó con las células de hámster. Como control positivo se utilizaron cortes de intestinos de ratón, se probaron los anticuerpos específicos de ratón anti-DEC 205, anti-DEC 207 y anti-MHCII. Es evidente la presencia de estas células en el intestino de ratón, que se identifican con un precipitado gris (Figura 9A, B, C). El suero no inmune no detecta la presencia de DC (Figura 9D).

Cuadro 3. Anticuerpos heterólogos para identificación de DC de hámster

Anticuerpo primario	Diluciones	Tipo de anticuerpo
α ratón CII NIMR4	1: 50	monoclonal
α ratón Dec 205	1: 100	monoclonal
α ratón Dec207	1: 50	monoclonal
α humano CII	1: 50	monoclonal
α humano CD1a	1: 50	monoclonal
α humano Lg	1: 50	monoclonal
α humano Dec 205	1:10, 1:20, 1:200 (1 a 20 μ g/ml)	policlonal
α caballo CD11c	1: 400	policlonal
α caballo CD11c perrón	1: 1000	policlonal

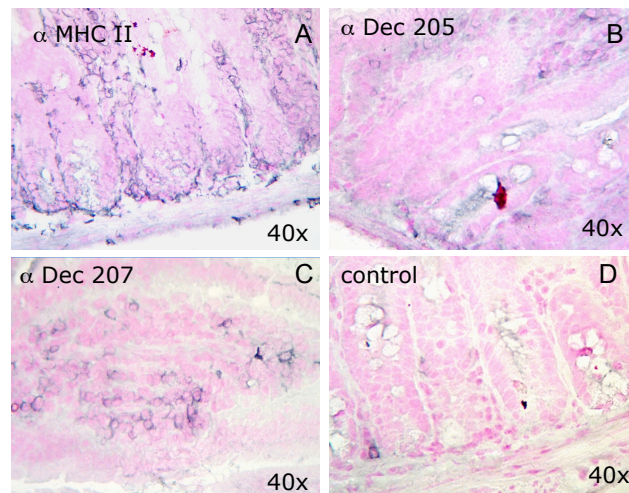


Figura 9. Inmunohistoquímica utilizando anticuerpos que reconocen marcadores de DC en biopsias de intestino de ratón. A) anti MHC II, B) anti-Dec 205, C) anti Dec 207, D) Control.

8. DISCUSIÓN

La teniosis es un enfermedad estrictamente humana, por lo que se desconocen muchos aspectos de la respuesta inmune. Sin embargo, gracias a la demostración de que el hámster dorado no inmunosuprimido es susceptible a la infección con cisticercos de *T. solium*, se sabe que en el sitio de anclaje de la tenia a la mucosa intestinal hay acumulación de células inmunes y expresión de citocinas Th1/Th2 al inicio de la infección, que viran a lo largo de la infección a una respuesta predominantemente Th2 (Avila et al., 2008; Cruz-Rivera et al., 2014). En general los helmintos intestinales promueven respuestas Th2 reguladoras que les permiten sobrevivir y reproducirse en el hospedero; sin embargo, en teniosis no se han identificado las moléculas capaces de inducir este tipo de respuesta. Se ha demostrado que la CRT de otros helmintos tiene funciones inmunoregulatoras. En el presente estudio se describe la respuesta inmune inducida por la rTsCRT durante la infección con *T. solium* en el modelo de teniosis en el hámster dorado. La rTsCRT indujo la expresión de la citocina inmunoregulatora IL-10 en células de los NLM y de bazo, tanto de animales infectados como de no infectados, en un microambiente predominantemente Th2 caracterizado por el aumento de los niveles de IL-4 e IL-5. Además, se demostró la presencia de la TsCRT nativa en los productos E/S de tenias cultivadas *in vitro*.

El análisis de Western blot indica que los parásitos adultos de *T. solium* secretan TsCRT. Previamente, en nuestro grupo se demostró que también está presente en extractos crudos de cisticercos y tenias; además su localización sugiere un papel en el desarrollo del parásito ya que se demostró que la TsCRT se expresa diferencialmente durante la gametogénesis y embriogénesis de *T. solium* (Mendlovic et al., 2006). Los resultados presentados en este trabajo indican que la TsCRT tiene un papel en la regulación de la respuesta inmune. La presencia de TsCRT en los productos E/S es consistente con otros reportes en donde se ha identificado a la CRT como una proteína secretada en diferentes nemátodos como *H. contortus* y *H. polygyrus* (Nagaraj et al., 2008). La activación o modulación del sistema inmune por parte de los

parásitos es más probable que se efectúe por medio de la liberación de mediadores solubles que se unen o interaccionan con moléculas y células en la interfase hospedero parásito (Hewitson et al., 2009). La identificación de anticuerpos anti IgG anti-TsCRT observados en un tercio de los hámsteres infectados sugiere que la TsCRT es secretada *in vivo*.

En este estudio no se observó proliferación en las células de los NLM en respuesta a la TsCRT o TsCE. En contraste, las células del bazo mostraron una fuerte proliferación linfocitaria *in vitro* tras la estimulación con el TsCE, más no con la rTsCRT. Durante la teniosis experimental, antígenos del parásito están presentes en la circulación y esto podría explicar en parte la activación de las células del bazo (Avila et al., 2003). Por otro lado, la falta de respuesta en los NLM puede depender de las subpoblaciones de células que participan en la respuesta inmune a nivel local, así como del microambiente de citocinas que predomina en los órganos linfoides en mucosas, ya que los NLM muestran propiedades inmunológicas únicas y están programados para respuestas reguladoras debido a que son responsables de la tolerancia oral a antígenos proteicos en el tracto gastrointestinal (Pabst et al., 2009). Por ejemplo, la infección por *Trypanosoma cruzi* resulta en la disminución de linfocitos por apoptosis en los NLM, mientras que las células de bazo y los nódulos linfáticos subcutáneos proliferan ante una estimulación específica (de Meis et al., 2006; de Meis et al., 2009). Otros mecanismos, tales como la presencia de DC o macrófagos tolerogénicos podrían promover la inducción de tolerancia o de una respuesta disminuida, interfiriendo con la inmunidad celular local (Mann and Li, 2014). La ausencia de proliferación en respuesta a la rTsCRT observada en este estudio fue evidente también en estudios anteriores en el caso de hámsteres y ratones inmunizados oralmente con rTsCRT y toxina colérica como adyuvante (Fonseca-Coronado et al., 2011; Leon-Cabrera et al., 2012). Esta falta de proliferación a antígenos específicos ha sido documentada para proteínas inmunomoduladoras como la cistatina de nemátodos y una posible explicación es que este tipo de antígenos interfieren con el procesamiento y la presentación antigénica de las células presentadoras de antígeno (APC) (Hartmann and Lucius, 2003; Pfaff et al., 2002). Sin embargo, sería necesario obtener reactivos

específicos para DC/macrófagos de hámster con el fin de realizar estudios adicionales para analizar el fenotipo de este tipo de células que se generan en respuesta a la rTsCRT.

Otro aspecto interesante de los resultados fue la disminución de la proliferación en respuesta a Con A a los 30 DPI en ambos órganos linfoides. Se ha reportado un fenómeno similar en infecciones por otros helmintos en modelos animales, así como en estudios en humanos. Por ejemplo, en un modelo de hámster de *Ancylostoma ceylanicum*, los antígenos de adulto no indujeron linfoproliferación en las etapas crónicas de la infección (Mendez et al., 2005). Además, varios reportes describen la falta de reactividad de las células T ante la estimulación con mitógenos en los seres humanos (Figueiredo et al., 2010; Maxwell et al., 1987). En pacientes con neurocisticercosis se ha observado una correlación negativa entre niveles más altos de linfocitos T reg y los niveles de proliferación linfocitaria (Adalid-Peralta et al., 2012). La disminución de la proliferación en respuesta a Con A de las células de los NLM y el bazo a los 30DPI en el presente estudio están de acuerdo con la noción de que las infecciones de parásitos comúnmente conducen a diferentes grados de inmunosupresión. De hecho, en los últimos años varios informes han puesto de manifiesto la influencia reguladora de la infección por helmintos o moléculas derivadas de helmintos en enfermedades inflamatorias y alérgicas tanto en modelos animales como en ensayos clínicos humanos. La infección terapéutica con huevos de *Trichuris suis* favorece la remisión en pacientes con enfermedades inflamatorias (Elliott and Weinstock, 2012; Hernandez et al., 2013).

La respuesta de tipo Th2 es predominante durante la infección por *T. solium*, como se observa en otros helmintos. Varios reportes sugieren el papel central de la IL-4 en las respuestas protectoras contra las infecciones de parásitos (Anthony et al., 2007). La estimulación con el TsCE, pero no con la rTsCRT, induce un aumento de la síntesis de mRNA IL-4 y IL-5 durante de la infección. Los datos presentados en este trabajo son consistentes con estudios anteriores en los que se detectaron células positivas a IL-4 e IL-5 en el sitio de anclaje de la tenia (Avila et al., 2008). Como se sabe, la IL-4 es un motor importante en el desarrollo de los linfocitos Th2 después de su interacción con

células presentadoras de antígenos (Phythian-Adams et al., 2010) y la IL-5 se requiere para la maduración de eosinófilos y generalmente se produce durante las respuestas Th2 junto con IL-4 (Allen and Maizels, 2011; Rzepecka et al., 2009). El hecho de que la rTsCRT no estimuló la expresión de estas dos citocinas Th2 durante la infección sugiere que otros factores presentes en el TsCE, además de la TsCRT, contribuyen a la respuesta Th2 presente durante la infección por *T. solium*. Otra posibilidad es que la estimulación con rTsCRT, por ser ésta una proteína pura, no fue suficiente, por lo que sería necesario probar concentraciones mayores de la proteína.

En todas las células eucariontes, salvo en levaduras donde no se expresa la CRT, participa en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} ; sin embargo, existe evidencia creciente de su papel en la regulación inmune (El Gengehi et al., 2000; Kasper et al., 2001; Morgan et al., 2006; Rzepecka et al., 2009). La expresión de la IL-10 inducida por la rTsCRT tras la estimulación *in vitro* en NLM (respuesta local) y bazo (respuesta sistémica) es consistente con reportes anteriores que muestran que la CRT nativa de *H. polygyrus* induce IL-4 e IL-10 en linfocitos T $CD4^{+}$ de ratones infectados experimentalmente (Rzepecka et al., 2009). La inducción de la IL-10 es una característica común que comparten diferentes helmintos, probablemente asociada con la supervivencia del parásito como un mecanismo para modular la respuesta inmune del hospedero (McSorley et al., 2013; Persaud et al., 2007). Sin embargo, la modulación de sistema inmune que le confiere ventajas al parásito puede beneficiar también al hospedero, inhibiendo la posible inmunopatología resultado de la reacción inflamatoria inducida por el parásito. Un ejemplo interesante es en individuos asintomáticos con neurocisticercosis en los que se presentan niveles significativamente más elevados de IL-4 e IL-10 en comparación con controles sanos y con pacientes sintomáticos con neurocisticercosis, lo que sugiere que estas citocinas podrían jugar un papel en la evolución de la enfermedad (Verma et al., 2011). El aumento en la producción de IL-10 se ha asociado a la inmunorregulación en infecciones crónicas por helmintos en seres humanos y en modelos animales (McSorley et al., 2013). Asimismo, contribuye al mantenimiento de la respuesta Th2 mediante la inhibición de las respuestas Th1 (Balic et al., 2009). En múltiples

infecciones por helmintos, al igual que durante la teniosis, se induce una respuesta Th1 en las etapas iniciales que en ocasiones es capaz de eliminar la infección, sin embargo, hay un viraje hacia una respuesta Th2 que permite la persistencia del parásito (Avila et al., 2008; Bancroft and Grencis, 1998; Terrazas et al., 2010a; Terrazas et al., 1998). Por otro lado, la terapia con helmintos ha sido utilizada para disminuir la patología de enfermedades inflamatorias (Elliott and Weinstock, 2012). Sin embargo, el uso de infecciones iatrogénicas conlleva a efectos secundarios no deseados, por lo que la identificación de moléculas con propiedades inmunomoduladoras puede constituir una estrategia viable para el tratamiento de estos padecimientos sin los efectos secundarios no deseados. Por lo tanto, la capacidad de la rTsCRT de inducir IL-10 podría contribuir a la estrategia desarrollada por *T. solium* para controlar la respuesta del hospedero y promover un microambiente más favorable para su persistencia en el hospedero y por otra parte explotarse como terapéutico para el tratamiento de inmunopatologías.

Las DC CD11c⁺ tienen un papel esencial en la inducción de respuestas Th2 en contra de helmintos (Phythian-Adams et al., 2010). Recientemente se demostró el papel importante que tienen las DC humanas derivadas de monocitos en la generación de linfocitos Treg cuando se incuban en presencia de cisticercos de *T. solium*. Los cisticercos modulan a las DC que muestran un aumento en la expresión de moléculas relacionadas con inmunosupresión (Adalid-Peralta et al., 2013). Más aún, se ha propuesto que la CRT de parásitos podría representar un patrón molecular asociado a patógenos capaz de interactuar con células dendríticas y dirigir la respuesta inmune hacia un perfil Th2 (Terrazas et al., 2010b). En el presente estudio no fue posible identificar DC de hámster a pesar de que se probaron diferentes anticuerpos heterólogos que reconocen moléculas que se utilizan para definir esta estirpe celular, tales como CD11c, DEC 205 y MHCII. Aun así, se propone una hipótesis sobre la capacidad de la rTsCRT de favorecer una respuesta Th2 al interactuar con diferentes receptores potenciales en las DC. Se ha demostrado que las DC en presencia de helmintos o sus productos de ES, muestran una expresión disminuida de IL-12 y esto resulta en una falta de maduración clásica de estas células lo que induce

un fenotipo tolerogénico y la inhibición de la respuesta Th1 pro-inflamatoria (Balic et al., 2009). Recientemente, se demostró que la interacción de los ligandos C1q y CD40L (ligando de CD40) con C1qR (receptor de C1q) y CD40 respectivamente, induce la colocalización de estos dos receptores en la superficie de la DC, lo que a su vez induce la producción óptima de IL-12 (Baruah et al., 2009). Las CRT del ser humano y de algunos parásitos se unen a C1q y a CD40L a través de su dominio similar a colágeno (Duus et al., 2007). Por lo tanto, la unión de la rTsCRT a C1q y/o CD40 podría bloquear la producción de IL-12 y por lo tanto la capacidad de las DC de inducir la respuesta Th1, promoviendo una respuesta Th2. También, se ha demostrado la unión de CRT al receptor carroñero A (Rzepecka et al., 2009). La activación este receptor resulta en la inhibición de la IL-12 inducida por LPS e IFN- γ y en ratones knockout en el receptor scavenger A hay una disminución de la expresión de IL-10 (Greaves and Gordon, 2009; Jozefowski and Kobzik, 2004). Por lo que la capacidad de unión a C1q, a CD40 y al receptor scavenger A, podrían constituir mecanismos de acción de la rTsCRT para inducir la citocina inmunorreguladora IL-10 (Figura 10).

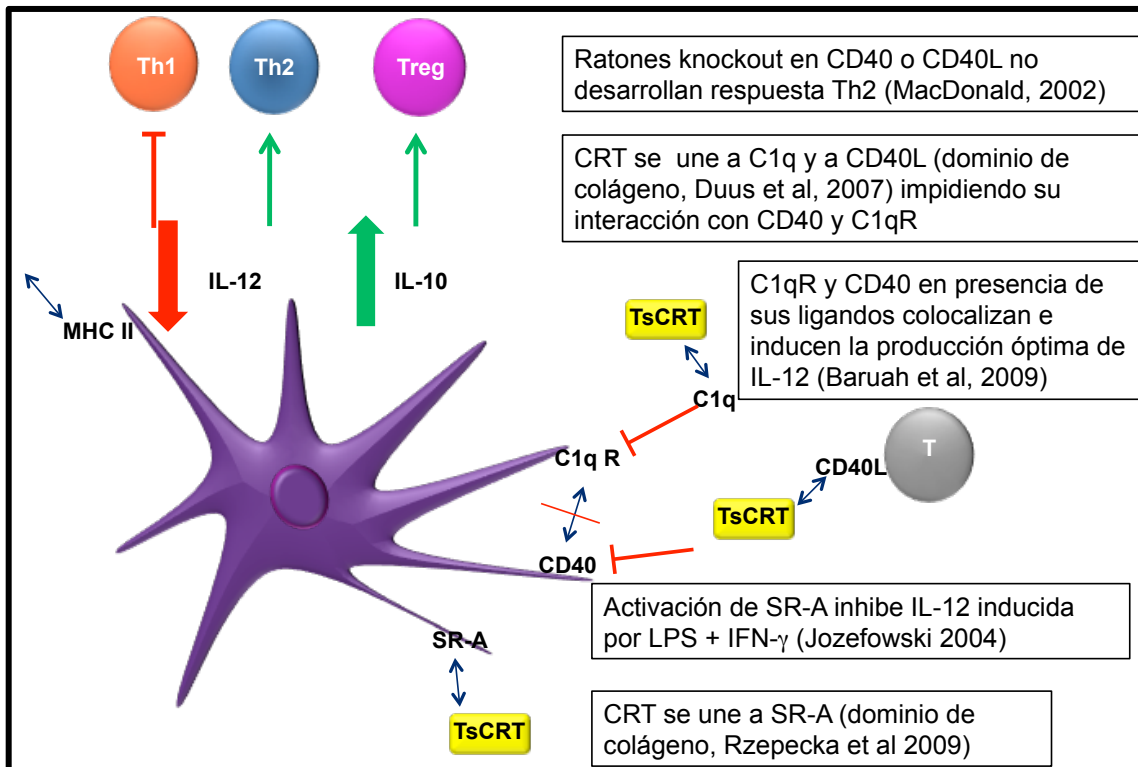


Figura 10. Hipótesis sobre la capacidad de la TsCRT de inducir IL-10 y favorecer una respuesta Th2.

9. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio que caracteriza la respuesta inmune inducida por la rTsCRT durante la infección por *T. solium*. La identificación de moléculas derivadas de helmintos, que tienen un papel en la interfase huésped-parásito durante la teniosis experimental, es un área de estudio que puede ayudar a comprender mejor la respuesta del hospedero contra el parásito. La respuesta inmune contra la teniosis ha sido poco estudiada debido a que el ser humano es el único hospedero definitivo de la tenia y solamente hay dos modelos animales que permiten el establecimiento de la tenia en el intestino delgado, siendo el hámster dorado el más susceptible. Sin embargo, el modelo experimental de teniosis en el hámster es muy variable debido a que se trata de una cepa exogámica y además tiene la limitante de que se cuenta con pocos reactivos inmunológicos comerciales. Sin embargo, en este trabajo fue posible demostrar la respuesta inmune humoral y celular durante la infección generada en contra de una proteína purificada. Nuestros datos indican que la rTsCRT es secretada por el parásito adulto, estimula la producción de anticuerpos IgG, aunque no induce una respuesta proliferativa. Un aspecto de gran interés es la capacidad de la rTsCRT de inducir la expresión de IL-10 en células inmunes de hámsteres no infectados. Esta propiedad podría explotarse para utilizar la rTsCRT como inmunomodulador para el tratamiento de enfermedades de etiología inflamatoria y estudiar la interacción de la rTsCRT con el sistema inmunológico en otros animales experimentales que permitan el análisis de las subpoblaciones celulares blanco, así como los receptores y vías de señalización involucrados, utilizando reactivos inmunológicos comerciales y cepas modificadas genéticamente. La capacidad de la rTsCRT para inducir IL-4 y la expresión de IL-10 en células de hámsteres no infectados podría explicarse por su interacción con DC inmaduras o macrófagos tolerogénicos. Esta hipótesis de trabajo abre una línea de investigación interesante que permitirá realizar estudios adicionales para elucidar los receptores que se unen a la rTsCRT, las vías de señalización implicadas, así como los cambios fenotípicos resultantes de las células blanco y la interacción subsecuente con distintas subpoblaciones de linfocitos. Más aún, se

CONCLUSIONES

podría analizar la interacción *in vitro* de la rTsCRT con células mieloides humanas que podría aportar información sobre su capacidad inmunomoduladora con el fin de utilizarla como terapia para el control de patologías de etiología inflamatoria, cuya incidencia, desde mediados del siglo pasado, ha aumentado en países desarrollados, incluyendo México (Bosques-Padilla et al., 2011). Por lo tanto, proteínas tales como la rTsCRT con actividad anti-inflamatoria que potencialmente protegen al parásito contra la respuesta inmune del hospedero podrían explotarse para el control y tratamiento de otros padecimientos.

10. ANEXOS

10.1 Artículos publicados

Mendlovic F, Cruz-Rivera M, Ávila G, Vaughan G, Flisser A. Cytokine, antibody and proliferative cellular responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters. PLOS One. 2015; PLoS One. 2015; 10: 1-13.

Mendlovic F and Flisser A. Dendritic cells in the Gut: Interaction with Intestinal Helminths. Journal of Biomedicine and Biotechnology, Special Issue: Immunology and cell biology of parasitic diseases, 2010; 1-10.

Flisser A, Ávila G, Maravilla P, Mendlovic F, León-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Garza A, Gómez B, Aguilar L, Terán N, Solano S, Benítez M. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. Parasitology 2010; 137: 347-357.

Mendlovic, F. & Conconi, M. Proteins and Gene Expression: Calreticulin: a Multifaceted Protein. Nature Education 2011; 4 (1): 1 .

Mendlovic, F. Respuesta inmunitaria contra calreticulina de *Taenia solium*. XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Biomédica 2011; 31 (sup. 3): 3.

10.2 Capítulos de libro

Mendlovic, F. y Flisser, A. Inmunomodulación por parásitos intestinales. En: Temas Selectos de Microbiología Médica e Infectología. Editora Ana Flisser. Editorial de la Universidad Veracruzana. ISBN 978-607-502-383-0, pp. 81-91.

10.3 Patente

Uso de la calreticulina recombinante de *Taenia solium* para inducir la expresión de interleucina 10. Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual, No. de registro: MX/a/2013/005007. Solicitud de búsqueda internacional: Registro PCT/MX/2014/000057. Número de publicación internacional WO 2014/178701 A1.

11. REFERENCIAS

- Adalid-Peralta, L., Arce-Sillas, A., Fragoso, G., Cardenas, G., Rosetti, M., Casanova-Hernandez, D., Rangel-Escareno, C., Uribe-Figueroa, L., Fleury, A., Sciutto, E., 2013. Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation. *Clinical & developmental immunology* 2013, 981468.
- Adalid-Peralta, L., Fleury, A., Garcia-Ibarra, T.M., Hernandez, M., Parkhouse, M., Crispin, J.C., Voltaire-Proano, J., Cardenas, G., Fragoso, G., Sciutto, E., 2012. Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *The Journal of parasitology* 98, 142-148.
- Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y., Collins, S.M., 2002. Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 282, G226-232.
- Allen, J.E., Maizels, R.M., 2011. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews. Immunology* 11, 375-388.
- Allen, J.E., Wynn, T.A., 2011. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS pathogens* 7, e1002003.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature reviews. Immunology* 7, 975-987.
- Avila, G., Aguilar, L., Benitez, S., Yopez-Mulia, L., Lavenat, I., Flisser, A., 2002. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *International journal for parasitology* 32, 1301-1308.
- Avila, G., Aguilar, L., Romero-Valdovinos, M., Garcia-Vazquez, F., Flisser, A., 2008. Cytokine response in the intestinal mucosa of hamsters infected with *Taenia solium*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149, 170-173.
- Avila, G., Benitez, M., Aguilar-Vega, L., Flisser, A., 2003. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitology research* 89, 284-289.
- Bach, J.F., 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* 347, 911-920.
- Bajor, A., Tischer, S., Figueiredo, C., Wittmann, M., Immenschuh, S., Blasczyk, R., Eiz-Vesper, B., 2011. Modulatory role of calreticulin as chaperokine for dendritic cell-based immunotherapy. *Clinical and experimental immunology* 165, 220-234.
- Balic, A., Smith, K.A., Harcus, Y., Maizels, R.M., 2009. Dynamics of CD11c(+) dendritic cell subsets in lymph nodes draining the site of intestinal nematode infection. *Immunology letters* 127, 68-75.
- Bancroft, A.J., Grencis, R.K., 1998. Th1 and Th2 cells and immunity to intestinal helminths. *Chemical immunology* 71, 192-208.
- Baruah, P., Dumitriu, I.E., Malik, T.H., Cook, H.T., Dyson, J., Scott, D., Simpson, E., Botto, M., 2009. C1q enhances IFN-gamma production by antigen-specific T

- cells via the CD40 costimulatory pathway on dendritic cells. *Blood* 113, 3485-3493.
- Bosques-Padilla, F.J., Sandoval-Garcia, E.R., Martinez-Vazquez, M.A., Garza-Gonzalez, E., Maldonado-Garza, H.J., 2011. [Epidemiology and clinical characteristics of ulcerative colitis in north-eastern Mexico]. *Revista de gastroenterologia de Mexico* 76, 34-38.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Cabezon, C., Cabrera, G., Paredes, R., Ferreira, A., Galanti, N., 2008. *Echinococcus granulosus* calreticulin: molecular characterization and hydatid cyst localization. *Molecular immunology* 45, 1431-1438.
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Roza, C., Bowdridge, S., Millman, A., Van Rooijen, N., Urban, J.F., Jr., Wynn, T.A., Gause, W.C., 2012. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature medicine* 18, 260-266.
- Coombes, J.L., Powrie, F., 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature reviews. Immunology* 8, 435-446.
- Cruz-Rivera, M., Vaughan, G., Mendlovic, F., Vergara-Castaneda, A., Romero-Valdovinos, M., Leon-Cabrera, S., Alonso, M., Avila, G., Flisser, A., 2014. Cytokine expression at the anchor site in experimental *Taenia solium* infection in hamsters. *Veterinary parasitology* 200, 299-302.
- Danilowicz-Luebert, E., Steinfeldt, S., Kuhl, A.A., Drozdenko, G., Lucius, R., Worm, M., Hamelmann, E., Hartmann, S., 2013. A nematode immunomodulator suppresses grass pollen-specific allergic responses by controlling excessive Th2 inflammation. *International journal for parasitology* 43, 201-210.
- de Meis, J., Mendes-da-Cruz, D.A., Farias-de-Oliveira, D.A., Correa-de-Santana, E., Pinto-Mariz, F., Cotta-de-Almeida, V., Bonomo, A., Savino, W., 2006. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8, 221-231.
- de Meis, J., Morrot, A., Farias-de-Oliveira, D.A., Villa-Verde, D.M., Savino, W., 2009. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e417.
- Duus, K., Pagh, R.T., Holmskov, U., Hojrup, P., Skov, S., Houen, G., 2007. Interaction of calreticulin with CD40 ligand, TRAIL and Fas ligand. *Scandinavian journal of immunology* 66, 501-507.
- El Gengehi, N., El Ridi, R., Tawab, N.A., El Demellawy, M., Mangold, B.L., 2000. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin. *The Journal of parasitology* 86, 993-1000.
- Elliott, D.E., Weinstock, J.V., 2012. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1247, 83-96.

- Espitia, C.M., Zhao, W., Saldarriaga, O., Osorio, Y., Harrison, L.M., Cappello, M., Travi, B.L., Melby, P.C., 2010. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC immunology* 11, 31.
- Figueiredo, C.A., Barreto, M.L., Rodrigues, L.C., Cooper, P.J., Silva, N.B., Amorim, L.D., Alcantara-Neves, N.M., 2010. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infection and immunity* 78, 3160-3167.
- Flisser, A., Avila, G., Maravilla, P., Mendlovic, F., Leon-Cabrera, S., Cruz-Rivera, M., Garza, A., Gomez, B., Aguilar, L., Teran, N., Velasco, S., Benitez, M., Jimenez-Gonzalez, D.E., 2010. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. *Parasitology* 137, 347-357.
- Flisser, A., Rodriguez-Canul, R., Willingham, A.L., 3rd, 2006. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Veterinary parasitology* 139, 283-292.
- Flisser, A., Sarti, E., Lightowers, M., Schantz, P., 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta tropica* 87, 43-51.
- Flisser, A., Viniestra, A.E., Aguilar-Vega, L., Garza-Rodriguez, A., Maravilla, P., Avila, G., 2004. Portrait of human tapeworms. *The Journal of parasitology* 90, 914-916.
- Fonseca-Coronado, S., Ruiz-Tovar, K., Perez-Tapia, M., Mendlovic, F., Flisser, A., 2011. *Taenia solium*: immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice. *Experimental parasitology* 127, 313-317.
- Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., Henson, P.M., 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334.
- Gold, L.I., Eggleton, P., Sweetwyne, M.T., Van Duyn, L.B., Greives, M.R., Naylor, S.M., Michalak, M., Murphy-Ullrich, J.E., 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 665-683.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., 2001. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *European journal of immunology* 31, 2539-2546.
- Greaves, D.R., Gordon, S., 2009. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S282-286.
- Guillou, F., Roger, E., Mone, Y., Rognon, A., Grunau, C., Theron, A., Mitta, G., Coustau, C., Gourbal, B.E., 2007. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Molecular and biochemical parasitology* 155, 45-56.

- Harnett, W., Harnett, M.M., 2010. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nature reviews. Immunology* 10, 278-284.
- Hartmann, S., Lucius, R., 2003. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International journal for parasitology* 33, 1291-1302.
- Hasnain, S.Z., Gallagher, A.L., Grecis, R.K., Thornton, D.J., 2013. A new role for mucins in immunity: insights from gastrointestinal nematode infection. *The international journal of biochemistry & cell biology* 45, 364-374.
- Herbert, D.R., Yang, J.Q., Hogan, S.P., Groschwitz, K., Khodoun, M., Munitz, A., Orekov, T., Perkins, C., Wang, Q., Brombacher, F., Urban, J.F., Jr., Rothenberg, M.E., Finkelman, F.D., 2009. Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *The Journal of experimental medicine* 206, 2947-2957.
- Hernandez, J.L., Leung, G., McKay, D.M., 2013. Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *International journal for parasitology* 43, 233-243.
- Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M., 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and biochemical parasitology* 167, 1-11.
- Ilic, N., Worthington, J.J., Gruden-Movsesijan, A., Travis, M.A., Sofronic-Milosavljevic, L., Grecis, R.K., 2011. *Trichinella spiralis* antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3+ T cells in vitro. *Parasite immunology* 33, 572-582.
- Iwasaki, A., 2007. Mucosal dendritic cells. *Annual review of immunology* 25, 381-418.
- Jang, S.W., Cho, M.K., Park, M.K., Kang, S.A., Na, B.K., Ahn, S.C., Kim, D.H., Yu, H.S., 2011. Parasitic helminth cystatin inhibits DSS-induced intestinal inflammation via IL-10(+)F4/80(+) macrophage recruitment. *The Korean journal of parasitology* 49, 245-254.
- Johnston, M.J., Wang, A., Catarino, M.E., Ball, L., Phan, V.C., MacDonald, J.A., McKay, D.M., 2010. Extracts of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, suppress macrophage activation in vitro and alleviate chemically induced colitis in mice. *Infection and immunity* 78, 1364-1375.
- Jozefowski, S., Kobzik, L., 2004. Scavenger receptor A mediates H₂O₂ production and suppression of IL-12 release in murine macrophages. *Journal of leukocyte biology* 76, 1066-1074.
- Kasper, G., Brown, A., Eberl, M., Vallar, L., Kieffer, N., Berry, C., Girdwood, K., Eggleton, P., Quinnell, R., Pritchard, D.I., 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins. *Parasite immunology* 23, 141-152.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leon-Cabrera, S., Cruz-Rivera, M., Mendlovic, F., Avila-Ramirez, G., Carrero, J.C., Lacleste, J.P., Flisser, A., 2009. Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination. *Methods* 49, 346-350.

- Leon-Cabrera, S., Cruz-Rivera, M., Mendlovic, F., Romero-Valdovinos, M., Vaughan, G., Salazar, A.M., Avila, G., Flisser, A., 2012. Immunological mechanisms involved in the protection against intestinal taeniosis elicited by oral immunization with *Taenia solium* calreticulin. *Experimental parasitology* 132, 334-340.
- Maizels, R.M., Hewitson, J.P., Smith, K.A., 2012. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Current opinion in immunology* 24, 459-466.
- Makepeace, B.L., Martin, C., Turner, J.D., Specht, S., 2012. Granulocytes in helminth infection -- who is calling the shots? *Current medicinal chemistry* 19, 1567-1586.
- Mann, E.R., Li, X., 2014. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World journal of gastroenterology : WJG* 20, 9653-9664.
- Maravilla, P., Avila, G., Cabrera, V., Aguilar, L., Flisser, A., 1998. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *The Journal of parasitology* 84, 882-886.
- Maxwell, C., Hussain, R., Nutman, T.B., Poindexter, R.W., Little, M.D., Schad, G.A., Ottesen, E.A., 1987. The clinical and immunologic responses of normal human volunteers to low dose hookworm (*Necator americanus*) infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 37, 126-134.
- McDermott, J.R., Bartram, R.E., Knight, P.A., Miller, H.R., Garrod, D.R., Grecis, R.K., 2003. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7761-7766.
- McSorley, H.J., Hewitson, J.P., Maizels, R.M., 2013. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *International journal for parasitology* 43, 301-310.
- McSorley, H.J., Maizels, R.M., 2012. Helminth infections and host immune regulation. *Clinical microbiology reviews* 25, 585-608.
- Mendez, S., Valenzuela, J.G., Wu, W., Hotez, P.J., 2005. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infection and immunity* 73, 3402-3407.
- Mendlovic, F., Carrillo-Farga, J., Torres, J., Laclette, J.P., Flisser, A., 2006. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *The Journal of parasitology* 92, 789-795.
- Mendlovic, F., Flisser, A., 2010. Dendritic cells in the gut: interaction with intestinal helminths. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 250563.
- Mendlovic, F., Ostoa-Saloma, P., Solis, C.F., Martinez-Ocana, J., Flisser, A., Laclette, J.P., 2004. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *The Journal of parasitology* 90, 891-893.
- Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M., 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal* 344 Pt 2, 281-292.

- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., Opas, M., 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal* 417, 651-666.
- Monroy-Ostria, A., Monroy-Ostria, T.J., Gomez, G.J., Hernandez, M.O., 1993. Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Revista latinoamericana de microbiologia* 35, 91-98.
- Morgan, C., LaCourse, E.J., Rushbrook, B.J., Greetham, D., Hamilton, J.V., Barrett, J., Bailey, K., Brophy, P.M., 2006. Plasticity demonstrated in the proteome of a parasitic nematode within the intestine of different host strains. *Proteomics* 6, 4633-4645.
- Mutapi, F., Bourke, C., Harcus, Y., Midzi, N., Mduluzza, T., Turner, C.M., Burchmore, R., Maizels, R.M., 2011. Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. *Parasite immunology* 33, 181-192.
- Nagaraj, S.H., Gasser, R.B., Ranganathan, S., 2008. Needles in the EST haystack: large-scale identification and analysis of excretory-secretory (ES) proteins in parasitic nematodes using expressed sequence tags (ESTs). *PLoS Negl Trop Dis* 2, e301.
- Norma 1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). In En: *Diario Oficial de la Federación*, México, 6 de diciembre de 1999 (Mexico).
- Pabst, O., Wahl, B., Bernhardt, G., Hammerschmidt, S.I., 2009. Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *J Mol Med (Berl)* 87, 945-951.
- Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., Yuan, J., Zitvogel, L., Madeo, F., Williams, D.B., Kroemer, G., 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* 28, 578-590.
- Persaud, R., Wang, A., Reardon, C., McKay, D.M., 2007. Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the non-permissive mouse host. *International journal for parasitology* 37, 393-403.
- Pfaff, A.W., Schulz-Key, H., Soboslay, P.T., Taylor, D.W., MacLennan, K., Hoffmann, W.H., 2002. *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis. *International journal for parasitology* 32, 171-178.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45.
- Phythian-Adams, A.T., Cook, P.C., Lundie, R.J., Jones, L.H., Smith, K.A., Barr, T.A., Hochweller, K., Anderton, S.M., Hammerling, G.J., Maizels, R.M., MacDonald, A.S., 2010. CD11c depletion severely disrupts Th2 induction and development in vivo. *The Journal of experimental medicine* 207, 2089-2096.
- Pulendran, B., Tang, H., Manicassamy, S., 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nature immunology* 11, 647-655.
- Rathore, D.K., Suchitra, S., Saini, M., Singh, B.P., Joshi, P., 2006. Identification of a 66 kDa *Haemonchus contortus* excretory/secretory antigen that inhibits host monocytes. *Veterinary parasitology* 138, 291-300.

- Reyes, J.L., Terrazas, C.A., Alonso-Trujillo, J., van Rooijen, N., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I., 2010. Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. *International journal for parasitology* 40, 731-742.
- Rokeach, L.A., Zimmerman, P.A., Unnasch, T.R., 1994. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infection and immunity* 62, 3696-3704.
- Rzepecka, J., Lucius, R., Doligalska, M., Beck, S., Rausch, S., Hartmann, S., 2006. Screening for immunomodulatory proteins of the intestinal parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite immunology* 28, 463-472.
- Rzepecka, J., Rausch, S., Klotz, C., Schnoller, C., Kornprobst, T., Hagen, J., Ignatius, R., Lucius, R., Hartmann, S., 2009. Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Molecular immunology* 46, 1109-1119.
- Sarti-Gutierrez, E.J., Schantz, P.M., Lara-Aguilera, R., Gomez Dandoy, H., Flisser, A., 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop Med Parasitol* 39, 194-198.
- Smith, K.A., Harcus, Y., Garbi, N., Hammerling, G.J., MacDonald, A.S., Maizels, R.M., 2012. Type 2 innate immunity in helminth infection is induced redundantly and acts autonomously following CD11c(+) cell depletion. *Infection and immunity* 80, 3481-3489.
- Sorvillo, F.J., DeGiorgio, C., Waterman, S.H., 2007. Deaths from cysticercosis, United States. *Emerging infectious diseases* 13, 230-235.
- Spolski, R.J., Corson, J., Thomas, P.G., Kuhn, R.E., 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite immunology* 22, 297-305.
- Suchitra, S., Anbu, K.A., Rathore, D.K., Mahawar, M., Singh, B.P., Joshi, P., 2008. *Haemonchus contortus* calreticulin binds to C-reactive protein of its host, a novel survival strategy of the parasite. *Parasite immunology* 30, 371-374.
- Suchitra, S., Joshi, P., 2005. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochimica et biophysica acta* 1722, 293-303.
- Terrazas, C.A., Gomez-Garcia, L., Terrazas, L.I., 2010a. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *International journal for parasitology* 40, 1051-1062.
- Terrazas, C.A., Terrazas, L.I., Gomez-Garcia, L., 2010b. Modulation of dendritic cell responses by parasites: a common strategy to survive. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 357106.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of parasitology* 84, 74-81.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

REFERENCIAS

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 4350-4354.
- Verma, A., Prasad, K.N., Cheekatla, S.S., Nyati, K.K., Paliwal, V.K., Gupta, R.K., 2011. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Medical microbiology and immunology* 200, 255-261.
- Wang, W.A., Groenendyk, J., Michalak, M., 2012. Calreticulin signaling in health and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 842-846.
- Yadav, S., Gupta, S., Selvaraj, C., Doharey, P.K., Verma, A., Singh, S.K., Saxena, J.K., 2014. In silico and in vitro studies on the protein-protein interactions between *Brugia malayi* immunomodulatory protein calreticulin and human C1q. *PloS one* 9, e106413.

RESEARCH ARTICLE

Cytokine, Antibody and Proliferative Cellular Responses Elicited by *Taenia solium* Calreticulin upon Experimental Infection in Hamsters

Fela Mendlovic^{1,2}, Mayra Cruz-Rivera¹, Guillermina Ávila¹, Gilberto Vaughan³, Ana Flisser^{1*}

1 Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, México D.F. 04510, México, **2** Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac, México Norte, Av. Universidad Anáhuac 46, Huixquilucan, 52786 Edo. de México, México, **3** AV BioSciences, Mexico City, Mexico

* flisser@unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Mendlovic F, Cruz-Rivera M, Ávila G, Vaughan G, Flisser A (2015) Cytokine, Antibody and Proliferative Cellular Responses Elicited by *Taenia solium* Calreticulin upon Experimental Infection in Hamsters. PLoS ONE 10(3): e0121321. doi:10.1371/journal.pone.0121321

Academic Editor: Alejandro Escobar-Gutiérrez, Instituto de Diagnostico y Referencia Epidemiologicos, MEXICO

Received: December 10, 2014

Accepted: January 30, 2015

Published: March 26, 2015

Copyright: © 2015 Mendlovic et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper. The accession number for the cytokine sequences used to design the qRT-PCR primers are listed in [Table 1](#).

Funding: AV BioSciences provided support in the form of salary for GV at the time of consultancy, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Abstract

Taenia solium causes two diseases in humans, cysticercosis and taeniosis. Tapeworm carriers are the main risk factor for neurocysticercosis. Limited information is available about the immune response elicited by the adult parasite, particularly the induction of Th2 responses, frequently associated to helminth infections. Calreticulin is a ubiquitous, multifunctional protein involved in cellular calcium homeostasis, which has been suggested to play a role in the regulation of immune responses. In this work, we assessed the effect of recombinant *T. solium* calreticulin (rTsCRT) on the cytokine, humoral and cellular responses upon experimental infection in Syrian Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). Animals were infected with *T. solium* cysticerci and euthanized at different times after infection. Specific serum antibodies, proliferative responses in mesenteric lymph nodes and spleen cells, as well as cytokines messenger RNA (mRNA) were analyzed. The results showed that one third of the infected animals elicited anti-rTsCRT IgG antibodies. Interestingly, mesenteric lymph node (MLN) cells from either infected or non-infected animals did not proliferate upon *in vitro* stimulation with rTsCRT. Additionally, stimulation with a tapeworm crude extract resulted in increased expression of IL-4 and IL-5 mRNA. Upon stimulation, rTsCRT increased the expression levels of IL-10 in spleen and MLN cells from uninfected and infected hamsters. The results showed that rTsCRT favors a Th2-biased immune response characterized by the induction of IL-10 in mucosal and systemic lymphoid organs. Here we provide the first data on the cytokine, antibody and cellular responses to rTsCRT upon *in vitro* stimulation during taeniosis.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist. AV BioSciences had no participation on consultancy, patents, products in development or marketed products related to this study. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Taenia solium is responsible for two diseases in humans, i.e. taeniosis and neurocysticercosis, which are caused by the adult tapeworm and the larval stage (cysticercus), respectively. Tapeworms lodge in the small intestine of human beings after ingestion of live cysticerci in contaminated, undercooked pork meat; develop into adult tapeworms and expel gravid proglottids full of eggs in feces. Accidental intake of eggs by humans results in the development of neurocysticercosis, due to the establishment of cysticerci in the central nervous system [1]. Neurocysticercosis is a public health problem in many developing countries [2]. Taeniosis is usually asymptomatic but epidemiological studies have shown that tapeworm carriers are the main risk factor for developing neurocysticercosis [3]. Human beings are the only definitive hosts for *T. solium*. Thus, the use of experimental models, such as the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*), is necessary to study the mechanisms involved in the immune response elicited by the tapeworm [4].

Helminth infections generally induce Th2 responses. Molecules derived from helminths that stimulate Th2 responses have been subject of current research for their potential regulatory immune functions [5,6]. However, only few molecules involved in triggering such responses have been recognized [7]. Calreticulin (CRT) is a ubiquitous and well-conserved protein found in all living cells except prokaryotes and fungi. CRT is a multifunctional protein with a house-keeping role in cellular calcium homeostasis and glycoprotein synthesis [8,9]. Additionally, there is growing evidence supporting its role in the induction and regulation of immune responses in different parasitic diseases [10]. For example, *Schistosoma mansoni* CRT is a strong T-cell immunogen capable of inducing IL-4 synthesis [11], while native *Heligmosomoides polygyrus* CRT has been shown to induce production of IL-4 and IL-10 by T cells from infected mice [12], suggesting that CRT is able to induce a Th2 response during helminth infections.

We have previously identified, cloned and expressed *T. solium* CRT as a recombinant protein (rTsCRT) with calcium binding functions and analyzed its expression pattern during *T. solium* development [12,13]. We have also characterized the immune response elicited by rTsCRT as an oral vaccine [14–16]. Nonetheless, the immune response to rTsCRT upon tapeworm infection has not been investigated. The aim of the present study was to characterize the cytokine, humoral and cellular immune responses against rTsCRT during experimental infection in the hamster model.

Methods

Ethics Statement

The Institutional Research and Ethics Committee of the Faculty of Medicine, National University of Mexico (UNAM) in accordance with the Mexican Official Guidelines (NOM-062-ZOO-1999) approved all animal procedures and the experimental protocol (Approval numbers for immune response experiments: 004–2010 and quantitative RT-PCR: 020–2011).

T. solium infection

Six-month-old outbred female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) were supplied with water and food *ad libitum*. Five animals were kept *per* cage and light/darkness was on a 12:12 hour cycle. Two weeks prior to infection, all hamsters were treated for intestinal parasites with three daily doses of albendazole (30mg/Kg) and a single dose of praziquantel (30 mg/kg). Two experiments were performed and hamsters were infected orally with 4 *T. solium* cysticerci obtained from the skeletal muscle of one naturally infected pig per experiment. Prior to infection, cysticerci were assayed for viability by *in vitro* evagination in the presence of 25% porcine bile

and only cysticerci from pigs that had parasites with >90% evagination were used. All hamsters in each experiment were infected at day 1 and were euthanized at 10, 20, and 30 days post infection (DPI) by inhalation of sevoflurane (Svofast, Baxter Int., Deerfield, IL). Two control groups were left uninfected. Blood, spleen and mesenteric lymph node (MLN) cells were collected for ELISA, lymphocyte proliferation assays and RT-PCR analyses.

Preparation of tapeworm crude extract and excretion/secretion products

Excretion and secretion (E/S) products and crude extract (TsCE) from tapeworms were prepared as follows: Hamsters were orally infected with 8 cysticerci at day 1 and immunosuppressed with methyl prednisolone acetate (2 mg, Depo-medrol, Pfizer, Mexico) at days 1, 15 and 30 [17]. *T. solium* mature tapeworms were obtained at 35 DPI, rinsed and incubated in sterile RPMI supplemented with antibiotics (Gibco, Grand Island, NY) for 24h at 37°C. For E/S products preparation culture medium was centrifuged at 3300xg for 15 min and E/S products were concentrated 100 fold using a Millipore concentrator (Millipore Corp, Bedford, MA) with a 10kDa molecular weight cut-off. For TsCE preparation, tapeworms were recovered from the culture medium, washed with phosphate buffer saline (PBS) and homogenized in 6.7 mM phosphate buffer plus 0.4 mM KCl and 1 mM MgCl₂, pH 7.4 using a homogenizer (Power-Gen125, Fisher Scientific, UK). Homogenates were then sonicated 3 times (Omniruptor 250, Omni Int. Inc., GA), centrifuged at 12000xg for 30 min to eliminate any particulate material and filtered using a 0.2 μm membrane. All working solutions contained complete protease inhibitors (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA) was used to measure protein concentration. Aliquots were kept at -70°C until use.

Expression and purification of recombinant TsCRT

The full coding region of the mature rTsCRT was cloned, expressed and the resulting protein was purified as described previously [13,14]. Briefly, *Escherichia coli* bacterial cultures were induced to express rTsCRT, treated with 20% sucrose in Tris buffer, centrifuged and sonicated. rTsCRT was submitted to 10% SDS-PAGE, the 50kDa band was electro-eluted. Residual LPS was eliminated by Detoxi-gel endotoxin removing columns (Pierce Biotechnology, IL, USA) and endotoxins were measured as reported elsewhere [14]. Purified rTsCRT was filtered using a 0.2μm filter and kept at -70°C until use.

Electrophoresis and western blot analysis of E/S products

To evaluate if TsCRT was secreted/excreted by the tapeworms, 25μg of E/S products were diluted in loading buffer under reducing conditions, boiled at 100°C for 5 min, and subjected to SDS-PAGE using a 10% polyacrylamide gel. Proteins were blotted to PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA) and incubated with either anti rTsCRT or control sera at a 1:5000 dilution [12]. HRP-labeled goat anti mouse IgG was used as secondary antibody (Zymed, CA). Blots were developed using 3–3' diaminobenzidine.

Analysis of antibody detection by enzyme-linked immunosorbent assay

Serum samples were analyzed by ELISA for the specific detection of anti-rTsCRT and anti-TsCE IgG antibodies as described previously [18]. Biotin conjugated anti-hamster IgG (eBioscience, San Diego, CA), streptavidin-HRP and ABTS (Invitrogen) were used. All incubations were followed by three washings with PBS plus 0.05% Tween 20. Absorbance was measured at 405 nm. The cut-off value was defined as the mean of the optical density obtained with the serum from uninfected animals plus two standard deviations.

Lymphocyte proliferation assay

Spleens and mesenteric lymph nodes (MLN) were dissected from uninfected and infected hamsters at 10, 20 and 30 DPI. Cell suspensions were obtained by disaggregation through a 70 µm cell strainer (BD Biosciences, San Jose, CA). 0.15 M ammonium-chloride-potassium buffer was used to lyse erythrocytes. The resulting cell suspensions were washed three times with RPMI culture medium with antibiotics (Gibco) by centrifugation at 1200 rpm at 4°C. Cells were counted, suspended in 10% FCS-supplemented RPMI and plated in 96-well flat-bottom plates (Nalge Nunc Int., Rochester, NY) in presence of medium alone, 10 µg/ml rTsCRT, 25 µg/ml TsCE or 2 µg/ml concanavalin A (Con A, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Triplicate cultures consisting of 2x10⁵ cells were maintained at 37°C in a CO₂ incubator for 5 days. Eight hours before harvesting, ³H thymidine (PerkinElmer, Wellesley, MA) was added to each well and the radioactive label was measured using a cell harvester and counter (MicroBeta Trilux, PerkinElmer).

RNA isolation and cytokine quantification by quantitative RT-PCR

Spleen and MLN cells were isolated and stimulated as described above. Triplicate cultures consisting of 3x10⁵ were maintained at 37°C in a CO₂ incubator for 5 days, and plated in 96-well flat-bottom-plates. RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer’s recommendations. RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and quantified at 260 nm using a Genequant spectrophotometer (BioRad). RNA samples were treated with DNase (Invitrogen) following manufacturer’s instructions. cDNA was prepared from 1.2 µg RNA by reverse transcription using a Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen). The cDNA samples were kept at -20°C until use. TibMolbiol LLC (Adelphia, NJ) designed the primers for β-actin, IL-4 and IL-5; the primers for IL-10 were synthesized according to Espitia *et al.* [19]. Nucleotide sequences, Tm values, product size and Genbank accession numbers are shown in Table 1.

For each primer combination, optimal primer and MgCl₂ concentrations, as well as annealing temperatures were experimentally determined. cDNA amplification was performed using the LightCycler 2.0 instrument (Roche Applied Science). The reaction mixture consisted of 1µl cDNA, 3mM MgCl₂, 0.5µM of each primer, and 1µl LightCycler FastStart DNA Master SYBR I Green mix (Roche Applied Science) in a final volume of 10µl. For the non-template control, water was added to the reaction instead of cDNA. The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles each consisting of denaturation at 95°C for 10s, annealing at 60°C for 5s, and extension at 72°C for 9s. Fluorescence was acquired

Table 1. Nucleotide sequences of primers for hamster genes.

Cytokine	Primer sequence	Tm (°C)	GenBank accession number
β-Actin F	5' TGTACCCAGGCATTGCTGAC 3'	58.2	AF047041
β-Actin R	5' TCATCGTACTCCTGCTTGCTGA 3'	58.5	
IL-4 F	5' CTTCTAGCATGTACCGGGAAGT 3'	58.8	AF04621
IL-4 R	5' CTCAAGCACAGGGTCACCTC 3'	58.8	
IL-5 F	5' GCCGTAGCCATGGAGATC 3'	54.6	JQ290352
IL-5 R	5' CGATGCACAGCTGGTGGTGAT 3'	55.4	
IL-10 F	5' GGTGCCAAACCTTATCAGAAATG 3'	54.0	AF046210
IL-10 R	5' TTCACCTGTTCACAGCCTTG 3'	54.4	

Tm: Melting temperature

doi:10.1371/journal.pone.0121321.t001

after each extension phase. After amplification, a melting curve analysis was performed to assess the specificity of the product. Standard curves for each primer set were generated from ten-fold serial dilutions of cDNA starting at a 1:10 and used to calculate the PCR efficiencies using the LightCycler software. Relative quantification calculations were performed by the Pfaffl method [20]. Non-stimulated cells were used as controls in all experiment.

Statistical Analysis

Data are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). The Kruskal-Wallis test for non-parametric data with Dunn post-test was used. *P* values <0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed using the Prism 6.0 software (Graphpad Prism, San Diego, CA).

Results

Presence of TsCRT in E/S of cultured tapeworms

The identification of TsCRT in E/S products was performed in supernatants of *in vitro* cultured tapeworms recovered from immunosuppressed hamsters and analyzed by western blot using specific anti-rTsCRT polyclonal antibodies. Among the proteins present in the *T. solium* E/S products separated by SDS-PAGE, a band of ~ 50 kDa reacted with the anti-rTsCRT serum (Fig. 1). This molecular weight corresponds to the expected size of TsCRT.

TsCRT specific humoral immune response

The capacity of TsCRT to induce a specific IgG response in infected animals at different DPI by ELISA was investigated. Fig. 2 shows the presence of specific IgG antibodies reacting to TsCE (Fig. 2A) and the purified rTsCRT (Fig. 2B). Between 28 and 33% of hamsters showed anti-TsCRT specific antibodies at 20 and 30 DPI respectively. Anti-TsCE OD values increased along the experiment starting at 10 DPI, and at 20 and 30 DPI all infected hamsters were positive ($p < 0.05$).

Local and systemic lymphoproliferative responses

The ability of TsCE and rTsCRT to induce *in vitro* responses during *T. solium* infection was assessed by lymphoproliferative assays in MLN (local) and spleen (systemic) cells. Con A was used as positive control for all proliferation assays (data not shown). Fig. 3 shows the proliferative response to TsCE and rTsCRT before infection and at different DPI. MLN cells did not show significant levels of proliferation in response to rTsCRT or TsCE (Fig. 3A). In contrast, TsCE induced a significant proliferative response in spleen cells at 20 and 30 DPI ($P < 0.05$). rTsCRT showed an increase in the proliferation levels of spleen cells at 20 DPI that were not statistical significant (Fig. 3B).

Cytokine profile induced during *T. solium* taeniosis

To analyze if TsCE and rTsCRT induce a Th2 immune response during *T. solium* infection, the relative expression of IL-4, IL-5 and IL-10 in spleen and MLN cells from uninfected and infected hamsters in response to *in vitro* stimulation at different DPI was evaluated. Fig. 4 shows the expression of mRNA for IL-4, IL-5 and IL-10 relative to β -actin assessed by quantitative RT-PCR. Stimulation with TsCE resulted in an increased expression of IL-4 and IL-5 transcripts in both MLN and spleen cells at 20 and 30 DPI compared to non-stimulated cells (Fig. 4A, B, C, and D) while rTsCRT induced a significant increase of the IL-4 mRNA levels in MLN cells from uninfected hamsters ($p < 0.05$) but not from spleen cells (Fig. 4A and B). Only MLN cells from infected hamsters at 30 DPI increased IL-5 mRNA expression in response to

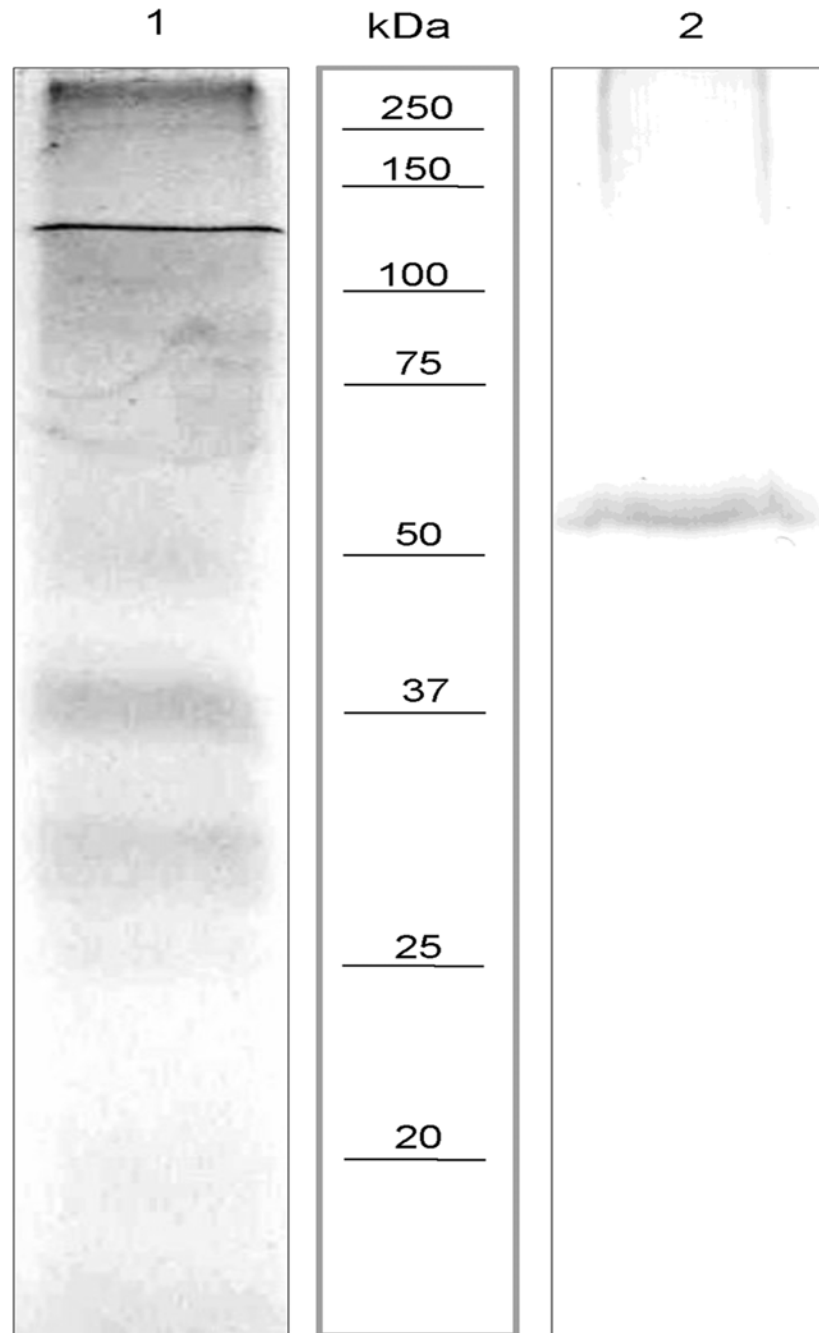


Fig 1. TsCRT identification in E/S products obtained from *in vitro* cultured tapeworms. E/S products were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (lane 1). Samples were blotted to PVDF membranes after SDS PAGE and analyzed by western blot with anti-rTsCRT serum (lane 2). Molecular weight markers (kDa) are shown in the center lane.

doi:10.1371/journal.pone.0121321.g001

rTsCRT stimulation ($P < 0.05$, Fig. 4D). Interestingly, cells from uninfected and infected hamsters significantly induced IL-10 mRNA expression in response to rTsCRT stimulation, with the exception of MLN cells from 20 DPI. Stimulation with TsCE did not result in a significant increase of transcript levels for the IL-10 immunoregulatory cytokine neither in MLN nor spleen cells (Fig. 4E and F).

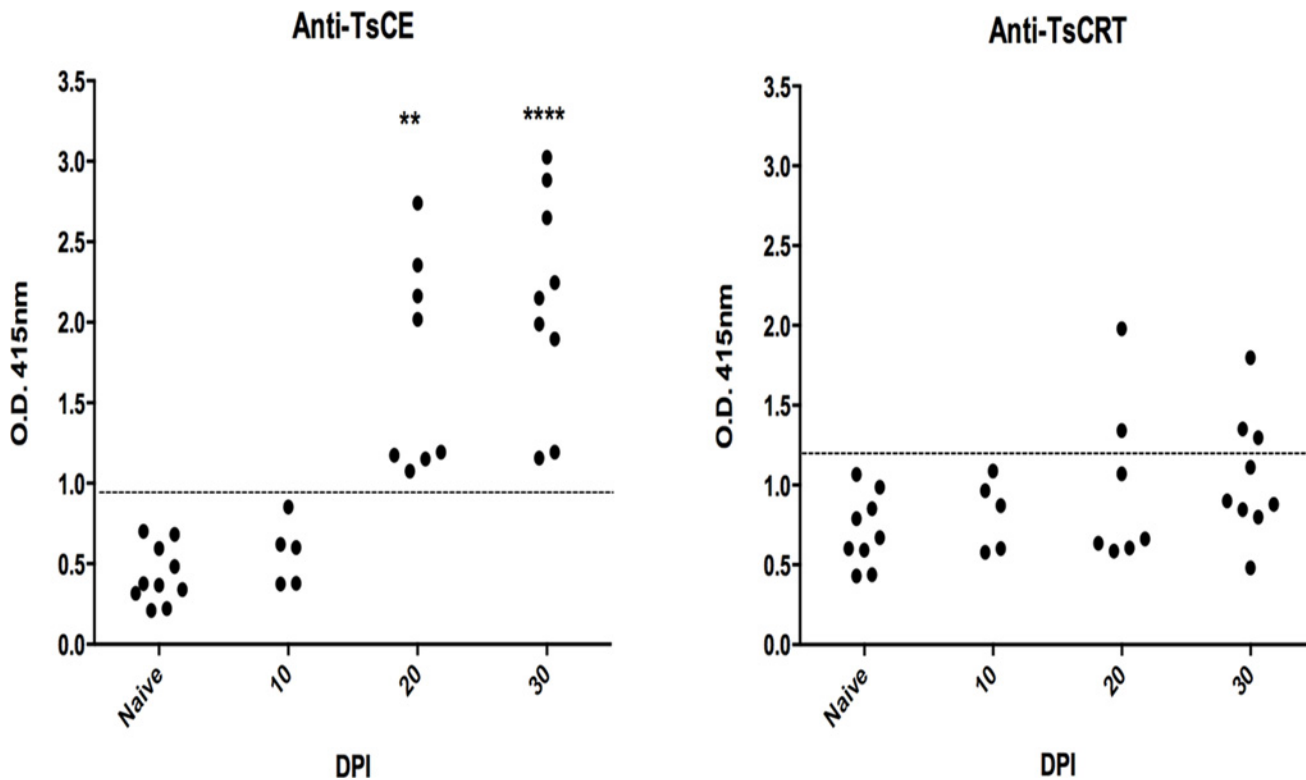


Fig 2. Presence of IgG antibodies after oral infection with *T. solium* cysticerci. ELISA testing was used to detect specific antibodies. A) Anti-TsCE IgG and B) anti-rTsCRT antibodies present in the sera obtained from uninfected and infected hamsters. Each dot refers to an individual hamster and the discontinuous lines represent the cutoff value that was calculated as the mean OD of the uninfected group plus 2 standard deviations. Kruskal-Wallis: ** $p < 0.01$ and **** $p < 0.0001$ as compared to the uninfected animals.

doi:10.1371/journal.pone.0121321.g002

Discussion

Here we have described the immune response elicited by *T. solium* TsCRT upon infection in the hamster model. Interestingly, *T. solium* TsCRT induced a robust IL-10 response in both MLN and spleen cells from infected and uninfected animals within a prevalent Th2 microenvironment characterized by increased levels of IL-4 and IL-5. These findings are of importance owed to the fact that Th2 responses prevail during helminth infections. Additionally, the presence of native TsCRT in tapeworms E/S products was confirmed.

CRT is involved in cellular Ca^{2+} homeostasis; however, there is growing evidence of its role in immune regulation [10]. IL-10 expression induced by rTsCRT in local and systemic lymphoid organs upon *in vitro* stimulation is in agreement with previous reports [21]. This is important for the parasite life cycle as a mechanism to modulate the host immune response [22,23]. IL-10 induction is a common feature shared by different helminths, presumably, associated with parasite survival [24,25]. In human neurocysticercosis, asymptomatic patients usually present elevated levels of IL-10, suggesting that IL-10 might play a role in disease outcome [26]. Increased IL-10 production has been associated to immunoregulation in helminth chronic infection in humans and animal models [23], and also contribute to the maintenance of the Th2 response by inhibiting Th1 responses [27]. Additionally, IL-10 acts as an anti-inflammatory cytokine preventing the pathology associated with parasite infections, down-regulating the host immune response [6,28]. Thus, TsCRT might contribute to the overall masking strategy

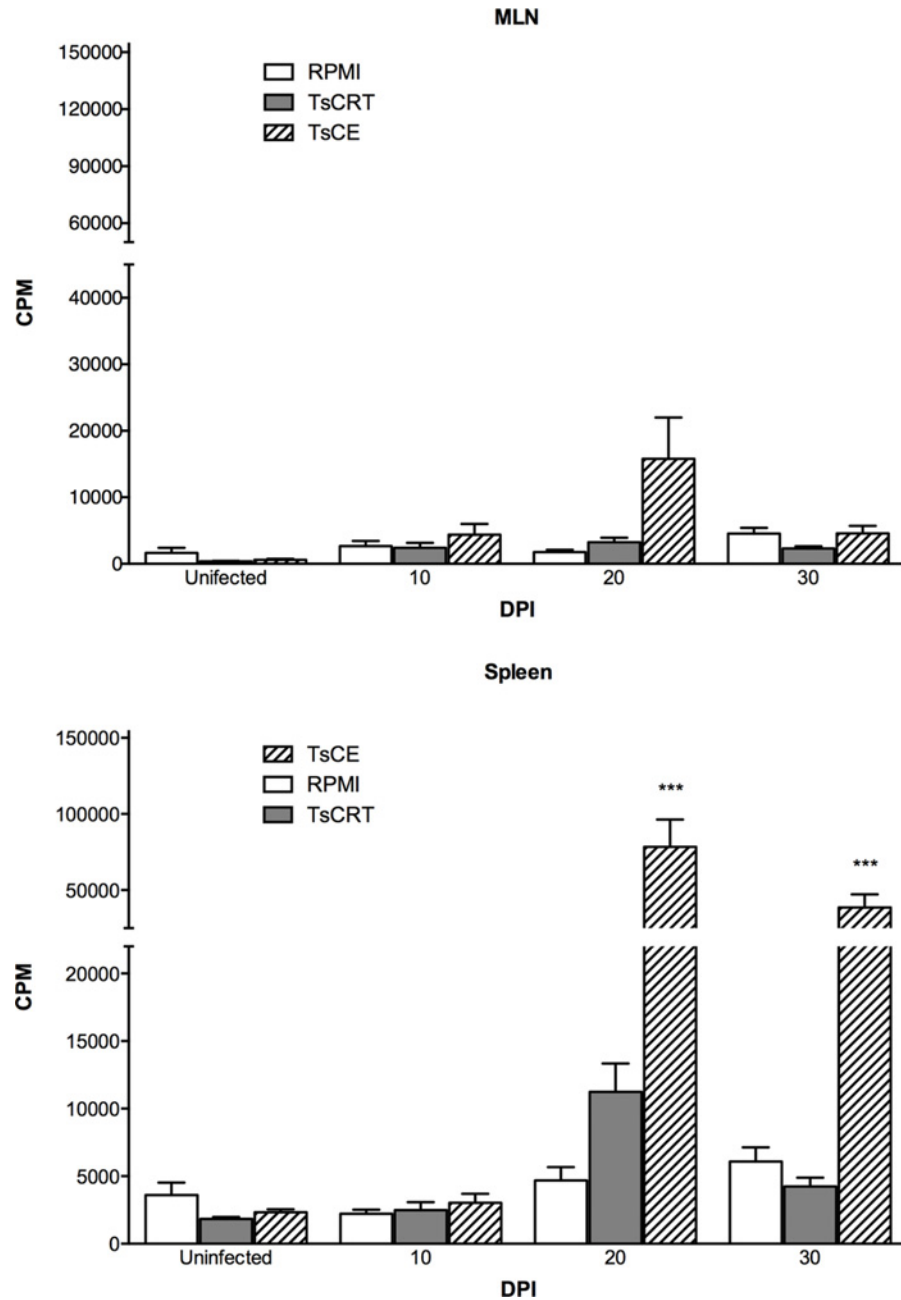


Fig 3. Proliferative responses of MLN (A) and spleen (B) cells from uninfected and infected hamsters to purified rTsCRT and TsCE. White bars represent data from cells incubated in RPMI alone, grey bars from cells incubated with rTsCRT, and hatched bars indicate the response to TsCE. Bars represent mean \pm SEM of ^3H thymidine incorporation from triplicate cultures of cells obtained from 6 animals. Kruskal-Wallis: *** $P < 0.001$ as compared to the RPMI control.

doi:10.1371/journal.pone.0121321.g003

developed by *T. solium* to escape the host response in an unfavorable microenvironment, characterized by mediators and cytokines that influence parasite expulsion.

As observed in other helminths [29–31], Th2 type responses are primarily developed during *T. solium* infection. Several reports have suggested the pivotal role of IL-4 in host protective responses against parasite infections [32]. Interestingly, stimulation with TsCE, but not rTsCRT,

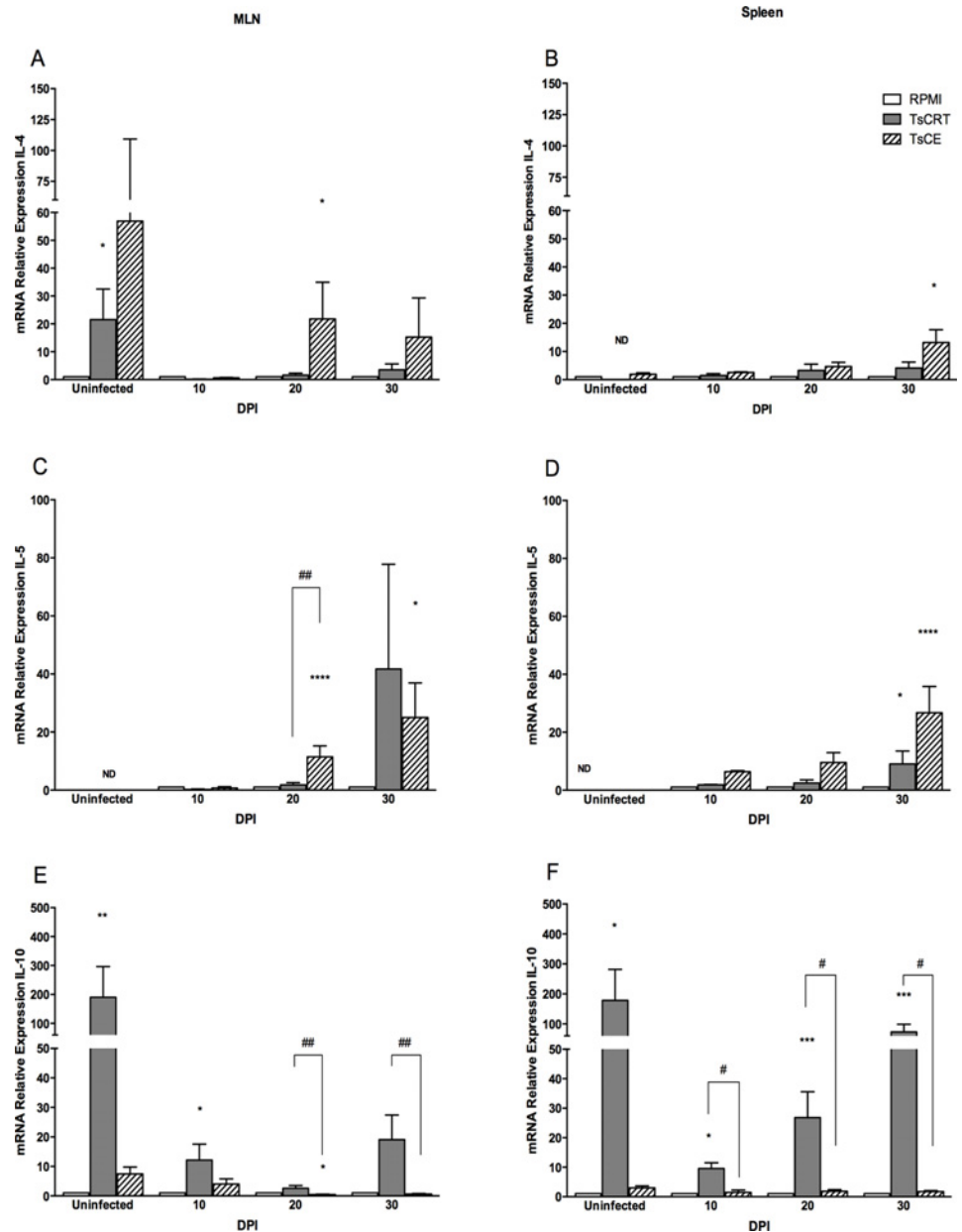


Fig 4. Cytokine mRNA expression by MLN and spleen cells after *in vitro* stimulation with TsCE and rTsCRT. cDNA was prepared from mRNA obtained from MLN (A, C, D) or spleen (B, D, E). mRNA levels of IL-4 (A, B) IL-5 (C, D) and IL-10 (E, F) were determined by quantitative RT-PCR. Data are expressed as the mean of the ratio of each cytokine relative to β -actin (housekeeping gene). White bars represent data from cells incubated in RPMI alone, grey bars from cells incubated with rTsCRT and hatched bars with TsCE. Bars represent mean \pm SEM of relative expression from triplicate cultures of cells obtained from 6 animals. Kruskal-Wallis: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ rTsCRT-induced expression as compared to the RPMI control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ rTsCRT-induced expression as compared to TsCE. ND, not detected.

doi:10.1371/journal.pone.0121321.g004

resulted in increased synthesis of both IL-4 and IL-5 mRNA upon infection. Our data are in agreement with previous studies where IL-4 and IL-5 positive cells were detected at the tape-worm anchor site [33]. IL-4 is an important driver in T helper cell development leading to Th2 responses guided by antigen presenting cells [34]. Additionally, IL-5 is required for eosinophils

maturation and is frequently produced along other Th2 type cytokines such as IL-4. The fact that rTsCRT did not stimulate expression of these two Th2 cytokines suggests that other parasite factors present in the TsCE besides TsCRT, contribute to the Th2 response prevailing during *T. solium* infection.

The golden hamster model of taeniosis reflects to some extent the early stages of infection produced by the *T. solium* tapeworm in humans. In this study, no proliferation in response to antigen stimuli was observed in MLN cells. Conversely, spleen cells showed a rather strong cell proliferation *in vitro* upon stimulation. During experimental taeniosis, parasite antigens are present in circulation, and this could explain, at least partially, the priming of spleen cells [18]. The lack of response in MLN, might depend on “local” dynamics involved in the immune response being elicited and may vary based on the participating cell subpopulations, as well as the prevailing cytokine microenvironment. MLN display unique immunologic properties and are programmed for tolerance induction [35]. For instance, *Trypanosoma cruzi* infection leads to lymphocyte depletion in the thymus and MLN due to apoptosis, while subcutaneous lymph nodes and spleen cells undergo vigorous lymphocyte proliferation [36,37]. Other mechanisms, such as cytokine deprivation by subsets of T cells or tolerogenic dendritic cells or macrophages might promote cell anergy and/or hyporesponsiveness, impairing local cell immunity [38,39]. Our results are in agreement with the notion that parasite infections commonly lead to different degrees of immunosuppression [31,40]. Nonetheless, the relative unresponsiveness of immune cell in specific lymphoid organs during *T. solium* infection warrants further research.

Our western blot analysis suggests that TsCRT is secreted by *T. solium* adult parasites. TsCRT is also present in crude extracts of cysticerci and tapeworms and its localization suggests a role in parasite development [12]. Likewise, CRT has been identified as a secreted protein in different nematodes [41]. The identification of anti-TsCRT IgG antibodies observed in one third of infected hamsters suggests that TsCRT is secreted *in vivo*.

In conclusion, this is the first study characterizing the Th2 immune response elicited by rTsCRT upon *T. solium* infection. The identification of helminth-derived molecules playing a role in the host-parasite interface during experimental taeniosis is an area of current study that may help unveil and better understand the host anti-parasite response. The ability of rTsCRT to induce IL-4 and IL-10 expression in cells from uninfected hamsters might be explained by its interaction with immature dendritic cells or tolerogenic macrophages. Our results suggest that the host response against rTsCRT features a robust IL-10 response. Future studies should aim to analyze the interaction of rTsCRT with different types of immune cells and elucidate the receptors and signaling pathways involved, as well as the resulting phenotypic changes of the responding cells.

Acknowledgments

We thank Dr. Libia Vega Loyo and Elizabet Estrada Muñiz, MSc, from the Department of Toxicology at CINVESTAV IPN, for their technical assistance in the ³H thymidine incorporation experiments. We are thankful to Ulises Gonzalez for obtaining the partial sequence of hamster IL-5 and to Lizeth Hernandez and Bernardo Oldak for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FM AF. Performed the experiments: FM MC. Analyzed the data: FM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MC GA. Wrote the paper: FM AF. Helped with the qRTPCR methodology: GV. Revised the paper: FM AF.

References

1. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta tropica*. 2003; 87(1):43–51. Epub 2003/06/05. PMID: [12781377](#)
2. Sorvillo FJ, DeGiorgio C, Waterman SH. Deaths from cysticercosis, United States. *Emerging infectious diseases*. 2007; 13(2):230–5. Epub 2007/05/08. doi: [10.3201/eid1302.060527](#) PMID: [17479884](#)
3. Sarti-Gutierrez EJ, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gomez Dandoy H, Flisser A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop Med Parasitol*. 1988; 39(3):194–8. Epub 1988/09/01. PMID: [3194663](#)
4. Flisser A, Avila G, Maravilla P, Mendlovic F, Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, et al. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. *Parasitology*. 2010; 137(3):347–57. Epub 2010/03/02. doi: [10.1017/S0031182010000272](#) PMID: [20188011](#)
5. McSorley HJ, Maizels RM. Helminth infections and host immune regulation. *Clinical microbiology reviews*. 2012; 25(4):585–608. Epub 2012/10/05. doi: [10.1128/CMR.05040-11](#) PMID: [23034321](#)
6. Elliott DE, Weinstock JV. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2012; 1247:83–96. Epub 2012/01/14. doi: [10.1111/j.1749-6632.2011.06292.x](#) PMID: [22239614](#)
7. Harnett W, Harnett MM. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nature reviews Immunology*. 2010; 10(4):278–84. Epub 2010/03/13. doi: [10.1038/nri2730](#) PMID: [20224568](#)
8. Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal*. 1999; 344 Pt 2:281–92. Epub 1999/11/24. PMID: [10567207](#)
9. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012; 44(6):842–6. Epub 2012/03/01. doi: [10.1016/j.biocel.2012.02.009](#)
10. Rzepecka J, Rausch S, Klotz C, Schnoller C, Kornprobst T, Hagen J, et al. Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Molecular immunology*. 2009; 46(6):1109–19. Epub 2008/12/26. doi: [10.1016/j.molimm.2008.10.032](#) PMID: [19108896](#)
11. El Gengehi N, El Ridi R, Tawab NA, El Demellawy M, Mangold BL. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin. *The Journal of parasitology*. 2000; 86(5):993–1000. Epub 2000/12/29. doi: [10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0993:ASMKB\]2.0.CO;2](#) PMID: [11128523](#)
12. Mendlovic F, Carrillo-Farga J, Torres J, Laclette JP, Flisser A. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *The Journal of parasitology*. 2006; 92(4):789–95. Epub 2006/09/26. doi: [10.1645/GE-724R1.1](#) PMID: [16995397](#)
13. Mendlovic F, Ostoa-Saloma P, Solis CF, Martinez-Ocana J, Flisser A, Laclette JP. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *The Journal of parasitology*. 2004; 90(4):891–3. Epub 2004/09/11. doi: [10.1645/GE-3325RN](#) PMID: [15357095](#)
14. Fonseca-Coronado S, Ruiz-Tovar K, Perez-Tapia M, Mendlovic F, Flisser A. *Taenia solium*: immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice. *Experimental parasitology*. 2011; 127(1):313–7. Epub 2010/08/10. doi: [10.1016/j.exppara.2010.07.017](#) PMID: [20691181](#)
15. Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Mendlovic F, Avila-Ramirez G, Carrero JC, Laclette JP, et al. Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination. *Methods*. 2009; 49(4):346–50. Epub 2009/08/05. doi: [10.1016/j.ymeth.2009.07.007](#) PMID: [19651215](#)
16. Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, Mendlovic F, Romero-Valdovinos M, Vaughan G, Salazar AM, et al. Immunological mechanisms involved in the protection against intestinal taeniosis elicited by oral immunization with *Taenia solium* calreticulin. *Experimental parasitology*. 2012; 132(3):334–40. Epub 2012/08/28. doi: [10.1016/j.exppara.2012.08.006](#) PMID: [22921496](#)
17. Avila G, Aguilar L, Benitez S, Yopez-Mulia L, Lavenat I, Flisser A. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *International journal for parasitology*. 2002; 32(10):1301–8. Epub 2002/09/03. PMID: [12204230](#)
18. Avila G, Benitez M, Aguilar-Vega L, Flisser A. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitology research*. 2003; 89(4):284–9. Epub 2003/03/13. doi: [10.1007/s00436-002-0605-8](#) PMID: [12632165](#)
19. Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World

- cutaneous leishmaniasis. *BMC immunology*. 2010; 11:31. Epub 2010/06/24. doi: [10.1186/1471-2172-11-31](https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-31) PMID: [20569429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20569429/)
20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29(9):e45. Epub 2001/05/09. PMID: [11328886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11328886/)
 21. Figueiredo CA, Barreto ML, Rodrigues LC, Cooper PJ, Silva NB, Amorim LD, et al. Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infection and immunity*. 2010; 78(7):3160–7. Epub 2010/04/21. doi: [10.1128/IAI.01228-09](https://doi.org/10.1128/IAI.01228-09) PMID: [20404082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20404082/)
 22. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature reviews Immunology*. 2011; 11(6):375–88. Epub 2011/05/26. doi: [10.1038/nri2992](https://doi.org/10.1038/nri2992) PMID: [21610741](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21610741/)
 23. McSorley HJ, Hewitson JP, Maizels RM. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *International journal for parasitology*. 2013; 43(3–4):301–10. Epub 2013/01/08. doi: [10.1016/j.ijpara.2012.11.011](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.11.011) PMID: [23911309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23911309/)
 24. Hernandez JL, Leung G, McKay DM. Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *International journal for parasitology*. 2013; 43(3–4):233–43. Epub 2012/10/13. doi: [10.1016/j.ijpara.2012.09.005](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.005) PMID: [23911309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23911309/)
 25. Persaud R, Wang A, Reardon C, McKay DM. Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the non-permissive mouse host. *International journal for parasitology*. 2007; 37(3–4):393–403. Epub 2006/11/10. doi: [10.1016/j.ijpara.2006.09.012](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.012)
 26. Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Medical microbiology and immunology*. 2011; 200(4):255–61. Epub 2011/05/03. doi: [10.1007/s00430-011-0198-x](https://doi.org/10.1007/s00430-011-0198-x) PMID: [21533784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21533784/)
 27. Balic A, Harcus YM, Taylor MD, Brombacher F, Maizels RM. IL-4R signaling is required to induce IL-10 for the establishment of T(h)2 dominance. *International immunology*. 2006; 18(10):1421–31. Epub 2006/08/31. doi: [10.1093/intimm/dxl075](https://doi.org/10.1093/intimm/dxl075) PMID: [16940042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940042/)
 28. Yazdanbakhsh M, Wahyuni S. The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Current opinion in allergy and clinical immunology*. 2005; 5(5):386–91. Epub 2005/09/01. PMID: [16131911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16131911/)
 29. Allen JE, Maizels RM. Immunology of human helminth infection. *International archives of allergy and immunology*. 1996; 109(1):3–10. Epub 1996/01/01. PMID: [8527948](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8527948/)
 30. Bancroft AJ, Grencis RK. Th1 and Th2 cells and immunity to intestinal helminths. *Chemical immunology*. 1998; 71:192–208. Epub 1998/10/08. PMID: [9761955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9761955/)
 31. Loukas A, Prociv P. Immune responses in hookworm infections. *Clinical microbiology reviews*. 2001; 14(4):689–703, table of contents. Epub 2001/10/05. doi: [10.1128/CMR.14.4.689-703.2001](https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.689-703.2001) PMID: [11585781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11585781/)
 32. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr., Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature reviews Immunology*. 2007; 7(12):975–87. Epub 2007/11/17. doi: [10.1038/nri2199](https://doi.org/10.1038/nri2199) PMID: [18007680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18007680/)
 33. Avila G, Aguilar L, Romero-Valdovinos M, Garcia-Vazquez F, Flisser A. Cytokine response in the intestinal mucosa of hamsters infected with *Taenia solium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1149:170–3. Epub 2009/01/06. doi: [10.1196/annals.1428.079](https://doi.org/10.1196/annals.1428.079) PMID: [19120202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19120202/)
 34. Liu Q, Liu Z, Roza CT, Hamed HA, Alem F, Urban JF Jr., et al. The role of B cells in the development of CD4 effector T cells during a polarized Th2 immune response. *J Immunol*. 2007; 179(6):3821–30. Epub 2007/09/06. PMID: [17785819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17785819/)
 35. Pabst O, Wahl B, Bernhardt G, Hammerschmidt SI. Mesenteric lymph node stroma cells in the generation of intestinal immune responses. *J Mol Med (Berl)*. 2009; 87(10):945–51. Epub 2009/08/04. doi: [10.1007/s00109-009-0502-z](https://doi.org/10.1007/s00109-009-0502-z) PMID: [19649572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19649572/)
 36. de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira DA, Villa-Verde DM, Savino W. Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(7):e417. Epub 2009/07/08. doi: [10.1371/journal.pntd.0000417](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000417) PMID: [19582140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19582140/)
 37. de Meis J, Barreto de Albuquerque J, Silva Dos Santos D, Farias-de-Oliveira DA, Berbert LR, Cotta-de-Almeida V, et al. Trypanosoma cruzi Entrance through Systemic or Mucosal Infection Sites Differentially Modulates Regional Immune Response Following Acute Infection in Mice. *Frontiers in immunology*. 2013; 4:216. Epub 2013/07/31. doi: [10.3389/fimmu.2013.00216](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00216) PMID: [23898334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23898334/)
 38. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology*. 2007; 8(12):1353–62. Epub 2007/11/06. doi: [10.1038/ni1536](https://doi.org/10.1038/ni1536) PMID: [17982458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17982458/)
 39. Mann ER, Li X. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2014; 20(29):9653–64. Epub 2014/08/12. doi: [10.3748/wjg.v20.i29.9653](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i29.9653) PMID: [25110405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25110405/)

40. Olatunde BO, Onyemelukwe GC. Immunosuppression in Nigerians with hookworm infection. *African journal of medicine and medical sciences*. 1994; 23(3):221–5. Epub 1994/09/01. PMID: [7604745](#)
41. Nagaraj SH, Gasser RB, Ranganathan S. Needles in the EST haystack: large-scale identification and analysis of excretory-secretory (ES) proteins in parasitic nematodes using expressed sequence tags (ESTs). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(9):e301. Epub 2008/09/30. doi: [10.1371/journal.pntd.0000301](#) PMID: [18820748](#)

Review Article

Dendritic Cells in the Gut: Interaction with Intestinal Helminths

Fela Mendlovic^{1,2} and Ana Flisser¹

¹ *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenue Universidad 3000, Colonia Copilco Universidad, México DF 04510, Mexico*

² *Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac México Norte, Avenue Universidad Anáhuac 46, Huixquilucan, 52786 Estado de México, Mexico*

Correspondence should be addressed to Ana Flisser, flisser@servidor.unam.mx

Received 22 August 2009; Revised 30 November 2009; Accepted 18 December 2009

Academic Editor: Luis I. Terrazas

Copyright © 2010 F. Mendlovic and A. Flisser. 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.

The mucosal environment in mammals is highly tolerogenic; however, after exposure to pathogens or danger signals, it is able to shift towards an inflammatory response. Dendritic cells (DCs) orchestrate immune responses and are highly responsible, through the secretion of cytokines and expression of surface markers, for the outcome of such immune response. In particular, the DC subsets found in the intestine have specialized functions and interact with different immune as well as nonimmune cells. Intestinal helminths primarily induce Th2 responses where DCs have an important yet not completely understood role. In addition, this cross-talk results in the induction of regulatory T cells (T regs) as a result of the homeostatic mucosal environment. This review highlights the importance of studying the particular relation “helminth-DC-milieu” in view of the significance that each of these factors plays. Elucidating the mechanisms that trigger Th2 responses may provide the understanding of how we might modulate inflammatory processes.

1. Introduction

Dendritic cells (DCs) were first identified around 140 years ago. Nevertheless their role in immunology was discovered more than 100 years later, in 1973; and, since then, ongoing research on their localization, phenotypic characterization, and functions is still taking place [1]. DCs in the intestine show two major paradoxical roles. On one hand they are responsible for the generation of immunological tolerance in absence of infection or danger signals, albeit the presence of a myriad of intestinal commensal microorganisms and alimentary antigens; and, on the other hand, they must be able to react and induce specific immune responses against pathogens [2, 3]. Intestinal helminths constitute a cause of high morbidity and chronic infections in humans [4]. Chronicity is probably associated with immunomodulation of the intestinal immune response. In this context, current evidence indicates that helminth products are capable of inhibiting *in vitro* generated DCs [5–7]. While there is a vast amount of studies on DCs and gut bacteria [8, 9], only few publications describe the interaction of intestinal

parasites and these cells. Since DCs from intestine have inherent characteristics regarding their ability to induce Th2 responses [2, 3, 10], the study of this particular interaction is of fundamental importance. The cross-talk between intestinal helminths or their excretion/secretion (E/S) products and the different DC subsets present in the gut, which result in the induction of Th2 responses and regulatory T cells (T regs) in that milieu, is reviewed.

2. Intestinal Immunity

The first line of defense against pathogens and exogenous antigens present in the gastrointestinal (GI) tract includes the physical barrier provided by epithelial cells (enterocytes), the tight junctions formed between them, the ciliary movements, the mucus secretion by goblet cells on the apical portion of the mucosa, microfold (M) cells, the cytotoxic activity of natural killer cells, as well as the production of antibacterial peptides by Paneth cells that include defensins, lysozyme, and secretory phospholipase A2. The adaptive immune system in the GI tract includes the GI-associated lymphoid tissue

(GALT), comprising Peyer's patches (PPs), isolated lymphoid follicles (ILFs), and diffuse lymphoid cells present along the lamina propria (LP) in the small intestine. In the large intestine, caecal and rectal patches are similar to individual follicles of the PPs. Cryptopatches (CPs), aggregates of lymphocytes and DCs should also be considered part of the immune system, since they are present throughout both the small and large intestines, in the LP between the crypts [11]. CPs have been shown to develop into ILFs recruiting B cells, in response to Gram-negative commensal bacteria through recognition of NOD-1 (nucleotide-binding oligomerization containing domain 1) and toll-like receptors resulting in generation and maturation of B cells, respectively. In addition, alterations in gut microflora composition occur in mice that lack NOD-1 showing reciprocal regulation of the intestinal microflora and ILFs which in turn affects intestinal homeostasis [12]. These findings can significantly contribute to development of novel treatments for pathologies involving intestinal inflammation through the modulating capacity of commensal by-products. The gut epithelium, lamina propria, and intraepithelial lymphocytes (IELs) represent the lymphoid effector sites, while mesenteric lymph nodes (MLNs), PPs, and ILFs are considered inductive sites where immune responses are initiated. Immune cells migrate from LP and PPs via efferent lymphatics to MLN and finally reach effector sites, traveling through the thoracic duct and blood circulation.

PPs consist of collections of closely associated lymphoid follicles. The epithelium that covers these aggregates, termed follicle-associated epithelium, is characterized by the presence of specialized cells, M cells that lack cilia and take up antigens releasing them at the basal surface, where associated antigen presenting cells start their processing and latter presentation to lymphocytes. Just beneath the follicle-associated epithelium, PPs consist of a dome region, populated by T and B cells, macrophages, and different subsets of DCs. B cells that switch to IgA producing plasma cells that prevail in the germinal centers and TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ T cells, which represent the predominant phenotype, are found in interfollicular regions accompanied by interstitial DCs. TCR $\gamma\delta$ and CD8⁺ T cells are also present. PPs contain both naïve and memory T and B cells whereas in the LP only memory cells and fully differentiated plasma cells are present. The spatial cell organization of these lymphoid organs makes them suitable to deal with both harmless and hazardous stimuli from incoming antigens. DCs represent one of the cell types in charge of differentiating between these two completely opposite phenomena and regulating the outcome of the immune response [2, 13].

Afferent lymphatics drain the epithelium and LP from both the small and large intestines to MLNs which are organized along the mesenteric side of the intestine and drain succeeding sections of the gut. Like other lymph nodes, MLN consist of B cells that are organized as lymphoid follicles in the cortex, while T cells and DCs shape the paracortical areas. Efferent lymphatic vessels leave the lymph node from the medulla and drain to the thoracic duct and finally to the systemic circulation. Stromal cells in MLN are important in imprinting antigen primed T cells with the capacity to

express $\alpha 4\beta 7$ integrin and chemokine receptor 9 (CCR9) that are essential molecules in gut homing. Expression of these two molecules is dependent on retinoic acid and stromal cells from MLN, but not from peripheral LN [14, 15]. In addition, MLNs have been shown to be important in the regulation of IgA responses since removal of these organized lymphoid structures results in an enhanced IgA response to orally administered antigens [16]. Thus, MLNs contribute to gut homeostasis and effector mechanisms by providing regulatory environmental factors.

Besides the organized tissues, cells in diffuse compartments, that is, cells in LP and IEL, are important players in mucosal immunity. Memory/effector cells home to the LP and plasma cell differentiation is accomplished in this compartment. LP stromal cells support IgA secreting plasma cells generation from B220⁺IgM⁺ lymphocytes [17]. The majority of IELs are T lymphocytes expressing CD3 and the T cell receptor, either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$. Most IELs in the small intestine are CD8⁺ and are able to express regulatory properties and secrete IL-10 and TGF- β . In addition, IELs are able to secrete cytokines and chemokines as well as cytotoxic molecules during inflammatory conditions contributing to the dual function of mucosal immunity in tolerance and defense [18].

3. DC Subsets

Several hematopoietic DC subsets have been described in mice and are often classified on the basis of the surface receptors they express, developmental origin, anatomical localization, migratory and functional properties, and their maturation state. Such heterogeneity makes a single classification of DCs rather difficult; nonetheless, some common phenotypical and functional characteristics are used to define DCs, besides their prominent dendritic appearance, both in situ and in vitro: (i) CD11c expression, (ii) endocytic ability, (iii) high expression of MHC-II molecules, and (iv) strong capacity to activate naïve T cells [19]. Hematopoietic DCs are subdivided in two main subsets: plasmacytoid DCs (pDCs) and conventional DCs (cDCs) [20]. A distinctive feature of pDCs is their rapid and very high production of type I IFN when properly stimulated (virus, DNA, etc.). When activated, expression of MHC-II and costimulatory molecules is upregulated. Compared to conventional DCs, pDCs are less efficient as antigen presenting cells, although they are able to stimulate naïve T cells in addition to cells from the innate immune response (e.g., natural killer cells). pDCs express intermediate amounts of CD11c⁺ and are B220⁺. These DCs mature in the bone marrow, are found in all lymphoid organs and blood, and are capable of recirculating [21]. On the other hand, cDCs are also bone marrow derived but emerge with an immature phenotype characterized by low expression of MHC-II and costimulatory molecules and are present in different organs and lymphoid tissues. cDCs can be further subdivided in migratory and resident DCs. Migratory DCs include Langerhans cells in epidermis and interstitial DCs in all organs and the gut, mainly in their immature state. Upon encountering antigen they drain to regional lymph nodes acquiring a mature phenotype, and in the case of the gut, they travel into T cell areas of MLN. The second subset

of cDCs is the resident DCs that are the only type present in spleen and thymus and account for ~50% of the DC population present in lymphoid organs probably emerging from blood precursors and differentiating in situ [3, 20, 21]. Until they encounter pathogens, resident DCs express an immature phenotype. These cells apparently do not exit lymphoid tissues and can be further subdivided depending on surface marker expression. All these cDC subsets express both CD11c and MHCII [2, 20].

As mentioned above, both pDCs and cDCs are able to modify their phenotype and functional capabilities in response to external stimuli resulting in a further classification of DCs in immature (naïve) and mature DCs. These two different conformations result in the differential expression of surface markers. Immature cells express very low levels of costimulatory molecules such as CD80, CD86, and CD40. In this state, DCs are highly endocytic and express C-type lectin receptors such as Langerin/CD207 and DEC 205, involved in antigen capture and internalization. In addition, innate receptors involved in antigen recognition such as Toll-like receptors (TLRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) are also present and are differentially expressed in the various subsets. In their mature state, DCs upregulate costimulatory surface antigens which are important for T cells interaction and activation [22, 23].

4. Intestinal DCs

Along the small and large intestines, DCs are present in different locations. Both pDCs and cDCs are present in PPs, MLN, as well as in the small intestinal and colonic LP and ILFs. Various DC subpopulations expressing different surface markers and showing diverse functional properties can be identified (Table 1). Surface antigen expression can be associated with specific locations within the lymphoid tissue and importantly with functional characteristics. For example, in PPs, DCs present underneath the follicle-associated epithelium are mainly immature cells expressing low MHC-I and -II and costimulatory molecules and are highly macropinocytic and phagocytic in order to sample the environment and process antigens that have passed through M cells. In addition, these immature DCs express Toll-like, C-type lectin, and scavenger receptors which recognize PAMPs that, in the presence of microbial products and danger signals released by damaged tissue, are able to activate and induce their maturation. Mature DCs expressing high levels of MHC-II, CD80, CD86, and CD40 lose their endocytic ability and migrate from the subepithelial dome to T cell areas within the PPs or to the regional lymph nodes, where they can efficiently present antigen and activate CD4⁺ T cells [2, 3].

Several examples of the unique functional properties and specific location of particular DC subsets can be cited. For instance, CD8α⁺ DCs are mainly found in the interfollicular region and preferentially secrete IL-12, while CD11b⁺ DCs produce IL-10 upon stimulation and are localized mainly in the subepithelial dome of the PPs. Moreover, CD11b⁺ DCs induce T cells to secrete IL-4 and IL-10, and thus, are

important in regulating immunity as well as facilitating IgA-mediated humoral responses [10, 24]. Additionally, CD11b⁺ DCs in PPs and MLN internalize secretory IgA. Neither CD8α⁺ nor DCs isolated from peripheral lymph nodes or spleen show this particular feature [25].

The majority of cDCs found in the LP are CD11b⁺, although small numbers of CD8α⁺ and double-negative cells (CD8α⁻ CD11b⁻) are present. Although CD11b⁺ cells are able to upregulate costimulatory molecules and prime specific T cells, when they are adoptively transferred into recipient mice, they induce a lower response and express mRNA for IL-10 and IFN-β. It is important to clarify that LP DCs were isolated from small intestine devoid of PPs but containing ILFs; thus, these DCs do not represent true LP DCs [26]. In a different study, a CD11c⁺ CD11b⁺ DC subset that produces retinoic acid and is able to induce differentiation of Th17 cells and IgA producing plasma cells in the LP, upon activation of TLR5, was identified [2, 27]. DCs isolated from LP could be contaminated with DCs present in ILFs; thus, immunohistochemical analysis should be performed to confirm which subsets are present in these two diffuse compartments. Interestingly, a CD103 expressing DC subset which constitutes ~25% of the total LP DC populations constitutively expresses IL-10 and favors the maintenance of tolerance by inducing, through TGF-β and retinoic acid dependent mechanisms, the generation of FoxP3⁺T regs in the intestine. These “regulatory DCs” are able to migrate to MLN in a CCR7 dependent manner [28–31]. Retinoic acid produced by CD103⁺ DCs imprints primed T cells and IgA expressing plasma cells to express gut homing receptors such as the integrin α4β7 and CCR 9 [32]. Accordingly, this DC subset expresses retinal dehydrogenase 2 (RALDH2), a key enzyme involved in the formation of retinoic acid from retinaldehyde [27]. In addition, some LP DCs are able to form tight-junction-like structures with enterocytes and project their dendrites to sample antigens in the intestinal lumen, both in normal conditions and during infection; hence, their name is “periscoping DCs” [33]. As cDCs in mucosal sites, pDCs in the GALT are able to induce differentiation of T reg cells and upon CpG-induced maturation retain their regulatory capacity, suggesting the necessity of a strict regulatory environment in the gut [34].

Recently, a different population of DCs arranged as a planar network has been identified after a sheet separation technique that results in two layers: one facing the lumen and the other one the serosa. These DCs were localized in the muscularis layer close to the serosa and have surface antigens characteristic of an immature phenotype. Upon systemic or oral stimulation with LPS or bacteria, they are able to acquire a mature phenotype even though they are not close to the intestinal lumen. In addition, a higher frequency of these muscularis DCs was detected in the large intestine, where the concentration of commensal bacteria is higher, suggesting a possible association with microbial external stimuli and a possible immunoregulatory role [23]. Concerning the large intestine, DCs in the colon are very similar to the subpopulations present in MLN and reside mainly in the subepithelial region and in the isolated lymphoid follicles. These DCs express IL-10 in a constitutive manner, again

TABLE 1: Intestinal DC subsets.

DC subset	Organ	Functional characteristics	References
*CD11b ⁺ DCs (1) **CD8 α ⁺ DCs (2) ***DN DCs (3)	Peyer's patches	(1) During infection recruited to FAE from subepithelial dome. (2) Produce IL-10. (3) Produce IL-12 and drive IFN γ by T cells.	[2, 3, 19]
*CD11b ⁺ DCs **CD8 α ⁺ DCs ***DN DCs CD8 α ^{int} CD103 ⁺	Mesenteric lymph nodes	CD11b ⁺ cells show higher capacity to secrete IL-10 and prime Th2 cells. CD103 ⁺ DC migrate from LP in a CCR7 dependent manner.	[3, 28, 35]
CD11b ⁺ CD8 α ^{int} CD103 ⁺	Lamina propria	Constitutive expression of IL-10 and IFN- β . Extend their dendrites to sample bacteria through epithelial cell tight junctions.	[26]
CD11b ⁺ DCs CD8 α ⁺ CD103 ⁺ DCs CD8 α ⁻ CD11b ^{lo} CD11b ⁺ CD103 ⁺	Colon	Constitutive expression of IL-10. Maintenance of T cell homeostasis. Concentrated in isolated lymphoid follicles (ILFs) few in lamina propria.	[2]
MHCII ⁺ CD11c ^{mid} Dec 205 ⁺ , Dec 207, CD14, CD16/32	Muscularis layer	Not known. Possible correlation with increasing number of commensal bacteria.	[23]
CD11c ⁺ , MHCII ⁺ (Lymphatic or "veiled" DCs)	Lymphatic vessels draining the intestine	Transport of apoptotic bodies from intestinal epithelial cells to regional lymph nodes.	[36]
CD11c ^{mid} B220 ⁺ (plasmacytoid DCs)	Peyer's patches, Mesenteric Lymph nodes, and Lamina Propria (small intestine and colon)	PPs: production of type I IFN regulated by IL-10, TGF- β , and prostaglandin E ₂ . MLN: induction of T regs.	[34, 37]

*CD11c⁺ CD11b⁺ CD8 α ⁻ (CD11b⁺).

**CD11c⁺ CD11b⁻ CD8 α ⁺ (CD8 α ⁺).

***CD11c⁺ CD11b⁻ CD8 α ⁻ (double negative: DN).

suggesting a role in peripheral tolerance mechanisms [2]. Thus, DC subsets with immunomodulatory properties are well represented along the GI tract.

5. Intestinal DCs and Infection

Helminth infections affect more than three billion people worldwide, mostly in underdeveloped countries. The study of the immune response against geohelminths has revealed the importance of these parasites not only in the ability to induce Th2 responses, but also in the modulatory role of the parasite or its products on the immune system of the host. The protective host's immune response induced by helminths is mediated by Th2 cells involving IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13 secretion, IgE, IgG1 production, and activation of effector cells such as mast cells, eosinophils, and basophils [5, 38, 39]. In addition, some helminths are able to persist in their hosts for many years by creating an antiinflammatory environment favorable to their survival and maintenance. DC modulation represents a potential mechanism by which helminths may exert their effects on the immune system.

In spite of increasing numbers of studies involving helminth products and DCs generated in vitro, few studies cope with the interaction of these parasites in the intestinal

milieu (see below). The significance of studying these interactions is highlighted by the fact that there is rising research aimed on the use of helminth infections or their products as therapy for autoimmune, allergic, or inflammatory diseases [6]. In particular, intestinal DC subsets have unique characteristics and the effects helminths may exert upon them probably depend on several parameters, which include (i) the DC subset, (ii) the helminth species, (iii) the excretory/secretory (E/S) products, and (iv) the regulatory environment in the gut. These interactions will result in the different immunomodulatory mechanisms, such as downregulation of costimulatory or antigen-presenting molecules, IL-10 and TGF- β secretion, and/or generation of T regs, depending on the biological players involved (Table 2).

The role of DCs and the phenotype induced during infection is essential in order to get insights of the cellular and molecular interactions in vivo, which include intestinal DC subsets within the appropriate environment, as well as the timing of production of E/S molecules by the established parasites. In mouse infections with *Trichuris muris*, an animal model for the human geohelminth, *T. trichiura*, the adult worms reside in the caecum and colon. IL-4 and IL-13 promote protection against the murine nematode in

TABLE 2: Effect of intestinal helminth infections or their products on DC function.

Intestinal helminth product	DC subset	DC response	References	
<i>Ascaris suum</i>	High molecular weight components of adult worms	CD11c ⁺ MLN DCs	Downregulation of CD 40, CD 80, CD86, and MHCII induced by immunization. Production of IL-10.	[40]
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Infection	CD11c ⁺ Spleen and MLN DCs	Activation with upregulation of CD80 and CD86. Production of IL-10. Inhibition of protective response against bacteria and exacerbated colonic inflammation (passive transfer of Hp-DCs).	[41, 42]
	E/S products	Bone marrow DCs	Inhibition of cytokine production. Inhibition of upregulation of CD40, CD86, and MHCII by TLR engagement. Induction of IL-10 producing T cells (regulatory T cells).	[43]
<i>Necator americanus</i>	E/S products	Human monocyte-derived DC	Downregulation of CD86, CD1a, HLA-ABC, and HLA-DR resulting in a diminished capacity to induce T cell proliferation.	[44]
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	E/S products	Bone marrow DCs	Upregulation of CD86 and Ox40L. No effect on CD80 and MHCI. Production of IL-6, IL-10, and IL-12 p40. Inhibition of LPS-induced IL-12 p70.	[45]
	Infection	CD11c ⁺ CD8 α ^{int} CD103 ⁺	Reduction of this subpopulation during infection. Reduction of CD86 and Dec 205. Reduced production of Il-12 and increase in IL-6, TNF α , and IL-10. In <i>H. polygyrus</i> infection reduction of this DC subset is more pronounced.	[46]
<i>Trichuris muris</i>	Infection (E-J isolate)	CD11c ⁺ MLN DCs	Expansion of DCs correlates with worm expulsion. Production of IL-4, IL-13, and IL-10.	[47–49]
	E/S products (S, J, E isolates)	Bone marrow DCs	S isolate induces higher levels of IL-6 and IL-10. Upregulation of CD 40 by all three isolates.	[50]
	Infection	CD11c ⁺ MLN DCs	Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) produced by intestinal epithelial cells (IECs) interacts with DCs inhibiting LPS-induced IL12/23p40 and increasing IL-13 production.	[51, 52]

contrast to Th1 cytokines such as IFN γ , IL-12, and IL-18 that help maintain a chronic infection depending on the mouse strain [53, 54]. Resistance to infection has been associated with mobilization of colonic DCs to the epithelium since there is an increased number of DCs in resistant mice that developed a mature phenotype, compared to susceptible strains [55]. Accordingly, in a different study, the kinetics of DC numbers after *T. muris* infection revealed a correlation between increased numbers of CD11c⁺ B220⁻ DC in MLN and worm expulsion from the gut with the concomitant production of IL-4, IL-13, and IL-10 [47, 48]. IL-10 has been shown to be essential for the expulsion of *T. muris* from the gut, since IL-10 deficient mice fail to expel worms, resulting in a chronic infection [56]. CD11c⁺ DCs from PPs and MLN were shown to be responsible for the production of this cytokine although particular DC subsets were not

identified [49]. In contrast, in a different study, IL-10 and IL-6 production by bone marrow-derived DCs after activation with E/S was correlated to the capacity of a particular isolate of *T. muris* to survive in its host [50]. Production of IL-10 by DCs is also observed in MLNs of mice infected with the intestinal helminth *H. polygyrus* that induces a chronic infection in most inbred strains of mice [41]. Therefore, IL-10 production by DCs can induce worm expulsion or survival and this different outcome might be dependent on presence of other cytokines that might influence the Th1/Th2 balance. A very recent study analyzed the DC populations present in MLN during the absence or presence of infections with both *Nippostrongylus brasiliensis* (short-lived infection) and *Heligmosomoides polygyrus* (chronic infection). *N. brasiliensis* infection induces a reduction on CD8 α ^{int} CD11b⁻ subset and decrease in CD40 and

CD86 expression. The decline of this DC subset is more pronounced during *H. polygyrus* infection and could result from a lack of migration of this subset from LP. This subset represents the subpopulation that expresses the highest levels of CD103 and CD205. Concomitantly, cytokine production is altered; IL-12 production in response to LPS was reduced whereas IL-6, TNF α , and IL-10 secretion was upregulated [46].

6. DC Activation versus the “Default Hypothesis”

Generation of Th1 responses through activation of DCs by viral or bacterial products is much better understood than Th2 induction. It is known that binding of those products to TLRs through activation of MyD88 initiates signaling cascades that result in enhanced expression of MHCII (signal 1) and costimulatory molecules such as CD80, CD86 and CD40 (signal 2) with concomitant production of IL-12 (signal 3). In turn, for Th2 responses signals 2 and 3 have not yet been identified. Indeed lack of costimulatory molecules, upregulation, and IL-12 induction have led to propose a “default hypothesis” [57]. E/S products of helminths are able to affect DC maturation in different ways, either through their activation (upregulation of MHC-II and costimulatory molecules) or through the inhibition of their maturation (“default response”). This response is characterized by a diminished gene expression and no upregulation of classical costimulatory molecules, both types of responses (activation and inhibition of DC) results in a type 2 phenotype [39, 58]. For example, adult worm components from *Ascaris suum* have been studied for their ability to suppress the immune response. DC upregulation of MHC-II and costimulatory molecules is inhibited and consequently there is no lymphoproliferation. IL-10 was shown to play a crucial role in this phenomenon since the inhibitory effect was not observed in IL-10 deficient mice, suggesting that helminth components are able to affect the inductive phase of the immune response, probably through the generation of IL-10, compromising antigen presentation and T cell proliferation [40, 59]. Since this effect was shown in inguinal and peritoneal CD11c⁺ DCs of subcutaneously immunized mice, which might not be reflecting an actual infection in the intestine, it is necessary to study the role of IL-10 production by intestinal DCs in response to *A. suum* infection. *Necator americanus*-infected individuals also show significantly downregulated expression of CD86, CD1a, HLA-ABC, and HLA-DR, which reflects an immature phenotype that results in diminished ability to induce T cell proliferation [44]. Lack of DC maturation by E/S form *H. polygyrus* has also been reported. These DCs are able to induce the generation of CD4⁺CD25⁺ IL-10-producing T cells in vitro, thus inhibiting T cell proliferation and IFN- γ production. The authors suggest that E/S might suppress both Th1 and Th2 responses via the generation of regulatory T cells. In many cases helminth DCs are programmed to synthesize IL-10. The induction of T reg differentiation is an important mechanism by which, intestinal DCs, exposed to helminths, are able to

modulate immune responses [43, 60]. In fact, Foxp3⁺ T reg cells develop in the intestine driven by the LP DCs [30]. Products of other non intestinal helminths such as soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* and ES-62, the immunomodulatory filarial glycoprotein, similarly fail to induce DC activation [61, 62].

Several studies, where genomic and proteomic approaches were used to analyze Th2 polarizing DCs exposed to helminth parasites, have shown that few genes or proteins are expressed after stimulation [7, 62]. Although the general picture favors the “default hypothesis” with a limited gene expression, there are examples where, depending on the DC subset exposed, either to E/S products or to the parasite, the response varies (Table 2).

Interestingly, and in contrast to the effect of *H. polygyrus*, the E/S products mentioned above, which downmodulate maturation of in vitro generated bone marrow DCs, spleen and MLN-derived DCs obtained from *H. polygyrus*-infected mice, were shown to upregulate costimulatory molecules and synthesize IL-10 and IL-4 [41, 42]. Also, E/S products from *N. brasiliensis* are able to upregulate costimulatory molecules such as CD86, CD40, and OX40L and induce production of IL-6 and IL-10 [45]. These two examples contradict the “default hypothesis” and highlight the necessity of analyzing better these interactions, taking into account the intestinal microenvironment and the different pathways activated by the different DC subsets. Concomitantly, helminth stimuli involved should be considered, since different helminth parasites and their individual products may use different and possibly multiple mechanisms to induce modulation of DC functions.

Indeed, increasing evidence shows that C-type lectins are likely to play a role in conditioning DCs towards Th2 responses leading to the “alternate pathway model” [57]. Scavenger receptors are also pattern recognition receptors involved in pathogen recognition and facilitation of immune responses expressed in macrophages and DCs [63]. Scavenger receptor-A engagement results in inhibition of LPS-stimulated production of IL-12 which might contribute to induce a Th2 phenotype by DCs counteracting with the ability to respond to TLR ligands and induce Th1 responses [64]. In accordance, calreticulin from *H. polygyrus*, a secreted protein that has been implicated in the host-parasite interactions, stimulated robust Th2 responses in mice immunized with the protein devoid of extrinsic adjuvant and stimulated IL-4 and IL-10 secretion in T cells from infected animals. Furthermore, *H. polygyrus* calreticulin interacted with, and was internalized by, scavenger receptor type A on DCs [65]. Concerning costimulation, recently, OX40L upregulation by thymic stromal lymphopoietin (TSLP) has been implicated in generation of Th2 responses [66]. As mentioned above, E/S products from *N. brasiliensis* upregulate this TNF family receptor. Thus other molecules besides the classical Th1 costimulators might be involved in inducing Th2 phenotypes (Figure 1).

Additional candidates may include inducible T cell costimulator (ICOS) and its ligand (ICOSL) that is expressed in DCs. ICOS is able to transmit reverse signals through its ligand to DCs, enhancing antigen presentation in vitro, in

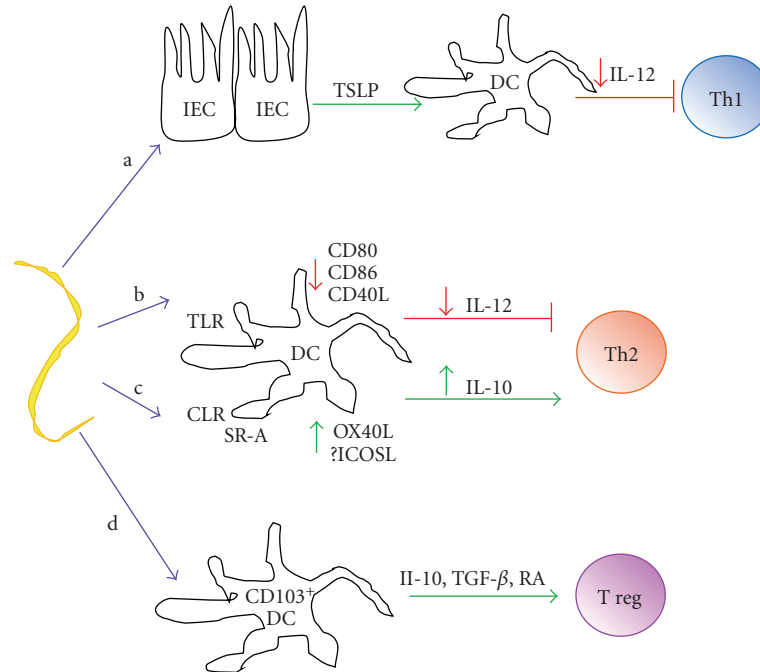


FIGURE 1: Helminth E/S products are able to act on intestinal epithelial cells (IECs) inducing TSLP that engages with the TSLP receptor on DCs and inhibits IL-12/p40. (a) Some E/S products are able to induce signaling through TLRs directly on DCs, resulting in the inhibition of this Th1-promoting cytokine. (b) On the other hand, Th2 responses could be promoted through interactions of helminths with other pattern recognition receptors such as C-type lectins (CLR) or scavenger receptor-A (SR-A) and induction of costimulators such as OX40L that result in Th2 promotion. (c) Finally, interaction with CD103⁺ DCs may result in the induction of T regs through TGF- β and retinoic acid (RA) production. (d) The question of whether different subsets are responsible for these phenomena remains to be determined.

addition to its role in expanding Th2 responses and antibody production [67]. Both ICOSL and ICOS deficient mice have been shown to be defective in early T cell IL-4 production [68]. In a recent study the Th2 response and IL-4 production in the draining MLN were studied during infection with *H. polygyrus*. IL-4 producing cells were present in germinal centers with a typical T follicular helper cell phenotype expressing high levels of ICOS [69].

7. “Helminth-Educated DCs”

In addition to the direct effect of intestinal helminths or their products on DCs, “helminth-educated DCs” can influence immune responses, both Th1 and Th2 types. For example, DCs obtained from mice infected with *H. polygyrus* exacerbated the bacterial inflammation and colitis after adoptive transfer to recipient mice infected with *Citrobacter rodentium*, a murine bacterial pathogen that induces Th1 protective responses. The helminth primed DCs were shown to secrete IL-10 that modulates the bacteria-induced Th1 response reducing IFN- γ production by MLN cells and stimulated IL-4 production by the colonic mucosa, resulting in a Th2-biased response, and thus a more severe bacterial infection due to less inflammatory components [41]. Regarding Th2 responses, adoptively transferred bone marrow-derived DC pulsed with *N. brasiliensis* E/S products induced IL-4, IL-5 and IL-10 by in vitro activated lymph node cells [45].

8. Other Cells Affecting DC Function

Although DCs are capable of directly responding to helminth stimuli, the importance of the interactions of DCs with other cells in the intestinal mucosa and how this cross-talk might influence mucosal immunity require special attention. Intestinal epithelial cells are critical regulators of DCs and of CD4 T cells in the GI tract. Expression of TSLP by epithelial cells limits proinflammatory cytokine production by DCs, inhibiting nonprotective Th1 responses after *T. muris* infection and promoting the pathogen-specific Th2 responses that result in clearance of infection. Furthermore, TSLP limits expression of IL12/23p40 and TNF α by DCs and CD4⁺ T cell-derived IFN γ and IL-17, and thus prevents intestinal inflammation. TSLP expression was shown to be dependent on the activation of the NF κ B pathway in the GI tract [51, 52]. Recently, it has been shown that TSLP does not affect Th2 responses after *H. polygyrus* and *N. brasiliensis* infection. E/S products from these two helminths inhibit the CD-40 and LPS-induced production of IL-12p40 by DCs directly, thereby attenuating Th1 responses and enhancing protective Th2 immunity. In contrast, E/S products from *T. muris* are unable to affect DC function; expulsion of this parasite is dependent on TSLP that inhibits IL-12 p40 during infection [70]. These data demonstrate that different strategies are able to result in attenuation of IL-12/p40 production by DCs and concomitant Th2 activation (Figure 1). In another example both differentiated and undifferentiated intestinal

pig epithelial cells stimulated *in vitro* with low doses of *T. suis* E/S products predominantly synthesized IL-6 and IL-10. These two cytokines were produced within the first 24 h of stimulation, suggesting that they might be part of the *in vivo* primary immune response to this helminth [71]. In addition, mucosal epithelial cells are involved in the recruitment of DCs through the secretion of specific chemokines such as CCL5 and CCL20 [55].

9. Concluding Remarks

Intestinal DCs are *sui-generis* cells as indicated by the different subpopulations, degrees of maturation, specific characteristics, and properties, such as being periscopes of the intestinal lumen. Moreover, survival of intestinal helminths is associated with local DCs which usually generate an antiinflammatory milieu. Despite the increasing number of studies analyzing the effects of helminth products on *in vitro* generated DCs, very few studies have been designed to try to understand the interaction of intestinal DC subsets with helminths. The importance of this kind of studies is highlighted by the fact that the biological function of each subset of DCs present in the gut is well adapted to its microenvironment and that these cells show different properties compared to DCs in other locations. The mechanism by which DCs induce Th2 responses is still not completely understood. The influence of the regulatory milieu in the intestine should not be disregarded since different signals that act upon DCs might influence the outcome, both locally and systemically. Helminths might prove useful tools as models to understand the mechanisms that are turned on during type 2 responses and might help in developing new strategies to manipulate hazardous immune responses that arise during inflammatory, allergic, or hypersensitivity reactions and probably to diminish the risk for cancer. DCs are known to respond not only to PAMPs, but also to different bioactive metabolites and factors secreted by other cells in their vicinity. The combination of these stimuli might result in the different activation conditions that have been reported for DCs when stimulated by helminths to generate Th2 responses. Thus, the study of the interaction of parasites and host's DCs should include especially *in situ* studies of microenvironmental conditions, as well as the intrinsic characteristics of intestinal DCs that differ in some ways from DC from other locations or from *in vitro* generated DCs.

Acknowledgment

The authors are thankful Dr. Leopoldo Flores-Romo for his critical review of the manuscript and helpful discussions.

References

- [1] R. M. Steinman and Z. A. Cohn, "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 137, no. 5, pp. 1142–1162, 1973.
- [2] A. Iwasaki, "Mucosal dendritic cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 25, pp. 381–418, 2007.
- [3] J. L. Coombes and F. Powrie, "Dendritic cells in intestinal immune regulation," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 6, pp. 435–446, 2008.
- [4] 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," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 4, pp. 1311–1321, 2008.
- [5] R. M. Maizels, "Infections and allergy-helminths, hygiene and host immune regulation," *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, no. 6, pp. 656–661, 2005.
- [6] M. J. G. Johnston, J. A. MacDonald, and D. M. McKay, "Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules," *Parasitology*, vol. 136, no. 2, pp. 125–147, 2009.
- [7] L. Carvalho, J. Sun, C. Kane, F. Marshall, C. Krawczyk, and E. J. Pearce, "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function," *Immunology*, vol. 126, no. 1, pp. 28–34, 2009.
- [8] A. J. Stagg, A. L. Hart, S. C. Knight, and M. A. Kamm, "The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria," *Gut*, vol. 52, no. 10, pp. 1522–1529, 2003.
- [9] B. L. Kelsall and M. Rescigno, "Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation," *Nature Immunology*, vol. 5, no. 11, pp. 1091–1095, 2004.
- [10] A. Iwasaki and B. L. Kelsall, "Unique functions of CD11b⁺, CD8 α ⁺, and double-negative Peyer's patch dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 166, no. 8, pp. 4884–4890, 2001.
- [11] Y. Kanamori, K. Ishimaru, M. Nanno, et al., "Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 184, no. 4, pp. 1449–1459, 1996.
- [12] D. Bouskra, C. Brézillon, M. Béard, et al., "Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis," *Nature*, vol. 456, no. 7221, pp. 507–510, 2008.
- [13] K. Fujihashi, P. B. Boyaka, and J. R. McGhee, "Host defences at mucosal surfaces," in *Clinical Immunology Principles and Practice*, R. R. Rich, Ed., pp. 287–303, Mosby, St. Louis, Miss, USA, 2008.
- [14] S. I. Hammerschmidt, M. Ahrendt, U. Bode, et al., "Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells *in vivo*," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 11, pp. 2483–2490, 2008.
- [15] G. Gofu, J. Rivera-Nieves, and K. Ley, "Role of β 7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention," *Current Molecular Medicine*, vol. 9, no. 7, pp. 836–850, 2009.
- [16] A. Hahn, N. Thiessen, R. Pabst, M. Buettner, and U. Bode, "Mesenteric lymph nodes are not required for an intestinal immunoglobulin A response to oral cholera toxin," *Immunology*, vol. 129, no. 3, pp. 427–436, 2009.
- [17] S. Fagarasan, K. Kinoshita, M. Muramatsu, K. Ikuta, and T. Honjo, "In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria," *Nature*, vol. 413, no. 6856, pp. 639–643, 2001.
- [18] H. Kiyono, J. Kunisawa, J. R. McGhee, and J. Mestecky, "The mucosal immune system," in *Fundamental Immunology*, William E. Paul, 6th edition, 2008.
- [19] K. Shortman and Y.-J. Liu, "Mouse and human dendritic cell subtypes," *Nature Reviews Immunology*, vol. 2, no. 3, pp. 151–161, 2002.

- [20] J. A. Villadangos and P. Schnorrer, "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 7, pp. 543–555, 2007.
- [21] J. A. Villadangos and L. Young, "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells," *Immunity*, vol. 29, no. 3, pp. 352–361, 2008.
- [22] H. Ueno, E. Klechevsky, R. Morita, et al., "Dendritic cell subsets in health and disease," *Immunological Reviews*, vol. 219, no. 1, pp. 118–142, 2007.
- [23] A. Flores-Langarica, S. Meza-Perez, J. Calderon-Amador, et al., "Network of dendritic cells within the muscular layer of the mouse intestine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 52, pp. 19039–19044, 2005.
- [24] A. Iwasaki and B. L. Kelsall, "Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 190, no. 2, pp. 229–239, 1999.
- [25] K. A. Kadaoui and B. Corthésy, "Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 11, pp. 7751–7757, 2007.
- [26] F. G. Chirido, O. R. Millington, H. Beacock-Sharp, and A. M. Mowat, "Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria," *European Journal of Immunology*, vol. 35, no. 6, pp. 1831–1840, 2005.
- [27] S. Uematsu, K. Fujimoto, M. H. Jang, et al., "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 7, pp. 769–776, 2008.
- [28] M. H. Jang, N. Sogawa, T. Tanaka, et al., "CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 2, pp. 803–810, 2006.
- [29] J. L. Coombes, K. R. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Cárcamo, et al., "A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β -and retinoic acid-dependent mechanism," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 8, pp. 1757–1764, 2007.
- [30] C.-M. Sun, J. A. Hall, R. B. Blank, et al., "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, no. 8, pp. 1775–1785, 2007.
- [31] E. Jaensson, H. Uronen-Hansson, O. Pabst, et al., "Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 9, pp. 2139–2149, 2008.
- [32] J. R. Mora, M. Iwata, B. Eksteen, et al., "Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells," *Science*, vol. 314, no. 5802, pp. 1157–1160, 2006.
- [33] M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina, et al., "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria," *Nature Immunology*, vol. 2, no. 4, pp. 361–367, 2001.
- [34] J. Bilsborough, T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney, "Mucosal CD8 α ⁺ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties," *Immunology*, vol. 108, no. 4, pp. 481–492, 2003.
- [35] C. Johansson and B. L. Kelsall, "Phenotype and function of intestinal dendritic cells," *Seminars in Immunology*, vol. 17, no. 4, pp. 284–294, 2005.
- [36] F.-P. Huang, N. Platt, M. Wykes, et al., "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 3, pp. 435–443, 2000.
- [37] N. Contractor, J. Louten, L. Kim, C. A. Biron, and B. L. Kelsall, "Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGF β , and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 5, pp. 2690–2694, 2007.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] S. R. Silva, J. F. Jacysyn, M. S. Macedo, and E. L. Faquin-Mauro, "Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism," *European Journal of Immunology*, vol. 36, no. 12, pp. 3227–3237, 2006.
- [41] C.-C. Chen, S. Louie, B. A. McCormick, W. A. Walker, and H. N. Shi, "Helminth-primed dendritic cells alter the host response to enteric bacterial infection," *Journal of Immunology*, vol. 176, no. 1, pp. 472–483, 2006.
- [42] H. N. Shi, H. Y. Liu, and C. Nagler-Anderson, "Enteric infection acts as an adjuvant for the response to a model food antigen," *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 11, pp. 6174–6182, 2000.
- [43] M. Segura, Z. Su, C. Piccirillo, and M. M. Stevenson, "Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 7, pp. 1887–1904, 2007.
- [44] R. T. Fujiwara, G. G. L. Cançado, P. A. Freitas, et al., "*Necator americanus* infection: a possible cause of altered dendritic cell differentiation and eosinophil profile in chronically infected individuals," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 3, no. 3, article e399, 2009.
- [45] A. Balic, Y. H Marcus, M. J. Holland, and R. M. Maizels, "Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses," *European Journal of Immunology*, vol. 34, no. 11, pp. 3047–3059, 2004.
- [46] A. Balic, K. A. Smith, Y. H Marcus, and R. M. Maizels, "Dynamics of CD11c⁺ dendritic cell subsets in lymph nodes draining the site of intestinal nematode infection," *Immunology Letters*, vol. 127, no. 1, pp. 68–75, 2009.
- [47] K. Koyama, "Dendritic cell expansion occurs in mesenteric lymph nodes of B10.BR mice infected with the murine nematode parasite *Trichuris muris*," *Parasitology Research*, vol. 97, no. 3, pp. 186–190, 2005.
- [48] K. Koyama, "Erratum: dendritic cell expansion occurs in mesenteric lymph nodes of B10.BR mice infected with the murine nematode parasite *Trichuris muris*," *Parasitology Research*, vol. 97, no. 3, p. 258, 2005.
- [49] K. Koyama, "Dendritic cells have a crucial role in the production of cytokines in mesenteric lymph nodes of B10.BR mice infected with *Trichuris muris*," *Parasitology Research*, vol. 102, no. 3, pp. 349–356, 2008.
- [50] R. D'Elia and K. J. Else, "In vitro antigen presenting cell-derived IL-10 and IL-6 correlate with *Trichuris muris* isolate-specific survival," *Parasite Immunology*, vol. 31, no. 3, pp. 123–131, 2009.

- [51] C. Zaph, A. E. Troy, B. C. Taylor, et al., "Epithelial-cell-intrinsic IKK- β expression regulates intestinal immune homeostasis," *Nature*, vol. 446, no. 7135, pp. 552–556, 2007.
- [52] B. C. Taylor, C. Zaph, A. E. Troy, et al., "TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 3, pp. 655–667, 2009.
- [53] H. Helmbj, K. Takeda, S. Akira, and R. K. Grencis, "Interleukin (IL)-18 promotes the development of chronic gastrointestinal helminth infection by downregulating IL-13," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 194, no. 3, pp. 355–364, 2001.
- [54] W. C. Gause, J. F. Urban Jr., and M. J. Stadecker, "The immune response to parasitic helminths: insights from murine models," *Trends in Immunology*, vol. 24, no. 5, pp. 269–277, 2003.
- [55] S. M. Cruickshank, M. L. Deschoolmeester, M. Svensson, et al., "Rapid dendritic cell mobilization to the large intestinal epithelium is associated with resistance to *Trichuris muris* infection," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 5, pp. 3055–3062, 2009.
- [56] L. R. Schopf, K. F. Hoffmann, A. W. Cheever, J. F. Urban Jr., and T. A. Wynn, "IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 5, pp. 2383–2392, 2002.
- [57] A. S. MacDonald and R. M. Maizels, "Alarming dendritic cells for Th2 induction," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, no. 1, pp. 13–17, 2008.
- [58] D. Jankovic, S. Steinfeld, M. C. Kullberg, and A. Sher, "Mechanisms underlying helminth-induced Th2 polarization: default, negative or positive pathways?" *Chemical Immunology and Allergy*, vol. 90, pp. 65–81, 2006.
- [59] G. Grutz, "New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 77, no. 1, pp. 3–15, 2005.
- [60] H. H. Smits, E. C. de Jong, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg, "Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity," *Trends in Immunology*, vol. 26, no. 3, pp. 123–129, 2005.
- [61] M. Whelan, M. M. Harnett, K. M. Houston, V. Patel, W. Harnett, and K. P. Rigley, "A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 12, pp. 6453–6460, 2000.
- [62] S. Ferret-Bernard, R. S. Curwen, and A. P. Mountford, "Proteomic profiling reveals that Th2-inducing dendritic cells stimulated with helminth antigens have a 'limited maturation' phenotype," *Proteomics*, vol. 8, no. 5, pp. 980–993, 2008.
- [63] F. Granucci, C. Vizzardelli, E. Virzi, M. Rescigno, and P. Ricciardi-Castagnoli, "Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli," *European Journal of Immunology*, vol. 31, no. 9, pp. 2539–2546, 2001.
- [64] S. Józefowski, M. Arredouani, T. Sulahian, and L. Kobzik, "Disparate regulation and function of the class A scavenger receptors SR-AI/II and MARCO," *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 12, pp. 8032–8041, 2005.
- [65] J. Rzepecka, S. Rausch, C. Klotz, et al., "Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A," *Molecular Immunology*, vol. 46, no. 6, pp. 1109–1119, 2009.
- [66] T. Ito, Y.-H. Wang, O. Duramad, et al., "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, no. 9, pp. 1213–1223, 2005.
- [67] G. Tang, Q. Qin, P. Zhang, et al., "Reverse signaling using an inducible costimulator to enhance immunogenic function of dendritic cells," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 18, pp. 3067–3080, 2009.
- [68] R. I. Nurieva, J. Duong, H. Kishikawa, et al., "Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator," *Immunity*, vol. 18, no. 6, pp. 801–811, 2003.
- [69] I. L. King and M. Mohrs, "IL-4-producing CD4⁺ T cells in reactive lymph nodes during helminth infection are T follicular helper cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 5, pp. 1001–1007, 2009.
- [70] J. C. Massacand, R. C. Stettler, R. Meier, et al., "Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 33, pp. 13968–13973, 2009.
- [71] G. Parthasarathy and L. S. Mansfield, "*Trichuris suis* excretory secretory products (ESP) elicit interleukin-6 (IL-6) and IL-10 secretion from intestinal epithelial cells (IPEC-1)," *Veterinary Parasitology*, vol. 131, no. 3–4, pp. 317–324, 2005.



Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination

Sonia León-Cabrera^a, Mayra Cruz-Rivera^a, Fela Mendlovic^{a,b}, Guillermina Ávila-Ramírez^a, Julio César Carrero^c, Juan Pedro Laclette^c, Ana Flisser^{a,*}

^a Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Av. Universidad 3000, Colonia Copilco Universidad, México 04510 DF, México

^b Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Anáhuac, México Norte, Av. Universidad Anáhuac 46, Huixquilucan, 52786 Edo. de México, México

^c Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Av. Universidad 3000, Colonia Copilco Universidad, México

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 29 July 2009

Available online 3 August 2009

Keywords:

Calreticulin

Cholera toxin

Experimental model

Hamster

Oral vaccination

Taenia solium

Taeniosis

ABSTRACT

Neurocysticercosis in humans is caused by the tapeworm *Taenia solium* and generates substantial morbidity in Latin America, Africa and Asia. The life cycle of *T. solium* includes pigs as intermediate hosts and human beings as definitive hosts. Tapeworm carriers are the main risk factor for acquiring cysticercosis in the household, thus prevention and control programs are being developed. Infected people have no symptoms, therefore are difficult to identify and treat, thus vaccination against the adult tapeworm is an alternative control measure. Since the infection occurs naturally only in human beings, experimental models have been standardized. Hamsters are believed to be good models to study the infection but they have not been properly evaluated for vaccination. Since taeniosis is gained by ingesting pork meat with cysticerci, oral vaccination was evaluated, and given that intestinal immunity is enhanced with adjuvants, cholera toxin was used, because it is one of the most potent adjuvants, in view of the fact that it increases epithelium permeability enhancing entrance of the co-administered unrelated antigens. Recombinant functional *T. solium* calreticulin was employed for the standardization of the methodology and the evaluation of oral vaccination. Protection was associated with the type of cysticerci and the age of the hamsters used. When reddish bigger parasites were orally introduced in hamsters as challenge, protection was around 40%, while when yellowish small parasites were used, protection increased to 100%, suggesting that the characteristics of cysticerci are determinant. Protection was gained in 9 month old hamsters, but not in 3 month old animals.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Taenia solium causes two diseases, i.e. cysticercosis and taeniosis. Human neurocysticercosis is considered a public health problem and, as well as swine cysticercosis, is prevalent in countries of Latin America, Africa and Asia. In addition, it is considered an emergent disease in some developed countries [1]. Cysticercosis is acquired after the ingestion of microscopic eggs released by the adult tapeworm, which develops exclusively in the human small intestine after a person ingests cysticerci present in inadequately cooked infected pork meat. The cysticercus, a fluid-filled vesicle containing an invaginated scolex or head, evaginates in the gastrointestinal tract; its double row of 22 hooks and 4 suckers that conform the rostellum, attach to the intestinal mucosa and, from the neck, proglottids develop and transform from immature to mature structures and, at the end of the strobila, or ribbon-like body, into gravid segments. The latter contain eggs and are released with feces [2].

Although the infection by the adult tapeworm is not recognized as a public health problem, since it does not cause symptoms, it is accountable for survival and spread of the parasite, because a single worm frequently releases gravid segments, each one containing around 60,000 eggs with the potential of developing into cysticerci. Furthermore, it has been demonstrated that tapeworm carriers are the main risk factor for acquiring cysticercosis in their households [3,4] and therefore prevention and control programs are being established nowadays in various endemic areas [5–7]. A vaccine against taeniosis, the disease caused by the adult parasite, seems to be a good alternative intervention, because it can impede dissemination of eggs and, thus, provide long term prevention of cysticercosis. On the other hand, direct stimulation of gut associated lymphoid tissue by oral administration of antigens seems to be the best approach to vaccinate against infections caused by gastrointestinal parasites [8].

Since humans are the only hosts for adult *T. solium*, experimental animal models have been searched and only hamsters, gerbils and chinchillas are able to sustain infection. Of these, only the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*) develops *T. solium* adult worms without the requirement for corticosteroids for

* Corresponding author. Fax: +52 55 56232382.

E-mail address: flisser@servidor.unam.mx (A. Flisser).

immunosuppression, after cysticerci, obtained from naturally infected swine, are orally introduced resembling the natural route [9,10]. This model has been used to establish the attachment site, the duration of the infection and the size and developmental stage of tapeworms, as well as to characterize the inflammatory cells and cytokines present at this site [10–13]. Hamsters are especially useful because tapeworms grow up to several centimeters long but do not develop gravid proglottids and thus are not infective to humans. To date no studies have been performed to define the suitable conditions to evaluate vaccination against taeniosis in this experimental model.

T. solium calreticulin (TsCRT), a highly conserved multifunctional protein, was cloned and expressed as a Ca²⁺ binding protein [14]. Immunolocalization studies showed that TsCRT expression is spatially and temporally regulated during spermatogenesis and embryogenesis [15]. In addition, it is found in tegumentary and muscle cytons of the suckers and rostellum, suggesting participation at the attachment site and in nutrition across the tegument and thus, a possible important role at the host-parasite interface. Calreticulin has been identified in different parasites and shown to induce partial protection in parenteral vaccination [16]. Since antigens vary in their capacity for generating mucosal immunity, cholera toxin (CT) has been widely used as a gut adjuvant in animal models showing a strong action in stimulating IgA and other immune responses against unrelated antigens after oral immunization [17,18]. The aim of the present study was to standardize the optimal conditions for infection in the experimental golden hamster model, in order to evaluate the effect of oral immunization with TsCRT in expulsion rate, size and location of adult *T. solium*, using CT as adjuvant.

2. Description of methods and results

2.1. Cloning and expression of TsCRT

As reported by Mendlovic et al. [14], the coding region of the mature TsCRT, without the signal peptide, was cloned with the appropriate reading frame into the expression vector pET23-a (Novagen, Madison, Wisconsin). Recombinant protein expression was induced with 1 mM isopropyl thio- β -D-galactopyranoside. Induced BL-21 bacterial cultures were sonicated to solubilize membrane proteins. Expressed recombinant TsCRT was identified as a 50 kDa enriched band in SDS-PAGE and purified by isoelectric precipitation. Protein concentration was determined by the Bradford method, and purity was monitored by SDS-PAGE. Purified protein was stored at -20°C until use. Purity between 60 and 80% was obtained in the different assays performed, for this reason a batch of similarly processed non-transfected BL-21 cells were used as controls in the vaccination trials.

2.2. Hamsters, cysticerci and infections

Out-bred adult golden hamsters, produced in the animal house of the Faculty of Medicine, were maintained in a conventional breeding facility. All animals were fed with commercial pellets and water *ad libitum*. Animals were treated for intestinal parasites with 30 mg/kg body weight of a single dose of praziquantel and 3 daily doses of albendazole, 2 weeks before immunization [10,11]. All animal procedures were endorsed by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, UNAM and followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals translated into Spanish by the Office for Protection from Research Risks, Division of Animal Welfare, National Institutes of Health, NIH publication No. 90-23Sm 1985, USA.

T. solium cysticerci were dissected from fresh skeletal muscles of naturally infected pigs taking care when releasing the host capsule and avoiding rupture of the parasite's vesicle. This is a simple and safe procedure, since the only way of acquiring taeniosis is by ingesting a cysticercus. For each experiment a different batch of cysticerci was obtained. There are no reports indicating the relationship between the size and/or the color of cysticerci and the time of development in the pig. Empirical observations along many years (AF) suggest that bigger and reddish parasites correspond to older cysticerci, as compared to smaller and yellowish ones. In the experiments reported in this study, both types of parasites were obtained by chance and used. Prior to infection, excised cysticerci were measured, photographed and assayed for viability by *in vitro* evagination after incubating 10 parasites for up to 6 h in 40 ml of 25% fresh pig bile diluted in culture medium [19]. Evagination is the method routinely used to ascertain viability of cysticerci; values above 80% correlate with tapeworm development in hamsters [9,11]. In our study all batches of cysticerci used had between 85% and 100% evagination. The two types of cysticerci found were: reddish, measuring approximately 1.5 cm with a scolex and a developing neck (Fig. 1a), and yellowish, 0.5 cm, exhibiting only a scolex (Fig. 1b).

Hamsters were infected orally with four *T. solium* cysticerci each. For this purpose animals were left overnight without food (but with water). Each hamster was held by the back skin in a vertical position and a cysticercus was placed in the tip of the mouth, with the help of small forceps, the parasite was gently introduced in the mouth and the animal swallowed it. This procedure was repeated for each one of the 4 cysticerci used to infect a hamster. Necropsies of the hamsters were performed at different days post infection (DPI) using an overdose of the anesthetic sevoflurane (Sevorane, Abbott, Mexico). The small intestines were removed, placed in Petri dishes in PBS, and opened longitudinally with dissecting scissors. Tapeworms were identified under a magnifying glass, counted and measured, and the attachment sites of scolices (duodenum–jejunum) were determined and measured from the pylorus. The percentage of tapeworm recovery was defined as the number of worms recovered at necropsy with respect to the number of cysticerci used for oral infection. Blood and fecal samples were collected and kept for future studies.

In order to evaluate the infectivity related to the type of the parasites obtained from naturally infected pigs, four experiments were performed, 2 with reddish and 2 with yellowish cysticerci, using hamsters of 3 and 9 months of age and necropsied between 15 and 20 DPI. Tapeworm recovery rates were quite high, between 75% and 87.5% in hosts infected with reddish cysticerci, as compared to those infected with yellowish cysticerci, in which only 25–27.5% developed into tapeworms (Table 1). These data support the idea that yellowish cysticerci are younger and thus have a lower capacity to infect, furthermore they have less color, apparently because they have incorporated less host proteins (hemoglobin), and they do not have a neck already visible, as reddish parasites (Fig. 1).

In order to evaluate the effect of host age and gender on infection rate, reddish parasites obtained from the same pig were used to infect hamsters of different ages and genders. Results are seen in Fig. 2a; interestingly animals of all ages tested were susceptible to *T. solium* infection. At 10 DPI, all groups of animals became infected; the highest tapeworm recovery (95%) was in 9 month old male hamsters and the lowest (60%) in 12 month old female hamsters, suggesting that probably the latter should not be used for experimental tapeworm infections, although no statistical significant differences in the percent of tapeworm recovery were found between ages. At 20 DPI tapeworm recovery was similar to 10 DPI, but at 30 DPI less than 25% of tapeworms were recovered from animals 2, 4 and 12 months old and slightly higher in 3 and

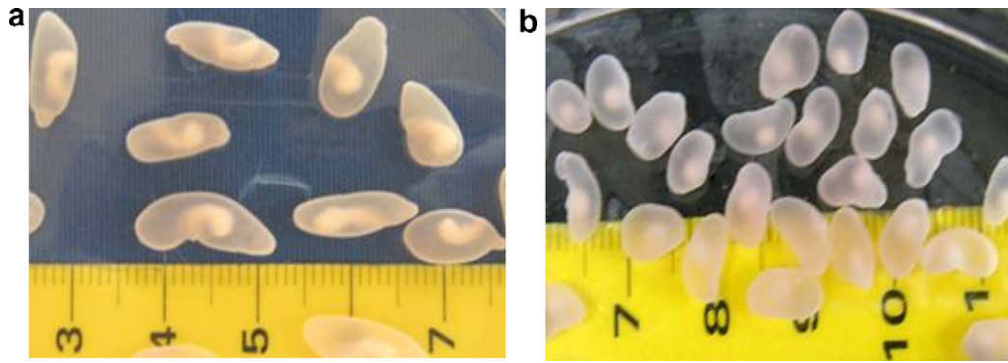


Fig. 1. Images of *T. solium* cysticerci used in experimental infections obtained from naturally infected pigs by chance: reddish parasites that measure more than 1 cm and have a visible neck (a), yellowish cysticerci measuring less than 1 cm, where only the scolex is visible (b).

Table 1
Establishment of *T. solium* tapeworms in hamsters after infection with 4 reddish or yellowish cysticerci.

Number/age of hamsters	Type of cysts	Worms recovered per hamster	# of worms/# of cysts	% worm recovery
4/9	Yellowish	0,0,1,3	4/16	25.0
10/3	Yellowish	0,1,1,1,1,1,1,1,2,2	11/40	27.5
10/9	Reddish	1,1,3,3,3,3,4,4,4,4	30/40	75.0
8/3 and 9	Reddish	3,3,3,3,4,4,4,4	28/32	87.5

9 month old hamsters, without a trend associated with age. Tapeworms were probably released with feces. Gender has been reported as a determinant in tapeworm infections [20], being female more susceptible to infection. Nevertheless this was not the case in the present experiment; since hamsters aged 2, 4 and 9 months were male while those of 3 and 12 months were female. The difference might be due to the fact that previous studies were performed in cysticercosis while the present study was in taeniosis. Notably at least one tapeworm per group was always found, confirming previous data [10] that hamsters are adequate experimental hosts, adding that this is true for almost any age of the host. Since tapeworm recovery was always lower in 2, 4 and 12 month old hamsters, in which less than 75% parasites could be found, and the number of worms recovered at 10, 20 and 30 DPI was higher in 3 and 9 month old hamsters, these latter animals were selected for vaccination trials.

As expected, development of parasites increased with the time of infection but was quite variable (Fig. 2b). The length of tapeworms recovered from 3 and 9 month old animals at 10 DPI was 2.5 ± 1.1 mm and 7.9 ± 2.7 mm, respectively, and at 30 DPI worms

of 85.1 ± 81 mm and 129 ± 28 mm were recovered, respectively. At 20 DPI worms measured up to 100 mm in 12 month old hamsters, while in 2 month old hamsters tapeworms developed, but did not grow, and the longest parasite was only 18 mm.

2.3. Vaccination

Female 3 and 9 month old golden Syrian hamsters were divided into groups, usually composed of 8–10 hamsters. Three or 4 oral immunizations with 100 µg of TsCRT mixed with 10 µg of CT as adjuvant, 100 µg of TsCRT alone, 10 µg of CT alone, 100 µg of non-transfected BL-21 bacteria or with diluent (NaHCO₃ 0.2 M with 0.3% w/v glucose) were performed weekly. Oral vaccination was carried out by filling 0.5 ml of vaccine or control reagent in a syringe coupled to a neonatal cannula used as a gastric tube. Hamsters were held vertically and the tube was slowly inserted through the mouth until it reached the stomach and did not flow anymore, between 10 and 12 cm of cannula were introduced, thereafter the vaccine or control reagent in 500 µl volume was slowly introduced, the cannula was filled with air and instilled to make sure that the vaccine was completely administered. Fifteen days after the last immunization, hamsters were challenged and two weeks later all hamsters were euthanized and processed as described above. Tapeworm burden reduction (vaccine protection) was defined as $P = (WCH - WVH) / WCH$ [21], where *P* (protection) is expressed as percentage, WCH is the number of worms in diluent-control hamsters and WVH the number of worms in vaccinated hamsters. Data were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) using GraphPad software. When significant differences were found, the Student *t*-test and *t*-Tukey test were applied to each

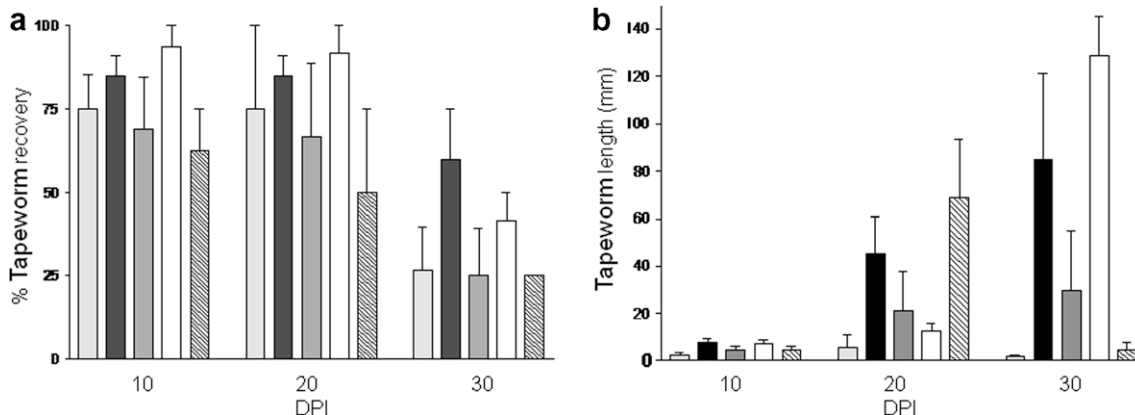


Fig. 2. Experimental infections in hamsters of different months: □, 2; ■, 3; ▒, 4; ◻, 9; ▨, 12. Reddish cysticerci collected from the same pig were used for all infections. Fewer parasites were recovered after 30 days post infection (a) although these tapeworms were bigger than those collected sooner after infection (b).

Table 2Protection against tapeworm development in hamsters orally immunized with *Taenia solium* calreticulin.

Vaccine	Mean worms \pm SD (# of hamsters)	# of worms/ # of cysts	% reduction in # of worms	P
<i>First experiment, nine month old hamsters, yellowish, smaller cysticerci</i>				
TsCRT + CT	0 (4)	0/16	100	—
TsCRT	0.2 (4)	1/16	75	—
CT	1 (3)	3/12	0	—
Diluent	1 (4)	4/16	—	—
<i>Second experiment, nine month old hamsters, reddish, bigger cysticerci</i>				
TsCRT + CT	2 \pm 0 (9)	18/36	33	0.01*
TsCRT	1.9 \pm 0.9 (10)	19/40	36	0.02*
CT	2.7 \pm 0.9 (10)	27/40	10	—
BL-21	3.2 \pm 1.2 (10)	32/40	0	—
Diluent	3 \pm 1.1 (10)	30/40	—	—
<i>Third experiment, nine month old hamsters, reddish, bigger cysticerci</i>				
TsCRT + CT	2 \pm 0.6 (5)	10/20	44	0.04
Diluent	3.6 \pm 0.8 (5)	18/20	—	—
<i>Fourth experiment, three month old hamsters, yellowish, smaller cysticerci</i>				
TsCRT + CT	2 \pm 1.4 (9)	17/36	0	—
CT	1 \pm 1.6 (8)	8/32	9	—
BL-21	2 \pm 1 (8)	16/32	0	—
Diluent	1.1 \pm 0.5 (10)	11/40	—	—
<i>Fifth experiment, three month old hamsters, reddish, bigger cysticerci</i>				
TsCRT + CT	3.2 \pm 1 (10)	32/40	0	—
CT	3.1 \pm 0.6 (9)	28/36	0	—
Diluent	2.8 \pm 0.9 (9)	25/36	—	—

* Significantly different from controls (ANOVA test, followed by *t*-Tukey).

experiment using the residual variance estimated by ANOVA to test for significance. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Five vaccination trials were performed to evaluate the protective effect of TsCRT as well as the effect of the host's age and type of cysticerci on protection. Most experiments included 8–10 hosts per group, except the first and third experiment, in which only 4 and 5 animals, respectively, were used per group. Table 2 summarizes all the results obtained. The data indicate that protection induced by TsCRT mixed with CT, when yellowish small parasites were used for challenge, was as high as 100% in 9 month old hamsters, while when reddish big parasites were used for challenge 33% and 44% protection was obtained, with statistically significant differences between the immunized and control groups. Although no statistical analysis could be performed in the first experiment because of the low number of tapeworms obtained in the 4 control hamsters used, the data were included in the table because they show protection. More tapeworms developed when reddish cysticerci were used for challenging 3 and 9 month old hamsters. In 3 month old hamsters no protection was obtained. The groups that received CT alone or non-transfected bacteria were not protected,

with values similar to the group that received the diluent, further strengthening the protective effect of TsCRT. On the other hand, the data obtained with 9 month hamsters performed in two independent experiments using reddish bigger parasites for challenge were reproducible since 33 and 44% protection was found.

Protection against helminth parasites can also be evaluated using other parameters [21,22]. Here we present data on tapeworm size and attachment site in the gut. Fig. 3 shows one worm recovered from a vaccinated hamster, as it can be seen it did not develop strobila, only a scolex was found, which measured 1 mm (Fig. 3a); in contrast, control animals had tapeworms with visible strobila, which could be small or even long (Fig. 3b). Tapeworms measured between 1 and 10 mm in vaccinated groups and up to 60 mm in control groups, without significant statistical differences. The attachment site of tapeworms changed in vaccinated hamsters in contrast to the control group. The worms that remained in vaccinated hamsters were found 2 cm farther away from the pilorus. The location of the attachment site was significantly different between immunized and control groups ($P < 0.05$). Tape worms found in the protected groups were anchored at 9.3 ± 2.1 cm and at 11.3 ± 2.8 cm in the second and third experiment. In contrast, in the control groups, worms were located and at 7.2 ± 1.3 cm and 9.2 ± 2.8 cm respectively. This type of relocation in the small intestine has been described in intestinal helminths as a result of vaccination [21,22].

3. Concluding remarks

Human neurocysticercosis is an important public health problem in many developing countries of the world [1]. The disease is caused by ingestion of eggs released by tapeworm carriers; therefore vaccination against the adult tapeworm can be an adequate control intervention. Since the tapeworm is naturally lodged only in human beings, oral vaccination in the hamster experimental model for human taeniosis was evaluated using *T. solium* calreticulin [10,14]. Cholera toxin was used because it is a potent adjuvant that increases epithelium permeability enhancing entrance of the co-administered unrelated antigens [17]. With these elements, the methodology for evaluating oral vaccination was standardized and preliminary results are provided.

In this study 33% and 44% reduction in tapeworm establishment was obtained after vaccination of 9 month old hamsters with TsCRT when big reddish cysticerci were used for challenge, and up to 100% protection was reached when small yellowish parasites were used to infect; the latter possibly reflects reduced establishment efficacy of small parasites. Between 43 and 49% fewer worms in lungs of immunized mice as compared to non-vaccinated controls were found using a recombinant hookworm calreticulin [16], while 30–46% worm reduction in hamsters immunized with a *Necator*

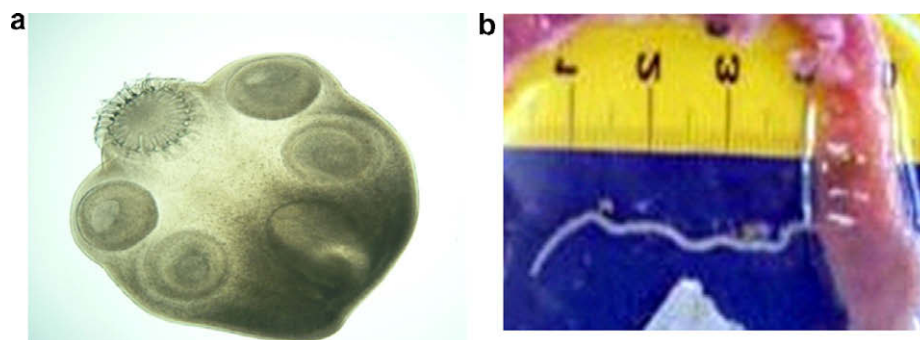


Fig. 3. Image of a tapeworm recovered from a vaccinated hamster, only the scolex can be seen, no strobila developed (a). Worm recovered from a control hamster measuring more than 4 cm (b).

americanus-*Ancylostoma* secreted protein 2 and challenged with *N. americanus* infective larvae resulted over the course of three vaccine trials relative to adjuvant controls [23]. These data show that protection values against intestinal helminths in different models are similar to the ones obtained in our study. Vaccination against intestinal helminths has been considered very difficult to achieve [24], the use of efficient mucosal adjuvants may diminish this potential handicap.

The fact that protection levels varied with the type of cysticerci used for challenge should be taken into consideration, because, if confirmed, it could indicate that protection will vary depending on the type of cysticerci ingested by people. Also, cysticerci are not the only factor for a successful infection, since protection was gained in 9 month old hamsters, but not in 3 month old hosts, indicating that there are differences in the host's immune system. Therefore, the humoral and cellular immune responses that participate in protection should be compared in 3 and 9 month old vaccinated and control hosts along 20 days of infection, before the host naturally expels the tapeworm.

Acknowledgment

The authors acknowledge DGAPA, UNAM for Grant PAPIIT IN220007.

References

- [1] G. Roman, J. Sotelo, O. Del Brutto, A. Flisser, M. Dumas, N. Wadia, D. Botero, M. Cruz, H. Garcia, P.R. deBittencourt, L. Trelles, C. Arriagada, P. Lorenzana, T.E. Nash, A. Spina-Franca, Bull. World Health Organ. 78 (2000) 399–406.
- [2] A. Flisser, A.E. Viniegra, L. Aguilar-Vega, A. Garza-Rodriguez, P. Maravilla, G. Avila, J. Parasitol. 90 (2004) 914–916.
- [3] P.M. Schantz, A.C. Moore, J.L. Munoz, B.J. Hartman, J.A. Schaefer, A.M. Aron, D. Persaud, E. Sarti, M. Wilson, A. Flisser, N. Engl. J. Med. 327 (1992) 692–695.
- [4] A. Flisser, in: C.P.a. Pawlowski (Ed.), Risk Factors and Control Measures for Taeniosis/Cysticercosis, vol. 341, IOS Press, NATO Science Series, Amsterdam, 2002, pp. 335–342.
- [5] A. Flisser, C.G. Gauci, A. Zoli, J. Martinez-Ocana, A. Garza-Rodriguez, J.L. Dominguez-Alpizar, P. Maravilla, R. Rodriguez-Canul, G. Avila, L. Aguilar-Vega, C. Kyngdon, S. Geerts, M.W. Lightowlers, Infect. Immun. 72 (2004) 5292–5297.
- [6] A. Flisser, R. Rodriguez-Canul, A.L. Willingham 3rd, Vet. Parasitol. 139 (2006) 283–292.
- [7] D.D. Joshi, M. Maharjan, M.V. Johansen, A.L. Willingham, M. Sharma, Acta Trop. 87 (2003) 119–127.
- [8] M.A. Dea-Ayuela, S. Rama-Iniguez, F. Bolas-Fernandez, Vaccine 24 (2006) 2772–2780.
- [9] P. Maravilla, G. Avila, V. Cabrera, L. Aguilar, A. Flisser, J. Parasitol. 84 (1998) 882–886.
- [10] G. Avila, N. Teran, L. Aguilar-Vega, P. Maravilla, P. Mata-Miranda, A. Flisser, Parasitol. Int. 55 (Suppl.) (2006) S99–S103.
- [11] G. Avila, L. Aguilar, S. Benitez, L. Yepez-Mulia, I. Lavenat, A. Flisser, Int. J. Parasitol. 32 (2002) 1301–1308.
- [12] G. Avila, M. Benitez, L. Aguilar-Vega, A. Flisser, Parasitol. Res. 89 (2003) 284–289.
- [13] G. Avila, L. Aguilar, M. Romero-Valdovinos, F. Garcia-Vazquez, A. Flisser, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149 (2008) 170–173.
- [14] F. Mendlovic, P. Ostoa-Saloma, C.F. Solis, J. Martinez-Ocana, A. Flisser, J.P. Lacleste, J. Parasitol. 90 (2004) 891–893.
- [15] F. Mendlovic, J. Carrillo-Farga, J. Torres, J.P. Lacleste, A. Flisser, J. Parasitol. 92 (2006) 789–795.
- [16] J.A. Winter, O.R. Davies, A.P. Brown, M.C. Garnett, S. Stolnik, D.I. Pritchard, Parasite Immunol. 27 (2005) 139–146.
- [17] J. Holmgren, N. Lycke, C. Czerkinsky, Vaccine 11 (1993) 1179–1184.
- [18] J. Holmgren, C. Czerkinsky, K. Eriksson, A. Mharandi, Vaccine 21 (Suppl. 2) (2003) S89–95.
- [19] D. Correa, J.P. Lacleste, E. Rodriguez-del-Rosal, M. Merchant, A. Flisser, J. Parasitol. 73 (1987) 443–445.
- [20] J. Morales-Montor, C. Larralde, Parasitology 131 (2005) 287–294.
- [21] G.N. Goud, B. Zhan, K. Ghosh, A. Loukas, J. Hawdon, A. Dobardzic, V. Deumic, S. Liu, R. Dobardzic, B.C. Zook, Q. Jin, Y. Liu, L. Hoffman, S. Chung-Debose, R. Patel, S. Mendez, P.J. Hotez, J. Infect. Dis. 189 (2004) 919–929.
- [22] M.W. Kennedy, Parasitology 80 (1980) 49–60.
- [23] S. Xiao, B. Zhan, J. Xue, G.N. Goud, A. Loukas, Y. Liu, A. Williamson, S. Liu, V. Deumic, P. Hotez, Exp. Parasitol. 118 (2008) 32–40.
- [24] M. Lightowlers, Parasitol. Intl. 55 (2006) S39–S43.



| Lead Editor: **Laura Vargas-Parada**

PROTEINS AND GENE EXPRESSION

Calreticulin: a Multifaceted Protein

By: Fela Mendlovic, M.Sc. (Medicina, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Universidad Anahuac) & Mariangela Conconi, Ph.D. (Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Anahuac) © 2011 Nature Education

Citation: Mendlovic, F. & Conconi, M. (2011) Calreticulin: a Multifaceted Protein. Nature Education 4(1):1

Calreticulin is a protein with many roles, including calcium regulation and helping other proteins fold. How did scientists discover calreticulin and its functions?

Calreticulin (CRT) is a **protein** that is widely distributed in **eukaryotic** cells. It was first described in the endoplasmic reticulum (ER, a network of interconnected membranes within the cell **cytoplasm**). Since its discovery, it has been identified in many other cellular structures like the cytoplasm, the cell membrane, and the extracellular **matrix** (a protein scaffold found between cells). Among its many functions, calreticulin is involved with maintaining adequate calcium levels in organisms. It also functions as a chaperone to help other proteins fold correctly. How can this one protein be so ubiquitous and do so many different things? To answer this question, we will review what we know about calreticulin, from its discovery to more recent exciting findings, which suggest that this protein plays a key role in processes like wound healing, **cancer** cell removal, and parasite **development**.

How Proteins Fold

All of the information required to build a living **organism** is stored in its chromosomes, and the end result of the expression of most **genes** in those chromosomes is a protein. Proteins play crucial roles in essentially all biological processes. When you observe a **cell** through the lens of a microscope, what you are really seeing are proteins in action. There are proteins that give the cell its form and structure, whereas other proteins perform all the vital functions required for the cell to operate. Proteins can function as catalysts (changing the rate of chemical reactions), in the

transport and storage of other molecules (such as oxygen or iron), and in immune protection, among many other functions. They are able to generate movement, transmit nerve impulses through membrane receptors, act as hormones, and provide control of growth and **differentiation**.

In their most basic state, proteins are composed of a **linear** chain of amino acids, and these linear molecules normally fold up into specific three-dimensional shapes. A protein's **function** directly depends on its folded structure. Additionally, each protein contains a wide range of functional groups (groups of atoms attached to the amino acids that participate in specific chemical reactions) that may affect its final shape.

Functional groups are added to the protein after it is synthesized in the **ribosomes** in a process called post-translational modification, which takes place in the **endoplasmic reticulum**. What are these post-translational modifications for? These chemical modifications contribute to the proper folding of proteins, promote their activation from inactive forms, affect their functions, determine their cellular localizations, or mark them for secretion. These modifications affect the overall condition of proteins within the cell and/or the organism. Post-translational modifications include: the addition of phosphate groups (**phosphorylation**), sugars (glycosylation), fats (lipidation), acetyl groups (**acetylation**), and the breaking of proteins into fragments (proteolysis). There are more than 100 different types of these modifications, reflecting the importance of post-translational modification in protein functions.

Some proteins do not fold into their correct three dimensional structures by themselves. They need help. Specialized proteins, collectively known as chaperones, come to their rescue. The mission of the chaperones is to help other proteins fold into their correct **configuration** and thus acquire functionality (Herbert & Molinari 2007).

The Discovery of Calreticulin: Many Names, One Protein

Calreticulin was discovered in skeletal muscle cells in 1974. Thomas Ostwald and David MacLennan were characterizing proteins that bind to calcium in the sarcoplasmic reticulum — a specialized type of endoplasmic reticulum found in muscle cells. Since calcium is essential for muscle contraction and relaxation, they hoped to learn about the regulation of calcium by studying these proteins in muscle cells. Ostwald and MacLennan isolated seven proteins from an extract of rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, and when they measured the calcium binding activity, only one protein showed a high affinity for the element. They gave this newly identified protein the name "high affinity calcium binding protein" (HABP), for obvious reasons.

Fifteen years later, advances in molecular biology allowed scientists to clone and characterize the amino acid sequence of HABP (Fliegel et al. 1989). To their surprise, when they compared its amino acid sequence to those of other calcium binding proteins reported in the literature, they learned that the sequence was identical to those of calregulin, CRP55, CaBP3, ERp60, and calsequestrin-like protein (Michalak et al. 1992). Out of all these proteins, CRP55 was the first sequenced and proposed to be involved in calcium storage, a prediction that turned out to be correct. The authors named this protein calreticulin (Smith & Koch 1989). Previously, calregulin had been localized in the endoplasmic reticulum (Waisman et al. 1985), and calreticulin in the luminal material of that organelle (Macer and Koch 1988). All of these proteins had been discovered by different research groups studying a variety of non-muscle cells, such as liver and brain cells. To avoid confusion, all of the laboratories involved reached a consensus to name the protein "calreticulin," reflecting its calcium binding capacity and its localization in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum. At the time, they had no idea that this multi-named protein would also turn out to be a multifaceted molecule. Next, scientists compared the human calreticulin (CRT) amino acid sequence with other known sequences from different organisms using phylogenetic analyses. Their results showed that CRT is a conserved protein, suggesting that it plays an essential role in cell physiology. So far, CRT has been found in all eukaryotic cells, except erythrocytes — these cells lack an ER — and yeast (Michalak 1999).

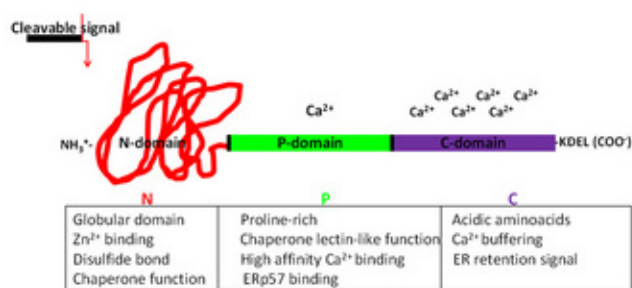


Figure 1: Structure and functions of the calreticulin domains

© 2010 Nature Education All rights reserved. 

Scientists performed additional analyses of CRT's amino acid sequence using computational methods to predict relevant features about its structure. They learned that CRT has three domains. (i) The first domain is an amino (N) terminal domain, which has a highly conserved amino acid sequence that has been found in proteins with chaperone functions and in proteins that have direct interactions with other proteins. CRT contains a cleavable signal sequence in this domain, which is found in proteins that are marked for

targeting to the ER, and the presence of this signal indicates that CRT is transported into the ER following synthesis. (ii) The second domain is a central or P domain, which is rich in the amino acid proline. This domain contains a binding site with a high affinity for calcium and a lectin-like chaperone site — lectin is a protein that interacts with sugar residues. This suggests that CRT, like many proteins in the endoplasmic reticulum, participates in calcium metabolism and interactions with glycoproteins. (iii) The third domain, the carboxyl (C) domain, is rich in acidic amino acids that give CRT a high capacity for binding calcium. This domain contains a KDEL signal — a four amino acid signal composed of lysine (K), aspartate (D), glutamate (E), and leucine (L). This signal is present in many soluble proteins in the endoplasmic reticulum, and serves as a retention signal for proteins in this organelle. Together, these domains confirm that CRT is an endoplasmic reticular protein (Figure 1).

Once scientists have some knowledge about the structure of a protein, they can then make predictions about the protein's functions. The structure of CRT suggested that it has two main functions: i) CRT acts as a chaperone helping other proteins fold correctly and become functional proteins (this is considered a characteristic quality control process of the endoplasmic reticulum), and ii) CRT regulates intracellular calcium levels, acting as a sensor and buffer of this element in the ER lumen.

Once the scientists made these predictions, they had to design experiments to examine their hypotheses. How did they show that CRT was a chaperone and that the protein participated in calcium metabolism? To test these hypotheses required many years of hard work and painstaking experiments.

The Life of CRT as a Chaperone

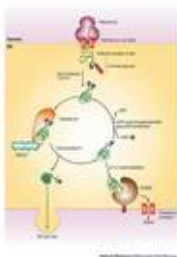


Figure 2

In 1995, scientists at Yale University demonstrated that CRT acts as a chaperone. They used immunoprecipitation experiments — in which antibodies are used to precipitate proteins — to show that CRT associates transiently with a large number of cellular proteins immediately after their synthesis (Peterson et al. 1995). Many genes are translated into proteins by ribosomes that are attached to the ER membranes. Since proteins need to fold correctly to function properly, the endoplasmic reticulum has a quality-

control system for proof-reading newly synthesized proteins. If the folding and maturation process of a protein is incorrect, then the protein is not transported to its final destination in the cell, and is eventually degraded. To distinguish between correct and incorrect conformations, the cell uses various sensor molecules, such as molecular chaperones. What do chaperones do?

When a **polypeptide** is incorrectly folded, it is bound by one or more chaperones (including CRT) and retained in the endoplasmic reticulum. The chaperones help the polypeptide fold into the correct configuration. If the polypeptide fails to fold properly, it will not be transported to its final destination. Instead, it will be transferred from the endoplasmic reticulum back to the cytoplasm where it will be degraded by the **proteasome**, a multi-protein complex where proteins are broken down into fragments. This mechanism prevents the expression, aggregation, and secretion of misfolded proteins, which can be detrimental to the cell. If the newly synthesized protein is properly folded, it will be transported to the Golgi complex and secreted. As a final option, if the polypeptide does not achieve its native **conformation** and still has unfolded domains, it can be re-bound by CRT, giving it another chance to fold into the proper conformation (Figure 2).

CRT Participates in Calcium Metabolism

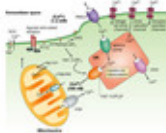


Figure 3

In 1999, Mesaeli et al. decided to investigate the functions of CRT *in vivo*. To this aim, they genetically engineered CRT deficient mice. They found that elimination of the CRT gene resulted in defects in heart development and function, so the embryos were unable to survive. This was a surprising result, since they knew that CRT was a minor component of the mature heart. Next, they decided to generate a genetically modified (transgenic) mouse that expressed a protein that was originally isolated from a jellyfish called **green fluorescent protein**. This fluorescent protein can be used to track the expression of a gene of interest, in this case the gene encoding CRT. Using this approach, the scientists aimed to study under which conditions the CRT gene was active or inactive. If the CRT gene was active, then fluorescent protein would be visible, and if CRT was inactive, then no fluorescent protein would be **observed**.

Their experiments showed that the CRT **gene** was active during the early stages of cardiac development, since they detected a fluorescent signal in the

embryo's heart. However, they observed that the CRT gene switched off in mature cardiac tissue. In addition, they noted the key finding that cells deficient in CRT were unable to release calcium from the endoplasmic reticulum into the **cytosol** upon stimulation. The scientists concluded that the impairment in cardiac development was due to the CRT's calcium regulating function (Figure 3).

Multi-Functionality

Besides the essential functions CRT performs in the ER lumen, this multifaceted protein has also been implicated in many completely unexpected roles that occur at the cell surface, in the cytosol, within the **nucleus**, and in the extracellular matrix. Surprisingly, CRT has been detected in all of these cellular regions. Indeed, since the discovery of CRT's chaperone and calcium-regulating functions, scientists have learned that CRT has many other duties in the cell. CRT has been implicated in diverse cellular processes including signaling, regulation of **gene expression**, cell adhesion, **apoptosis** (programmed cell death), wound healing, removal of cancer cells, and autoimmunity. Now that is multi-functionality!

Calreticulin in Parasite Infections: A Personal Encounter

Taenia solium tapeworms in action

In vitro cultivated *Taenia solium* tapeworms showing movement of the suckers and rostellum, which are the intestinal attachment structures.

© 2010 **Nature Education** All rights reserved. 

Calreticulin was discovered in *Taenia solium* — a tapeworm that infects humans — by serendipity (Video at right). At the time, we were trying to characterize the parasite's glycoproteins — proteins with sugars molecules attached to them — since they are important for diagnosing neurocysticercosis, a serious condition caused by the larval stage of this parasite. To do so, we used antibodies that specifically recognized these glycoproteins. Surprisingly, among the proteins we isolated, we came across an unexpected guest — CRT. What could explain this finding? We have two possible explanations. The simplest is that CRT is present in a glycosylated form in this parasite — CRTs in plants have been found to have attached sugars. The second explanation, however, is more interesting. As we mentioned earlier, CRT is a lectin-like chaperone that interacts with glycosylated proteins. Therefore, it is possible that CRT was bound to one of the parasite's glycoproteins when the antibodies were generated, and thus, one of these antibodies selectively was able to recognize CRT. We are currently studying this surprising finding.

Since CRT has so many functions, we immediately wondered what role it could play in *T. solium*. As expected from its known functions, we observed

that CRT from *T. solium* binds calcium. We also observed that CRT expression is developmentally regulated in the parasite. We used immunological techniques to identify the location of CRT. By using antibodies that specifically recognized CRT, we were able to demonstrate that CRT is mainly present during germ cell development and embryogenesis. However, its expression is strictly regulated, both spatially and temporally. CRT is expressed in the germinal cells, but once fertilization takes place, its expression starts to diminish, until it is practically absent in the infective egg. These findings led us to hypothesize that CRT had an important role in parasite development, and that CRT might be used to generate a vaccine to interfere with the tapeworms' growth.

Table 1. Calreticulin functions in parasites that cause disease in humans

Parasite	Disease	CRT Localization	CRT Function
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amibiasis	ER, cell surface, uropod	Phagocytosis
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas disease	ER, cell surface	Lectin-like chaperone, interaction with C1q, IgG from patients
<i>Leishmania donovani</i>	Visceral leishmaniasis	Somatic and secreted forms	Involved in secretion of acid phosphatases
<i>Necator americanus</i>	Hookworm infection	Somatic and secreted forms	Allergen, induces basophil histamine release C1q
<i>Schistosoma mansoni</i>	Schistosomiasis	Somatic and secreted forms, penetration glands	Regulation of Ca ²⁺ dependent proteases in penetration and migration, T and B cell imm
<i>Taenia solium</i>	Taeniosis and neurocysticercosis	Somatic and secreted forms, gametes and developing embryos	Possible role in egg development

After several vaccination trials in a hamster experimental model, we observed that vaccinated animals contained fewer parasites than unvaccinated control animals. Most importantly, the parasites were unable to mature in the vaccinated animals (Mendlovic 2004, 2006, Leon-Cabrera 2009). CRT is not unique to *T. solium*. It has also been described in several other parasites (Table 1). We still have many questions concerning CRT in *T. solium*. For instance, is it secreted by the parasite? If so, could it interact with immune cells from the host? What are the mechanisms responsible for the impaired development of the parasite following vaccination? We are currently trying to answer these questions.

Summary

Scientists have just begun to understand the multiple facets of CRT functions, and there are more questions than answers. Recently, scientists showed that when CRT was applied directly to the surface of cutaneous wounds, it induced cell proliferation and resulted in faster healing (Gold et al. 2010). Scientists have also identified alternative forms of the protein (isoforms) in both mammals and plants, in addition to different post-translationally modified forms (Michalak 1999). These characteristics,

together with the fact that CRT modulates calcium signaling and is involved in correctly folding many proteins, may explain the plethora of functions that are regulated by this multifaceted protein. CRT is a protein with such extraordinary characteristics that will certainly continue to puzzle researchers for years to come.

References and Recommended Reading

Fliegel, L., Burns, K., et al. [Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein \(calreticulin\) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.](#) *Journal of Biological Chemistry* **264**, 21522–21528 (1989).

Gold, L. I., Eggleton, P., et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB Journal* **24**, 665–683 (2010).

Herbert D, N. & Molinari M. [In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation and related diseases.](#) *Physiological Reviews* **87**, 1377–1408 (2007).

León-Cabrera, S., Cruz-Rivera, M., et al. Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination. *Methods*. **49**, 346–350 (2009).

Macer, D. R. & Koch, G. L. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* **91**, 61–70 (1988).

Mendlovic, F., Ostoa-Saloma, P., et al. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *Journal of Parasitology* **90**, 891–893 (2004).

Mendlovic, F., Carillo-Farga, J., et al. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *Journal of Parasitology* **92**, 789–795 (2006).

Mesaeli, N., Nakamura, K., et al. **Calreticulin is essential for cardiac development.** *Journal of Cell Biology* **144**, 857–868 (1999).

Michalak, M., Corbett, E. F., et al. **Calreticulin: one protein, one gene, many functions.** *Biochemical Journal* **344**, 281–292 (1999).

Michalak, M., Milner, R. E., et al. Calreticulin. *Biochemical Journal* **285**, 681–692 (1992).

Ostwald, T. J. & MacLennan, D. H. **Isolation of a high affinity calcium-binding protein for sarcoplasmic reticulum.** *Journal of Biological Chemistry* **249**, 974–979 (1974).

Peterson, J. R., Ora, A., et al. **Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins.** *Molecular Biology of the Cell* **6**, 1173–1184 (1995).

Smith, M. J. & Koch, G.L. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO Journal* **8**, 3581–3586 (1989).

Waisman, D.M., Salimath, B.P., et al. Isolation and characterization of CAB-63, a novel calcium-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 1652–1660 (1985).

Respuesta inmunitaria contra calreticulina de *Taenia solium*

Fela Mendlovic^{1,2}

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

² Facultad de Ciencias de las Salud, Universidad Anáhuac del Norte, Huixquilucan, México

Taenia solium causa dos enfermedades importantes en el ser humano. La mayor parte de la investigación se ha enfocado en el estadio larvario o metacestodo, debido a que causa neurocisticercosis, una de las parasitosis más comunes del sistema nervioso central. El portador del parásito adulto es el principal factor de riesgo para adquirir neurocisticercosis y, sin embargo, se conoce muy poco sobre la inmunidad intestinal inducida durante la teniasis. Esto se debe a que el ser humano es el único huésped definitivo de la tenia y, por lo tanto, es necesario recurrir a modelos experimentales para estudiarla. Desde hace varios años, en el laboratorio hemos utilizado el modelo experimental del hámster dorado para determinar los parámetros inmunológicos y de desarrollo de *T. solium* (1,2).

La calreticulina es una proteína ubicua y muy conservada, involucrada en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} y en el plegamiento correcto de proteínas "glucosiladas" (*glycosylated*). Estas dos funciones denotan su importancia e influencia en diversos procesos celulares (3). Inicialmente, fue descrita en la luz del retículo endoplásmico y, recientemente, se ha identificado en la superficie de varias células, así como en productos de excreción y secreción de varios helmintos (4,5). La calreticulina interactúa con el sistema inmunitario del huésped, pues los pacientes con tripanosomosis, esquistosomosis y oncocercosis tienen anticuerpos anticalreticulina (6,7) e, interesantemente, se expresa exageradamente en las parasitosis intestinales crónicas en el ratón (8). Además, se ha demostrado que la calreticulina de *Heligmosomoides polygyrus* se secreta, induce la producción de IL-4 e IL-10, y se une a células dendríticas por medio del receptor carroñero A (9). Se ha propuesto que la calreticulina de parásitos podría representar un patrón molecular asociado a patógenos capaz de interactuar con células dendríticas y dirigir la respuesta inmunitaria hacia un perfil Th2 (10,11).

En nuestro laboratorio, identificamos y expresamos de forma recombinante la calreticulina de *T. solium*, la que se expresa de manera diferencial durante la gametogénesis y la embriogénesis, además de estar presente en los miocitos de las ventosas y en los citones subtegumentarias;

ambos tipos celulares se encuentran en estrecho contacto con la mucosa intestinal del huésped (12,13). La calreticulina de *T. solium* está presente en los productos de excreción y secreción de tenias cultivadas *in vitro*. Además, hemos demostrado que en ratones inmunizados por vía oral con la calreticulina de *T. solium*, se induce la producción de citocinas de tipo Th2 en los ganglios linfáticos mesentéricos e IgA específica, tanto a nivel local como sistémico. La administración subcutánea de esta proteína induce preferentemente anticuerpos IgG1 asociados también a respuestas de tipo 2 (14).

En el modelo experimental de la teniasis, la calreticulina de *T. solium* induce proliferación de linfocitos de bazo de animales a los 20 días después de la infestación, mientras que los linfocitos de ganglios linfáticos mesentéricos no responden a este estímulo. Al analizar la respuesta a un sobrenadante de tenias después de ser sometidas a ultrasonido (*sonicated*), se observa un patrón similar, con una mayor estimulación de las células del bazo. En cuanto a la respuesta humoral, 100 y 50 % de los animales presentan anticuerpos séricos específicos contra el sobrenadante y la calreticulina de *T. solium*, respectivamente.

Nuestros datos sugieren que durante la infección por el parásito adulto de *T. solium*, hay una modulación de la respuesta inmunitaria en las mucosas. Además, dicha calreticulina induce preferentemente una respuesta de tipo Th2, que es una cualidad que caracteriza a los helmintos, y crea un ambiente antiinflamatorio que podría ser explotado con fines terapéuticos de inmunomodulación.

Referencias

1. Maravilla P, Ávila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol*. 1998;84:882-6.
2. Merchant MT, Aguilar L, Ávila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium*: Description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol*. 1998;84:681-5.
3. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochem J*. 1999;344:281-92.
4. Suchitra S, Joshi P. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and

- immune evasion by the parasite. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1722:293-303.
5. Guillou F, Roger E, Mone Y, Rognon A, Grunau C, Theron A, *et al*. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;155:45-56.
 6. Rokeach LA, Zimmerman PA, Unnasch TR. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infect Immun*. 1994;62:3696-704.
 7. Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguillon JC, *et al*. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop*. 2000;75:291-300.
 8. Morgan C, LaCourse EJ, Rushbrook BJ, Greetham D, Hamilton JV, Barrett J, *et al*. Plasticity demonstrated in the proteome of a parasitic nematode within the intestine of different host strains. *Proteomics*. 2006;6:4633-45.
 9. Rzepecka J, Rausch S, Klotz C, Schnoller C, Kornprobst T, Hagen J, *et al*. Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A. *Mol Immunol*. 2009;46:1109-19.
 10. Mendlovic F, Flisser A. Dendritic cells in the gut: Interaction with intestinal helminths. *J Biomed Biotechnol*. 2010;250563.
 11. Terrazas CA, Terrazas LI, Gómez-García L. Modulation of dendritic cell responses by parasites: A common strategy to survive. *J Biomed Biotechnol*. 2010;357106.
 12. Mendlovic F, Carrillo-Farga J, Torres J, Lacleste JP, Flisser A. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *J Parasitol*. 2006;92:789-95.
 13. Mendlovic F, Ostoa-Saloma P, Solís CF, Martínez-Ocana J, Flisser A, Lacleste JP. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *J Parasitol*. 2004;90:891-3.
 14. Fonseca-Coronado S, Ruiz-Tovar K, Pérez-Tapia M, Mendlovic F, Flisser A. *Taenia solium*: Immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice. *Exp Parasitol*. 2010;127:313-7.



Respuesta protectora inducida por la calreticulina de *Taenia solium*

Sonia León-Cabrera

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Introducción

La neurocisticercosis humana es causada por el estado larvario del cestodo *Taenia solium*. Los estudios epidemiológicos han demostrado que el portador de la tenia adulta intestinal en el hogar es el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis (1). La vacunación es una alternativa para prevenir el establecimiento o el desarrollo del parásito adulto. Debido a que la infección ocurre por vía oral, es necesario inducir una efectiva y eficiente inmunidad intestinal. La calreticulina de *Taenia solium* es una proteína multifuncional presente en las células subtegumentarias y musculares del cisticercos y la tenia; además, se expresa de manera diferencial durante la gametogénesis y la embriogénesis (2). Esta proteína es reconocida por su capacidad de inducir respuesta inmunitaria de tipo 2 (3), determinante para la protección contra helmintos intestinales.

Objetivo

Evaluar la protección inducida por la vacunación oral con calreticulina de *Taenia solium* en el modelo

experimental de teniasis intestinal en el hámster dorado.

Materiales y métodos

Se obtuvo calreticulina de *Taenia solium* en un sistema de expresión bacteriano y con esta proteína más toxina colérica como adyuvante, se inmunizaron hámsters por vía oral en cuatro ocasiones una vez por semana. Los grupos control fueron inmunizados con toxina colérica o con el diluyente. Quince días después de la última inmunización, los hámsters se retaron por vía oral con cuatro cisticercos provenientes de un cerdo infectado de manera natural. Durante la necropsia se determinó el porcentaje de infección, y la longitud y la localización de los parásitos en el intestino. La respuesta inmunitaria se evaluó por medio de ELISA, cortes histológicos, proliferación linfoide y PCR en tiempo real.

Resultados

La inmunización oral con calreticulina de *Taenia solium* indujo una reducción en el número de tenias de 44 % hasta 100 %, dependiendo de las

TEMAS SELECTOS
DE MICROBIOLOGÍA
MÉDICA ◀ E ◀ INFECTOLOGÍA

ANA FLISSER

(coordinadora)

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

XALAPA, VER., MÉXICO

2015

INMUNOMODULACIÓN POR PARÁSITOS INTESTINALES

*Fela Mendlovic y Ana Flisser**

La inmunología y la parasitología han tenido una larga y exitosa interacción, tanto en el apoyo del inmunodigánóstico de enfermos como en el campo de la seroepidemiología y, más recientemente, en el descubrimiento de la capacidad de inmunomodulación que tienen los parásitos helmintos intestinales; esto último ha generado un gran avance en el conocimiento básico de la inmunología y abre un nuevo capítulo en el desarrollo de nuevas estrategias y fármacos de origen biológico para el tratamiento de enfermedades inmunológicas.

En los últimos años ha aumentado la prevalencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias como esclerosis múltiple (EM), diabetes mellitus e IBD (por sus siglas en inglés, *inflammatory bowel disease*), la que incluye dos entidades principales: enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, así como enfermedades alérgicas. En los Estados Unidos se estima que 23.5 millones de personas padecen enfermedades autoinmunes. Por otra parte, se ha registrado una baja significativa en la presencia de enfermedades por helmintos. Antes del siglo XX, prácticamente todos los individuos habían padecido al menos una parasitosis por helmintos. Además, los datos epidemiológicos indican que las enfermedades inflamatorias son menos comunes en países tropicales en vías de desarrollo y sugieren que la gente portadora de helmintos tiene menos enfermedades inflamatorias, autoinmunes y alérgicas. Esta información

* Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, fmendlo@yahoo.com; flisser@unam.mx.

se asocia a la hipótesis de la higiene, que explica por qué la prevalencia de estas enfermedades, debidas a respuestas inmunes exageradas o disfuncionales, ha aumentado en poblaciones que han adoptado prácticas higiénicas modernas y carecen de exposición a helmintos. La hipótesis de la higiene propone que estos parásitos inducen vías de regulación del sistema inmune a través de la estimulación de citocinas como interleucina 10 (IL-10) y TGF- β (por sus siglas en inglés *transforming growth factor*), así como de células que incluyen a las dendríticas (DCs por sus siglas en inglés, *dendritic cells*), macrófagos alternativamente activados, linfocitos T reguladores (Tregs) y linfocitos B. Estas células y citocinas pueden regular las respuestas Th1 y Th17 que, en muchas ocasiones, son responsables de las patologías inflamatorias, así como la misma respuesta Th2, que causa las enfermedades alérgicas como asma.

David Artis ha sido clave en dilucidar la participación de diferentes componentes de la respuesta inmune a nivel intestinal en respuesta contra helmintos. Recientemente demostró que los basófilos llevan a cabo funciones esenciales en modelos de inmunidad y de inflamación dependientes de citocinas de tipo Th2, generadas después de exposición a helmintos. Los basófilos migran a los ganglios linfáticos y presentan antígenos a linfocitos TCD4+, promoviendo su diferenciación hacia Th2; esto sucede en cooperación con DCs. La presentación de antígenos por parte de basófilos es una función de reciente identificación en estas células. Además, los basófilos producen IL-4 e IL-13, citocinas esenciales en la protección contra helmintos.

Históricamente, los eosinófilos se han asociado a helmintiasis. Por ejemplo, durante la uncinariasis se produce eosinofilia muy elevada. Los eosinófilos son células terminales que participan en la protección contra helmintos por su habilidad de mediar citotoxicidad in vitro dependiente de anticuerpos o de complemento y por la observación de que los eosinófilos se acumulan y degranulan en la vecindad de los parásitos dañados. Durante las infecciones por helmintos, tanto en seres humanos como en animales experimentales de laboratorio, estas células presentan cambios morfológicos y funcionales asociados a activación in vitro. Esta diferenciación incluye disminución en su densidad, regulación de moléculas superficiales de activación (CD69, CD25, CD44 y HLA-DR), citotoxicidad celular aumentada, liberación de gránulos, proteínas, citocinas, leucotrienos y otros mediadores de inflamación. A pesar de su gran capacidad de matar helmintos in vitro, la función precisa de los eosinófilos durante estas parasitosis no se conoce. En comparación con las bien descritas funciones de la

respuesta inmune adaptativa, la influencia de la respuesta inmune innata, especialmente en cuanto a DCs y a eosinófilos, aún debe ser dilucidada.

Aunque existen diferencias en el balance de las respuestas de citoquinas y de las células que se activan dependiendo del parásito y del hospedero, los helmintos intestinales generalmente son potentes inductores de la inmunidad tipo 2. La inmunidad protectora contra *Trichuris muris*, que se produce en el modelo murino, varía dependiendo del fondo genético de la cepa utilizada y es similar al rango de respuestas observadas en la población humana expuesta a *T. trichiura*, una de las parasitosis intestinales en seres humanos más frecuentes en el mundo. La mayoría de las cepas de ratón, como BALB/c, son resistentes a *T. muris* y expulsan rápido al parásito, en cambio pocas cepas, como AKR, son susceptibles; éstas permiten el desarrollo de parásitos adultos y producen infecciones crónicas en el ciego y en el colon proximal. Está bien establecido que la respuesta Th2 es la dominante y necesaria para la expulsión de los gusanos en las cepas resistentes. En cambio, las cepas susceptibles, más que no poder montar una respuesta inmune contra *T. muris*, generan una respuesta Th1 que es inapropiada y se asocia a altos niveles de IL-12 y de IFN- γ .

Las diferencias en la inmunidad Th2 que se generan en respuesta a diferentes especies de helmintos se ejemplifican en los trabajos de investigación de Rick Maizels, quien ha sido uno de los pioneros en el estudio de la respuesta inmune en helmintos. Estos parásitos han aprendido a explotar las rutas inmunorreguladoras de sus hospederos mamíferos a lo largo de la coevolución resultando, en muchos casos, en tolerancia a las infecciones. Las parasitosis intestinales por nemátodos son cosmopolitas y de alta prevalencia y, como las de platemintos, están dominadas por una respuesta inmune Th2. Mientras que los mecanismos mediados por células Th2 por lo general causan la expulsión de los helmintos intestinales, las rutas precisas difieren entre las especies, probablemente porque cada parásito ha desarrollado una estrategia evolutiva singular de evasión que ha permitido que se adapte a un nicho particular dentro del hospedero. Por ejemplo, *Nippostrongylus brasiliensis* es un estimulador potente de inmunidad desviada hacia tipo Th2, los ratones pueden eliminar a los parásitos a través de una ruta dependiente de IL-4/IL-13 y STAT-6 (por sus siglas en inglés, *signal transducer and activator of transcription 6*) que involucra la proliferación de células caliciformes en el intestino y la producción de moco. En contraste, *Heligmosomoides polygyrus* induce una com-

binación de respuestas de linfocitos Th2 y Treg que resultan en una infección crónica y, sólo después de que los parásitos se expulsan debido al tratamiento farmacológico, aparece inmunidad a reinfección, que depende del receptor de IL-4 y es mediada por macrófagos alternativamente activados.

Debido a que los parásitos helmintos son expertos en modificar la actividad inmunológica de sus hospederos, se han usado modelos de roedores que simulan enfermedades inflamatorias del ser humano como IBD, EM, diabetes tipo I y artritis reumatoide para estudiar la capacidad de las helmintiasis de reducir los síntomas y dilucidar los mecanismos que utilizan los helmintos para la regulación. Actualmente se ha generado gran interés en el estudio del sistema inmune de los seres humanos en respuesta a sus parásitos metazoarios. Existen múltiples datos que comprueban que la infección con helmintos puede reducir la gravedad de las enfermedades inflamatorias intestinales; por lo que se están desarrollando tratamientos basados en la administración de nemátodos. Por ejemplo, Joel Weinstock trabaja con *Trichuris suis*, cuyos huevos constituyen ahora un fármaco aceptado por la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) para controlar el asma y otras entidades alérgicas como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa.

La EM es una enfermedad inflamatoria con efectos desmielinizantes a nivel del sistema nervioso central y que resultan en falta de comunicación neuronal. Los síntomas incluyen alteraciones motoras y cognitivas, problemas visuales y de lenguaje, depresión, entre otras. Actualmente no existe cura para esta enfermedad. Sin embargo, se ha reportado que pacientes con EM que presentan infecciones con helmintos tienen una enfermedad más leve por lo que se decidió llevar a cabo un estudio reciente de fase I en donde se trataron 5 pacientes con EM con huevos de *T. suis* que se utilizan en la terapia contra IBD. Los resultados mostraron una disminución de las lesiones en el sistema nervioso central y un aumento en los niveles de citocinas IL-4 e IL-10 en la sangre de 4 de los 5 pacientes que participaron en el ensayo clínico. Aunque es necesario realizar estudios para investigar más a fondo los efectos, mecanismos involucrados y seguridad de este tipo de terapia, los resultados son promisorios.

Todavía no se han usado helmintos para el tratamiento de la diabetes tipo I en humanos, que es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células β del páncreas que producen insulina por células T autoinmunes. La falta de insulina puede ser fatal si no hay terapia de reemplazo. Sin embargo ya hay planes para ensayos clínicos,

pues existen diversos reportes en modelos experimentales murinos en los que se presenta protección contra la insulinitis tras la exposición a parásitos como *Schistosoma mansoni*, *Trichiella spiralis* y *H. polygyrus*. La protección está asociada a la inducción de IL-10, expansión de linfocitos NKT (por sus siglas en inglés *natural killer T cells*) y a un incremento en Tregs en bazo y páncreas en el caso de *S. mansoni*. En *T. spiralis* la protección se asocia a un incremento en IL-4 en bazo sin producción de IL-10, mientras que en el caso de *H. polygyrus*, además de la IL-4, se observa aumento de macrófagos alternativamente activados. Por lo tanto, diversos helmintos pueden generar diferentes vías de regulación.

Asimismo, los estudios en seres humanos y en modelos experimentales indican que, además de inhibir la respuesta tipo Th1, las helmintiasis inhiben respuestas tipo Th2 en contra de antígenos no relacionados, por ejemplo, en enfermedades alérgicas, que se caracterizan por un perfil Th2 en individuos con atopía, se presenta aumento de células cebadas, eosinófilos y células caliciformes, así como secreción de citocinas Th2 y de IgE, similar a lo que sucede en las infecciones por helmintos. Sin embargo, en aquellas personas que viven en países endémicos para helmintiasis intestinales, hay menor incidencia de enfermedades alérgicas que en personas de países donde estas infecciones son poco prevalentes o no existen. Esto sugiere que las helmintiasis pueden proteger del desarrollo de inflamación alérgica, como se propone en la hipótesis de la higiene. La ascariosis afecta a más de 1.4 mil millones de personas en el mundo y se ha visto que la infección con este parásito altera la respuesta alérgica al disminuirla o incrementarla, lo que se ha denominado IgE "buena" o "mala". Para su estudio se han desarrollado varios modelos en ratones. Por ejemplo, cuando se induce conjuntivitis alérgica, la presencia de una infección aguda por *Ascaris* exacerba la alergia, pero cuando es crónica protege contra exposiciones subsecuentes de conjuntivitis. La protección se debe a un aumento global de IL-10, asociado a linfocitos Tregs CD4+/CD25+. Al aislar estos linfocitos reguladores provenientes de ratones con ascariosis crónica y transferirlos a ratones que posteriormente fueron sensibilizados con polen, se registró una respuesta baja ante un nuevo contacto con el alérgeno. Estos datos sugieren que los linfocitos Tregs CD4+/CD25+ inducidos por *A. suum* pueden reducir directamente la alergia causada por alérgenos de origen no parasitario.

Los mecanismos moleculares que intervienen en la generación de las redes de regulación inducidas por los helmintos apenas comienzan a dilucidarse. Las células presentadoras de antígenos (APC por sus siglas

en inglés, *antigen presenting cells*) son necesarias para activar a las células T y se inicie un proceso de inmunidad adaptativa; por lo tanto, los helmintos utilizan un mecanismo probable para controlar al sistema inmune, la modulación de DCs, que son un eslabón central de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las DCs son un tipo único de APC, pues perciben a los patógenos invasores e inician una respuesta inmune, ya sea Th1, Th2 o Th17 dependiendo de la naturaleza del antígeno involucrado. Esto hace más sorprendente aun que los parásitos hayan desarrollado estrategias para modificar la función de estas células inmunes. Aunque originalmente se había pensado que la inducción de una respuesta Th2 por helmintos era debida a la falta de maduración de las DCs, cada vez surgen más evidencias de que los productos de los parásitos desvían de manera activa la respuesta inmune hacia Th2 al promover la maduración de las DCs a un fenotipo Th2, pues es evidente que dicha inducción ocurre después de la exposición de las DCs a productos de helmintos, entre éstos la glicoproteína ES-62 de la filaria *Acanthocheilonema viteae*, el antígeno soluble del huevo del tremátodo *S. mansoni* o los productos de excreción/secreción del nemátodo *N. brasiliensis*. Además de tener un efecto directo sobre las DCs inhibiendo la producción de IL-12, se ha demostrado que, durante las infecciones por nemátodos, éstos pueden inhibir la migración de DCs a los nódulos linfáticos mesentéricos y modificar las respuestas de los linfocitos T en estos órganos linfoides. Más aún, los productos de nemátodos pueden también inducir la diferenciación de Tregs CD4+CD25+ que secretan IL-10 y a su vez regular las respuestas efectoras Th1, Th2 o Th17.

La terapia que utiliza infecciones con helmintos para modular los procesos inflamatorios presenta muchos beneficios. Sin embargo, también puede haber efectos colaterales no deseados. Se sabe que los helmintos al inducir una respuesta inmune polarizada a Th2 pueden llegar a establecer infecciones crónicas que generalmente son asintomáticas y no generan patología importante. Esto es ventajoso para los parásitos, pues pueden sobrevivir por largo tiempo en su hospedero y, al mismo tiempo, al inhibir la respuesta inmune o volverla ineficiente les permite completar su ciclo de vida. Como consecuencia, las parasitosis por helmintos modulan la respuesta inmune hacia antígenos no relacionados y pueden predisponer al hospedero a infecciones secundarias más severas debidas a varios patógenos, desde virus hasta protozoarios. Por ejemplo, María Yazdanbakhsh y su grupo han analizado moléculas del sistema inmune en niños y en adultos del Continente Africano, en personas con esquistosomosis y en individuos no parasitados, habiendo

una mayor producción de IL-4 en las personas parasitadas, mientras que la respuesta inmune tipo Th1, por lo general, está suprimida. También demostraron que no se induce protección al vacunar contra influenza a los niños de Gabón que tienen infecciones por esquistosomas, aunque sí hay producción de anticuerpos. Los linfocitos CD4+ en estos niños después de la vacunación no producen IFN- γ , TNF- α ni IL-2 en comparación con los niños no infectados. Por otra parte, en un estudio que involucró a 12 pacientes con EM con infección concomitante con diferentes helmintos, 4 de ellos tuvieron que ser tratados con antihelmínticos debido a que presentaron exacerbación de los síntomas propios de la infección. Esto ha llevado a que actualmente se traten de identificar las moléculas producidas por los helmintos capaces de inducir regulación sin necesidad de una infección para que se pueda traducir en mejores tratamientos para enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Durante la fase migratoria de *Ascaris suum* y de la mayor parte de los helmintos, el parásito presenta varios estadios de desarrollo larvario en diferentes órganos del hospedero. El ciclo de vida complejo dificulta el uso terapéutico de *A. suum*, ya que se puede desarrollar fibrosis pulmonar cuando las larvas migran por el pulmón generando el síndrome de Loeffler, en el cual hay una acumulación de eosinófilos en el pulmón en respuesta a una parasitosis. Para caracterizar la base molecular de la modulación de enfermedades alérgicas y para evitar la patología asociada con la migración larvaria, se evaluó la actividad de productos de *A. suum* en un modelo de inflamación alérgica. Se seleccionó fluido pseudocelómico por ser metabólicamente activo, contener varios antígenos y porque se obtiene con facilidad de la cavidad de los gusanos. Este fluido, mezclado con ovalbúmina, aumentó la producción de IL-10 y el desarrollo de linfocitos Tregs, las que suprimieron la hipersensibilidad retardada hacia antígenos no parasitarios, aunque no se evaluaron en respuestas Th1 en mucosas. Por otro lado, se evaluaron extractos tanto del parásito adulto como de sus huevos, los que mostraron un perfil inhibitorio de inflamación alérgica similar, indicando que este proceso no es específico de estadio y que con seguridad involucra diferentes antígenos del parásito. Los extractos antigénicos y los componentes de alto peso molecular que han sido purificados (Asc, PI o PAS-1) a partir de gusanos adultos de *A. suum* inhiben la respuesta Th1 e, incluso, el asma alérgico; el efecto inmunosupresor se acompaña de citocinas de perfil Th2, principalmente IL-4 e IL-10, en cuya ausencia, Asc y PI no pueden inducir regulación negativa de la respuesta Th1 o Th2 contra ovalbúmina.

En cuanto a proteínas específicas que provienen de parásitos, existen estudios que han demostrado que la cistatina, que es un inhibidor de la cisteína proteasa y que es producida por diferentes especies de filarias, protege contra la colitis y el asma en modelos experimentales de ratón. En el caso del modelo de asma, la protección estuvo mediada por macrófagos e IL-10. Otras moléculas que se han estudiado en este contexto incluyen a la ES-62, que es un producto de la filaria *A. vitae* que reside en el sistema linfático. Esta glicoproteína unida a fosforilcolina previene y revierte la artritis inducida por colágeno en un modelo murino. Sin embargo, la fosforilcolina es necesaria para que esta molécula ejerza su efecto, la proteína recombinante no funciona como reguladora. Se demostró que dos proteínas recombinantes que tienen efecto inmunomodulador, una de 53kDa obtenida de *T. spiralis* que mejora los síntomas en un modelo de IBD, además de disminuir las citocinas Th1, aumentan las Th2 y las regulatorias en el suero de los animales tratados. La segunda es una proteína con homología a galectina-9 del nemátodo *Toxocara leonina*; esta proteína se produjo recombinante y se demostró que disminuye la inflamación intestinal y aumenta los niveles de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF- β .

Los antígenos solubles de diversos helmintos pueden inducir distintos fenotipos de DCs en cuanto a la expresión de moléculas coestimuladoras y a la producción de citocinas. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmune por helmintos no necesariamente se restringe a desviar la respuesta hacia Th2 sino que también se presentan diferentes vías de activación de circuitos regulatorios, tanto de la inmunidad innata como adaptativa y que incluyen la participación de diferentes moléculas y de células inmunes. Las diferentes especies de helmintos y la gran diversidad de moléculas que producen representan una fuente enorme de posibles agentes con capacidad inmunomoduladora que podrían ser explotados para su uso como agentes terapéuticos novedosos, cuyo común denominador es la regulación del sistema inmune.

La uncinariasis humana se debe a los nemátodos *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, que infectan a más de 740 millones de personas, principalmente en áreas rurales tropicales y, debido a que se alimentan de la sangre del hospedero al que le causan anemia, generan un enorme costo económico calculado en años de vida ajustados por incapacidad (DALY, por sus siglas en inglés *disability adjusted life years*), cuyas pérdidas anuales son de más de 22 millones de DALY. Peter Hotez, primer investigador en desarrollar y evaluar una vacuna a partir de *N. americanus* con el antígeno Na-ASP-2, demostró recientemente que los

habitantes de áreas endémicas para este parásito producen niveles altos de IgE total y específica contra el antígeno utilizado para vacunar, que genera urticaria en las personas vacunadas. Estos datos muestran la propensión del antígeno de inducir una respuesta Th2 intensa. El estudio, además, resalta las diferencias entre una respuesta inmune natural a la helmintiasis y a la vacunación con un antígeno recombinante del parásito. La importancia de producir una vacuna eficiente es que, aunque el tratamiento con fármacos es muy efectivo, es difícil implementar un sistema de quimioterapia sostenida, especialmente en países en vía de desarrollo, en los que la reinfección es muy rápida (antes de 12 meses). Más importante aún es que la inducción de una respuesta Th2 por la uncinariasis ha eliminado, por ahora, la posibilidad de generar una vacuna que no exacerbe la respuesta Th2, hasta encontrar un antígeno que no estimule al sistema inmune durante la parasitosis, pero que sí lo haga por la vacunación, en particular porque, a diferencia de las infecciones por *A. lumbricoides* y *T. trichiura* cuya mayor intensidad de infección ocurre en niños, la intensidad de *N. americanus* y de *A. duodenale* es mayor en adolescentes y en adultos, siendo las personas de la tercera edad las que albergan mayor carga parasitaria.

En resumen, en las infecciones por helmintos intestinales, el equilibrio se polariza hacia una respuesta Th2. Esta polarización se ha explicado por la carencia de IL-12. Se sabe poco acerca de los mecanismos moleculares responsables del inicio de las respuestas Th2. Ahora el papel de las células epiteliales intestinales ha cobrado gran importancia debido a los hallazgos de que estas células se activan en respuesta a los parásitos, secretando alarminas como IL-25, IL-33 y TSLP (por sus siglas en inglés, *thymic stromal lymphopoietin*). Subsecuentemente, las células de la respuesta inmune innata tipo 2, como los nuocitos responden a estas señales secretando citocinas tipo 2 y, después, los linfocitos Th2 montan una respuesta más potente, se unen a la síntesis de las diferentes citocinas como IL-5, que es una citocina promotora de eosinofilia, así como a la de IL-4 e IL-13, que cooperan con linfocitos B y provocan el cambio de isotipo de anticuerpos de IgM a IgG4 e IgE y a la activación de macrófagos alternativamente activados. Además, IL-4 estimula la contracción muscular y el recambio de células epiteliales que contribuyen a la expulsión del parásito. IL-13 también induce la activación de células caliciformes y la producción de moco y RELM β (por sus siglas en inglés, *resistin-like molecule β*) que es una proteína con actividad antihelmíntica. Estas dos citocinas, que son esenciales en las respuestas tipo 2, son producidas también por otras células de la inmu-

nidad innata (basófilos y eosinófilos) y contribuyen a la amplificación de la respuesta. La exposición a helmintos también induce citocinas regulatorias como IL-10 y TGF- β , Tregs, así como DCs, linfocitos Tregs y linfocitos B reguladores. De hecho, hay moléculas solubles producidas por los helmintos intestinales que tienen la capacidad intrínseca de inducir la polarización hacia una respuesta Th2, sin embargo, es aún limitado el conocimiento de la naturaleza de estas moléculas y de los receptores en las células del hospedero que las reconocen. Cuando la respuesta inmune a los parásitos falla y estos no son eliminados, se genera una infección crónica que se caracteriza por anergia de linfocitos T. La anergia es un estado en el que los linfocitos no responden debido a una estimulación continua o a una estimulación en ausencia de moléculas coestimuladoras. Esta fase crónica puede estar asociada también a la activación de poblaciones celulares regulatorias. Este tipo de respuestas se ha observado en infecciones crónicas tanto en modelos experimentales como en infecciones humanas.

La capacidad de inducir circuitos regulatorios que poseen los productos derivados de helmintos intestinales representa una novedosa y prometedora opción en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, que abre nuevas líneas de investigación para dilucidar los mecanismos moleculares responsables de la regulación del sistema inmunológico, así como la posibilidad de desarrollar fármacos con propiedades antiinflamatorias.

Los autores desean agradecer al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto: IN214813.

BIBLIOGRAFÍA

- AL-RIYAMI, L. y W. Harnett. 2012. "Immunomodulatory Properties of ES-62, a Phosphorylcholine-containing Glycoprotein Secreted by *Acanthocheilonema vitae*", *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. 12: 45-52.
- ALLEN, J. E. y R. M. Maizels. 2011. "Diversity and Dialogue in Immunity to Helminths", *Nat. Rev. Immunol.* 11: 375-388.
- BALIC, A. *et al.* 2009. "Dynamics of CD11c+ Dendritic Cell Subsets in Lymph Nodes Draining the Site of Intestinal Nematode Infection", *Immunol. Lett.* 127: 68-75.
- COOKE, A. 2012. "Parasitic Worms and Inflammatory Disease", *Curr. Opin. Rheumatol.* 24: 394-400.
- CORREALE, J. y M. F. Farez. 2011. "The Impact of Environmental Infections (Parasites) on MS Activity", *Mult. Scler.* 17: 1162-1169.

- ELLIOTT, D. E. y J. V. Weinstock. 2012. "Helminth-host Immunological Interactions: Prevention and Control of Immune-Mediated Diseases", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1247: 83-96.
- FUJIWARA, R. T. *et al.* 2009. "Necator americanus Infection: A Possible Cause of Altered Dendritic Cell Differentiation and Eosinophil Profile in Chronically Infected Individuals", *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3: e399.
- GAZE, S. *et al.* 2012. "Characterising the Mucosal and Systemic Immune Responses to Experimental Human Hookworm Infection", *PLoS Pathog.* 8(2): e1002520.
- LITTLE, M. C. *et al.* 2005. "The Characterization of Intraepithelial Lymphocytes, Lamina Propria Leukocytes, and Isolated Lymphoid Follicles in the Large Intestine of Mice Infected with the Intestinal Nematode Parasite *Trichuris muris*", *J. Immunol.* 175: 6713-6722.
- MAIZELS, R. M. *et al.* 2012. "Susceptibility and Immunity to Helminth Parasites", *Curr. Opin. Immunol.* 24: 459-466.
- MEURS, L. *et al.* 2011. "Enhanced Pro-inflammatory Cytokine Responses Following Toll-like-receptor Ligation in *Schistosoma haematobium*-Infected Schoolchildren from Rural Gabon", *PLoS One.* 6: e24393.
- NEILL, D. R. y A. N. J. McKenzie. 2011. "Nuocytes and Beyond: New Insights into Helminth Expulsion", *Trends Parasitol.* 27: 214-221.
- PULENDRAN, B. y D. Artis. 2012. "New Paradigms in Type 2 Immunity", *Science.* 337: 431-435.
- SCHNEIDER, B. *et al.* 2011. "A History of Hookworm Vaccine Development", *Hum Vaccin.* 7: 1234-1244.



- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2014/000057
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de abril de 2014 (21.04.2014)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2013/005007
3 de mayo de 2013 (03.05.2013) MX
- (71) Solicitante: **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO [MX/MX]**; 9° Piso de la Torre de Rectoría, Ciudad Universitaria S/N, CP.04510, Distrito Federal (MX).
- (72) Inventores: **MENDLOVIC PASOL, Fela**; Cerrada de Juan Luis No. 18, Colonia Parques de la Herradura, CP. 52786, Huixquilucan, Estado de México (MX). **FLISSER STEINBRUCH, Ana**; Miguel de Cervantes Saavedra No.388, Torre 1, Depto.402, Colonia Irrigación, CP.11500, Distrito Federal (MX).
- (74) Mandatario: **FIGUEROA PÉREZ, Martha**; Edificio B, 3er Piso, Zona Cultural, Ciudad Universitaria, CP. 04510, Distrito Federal (MX).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF RECOMBINANT CALRETICULIN OF *TAENIA SOLIUM* IN ORDER TO INDUCE THE EXPRESSION OF INTERLEUKIN 10

(54) Título : USO DE LA CALRETICULINA RECOMBINANTE DE *TAENIA SOLIUM* PARA INDUCIR LA EXPRESIÓN DE INTERLEUCINA 10.

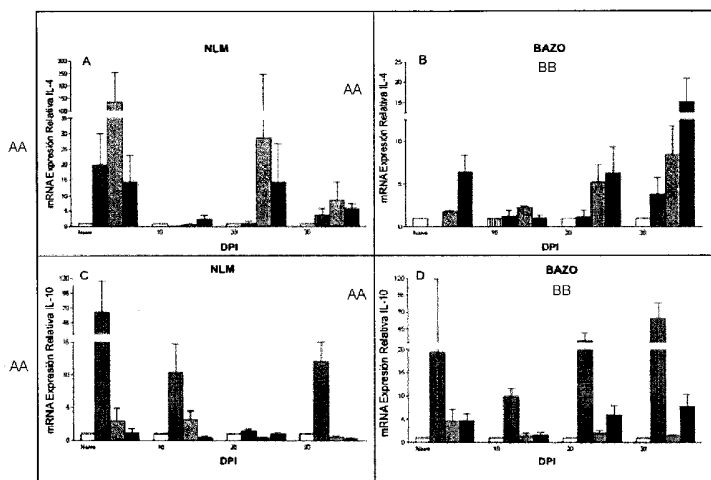


FIGURA 1

AA mRNA relative expression IL-4
AA mRNA relative expression IL-10
BB SPLEEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of a recombinant protein in order to induce the expression of interleukin 10, in which the protein is recombinant calreticulin of the parasite *Taenia solium* (rTsCRT) formulated in a physiological glucose solution administered orally or parenterally. The methodology used for the expression and purification of the rTsCRT as described in the present invention resulted in a recombinant protein expressed without post-transduction modifications, which has immune regulation effects and can stimulate the transcription levels of the mRNA that code for cytokines IL-4 and IL-10. The rTsCRT was expressed in an unlabelled *E. coli* system, although it can be applied to any expression system, whether in prokaryotic or eukaryotic cells. The rTsCRT is produced so that it can be used for the treatment of local and systemic inflammatory diseases.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

La presente invención se relaciona con el uso de una proteína recombinante para inducir la expresión de interleucina 10, en el que la proteína es calreticulina recombinante del parásito *Taenia solium* (rTsCRT) formulada en una solución glucosada fisiológica administrada de manera oral o parenteral. La metodología utilizada para la expresión y purificación de la rTsCRT que se describe en la presente invención, resultó en una proteína recombinante expresada sin modificaciones post-transduccionales que tiene efectos inmunológicos regulatorios y es capaz de estimular los niveles de transcripción de los mRNA que codifican para las citocinas IL-4 e IL-10. La expresión de la rTsCRT se realizó en un sistema de *E. coli* sin etiquetado, sin embargo aplicaría a cualquier sistema de expresión, ya sea en células procariontes o eucariontes. El propósito de producir rTsCRT es utilizarla para tratamiento de enfermedades inflamatorias locales o sistémicas.