

Participación de las células T reguladoras en la cisticercosis experimental murina por *taenia crassiceps*

Nataly Montserrat Ruiz-Monroy¹, Alexander López-Roblero¹, Marisol Nájera-Ocampo²,
Cynthia Camacho-Vázquez², Asiel Arce-Sillas¹, Didier Casanova-Hernández¹,
Héctor Palafox-Fonseca², Marlene Melo-Salas¹, Gladis Fragoso², Edda Sciutto-Conde¹,
Laura Adalid-Peralta^{1,3}

RESUMEN

Objetivo: determinar el papel de las células T reguladoras (Treg) durante la infección del cisticerco de *taenia crassiceps* en ratones C57BL/6. **Material y métodos:** se emplearon ratones hembras de 4 a 5 semanas de edad, de la cepa C57BL/6J. Se formaron dos grupos de ratones; se inoculó a cada ratón del *grupo I* por vía intraperitoneal con 20 cisticercos; el *grupo II*, sin infectar, se empleó como control. A diferentes tiempos de infección (5, 30, 90 y 130 días) se determinó el nivel de células Treg en el peritoneo, ganglios mesentéricos, placas de Peyer y el bazo. Paralelamente se evaluó la capacidad proliferativa de las células del bazo, estimulándolas con concanavalina A (ConA) y antígenos de *T. crassiceps*. **Resultados:** se observó que los niveles de Tregs fueron similares entre el grupo control y el infectado en el sitio de instalación del parásito (peritoneo) durante el periodo de estudio. Al mismo tiempo, se observaron niveles similares de proliferación en ambos grupos cuando las células se estimularon con ConA. Los antígenos específicos de cisticerco no indujeron proliferación de células T efectoras ni de Tregs. Estos resultados demuestran que el parásito *T. crassiceps* promueve una disminución en la capacidad proliferativa de linfocitos T, que es independiente de células Treg antígeno-específicas. **Conclusiones:** la resistencia a la infección

por el cisticerco de *T. crassiceps* en ratones de la cepa C57BL/6 no está asociada a presencia de células Treg.

Palabras clave: cisticercosis, células T reguladoras, *taenia crassiceps*, parásito.

ROLE OF REGULATORY T CELLS ON MURINE EXPERIMENTAL *TAENIA CRASSICEPS* CYSTICERCOSIS

ABSTRACT

Objective: to explore the role of T regulatory (Treg) cells during infection by *Taenia crassiceps* in C57BL/6 mice. **Materials and methods:** female C57BL/6J, 4-5-weeks-old mice were used. Mice were distributed in two groups. Mice from group I were intraperitoneally inoculated with 20 cysticerci each. Mice from group II were not infected and were used as control. At different times post-infection (5, 30, 90, and 130 days) Treg cells level was evaluated at peritoneum, mesenteric ganglia, Peyer's patches, and spleen. Concurrently, the proliferative capacity of spleen cells was assessed, by stimulating them both with Concanavalin A (ConA) and *T. crassiceps* antigens. **Results:** treg levels at the site of parasite establishment (peritoneum) were similar in the control group and the infected group during the period of study. Likewise, similar proliferation levels were observed in both groups when cells were stimulated with ConA. Cysticercal specific antigens failed to induce T effector or Treg cell proliferation. These results show that *T. crassiceps* promotes a decrease in the proliferative capacity of T

¹Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación en Patologías Neurológicas, UNAM-INNN. ²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. ³Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Correspondencia: Laura Adalid-Peralta. Insurgentes Sur 3877. Col. La Fama, 14269 México, D.F.

lymphocytes, which does not depend on antigen-specific Tregs. *Conclusions:* the resistance to infection by *T. crassiceps* cysticerci in the strain C57BL/6 is not associated to the presence of Treg cells.

Key words: cisticercosis, T regulatory cells, *taenia crassiceps*, parasite.

La cisticercosis murina por *taenia crassiceps* es una parasitosis que puede desarrollarse en la naturaleza, por ingestión de huevos producidos por la forma adulta del parásito, y experimentalmente por inoculación directa de cisticercos. Los roedores son los huéspedes naturales de la forma larvaria, que puede alojarse en el tejido subcutáneo, cavidad torácica y peritoneal del ratón¹. El desarrollo de la cisticercosis causada por *T. crassiceps* se ha explorado en particular en el peritoneo, donde el parásito puede multiplicarse por gemación polar múltiple²; esta propiedad se ha aprovechado para su reproducción en condiciones experimentales. Se han aislado diferentes cepas de *T. crassiceps* (ORF, WFU, HYG, KBS) a partir de cisticercos de ratones silvestres³⁻⁵. La más empleada, quizás por su rápida capacidad de reproducción por gemación en la cavidad peritoneal de los ratones, ha sido la cepa ORF⁶⁻⁹, la cual perdió la capacidad de transformarse en taenia¹⁰ (figura 1).

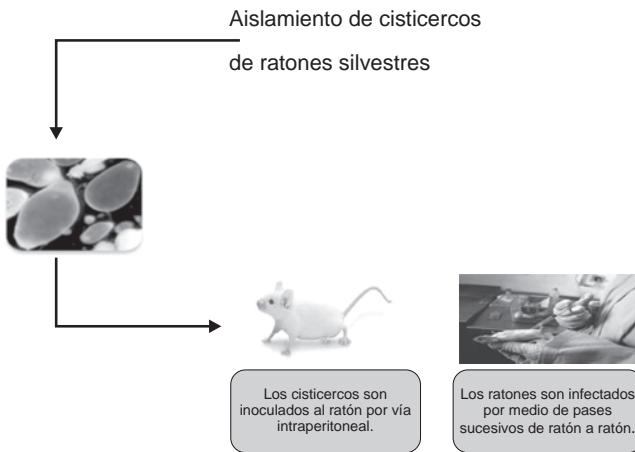


Figura 1. Modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*.

Este modelo de cisticercosis ha permitido estudiar diferentes aspectos de la parasitosis, desde los eventos inmunológicos que la acompañan^{7,9}, hasta la relevancia de componentes hormonales⁶ y genéticos^{8,11}. Las evidencias encontradas con el estudio de este modelo han orientado la investigación de la cisticercosis humana y porcina, ambas causadas por *taenia solium*¹²⁻¹⁴.

Los cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium* presentan alta homología¹⁵, ambos estimulan al sistema inmune

con una gran cantidad de antígenos complejos de origen protéico, glicoprotéico y lipídico¹⁶⁻¹⁸. Ambas infecciones tienen gran tendencia a la cronicidad, pudiendo el parásito vivir durante largos períodos dentro de su hospedero, sin destruirlo. Esta convivencia crónica implica una estimulación antigénica sostenida en un individuo inmunológicamente competente, con la posible activación de mecanismos inmunitarios tanto de tipo humorar como celular¹⁹⁻²¹. Los antígenos parasitarios estimulan preferentemente la activación de los linfocitos Th2 con la producción de citocinas IL4, IL5, IL10 e IL13. En la neurocisticercosis humana, causada por *T. solium*, se ha reportado la presencia de anticuerpos de los diferentes isotipos IgM, IgG e IgA²², siendo las IgE en el líquido cefalorraquídeo las que suelen asociarse con formas más graves de la enfermedad²⁰. Se ha descrito que los cisticercos vesiculares están inicialmente rodeados por una fina capa de colágena y un discreto infiltrado celular, en donde predominan células mononucleares, macrófagos, linfocitos T CD4⁺, eosinófilos y células plasmáticas. El inicio de la respuesta inmune contra el cisticerco se asocia con signos histológicos de destrucción y presencia de eosinófilos, por lo cual se especula que éstos pudieran mediar la destrucción del parásito, en particular en el tejido muscular²³⁻²⁵.

En los últimos años ha ganado consenso la tesis de la relevancia de las células T reguladoras (Treg) en la modulación de la respuesta inmunoinflamatoria. Las Treg son una subpoblación de linfocitos caracterizadas por el fenotipo CD4⁺, CD25⁺ y FOXP3⁺, capaces de controlar la respuesta inmune²⁶. Se han reportado numerosos mecanismos a través de los cuales las Treg median el control de la inflamación.

La presencia de Treg se ha reportado en parasitosis causadas por *trypanosoma*²⁷, *plasmodium*²⁸ y *T. solium*²⁹. En la cisticercosis humana, el papel de las células Treg parece estar relacionado con el control de la inflamación, que al mismo tiempo promueve el establecimiento del parásito y reduce los posibles daños al hospedero asociados con una inflamación exacerbada en respuesta a la parasitosis.

Este trabajo se diseñó con el propósito de conocer el papel de las células Treg durante la infección causada por el cisticerco de *taenia crassiceps* en ratones C57BL/6, y ahondar en la comprensión de mecanismos que participan en la regulación de la inflamación en la cisticercosis y su impacto en la relación huésped-parásito.

En este estudio experimental se utilizó el modelo de cisticercosis murina causado por *T. crassiceps* en una cepa restrictiva a la parasitosis (C57BL/6)^{8,30}.

En un inicio caracterizamos el fenotipo de células que infiltran la cavidad peritoneal, células de bazo,

ganglios y placas de Peyer a diferentes tiempos después de la infección, y comparamos los resultados con un grupo control (sin infectar). Al mismo tiempo se analizó la capacidad proliferativa de los linfocitos a la estimulación con diferentes extractos antigenicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cisticercosis murina

Se emplearon ratones C57BL/6 hembras, de 4 a 5 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos y mantenidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se formaron dos grupos, con 32 ratones en cada uno: el grupo A, control (no infectado) y el grupo B, infectado.

La infección se realizó por vía intraperitoneal con 20 cisticercos de 2 a 3 mm de diámetro por ratón. Ocho ratones de cada grupo se sacrificaron mediante una cámara de CO₂ a los 5, 30, 90 y 130 días posinfección. Se recuperaron células de bazo, ganglio mesentérico y peritoneo.

Linfoproliferación *in vitro*

Se obtuvo el bazo de cada ratón en ambos grupos experimentales. El bazo se maceró para obtener células. Se lisaron los glóbulos rojos empleando una solución de cloruro de amonio al 1%. Se resuspendieron 1×10^7 células de bazo en 1 mL de PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino; las células se marcaron intracelular con CFSE a una concentración de 5 μ M. Después se incubaron a 37° C por 5 min, se realizaron tres lavados con 15 mL de RPMI con 10% de suero fetal bovino. Después, 1×10^5 células se estimularon con concanavalina A (ConA), 5 μ g/mL (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) o con Ag total de *T. crassiceps* (10 μ g/mL), empleando 200 μ L del medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York, EE.UU.) suplementado con antibiótico (1%), 2-mercaptoetanol 50 μ M (sigma-aldrich) y suero fetal bovino (10%). Se cultivaron por 4 días. Al cuarto día se recuperaron las células y se marcaron con anticuerpos (fenotipo de células Treg) para identificar la población proliferativa. La adquisición y análisis de proliferación celular se realizaron en el equipo FACScalibur, y el análisis con el software *Cytometer Cell Quest* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.).

Fenotipificación de células Treg

El fenotipo de células Treg se realizó empleando 1×10^6 células del peritoneo, bazo y ganglios mesentéricos. Se emplearon los siguientes anticuerpos

monoclonales para el marcaje extracelular: mouse anti-CD3 FITC (isotype Rat IgG2a k), mouse anti-CD4 (isotype Rat IgG2a k) Percp y mouse anti-CD25 (isotype IgG1) APC. Las células se incubaron con los anticuerpos por 30 min a 4° C. Después se incubaron con solución de permeabilización por una noche. Al día siguiente las células se lavaron, se realizó el marcaje intracelular con anti-Foxp3 (isotype IgG2a, k) PE. Todos los anticuerpos usados se adquirieron de eBioscience (San Diego, California, EE.UU.), se emplearon a la concentración recomendada por el fabricante. La adquisición de muestras se realizó en el citómetro FACScalibur y los datos se analizaron con el programa *Cytometer Cell Quest* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.).

RESULTADOS

Niveles de Células T reguladoras en diferentes compartimentos

Se estableció el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y Treg en cuatro compartimentos diferentes: bazo, ganglios mesentéricos, placas de Peyer y peritoneo, en cuatro tiempos posteriores a la infección: 5, 30, 90 y 130 días.

Con respecto a los linfocitos CD4⁺, en el bazo se observó aumento de estas células a los 5, 90 y 130 días; en los ganglios mesentéricos se observó un aumento a los 90 días; en placas de Peyer a los 5 y 30 días, y en el peritoneo observamos un aumento a los 5 días de infección (figura 2).

Con respecto a los niveles de células Treg, se observó un aumento en bazo a los 90 días; en ganglios a los 5 días; en placas de Peyer a los 5 y 30 días, mientras que en el peritoneo no se observó aumento en el nivel de células con este fenotipo (figura 2).

Análisis de la respuesta proliferativa ante diferentes estímulos antigenicos

En este estudio se estableció el fenotipo de células que proliferan después de la estimulación específica e inespecífica. En las tablas 1 y 2 se muestra la respuesta proliferativa al estimular con antígenos de *T. crassiceps* y con ConA.

Los resultados mostraron que no hay respuesta proliferativa antígeno-específica. La falta de respuesta proliferativa no está asociada con la proliferación prioritaria de células Treg. Simultáneamente se realizó estimulación con ConA, se observó que la proliferación celular de células CD4⁺ es similar entre individuos de control e infectados.

DISCUSIÓN

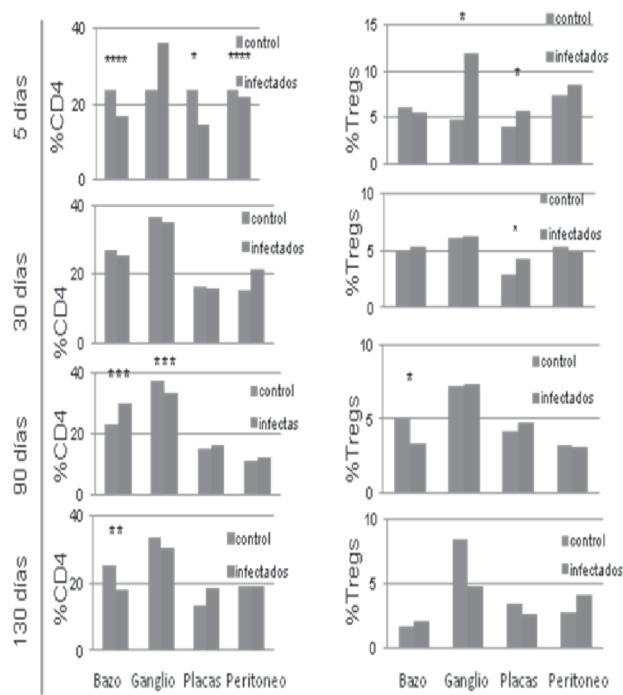


Figura 2. Análisis del fenotipo celular. Se observa el porcentaje de células T CD4 y Treg a distintos tiempos de infección: 5, 30, 90 y 130 días en el bazo, el ganglio mesentérico, las placas de Peyer y el peritoneo.

Tabla 1. Análisis de la respuesta proliferativa a antígenos de *taenia crassiceps*.

Grupo	Día	Proliferación total	Proliferación de T	% de T efectoras de CD4	
				CD4	CD4
Control	5	4.10 ± 0.93	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00
Infectado		3.61 ± 0.90	0.80 ± 0.08	0.04 ± 0.03	0.00
Control	30	4.10 ± 0.93	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00
Infectado		3.61 ± 0.90	0.08 ± 0.08	0.01 ± 0.00	0.00
Control	90	4.56 ± 0.51	0.29 ± 0.50	0.26 ± 0.49	0.00
Infectado		5.84 ± 5.72	0.26 ± 0.17	0.41 ± 0.34	0.00
Control	130	3.00 ± 1.17	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.05	0.00
Infectado		4.85 ± 2.25	0.15 ± 0.18	0.14 ± 0.14	0.00

Tabla 2. Análisis de la respuesta proliferativa a concavalina A.

Grupo	Día	Proliferación total	Proliferación de T	% de T efectoras de CD4	
				CD4	CD4
Control	5	32.45 ± 7.65	3.88 ± 1.78	2.63 ± 0.89	0.98 ± 0.83
Infectado		28.58 ± 0.39	4.59 ± 1.53	3.40 ± 1.46	1.01 ± 0.43
Control	30	38.89 ± 2.35	2.35 ± 0.81	2.11 ± 0.83	0.11 ± 0.06
Infectado		35.25 ± 9.50	4.27 ± 2.37	3.50 ± 1.91	0.27 ± 0.13
Control	90	54.67 ± 5.34	7.78 ± 2.30	5.59 ± 2.39	0.57 ± 0.14
Infectado		49.19 ± 6.71	8.02 ± 2.09	5.39 ± 1.55	0.70 ± 0.22
Control	130	44.52 ± 3.62	5.25 ± 3.09	4.60 ± 2.65	0.44 ± 0.33
Infectado		51.28 ± 5.16	7.34 ± 2.98	5.54 ± 3.46	0.60 ± 0.36

El cisticerco de *T. crassiceps* puede modular la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. En este trabajo evaluamos el nivel de las células Treg en cisticercosis experimental murina utilizando una cepa restrictiva a la infección (C57BL/6). Los resultados muestran un aumento de células Treg en órganos del sistema inmune, pero no en el peritoneo, compartimento donde el parásito se instala y reproduce. Este aumento en órganos linfoides es compatible con la inducción de células Treg como parte de la respuesta inmune adaptativa que desarrolla el hospedero contra el parásito. La ausencia de células Treg en la cavidad peritoneal sugiere que estas células podrían no estar implicadas en instalación y supervivencia del parásito en la cepa resistente. Este hallazgo contrasta con lo observado en una cepa permisiva para la cisticercosis murina, BALB/cAnN, en la que las células Treg están aumentadas en el peritoneo (Adalid-Peralta, artículo en preparación). Las diferencias observadas entre ambas cepas nos permiten considerar que la presencia diferencial de Treg en el peritoneo podría estar asociada con la susceptibilidad a la infección. Es factible que las células Treg en la cepa susceptible controlen el fenómeno inflamatorio, permitiendo instalación y desarrollo del parásito en el hospedero. Mientras tanto, en la cepa resistente, los niveles basales de células Treg permitirían que la respuesta inmune controlara la infección parasitaria. Resultados similares se han observado en otras parasitosis, como en leishmaniasis y esquistosomiasis^{31 32}.

En el presente estudio no se encontraron cambios en el porcentaje de células Treg que proliferan inducidos por estímulo específico con ConA, un resultado compatible con la ausencia de células de memoria de este fenotipo asociadas a la infección.

CONCLUSIONES

La ausencia de un aumento de células Treg en el sitio de instalación del parásito sugiere que en la cepa C57BL/6 (resistente) la respuesta inmunoinflamatoria podría estar favoreciendo la eliminación del parásito.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo contó con el financiamiento de los proyectos de Conacyt Ciencia Básica 100708 y 167278, así como del proyecto DGAPA IN213911, UNAM. Agradecemos a Carlos Castellanos Barba su apoyo técnico para la citometría de flujo y a Juan Francisco Rodríguez Ramírez por la corrección del manuscrito.

REFERENCIAS

- Kroeze WK, Freeman RS. *Taenia crassiceps*: fate of cysticerci following ingestion by the mouse. *Exp Parasitol* 1982;54:425-31.
- Larralde C, Scuitto E, Huerta L, Terrazas I, Fragoso G, Trueba L, et al. Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leiden* 1989; 57: 131-4.
- Zurabian R, Aguilar L, Jimenez JA, Robert L, Willms K. Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. *J Parasitol* 2008;94:1-6.
- Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 2010;137:335-46.
- Smith JK, Esch GW, Kuhn RE. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *Int J Parasitol* 1972; 2: 261-3.
- Morales-Montor J, Escobedo G, Vargas-Villavicencio JA, Larralde C. The neuroimmunoendocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cysticercosis. *Curr Top Med Chem* 2008;8:400-7.
- Terrazas LI. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 383-92.
- Ramirez-Aquino R, Radovanovic I, Fortin A, Scuitto-Conde E, Fragoso-Gonzalez G, Gros P, et al. Identification of loci controlling restriction of parasite growth in experimental *taenia crassiceps* cysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1435.
- Scuitto E, Fragoso G, Hernandez M, Rosas G, Martinez JJ, Fleury A, et al. Development of the S3pvac Vaccine against Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: a historical review. *J Parasitol* 2013.
- Smith JK, Parrish M, Esch GW, Kuhn RE. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda)-II. RNA and DNA synthesis in the ORF and KBS strains determined by autoradiography. *Int J Parasitol* 1972;2:383-9.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Scuitto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998; 66:760-4.
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:926-8.
- Jung H, Cárdenas G, Scuitto E, Fleury A. Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Curr Top Med Chem* 2008;8:424-33.
- Scuitto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martinez JJ, Fleury A, et al. Development of the S3pvac Vaccine against Porcine *Taenia solium* cysticercosis: a historical review. *J Parasitol* 2013.
- Scuitto E, Fragoso G, Larralde C. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunol* 2011; 33: 79-80.
- López-Marín LM, Montrozier H, Lemassu A, García E, Segura E, Daffe M. Structure and antigenicity of the major glycolipid from *Taenia solium* cysticerci. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 119: 33-42.
- Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcíarrubio A, Sánchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013;496:57-63.
- Esquivel-Velazquez M, Larralde C, Morales J, Ostoa-Saloma P. Protein and antigen diversity in the vesicular fluid of *Taenia solium* cysticerci dissected from naturally infected pigs. *Int J Biol Sci* 2011;7:1287-97.
- Restrepo BI, Aguilar MI, Melby PC, Teale JM. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 366-70.
- Chavarria A, Fleury A, García E, Marquez C, Fragoso G, Scuitto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 2005;116:271-8.
- Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med Microbiol Immunol* 2011;200:255-61.
- da SRV, Manhani MN, Costa-Cruz JM. IgA detection in human neurocysticercosis using different preparations of heterologous antigen. *Parasitol Res* 2010;107:221-5.
- de Aluja A, Vargas G. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 1988;28:65-77.
- Perez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, de AA. *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res* 2002;88:150-2.
- Alvarez JI, Colegial CH, Castano CA, Trujillo J, Teale JM, Restrepo BI. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J Neuroimmunol* 2002;127:139-44.
- Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490-500.
- Wei G, Tabel H. Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis. *J Immunol* 2008; 180: 2514-21.
- Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 2004; 10: 29-30.
- Adalid-Peralta L, Fleury A, Garcia-Ibarra TM, Hernández M, Parkhouse M, Crispin, JC, et al. Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *J Parasitol* 2011; 98: 142-8.
- Fragoso G, Meneses G, Scuitto E, Fleury A, Larralde C. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J Parasitol* 2008; 94: 551-3.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks, DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502-7.
- Wang X, Zhou S, Chi Y, Wen X, Hoellwarth J, He L, et al. CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. *Eur J Immunol* 2009; 39: 3052-65.