



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

**PAPEL DE LA MOLÉCULA MGL1 EN LA ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS
DURANTE LA RESPUESTA INMUNE AL CÉSTODO *Taenia crassiceps***

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA:**

DANIEL MONTERO BARRERA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES
(FES IZTACALA)**

**YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
(INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA)**

**JORGE MORALES MONTOR
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)**

MÉXICO, D. F. ABRIL 2016



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.

Índice.....	1
Resumen	3
Abstract.....	3
Introducción.....	4
Receptores de Reconocimiento de Patrones.....	4
Receptores tipo Toll.....	4
Receptores tipo NOD.....	5
Receptores tipo RIG-1.....	5
Lectinas tipo-C.....	5
Motivos glicosilados en helmintos.....	5
Cisticercosis experimental murina.....	7
MGL.....	8
Hipotesis.....	13
Objetivo General.....	13
Objetivos particulares.....	13
Materiales y Métodos.....	14
Ratones.....	14
Parásitos e infección.....	14
Análisis de Lectin-Blot de los antígenos de <i>T. crassiceps</i>	14
Preparaciones celulares y condiciones de cultivo.....	15
Producción de citocinas empleando la técnica de ELISA sándwich.....	16
Producción de citocinas y óxido nítrico de los Macrófagos.....	16

Diferenciación de Macrófagos derivados de la Médula ósea (M ϕ DMO).....	17
Estimulación <i>in vitro</i> y extracción de proteínas de los M ϕ DMO.....	17
Western Blot.....	18
Análisis de marcadores de activación por RT-PCR.....	18
Detección de anticuerpos y citocinas en suero por ELISA.....	20
Análisis por Citometría de Flujo.....	20
 Resultados.....	 22
 Los antígenos de <i>T. crassiceps</i> contienen glicoconjugados que expresan residuos de Galactosa y N-acetylgalactosamina.....	 22
El reconocimiento de los antígenos de <i>T. crassiceps</i> disminuye en los macrófagos MGL1 ^{-/-}	 23
La ausencia de MGL1 en macrófagos afecta la fosforilación de tirosinas en respuesta a TcGg.....	 24
Los Ratones deficientes en MGL1 son mas susceptibles a la infección por <i>T. crassiceps</i>	 25
La respuesta inmune contra <i>T. crassiceps</i> se altera en los ratones MGL1 ^{-/-}	 26
Diferencias en la producción de citocinas in vivo y en M ϕ peritoneales MGL1 ^{+/+} y MGL1 ^{-/-}	 29
Los Ratones MGL1 ^{-/-} Reclutan M ϕ alternativamente activados.....	 31
 Discusión.....	 34
 Conclusiones.....	 41
 Bibliografía.....	 42
 Artículo.....	 Anexo

Resumen

La lectina 1 tipo C de galactosa de Macrófagos (MGL1) reconoce glicoconjugados que expresan la estructura Lewis X que contiene residuos de galactosa, y se expresa en células dendríticas inmaduras y en macrófagos. Los helmintos parásitos presentan una gran cantidad de componentes glicosilados que juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune inducida en las infecciones causadas por estos mismos. Nuestros datos demuestran que en la infección causada por *Taenia crassiceps* los ratones deficientes en MGL1 presentan una reducida capacidad para eliminar la infección, a pesar de que inducen una fuerte respuesta tipo Th2. Los macrófagos de ratones MGL1^{-/-} muestran una reducción en la fosforilación de tirosinas en respuesta a los antígenos de *T. crassiceps* en comparación con los Mφ MGL1^{+/+}, así como también presentan una disminución en la producción de TNFα e IL-12. Estos datos indican que MGL1 participa en el reconocimiento de los carbohidratos de *T. crassiceps* y juega un papel importante en la respuesta de los macrófagos *in vivo* y podría participar como mediador en la resistencia a la infección de este helminto.

Abstract

C-type lectins are multifunctional sugar-binding molecules expressed on dendritic cells (DCs) and macrophages that internalize antigens for processing and presentation. Macrophage galactose-type lectin 1 (MGL1) recognizes glycoconjugates expressing LewisX structures which contain galactose residues, and it is selectively expressed on immature DCs and macrophages. Helminth parasites contain large amounts of glycosylated components, which play a role in the immune regulation induced by such infections. Macrophages from MGL1^{-/-} mice showed less binding ability toward parasite antigens than their wild-type (WT) counterparts. Exposure of WT macrophages to *T. crassiceps* antigens triggered tyrosine phosphorylation signaling activity, which was diminished in MGL1^{-/-} macrophages. Following *T. crassiceps* infection, MGL1^{-/-} mice failed to produce significant levels of inflammatory cytokines early in the infection compared to WT mice. In contrast, MGL1^{-/-} mice developed a Th2-dominant immune response that was associated with significantly higher parasite loads, whereas WT mice were resistant. Flow cytometry and RT-PCR analyses showed overexpression of the mannose receptors, IL-4Rα, PDL2, arginase-1, Ym1, and RELM-α on MGL1^{-/-} macrophages. These studies indicate that MGL1 is involved in *T. crassiceps* recognition and subsequent innate immune activation and resistance.

Introducción

Receptores de Reconocimiento de Patrones.

En el sistema inmune las células presentadoras de antígeno (APC) deben reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), para lo cual expresan una serie de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR por sus siglas en inglés Pattern recognition receptors). La función de los PRRs consiste en detectar rápidamente a las infecciones causadas por patógenos y controlar la activación de la respuesta inmune innata desatada por estos. Los PRRs presentes en las células del sistema inmune, como macrófagos (M ϕ) y células dendríticas (DCs) entre otras, reconocen y se unen a moléculas que presentan motivos o patrones conservados en diferentes tipos de patógenos, como es el caso del lipopolisacárido (LPS) en las bacterias Gram-negativas, el RNA de doble cadena en algunos virus, el Zymosan en hongos, la flagelina y diferentes tipos de moléculas en parásitos protozoarios intracelulares incluyendo la ciclofilina de *Toxoplasma gondi* (Aliberti, J., et al 2003) y los Glicoinositolfolípidos en *Trypanosoma cruzi* (Brodskyn, C., et al 2002).

Receptores tipo Toll

Entre los PRRs que están involucrados en la maduración y producción de citocinas por parte de las DC y M ϕ los más ampliamente estudiados son los de la familia de receptores tipo Toll (TLR) (Aliberti, J., et al 2004). Los TLRs son el principal grupo de receptores que están involucrados en la maduración y producción de citocinas proinflamatorias en DC y M ϕ . Esta familia de receptores son proteínas transmembranales con un dominio extracelular compuesto de repeticiones ricas en leucina y un dominio intracelular tipo receptor Toll/Interleucina (IL)-1 (TIR), el cual es necesario para la transducción de señales. Esta familia se divide en dos grupos, los del primer grupo (TLR3, TLR7, TLR8, y TLR9) están localizados en el retículo endoplásmico, en los endosomas y en los lisosomas, y los del segundo grupo (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, y TLR6) están localizados en la membrana celular. La interacción de los TLRs con sus ligandos recluta una serie de moléculas adaptadoras como MyD88 que activa vías de señalización asociadas a NF- κ B y TRIF que señala para activar a IRF₃ y en menor medida a NF- κ B, ambas vías asociadas a la producción de citocinas proinflamatorias e Interferones tipo I.

Receptores tipo NOD

Otra familia de PRRs son los receptores tipo NOD (NLR; dominio de oligomerización de unión a nucleótidos). Estos receptores son intracelulares y reconocen PAMPs y moléculas endógenas, comparten estructuras muy conservadas y se dividen en varias familias dependiendo de su dominio N-terminal. Las familias mejor descritas de estos receptores son NODC, a la cual pertenecen los receptores NOD1 y NOD 2 que reconocen productos bacteriales en el citoplasma y median la activación de NF- κ B y MAPcinasas (MAPKs) en respuesta a diferentes PAMPs, y la familia NODP que son un subgrupo de NLRs involucrados en la formación de complejos multiproteínicos llamados inflamosomas.

Receptores tipo RIG-1

Los receptores tipo gen inducible de ácido retinóico-I (RIG-I) (RLRs), son otra familia de PRRs, que reconocen el RNA de virus en células infectadas, e inducen la producción de citocinas proinflamatorias e interferones tipo I (Kumar., et a 2011).

Lectinas tipo-C

Otro tipo de PRRs es la familia de las Lectinas Tipo-C (CLRs), que tienen una afinidad selectiva por carbohidratos o grupos de carbohidratos, y cuya unión a su ligando es dependiente de Calcio Ca^{2+} . Esta familia incluye una amplia variedad de receptores de membrana que participan en la internalización y presentación de antígeno. Los receptores CLR tipo I como el receptor de manosa (MR) y DEC-205, contienen múltiples dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), mientras que los CLR tipo II que incluyen a integrina ICAM-3 específica de DC (DC-SIGN), DCIR y Macrophage Galactose-type Lectin (MGL), contienen un solo dominio CRD. Se ha descrito que los CLR reconocen patrones en diferentes patógenos como bacterias, hongos y glicoconjugados virales (Brown, G.D. and S. Gordon 2005, McGreal, E.P et al 2005, Vazquez-Mendoza, A 2013, Vukman, K.V., et al 2013); sin embargo, su participación y función en el reconocimiento de patrones en infecciones por helmintos ha sido poco estudiada.

Motivos glicosilados en helmintos.

Se ha demostrado que los helmintos presentan una gran cantidad de motivos glicosilados en sus antígenos., los cuales podrían participar en la inducción de una respuesta tipo Th2 (Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh 2003, Okano, M., et al 1999) y en la regulación de la inmunidad durante la infección (Tundup, S. et al 2012). En el nemátodo

Acanthocheilonema viteae, el producto ES-62 es capaz de inducir una respuesta tipo Th2, de disminuir la producción de IL-12 por parte de las DC y de los M ϕ , y en el caso de estos últimos induce una activación alternativa. El reconocimiento de esta glicoproteína aparentemente es mediado por el receptor TLR4 (Hooke et al 2005). El antígeno soluble de huevo de *Schistosoma mansoni* (SEA) es de los más estudiados, la proteína 2 Cys Peroxiredoxina, que está presente en el SEA, además de inducir la activación alternativa en M ϕ , polariza la respuesta inmune del hospedero hacia el tipo Th2, efecto que es independiente de IL-4 e IL-13 (Donnelly et al 2005, 2008). Se ha demostrado que los glicoconjugados en *T. crassiceps* y otros céstodos inducen una fuerte respuesta tipo Th2 *in vivo* (Gomez-Garcia, L., et al. 2006) y modulan la actividad de las DC de humanos y ratones *in vitro* (Nono, J.K., et al 2012, Terrazas, L.I., et al 2010, Terrazas, L.I., et al 2013).

Recientemente se ha reportado que algunos helmintos parásitos son reconocidos por diferentes CLR. Un ejemplo de ello es el reconocimiento del SEA por las lectinas DC-SIGN, Receptor de manosa (MR), y la lectina tipo galactosa de M ϕ (MGL) y la lectina 1 relacionada con SIGN (SIGNR1). Por otro lado, LDN (motivo LacdiNac) que es una secuencia de residuos GalNAc β 1-4GlcNAc comúnmente presente en los helmintos, y su derivado LDNF, contienen estructuras Lewis X. Estas glicoproteínas se presentan abundantemente en el SEA de esquistosoma y son reconocidos por MGL en DC de Humano. El 50% de LDN es reconocido por MGL, por lo tanto debe existir otro receptor en DC que también reconozca LDN. Se ha demostrado que galectina-3 en M ϕ humanos es capaz de reconocer e internalizar LDN, y dado que galectina-3 también está expresado en DC, el reconocimiento de LDN debe estar mediado por MGL y galectina-3 (van Vliet et al 2005).

El SEA también está conformado por otras glicoproteínas que contiene el glicano Lewis X en su estructura, a través del cual interactúa con el Receptor DC-SIGN. Este receptor es una Lectina tipo C que depende de calcio para unirse a la estructura Lewis X, está presente en DCs y es necesario junto con las lectinas MGL y el receptor de manosa (MR) para internalizar el SEA (Perrigoue, et al 2008, van Vliet, et al 2008).

Las lectinas Dectina 1 y MR en M ϕ reconocen el antígeno secretado excretado de *Fasciola hepática* (Guasconi L., 2011).

Otro ejemplo de reconocimiento de los antígenos de helmintos por lectinas, es el de *Trichuris muris* cuyos antígenos son reconocidos por la lectina MR (Paveley, R.A., et al. 2011, Prasanphanich, N.S., et al 2013). Sin embargo, el reconocimiento de estas lectinas parece tener un papel muy limitado en la protección o susceptibilidad en este tipo de infecciones ya que en ratones transgénicos que carecen de las lectinas MR o SIGNR1 la respuesta inmune montada contra estos parásitos, y la eliminación de los mismos ocurre de la misma manera que en ratones silvestres (deSchoolmeester, M.L., et al.2009).

Dada la complejidad de estas moléculas hay estudios que sugieren que algunos glicoconjugados de helmintos podrían presentar actividades inmunoestimuladoras. En un estudio con los céstodos *Mesocostoides corti* y *Taenia solium* encontraron que estos secretaban o presentaban en su tegumento los residuos terminales de acetyl-D-galactosamina, α -D-galactosil, N-acetylglucosaminil, α -mannopiranosil, α glucopyranosil y residuos de β -galactosa, y que estos azúcares eran los responsables de regular la respuesta inmune en infección del sistema nervioso central; sin embargo, también encontraron que una fracción de los glicoconjugados liberados en la circulación del hospedero formaban agregados estáticos de antígenos en las leptomeninges, en los ventrículos y en regiones alejadas del parásito caracterizados por la presencia de células inflamatorias, expresión moderada de MHC-II, mediadores proinflamatorios, y moléculas coestimuladoras. (Alvarez, J.I, et al 2008).

Cisticercosis experimental murina

En nuestro laboratorio estudiamos la interacción que existe entre el sistema inmune del ratón y el céstodo *Taenia crassiceps*. La estrategia experimental utilizada para entender esta interacción es conocida como cisticercosis experimental murina. Esta consiste en inyectar cisticercos de *T. crassiceps* en la cavidad intraperitoneal de ratones donde el cisticercos se reproduce de manera asexual. Esto nos ha permitido entender algunos mecanismos biológicos tanto del parásito como del hospedero que intervienen en el curso de la infección, y algunos de estos mecanismos han sido comparados y confirmados en la cisticercosis humana o porcina causada por *T. solium*. (Sciutto, et al 2007)

En el modelo de cisticercosis experimental murina se genera una respuesta inmune inicial tipo Th1 (niveles elevados de IL-12, IFN- γ , óxido nítrico, IgG2a) la cual se mantiene en la fase temprana de la infección (<4 semanas). Esta respuesta es reemplazada por una

fuerte respuesta inmune tipo Th2 (IL-4, IL-13, IgG1, IgE) en la fase crónica de la infección, a partir de las 8 semanas. (Terrazas, *et al* 1998). Paralelo al cambio del ambiente de citocinas en el estado crónico de la infección se desarrolla una población de M ϕ alternativamente activados (aaM ϕ), que producen niveles más altos de prostaglandina E2 (PGE2) e IL-6 y niveles menores de IL-12 y NO que en la fase temprana de la infección. Estos M ϕ exhiben un aumento en la expresión de la enzima arginasa-1, que es considerada como un marcador de activación alternativa. Otras moléculas consideradas como marcadores de activación alternativa de M ϕ son la quitinasa Ym1 y Fizz1 (por sus siglas Found in Inflammatory Zone). Interesantemente estos M ϕ tienen la capacidad de suprimir la proliferación de las células T activadas a través de la alta expresión de moléculas coestimuladoras negativas como son PD-L1 y PD-L2, además de que inducen a las células T CD4 a producir IL-4 (Rodríguez-Sosa, *et al* 2002; Terrazas, *et al* 2005).

En estudios previos se obtuvo evidencia de la participación de los carbohidratos de un extracto soluble de *T. crassiceps* en la regulación de la respuesta inmune, ya que al inyectar glicanos intactos de *T. crassiceps* cada semana durante un mes, se indujo la activación alternativa de M ϕ y se polarizó la respuesta inmune hacia un tipo Th2; de manera interesante, en ratones TLR4 -/- se obtuvieron los mismos resultados. Al modificar la estructura química de los azúcares en el extracto se perdió la inducción de los aaM ϕ y la polarización hacia el tipo Th2. Además se ha reportado que los antígenos de *T. crassiceps* se unen a la Concanavalina A, lo que en conjunto indica que estos antígenos están glicosilados con glucosa, manosa o galactosa y que son importantes para inducir una respuesta tipo Th2 y aaM ϕ (Gomez-Garcia, L., *et al.* 2006, Terrazas, L.I., *et al* 2010. Gomez-Garcia, L., *et al* 2005).

Más recientemente, se demostró en nuestro laboratorio que las DC de ratón son capaces de reconocer e internalizar antígeno del cisticerco de *T. crassiceps* a través de los receptores MGL1, MGL2 y MR. En ratones, no existe el receptor DC-SIGN, sin embargo en DC inmaduras y en M ϕ se expresa el receptor MGL1 que es capaz de reconocer las mismas estructuras Lewis X que reconoce DC-SIGN (Sakakura, 2008; Kaur, 2009).

MGL

MGL es miembro de la familia CLR tipo II y se expresa en DC inmaduras y en M ϕ . El dominio CRD de MGL contiene una secuencia Gln-Pro-Asp (QPD) que facilita el

reconocimiento de galactosa ó N-acetylgalactosamina. Esta lectina se ha encontrado en rata, ratón y en humano (van Vliet 2008). A diferencia de humano y rata, en ratón existen dos MGL's distintas, mMGL1 y mMGL2. En comparación con mMGL1, mMGL2 tiene una inserción de 14 aminoácidos en la región citoplásmica y difiere en algunos aminoácidos en el dominio CRD (Tsuiji 2002). En humanos, las DC expresan una forma variante de MGL producto de splicing alternativo que difiere por una inserción de 27 aminoácidos y una delección de 3 aminoácidos en una región extracelular fuera del dominio CRD (Valladeau 2001) (Esquema 1).

```

mMGL1 1 ---MIYENLQNSRIIEEKTQE-----PGK-A--PSQSFLWRILSWT-HLLLFSLGLS
mMGL2 1 -MTMRYENFQNLEREKQEMRNGDKKGMESPKFALIPQSFLWRILSWT-HLLLFSLGLS
hMGL 1 -MTRTYENFQYLENKVKVQG-----FKNGP-L--PLQSLQRLRSGPCHLLL-SLGLG
DCMGL 1 -MTRTYENFQYLENKVKVQG-----FKNGP-L--PLQSLQRLRCSGPCHLLL-SLGLG
rMGL 1 -MTMAYENFQNLGSEEKQNE-----AGK-A--PPQSFLCNILSWT-HLLLFSLGLS

mMGL1 2 LLLLIVVSVIGSQNSQLRRDLGTLRATLDNTTSKIKAEFQSLDSRADSFEKGISSLKVDVED
mMGL2 2 LLLLIVVISVIGSQNSQLRRDLGTLRAILDNTTSKIKAEFQSLDSRADNFEKGISSLKVDVED
Hmlg 2 LLLLVIICVVGFGNSKFKRDLVTLRTDFSNFTSNTVASIQALTSQGSSEETIASLKAVEEG
DCMGL 2 LLLLVIICVVGFGNSKFKRDLVTLRTDFSNFTSNTVAEIQALTSQGSSEETIASLKAVEEG
rMGL 2 LLLLIVVISVIGSQNSQLRRDLETLRDTLDNTTSNTKAEQALASRGDSLQGTGINSLKVEVDD

mMGL1 3 HRQELQAGRDLQKVTSLSESTVEKREQALKTDL---SDLTDHVQQLRKDLKALTCQLANLKN
mMGL2 3 HRQELQAGRDLQKVTSLSESTLEKREQALKTDL---SDLTDHVQQLRDLKALTCQLANLKN
Hmlg 3 FQQRQA-----VHSEMLLRVQQLVQDLKKLTCQVATLNN
DCMGL 3 FKQERQAGVSELQEHTTQKAHLGHCPHCPVSVCPVHSEMLLRVQQLVQDLKKLTCQVATLNN
rMGL 3 HGQELQAGRGLSQKVASLESTVEKKEQTLRTDL---SEITDRVQQLGKDLKTLTCQLASLKN

mMGL1 4 NG---S-EVACCPHWHTEHEGSCYWFSESEKSWPEADKYCRLNSHLVVVNSLEEQNFLQNR
mMGL2 4 NG---S-EVACCPHWHTEHEGSCYWFSESEKSWPEADKYCRLNSHLVVVNSLEEQNFLQNR
Hmlg 4 NGEESTEGTCCPVNWVEHQDSCYWFSSHGMSWAAEAKEYCQLKNAHLVVINSREEQNFVQKY
DCMGL 4 N---ASTEGTCCPVNWVEHQDSCYWFSSHGMSWAAEAKEYCQLKNAHLVVINSREEQNFVQKY
rMGL 4 NG---S-AVACCPHWHMEHEGSCYWFSSQSGKPWPEADKYCQLNSNLVAVNSLAEQNFLQTH

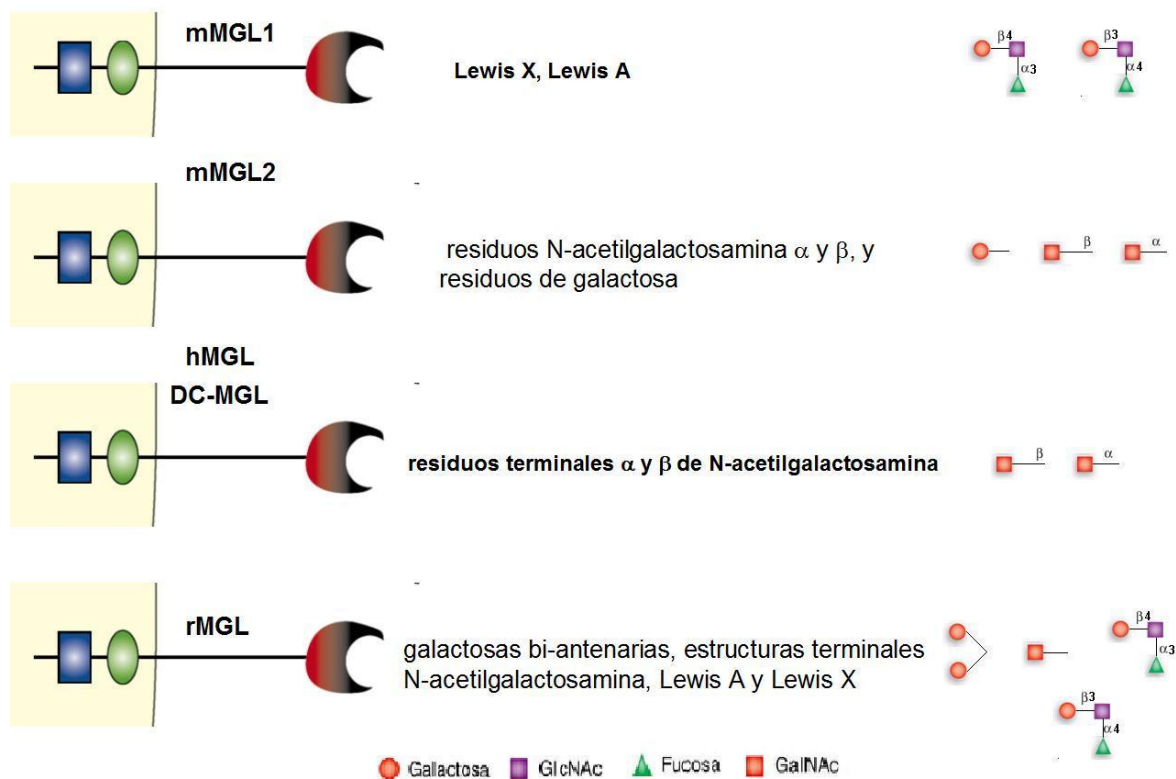
mMGL1 6 LANVVSWIGLTDQNGPWRWVDGTDFEKGFKNWAPLQPDNWFHGLGGGEDCAHITGGPWND
mMGL2 6 LANVLSWMLTDQNGPWRWVDGTDGDFKGNWRPLQPDNWHGHMLGGGEDCAHFSYDGRWND
Hmlg 6 LGSAYTWMGLSDPEGAWKWDGTDYATGFQNWKPGQPDDWQGHGLGGGEDCAHFHPDGRWND
DCMGL 6 LGSAYTWMGLSDPEGAWKWDGTDYATGFQNWKPGQPDDWQGHGLGGGEDCAHFHPDGRWND
rMGL 6 MGSVVTWIGLTDQNGPWRWVDGTDYEKGFTHWAPKQPDNWFHGLGGGEDCAHFTSDGRWND

mMGL1 7 DVCQRTFRWICEMKLAKES
mMGL2 7 DVCQRHYHWICETELGKASSAHSPQLIASVP
hMGL1 7 DVCQRPYHWVCEAGLGQTSQESH
DCMGL 7 DVCQRPYHWVCEAGLGQTSQESH
rMGL 7 DVCQRPYRWVCEMKLAKDS

```

Esquema 1. El alineamiento muestra la comparación entre las secuencias de MGL1 murino (mMGL1), MGL2 murino (mMGL2), MGL de humano (hMGL), variante de MGL humano en células dendríticas (DCMGL), y MGL de rata (rMGL). En rojo se muestra el dominio consenso de internalización, en verde el dominio transmembranal y en azul el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD)

MGL se une específicamente a residuos terminales α y β de N-acetilgalactosamina presentes en glicoproteínas o glicoesfingolípidos. En el ratón mMGL1 reconoce específicamente estructuras Lewis X y en menor medida estructuras Lewis A mientras que mMGL2 tiene afinidad por residuos N-acetilgalactosamina α y β , y residuos de galactosa, pero no reconoce ningún tipo de estructura Lewis (Sakakura 2008, Kaur 2009). En rata, rMGL se une con mayor afinidad a galactosas bi-antenarias y a estructuras terminales N-acetilgalactosamina, así como también reconoce en menor medida estructuras Lewis A y Lewis X (van Vliet 2008)(Esquema 2).



Esquema 2. Se muestra a las lectinas mgl murino 1 (mMGL1) Mgl murino 2 (mMGL2) MGL humano (hMGL) y MGL de rata (rMGL) y sus respectivas afinidades por sus ligandos (modificado de van Vliet. S. J et al 2008)

Se ha identificado a los gangliósidos GM2 Y GD2 que normalmente se expresan en el bazo y al antígeno tumoral MUC1 como ligandos de MGL, este último solamente es reconocido por MGL cuando presenta un patrón alterado de glicosilación que expone el epítipo de unión a MGL (van Vliet 2005). Las DC inmaduras pueden reconocer los antígenos solubles

del helminto *S. mansoni* a través de la interacción con MGL, MR y DC-SIGN. Estas tres lectinas participan en la endocitosis de estos antígenos. MGL reconoce glycanos específicos que contienen estructuras terminales de N-acetil galactosamina expresados por *S. mansoni*. A diferencia de MGL de humanos, mMGL1 y mMGL2 no reconocen la estructura Fuc α 3-Lac-di-NAc (LDNF) de *S. mansoni*, pero mMGL2 al igual que MGL de humanos reconocen a su precursor Lac-di-NAc (LDN) expresado por *S. mansoni* (Kaur *et al* 2009). Otro patógeno que se ha identificado como ligando de MGL son los filovirus del género Marburg y Ebola. MGL se une al dominio similar a mucina altamente O-glicosilado de la envoltura glycoprotéica y promueve la infectividad viral aumentando la unión del virus con receptores de entrada celular.

MGL reconoce todas las isoformas de CD45 excepto la isoforma CD45RO. La unión de MGL con CD45 en las células T efectoras regula negativamente la función de estas. Esta interacción suprime la señalización mediada por TCR, reduciendo la actividad fosfatasa de CD45 e inhibiendo la activación de Lck y la movilización de calcio. A través de este mecanismo las APC tolerogénicas MGL⁺ pueden disminuir la producción de citocinas, proliferación y activación de las células T efectoras (van Vliet 2008).

Al igual que otras CLR'S MGL es capaz de internalizar después de unirse a anticuerpos o a sus ligandos. Todos los ortólogos de MGL contienen en su región citoplásmica el motivo conservado YXX Φ , donde X puede ser cualquier aminoácido y Φ representa un aminoácido hidrofóbico. Mientras MGL, mMGL2 y rMGL presentan YENF, mMGL1 presenta YENL (Esquema 1). Estos motivos también se encuentran en otros CLR's y contribuyen al proceso de internalización. Mutaciones en el motivo YXX Φ afectan negativamente la internalización del ligando y la eliminación de la tirosina inhibe completamente la endocitosis mediada por MGL. Los antígenos internalizados por MGL son transportados a través de la vía endosomal lisosomal, y son presentados en MHC clase II (van Vliet 2007).

Se ha demostrado para varias CLR's que se encuentran en APC's que son capaces de señalar modulando las respuestas innata y adaptativa. Se ha descrito recientemente que MGL puede funcionar como receptor autónomo, se sabe que induce activación en DCs, y se ha demostrado que, MGL es capaz de señalar a través de la vía ERK después de la unión de anticuerpos policlonales-anti MGL con el receptor (Napoletano, C., *et al.* 2012)

MGL se une a ligandos en tejidos propios. El receptor específico de M ϕ sialoadhesina ha sido identificado como ligando propio de mMGL1 y probablemente regula la localización de células mMGL1^{pos} en los nodos linfáticos (Kumamoto 2004). También se han encontrado estructuras que se unan a MGL en la matriz extracelular de la dermis en humanos y estructuras que se unen solamente a mMGL2 en la matriz extracelular de la piel de ratones. mMGL1 y mMGL2 se unen a estructuras en los nodos linfáticos mesentéricos y en el mucus del intestino grueso. Ligandos solamente para mMGL1 se encuentran en las vénulas endoteliales y en el intestino delgado (van Vliet 2008, Kaur 2009).

Muchos de los datos descritos sugieren que mMGL1 es un receptor antiinflamatorio, sin embargo, en la infección por *Trypanosoma cruzi* los ratones mMGL1^{-/-} son más susceptibles a dicho parásito (Vazquez, A et al 2014). En el modelo de cisticercosis experimental murina, las lectinas mMGL1 y mMGL21 se encuentran sobre expresadas en los M ϕ alternativamente activados inducidos por *T. crassiceps* (Raes G et al 2005).

Hasta la fecha no se ha estudiado la señalización de MGL con ligandos naturales de helmintos ni se ha dilucidado su papel biológico en este tipo de enfermedades.

Hipótesis

MGL1 participa como receptor para los carbohidratos presentes en los antígenos de *T. crassiceps* y modula la respuesta de los macrófagos durante la infección.

Objetivo general

Determinar el papel que juega MGL1 en el reconocimiento y defensa contra el cestodo *T. crassiceps*

Objetivos particulares

1. Evaluar la infección causada por *T. crassiceps* en ratones deficientes en MGL1
2. Analizar el efecto de la ausencia de MGL1 en la respuesta de los macrófagos al antígeno de *T. crassiceps*
3. Analizar *in vivo* si la inducción de aaM ϕ por la infección con *T. crassiceps* se afecta en ausencia de MGL1.

Materiales y Métodos

Ratones.

Se utilizaron ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad deficientes en MGL1 (MGL1^{-/-}) cuyo fondo genético es de la cepa C57BL/6, esta cepa fue donada por el consorcio Glycomics. También se utilizaron ratones silvestres de 6 a 8 semanas de edad de las cepas C57BL/6 y BALB/c que fueron adquiridos de los laboratorios Harlan México. Todos los ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM (FES Iztacala) de acuerdo con los lineamientos del gobierno (Regulación Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) y del comité de la facultad de cuidados y uso de animales, que está en conformidad con las recomendaciones de la guía para el uso y cuidados de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud del los Estados Unidos.

Parásitos e infección. Metacéstodos de *T. crassiceps* fueron colectados de la cavidad peritoneal de hembras BALB/c después de 2 a 3 meses de infección. Los cisticercos fueron lavados 4 veces con solución buffer fosfato (PBS) estéril 0.15 molar, con un pH de 7.2 y la infección experimental se llevó a cabo con una inyección intraperitoneal (i.p.), en hembras de 8 semanas de edad, con 20 cisticercos que no presentaran gemación y de aproximadamente 2 mm de diámetro suspendidos en 3 ml de PBS por ratón.

Análisis de Lectin-Blot de los antígenos de *T. crassiceps*.

Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron lisados por sonicación con un pulso de 10 segundos a una amplitud de 100 W (Fisher Sonic Dismembrator modelo 300). La suspensión resultante fue centrifugada a 4°C por una hora a 4000 rpm (HERMLE modelo Z 383 K), el sobrenadante fue descartado y el pellet sobrante fue resuspendido en 3ml de PBS con 5mM de ácido p-hidroximercuribenzóico (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.). El antígeno de *T. crassiceps* (TcAg) fue concentrado y cuantificado por el método de Bradford. Un total de 20 µg de la proteína de TcAg fue separado en una electroforesis de gel de poliacrilamida al

10% (SDS-PAGE) y transferido a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 400 Ma (Towbin, H., T. *et al* 1979). Para la detección de glicoproteínas con residuos de galactosa o N-acetylgalactosamina, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con BSA al 1% diluido en PBS-T (10mM de buffer sodio-fosfato, 150mM de NaCl y 0.5% de Tween 20) e incubadas toda la noche a 4°C. Las membradas fueron tratadas con lectina biotinilada de *Helix Pomatia* (Hp) o con lectina biotinilada de *Ricinus communis* (RCA) a concentraciones de 5µg diluidos en PBS-T a una relación de 1:500 e incubadas toda la noche a 4°C (Sigma Aldrich., St Louis, Mo. USA). Al día siguiente, las membranas fueron incubadas con estreptavidina-peroxidasa, las membranas fueron lavadas con PBS, y la actividad enzimática fue detectada con solución sustrato (0.1% H₂O₂, 17.5% metanol, 0.15% 4-chloro- α -naphitol y 82.5% PBS) después de 15 minutos de incubación.

Preparaciones celulares y condiciones de cultivo.

Se extirpó el bazo de ratones infectados en condiciones de esterilidad. Las suspensiones celulares se obtuvieron profundiendo el bazo con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 unidades de penicilina/estreptomina, 2mM de glutamina 25mM de buffer HEPES y 1% de aminoácidos no esenciales (GIBCO, BRL Grand island, New York). Las células se centrifugaron por 10 minutos a 2500 rpm y los eritrocitos fueron lisados resuspendiendo la pastilla en solución de Boyle (0.17 M Tris y 0.16M de cloruro de amonio). Se hicieron dos lavados y se contó la viabilidad celular con azul tripano en cámara de Neubauer. La concentración de las células del bazo se ajustó a 3×10^6 células /ml en el mismo medio. Se sembraron alícuotas de 100µl de la suspensión celular en cada uno de los pozos de placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano. (Costar, Cambridge, Massachussets). Las células fueron estimuladas con TcAg 25µg/ml o con anti-CD3 (Las células se sembraron en placas previamente sensibilizadas con 1µg/ml de anticuerpo anti-CD3 a 37°C durante 72 h).

Los sobrenadantes de los cultivos se analizaron por ELISA para IL-4 e IFN- γ (PreproTech, México).

Producción de citocinas empleando la técnica de ELISA sándwich

Los pares de anticuerpos para las diferentes citocinas fueron comprados de Peprotech, México. El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 1µg/ml en amortiguador de fosfatos, pH 9 (0.1 M NaH₂PO₄ pH 9, J.T. Baker) para cada una de las citocinas se adicionaron 100µl por pozo a placas de 96 pozos para ELISA (Nunc Maxisorp) y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente las placas se lavaron 5 veces con solución de lavado (PBS/tween 0.05%), posteriormente se les adicionó 200µl de amortiguador de bloqueo (10% FCS en PBS) y se incubaron a temperatura ambiente por 2 h y se lavaron 5 veces más con solución de lavado. Se colocaron 50µl por pozo de las muestras de los sobrenadentes de cultivos a determinar por duplicado, se utilizó como control una curva de citocinas recombinantes en diluciones seriadas 1:2 en buffer de bloqueo iniciando una concentración de 4000pg/ml (Pharmingen). Las placas se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al siguiente día las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado y se secaron por aspiración. Se les adicionó el anticuerpo de detección para cada citosina correspondiente marcado con biotina a una concentración de 1µg/ml en amortiguador de bloqueo (Pharmingen). Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Se adicionaron 6µl por pozo del conjugado de estreptoavidina peroxidasa (BioRad) a una dilución de 1:2000 en amortiguador de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, se lavaron 6 veces con amortiguador de lavado. Se adicionaron 100 µl por pozo de sustrato ABTS recientemente preparado (Sigma) (0.5% ABTS en 0.1M ácido cítrico anhidro, pH 4.35 con NaOH más 1% H₂O₂ al 3%, Sigma). La densidad óptica se determinó entre los primeros 30 minutos de iniciada la reacción a 405nm y los valores se expresaron como pg/ml.

Producción de citocinas y óxido nítrico de los Macrófagos.

Se obtuvieron las células del exudado peritoneal (CEPs) de ratones sanos previamente inyectados con tioglicolato y de ratones después de 2, 4 y 8 semanas de infección con *T. crassiceps*. Las células se centrifugaron por 10 minutos a 2500 rpm y se ajustaron a 5 X 10⁶/ml en medio RPMI suplementado y se sembró 1 ml en cada uno de los pozos de placas de cultivo de 6 pozos (Costar). Se incubaron por 2 h a 37°C y 5% de CO₂. Después de esto

re removieron las células no adherentes, y las células adherentes fueron colectadas con lavados de PBS frío, se ajustó la concentración a 1×10^6 /ml. La viabilidad de los M ϕ fue >90% de acuerdo al análisis de FACS (F4/80⁺, Biolegend, San Diego, CA). Se sembró 1×10^6 células en cada pozo en placas de 24 pozos (Costar), y se estimularon con LPS (1 μ g/ml, *E coli* 111:B4; Sigma, St Louis, Mo), se incubaron por 24 h y se obtuvieron los sobrenadantes para medir la producción de TNF α , e IL-12 por ELISA sándwich (PreproTech 900-K97, 900-K54). La detección de la producción de óxido nítrico de los M ϕ se realizó determinando el incremento en la concentración de nitritos (Migliorini, P., G 1991) de la reacción de Griess adaptada a placas de micro pozos (Costar). Se mezclaron rápidamente 5 ml de sobrenadante de cultivo con una cantidad igual de reactivo de Griess y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad; se midió la absorbancia a 570nm en un lector automático de micro placas (Organon Technika Microwell System). Los valores se cuantificaron utilizando diluciones seriales de nitrito de sodio.

Diferenciación de Macrófagos derivados de la Médula ósea (M ϕ DMO).

Los M ϕ DMO se obtuvieron como se describió previamente por Lutz y colaboradores (Lutz, M.B., et al 1999). Las células de la médula ósea se obtuvieron por lavado de fémur y tibias con medio de cultivo. Las células se sembraron en placas a una concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI suplementado con 10% SFB, 100 unidades de penicilina/estreptomicina y 20ng de Factor Colonia-Estimulante de M ϕ Murino (M-CSF por sus siglas en inglés) durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂. Al tercer día se agregó medio RPMI fresco con M-CSF. Al día 7 se desecharon las células no adherentes, y las células adherentes fueron centrifugadas a 1500 rpm a 4°C por 15 minutos. Las células adherentes (F4/80⁺) se resuspendieron en medio y se cultivaron durante 24 h adicionales en placas de 12 pozos.

Estimulación in vitro y extracción de proteínas de los M ϕ DMO.

Las células de la médula ósea se diferenciaron como se describió anteriormente. Al séptimo día de cultivo los M ϕ DMO fueron ajustados a 2.5×10^6 /ml y sembradas en placas de 6

pozos. Las células se utilizaron 24 h después de haber sido sembradas para eliminar cualquier efecto del M-CSF. Los M ϕ DMO fueron estimulados con TcAg (50 μ g/ml) durante 5, 10 o 15 minutos. Después de la estimulación, las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos y lavadas con PBS. Después se lisaron con buffer de lisis durante 5 minutos. Los lisados se cuantificaron con el ensayo BSA (Thermo Scientific) y se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

Western Blot.

Los lisados celulares se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE, se agregó 40 μ g de proteína en cada pozo, después se transfirieron a membranas de PVDF (immobilon-P MILLIPORE) durante 2 h. Las membranas se bloquearon con 5% de leche en PBS por dos h, y se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche.

La detección se realizó utilizando anticuerpos IgG acoplados a peroxidasa anti-raton, anti-conejo (BioLegend 1:2000) y anti-cabra (Santa Cruz Biotechnology), se incubó con estos anticuerpos durante 2 h. Los anticuerpos primarios fueron anti-fosfotirosinas (Santa Cruz Biotechnology) y anti- β actina (BioLegend). Los anticuerpos primarios fueron diluidos en proporción 1:500 en leche en PBS al 1%. Los blots se realizaron con el sistema de detección ECL de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Amersham)

Análisis de marcadores de activación por RT-PCR.

Se midieron por RT-PCR los niveles de transcritos de iNOS, arginasa 1 (Arg-1), Ym-1 y Molécula tipo resistina- α (RELM- α por sus siglas en ingles) en M ϕ peritoneales adherentes (se dejaron adherirse 2 h a 37°C y 5% de CO₂). A los diferentes tiempos indicados, los M ϕ adherentes de ratones MGL1 +/+ y MGL1 -/- infectados con *T crassiceps* fueron extraídos en condiciones de esterilidad, después fueron estimulados con LPS e IFN- γ (1 μ g , 20ng/ml respectivamente). Se dejó un grupo de M ϕ sin algún estímulo para obtener niveles de producción basal. Se removió el sobrenadante de los cultivos y se agregó 1ml de trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA. USA). Posteriormente se agregaron 200 μ l de cloroformo grado molecular (J.T. Baker 9180-02) se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente

por 10 minutos. La muestra fue centrifugada a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase transparente y se le agregaron 500µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla, posteriormente se lavó 2 veces con etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20µl de H₂O DEPC y se agregaron 10 µl de inhibidor de RNAsas (RNase Inhibitor. No. Cat. 3915518-012, GIBCO BRL). Finalmente se cuantificó a 260nm en el espectrofotómetro utilizando una dilución 1:200 (4µl de muestra + 800µl de H₂O DEPC). Se utilizaron 3 µg de RNA para la obtención del cDNA utilizando el kit Superscript II First Strand Síntesis (Invitrogen) y oligos Dt primer. Se utilizó el cDNA para realizar el PCR en un volumen final de 25ml con amortiguador blue 5X, 10nM dNTP, 40nM de cada uno de los oligos forward y reverse, una unidad de Taq DNA polimerasa (Sacace Biotechnologies, Italia) y 2 ml de cDNA. El programa utilizado para la amplificación de cada gen tenía un primer paso de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, y después 35 ciclos que consistían en 95°C por 40 segundos, la temperatura de acoplamiento de cada juego de oligos por 50 segundos y 40 segundos a 72°C: Al final de los ciclos se hizo un paso final de extensión a 72°C por 4 minutos. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (Corbett Research, Australia). Para visualizar los productos se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, las muestras se cargaron en amortiguador Blue Juice que contiene SYBR Green (Invitrogen). Las muestras se visualizaron utilizando un escáner Fujifilm FLA 5000 (Fuji, Japón) con el software FLA 5000 Image reader V2.1. La especificidad del PCR se verificó con la ausencia de productos en las reacciones control sin templado. La secuencia de los primers fue la siguiente:

GAPDH Forward CTCATGACCACAGTCCATGC Reverse

CACATTGGGGGTAGGAACAC; Arg-1 Forward CAGAAGAATGGAAGAGTCAG

Reverse CAGATATGCAGGGAGTCACC; Ym-1 Forward

TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG Reverse TTTGTCCTTAGGAGGGCTTCCTC;

Fizz-1 Forward GGTCCCAGTGCATATGGATGAGACCATAG Reverse

CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTGGCAGC; iNOS Forward

GCCACCAACAATGGCAACAT Reverse AAGACCAGAGGCAGCACATC. (Reyes, J. L. 2010)

Detección de anticuerpos y citocinas en suero por ELISA

Se colectó sangre periférica de los ratones MGL1 +/+ y MGL1 -/- infectados con *T. crassiceps* con intervalos de 2 semanas en cada colecta a partir de la segunda semana de infección y hasta las 8 semanas de infección. Se determinaron los niveles de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para *T. crassiceps* en suero utilizando la técnica de ELISA. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Nunc, Polysorp) con 10 µg/mL de antígeno soluble total de *Taenia crassiceps* toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas 5 veces con PBS-T al 0.05% (solución de lavado). Se realizó el bloqueo con PBS-BSA al 1%. Se lavaron las placas 2 veces. Se colocaron los sueros de ratones a una dilución 1:25 y posteriores diluciones dobles. Se dejaron incubar toda la noche y se lavaron 5 veces. Se adicionaron los anticuerpos anti IgG1 y anti IgG2a (1:500 a 1:1000) contra ratón (Zymed) ambos acoplados a biotina estreptavidina. Después de otros 5 lavados se realizó el revelado adicionando ABTS/H₂O₂ como sustrato. Las placas fueron leídas a 405 nm.

Los resultados están presentados como la máxima dilución sérica en la que la densidad óptica (OD) fue detectada. La producción de IgE total se detectó por Opt-ELISA (Biolegend). Se determinaron los niveles en suero de TNF-α por ELISA sándwich a las 8 semanas de infección.

Análisis por Citometría de Flujo

Las CEP's se centrifugaron, se resuspendieron en 2ml de amortiguador de FACS y después de contarlas se ajustaron 1×10^6 CEP's/500µl. Las células se bloquearon durante media hora con anti-CD16/32 (Biolegend) a 4°C y después se incubaron con anticuerpos αPD-L1-PE, αPD-L2-PE, αF4/80-APC, IgG de rata monoclonal específico contra MGL1 de ratón (clona ER-MP23 de Santa Cruz) + αRat IgG-PE, αReceptor de Manosa-PE o αIL-4Rα-PE durante media hora a 4°C, se centrifugaron y se analizaron con un equipo FACsCalibur.

Otro grupo de células fueron incubadas con 20µg/ml de Ag de *T. crassiceps* conjugado con FITC durante 30 minutos a 4°C y 37°C, se centrifugaron, y se resuspendieron en amortiguador de FACS para su posterior análisis. El acoplamiento de marcador FITC al antígeno de *T. crassiceps* se realizó preparando 1mg/ml de TcAg en buffer de bicarbonato de sodio 0.1M a ph 9. Se disolvió FITC (Sigma) en DMSO a 1mg/ml. Se agregaron 500µl de la solución FITC a la solución TcAg en alícuotas de 5 µl. La solución FITC-TcAg se incubó durante 8 h a 4°C en oscuridad, después se lavó 3 veces con PBS. La proteína se cuantificó con el método de Bradford y se guardó a 4°C.

Análisis estadísticos: En este estudio se realizaron las comparaciones entre los grupos MGL1 +/+ y MGL1 -/- utilizando la prueba t de Student, y se consideró significativa una P < 0.05. La significancia estadística de los títulos de suero fue determinada con tests no-paramétricos utilizando el test Mann-Witney U/Wilcoxon Rank.

Resultados

Los antígenos de *T. crassiceps* contienen glicoconjugados que expresan residuos de Galactosa y N-acetylgalactosamina.

Se realizó un ensayo de Lectin Blot para detectar la presencia de N-acetilgalactosamina y residuos terminales de galactosa en el antígeno de *T. crassiceps* utilizando las lectinas de *Helix pomatia* (Hp) y *Ricinus communis* (RCA). Se detectaron glicoconjugados que son reconocidos por las dos lectinas, cuyo peso molecular es de: 310, 287, 250, 210, 182, 162, 79, 77, 75, 49, 47 y 41 kDa. Dos glicoproteínas adicionales de 51 y 39 kDa fueron reconocidas solamente por Hp (Fig 1). Utilizando solamente estreptavidina-peroxidasa en ausencia de lectinas se observa que son reconocidas 4 proteínas de 260, 250, 124 y 120 kDa. Estas proteínas pueden corresponder a carboxilasas dependientes de biotina (Fritz-Laylin, L.K., et al 2010, Jitrapakdee, S., et al. 2008). Estos resultados indican que el TcAg contiene glicoconjugados que expresan residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina.

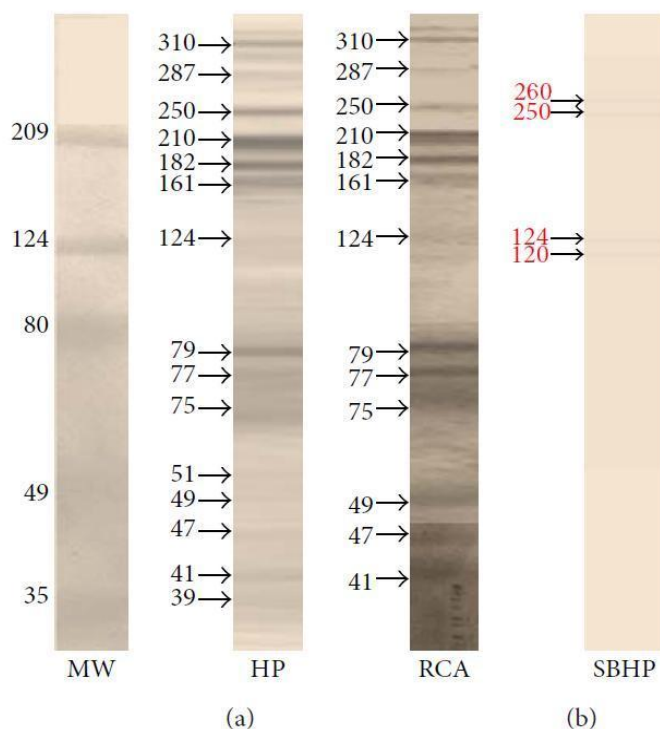


Figura 1 Análisis por lectin blot de los antígenos de *Taenia crassiceps*. Los antígenos de *T. crassiceps* se corrieron en un SD-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con las lectinas Hp que reconoce residuos terminales de N-acetilgalactosamina y RCA que reconoce residuos terminales de galactosa; MW-Marcador de peso molecular; SBHP-Estreptavidina.

El reconocimiento de los antígenos de *T. crassiceps* disminuye en los macrófagos MGL1^{-/-}.

Para determinar el papel que juega MGL1 en el reconocimiento del TcAg, se marcó este antígeno con el fluorocromo FITC (TcAg-FITC) y se incubó con Mφ MGL1^{+/+} y Mφ MGL1^{-/-} para realizar ensayos de unión por citometría de flujo. En los Mφ MGL1^{+/+} el TcAg-FITC se une eficientemente a 37°C (aproximadamente el 30% de las células fueron positivas), lo que indica que el TcAg está siendo reconocido por los Mφ (Fig 2a). Al incubar los Mφ a 4°C con el TcAg-FITC se observa una reducción en la fluorescencia (10%) lo que indica bajos niveles de unión no específica. Al incubar el TcAg-FITC con Mφ MGL1^{-/-} se observa una reducción significativa en el porcentaje de células TcAg-FITC positivas (aproximadamente 6%) también se observa una disminución en la intensidad media de fluorescencia en estas células (fig 2 a-b). Estos datos sugieren que MGL1 participa en el reconocimiento del TcAg.

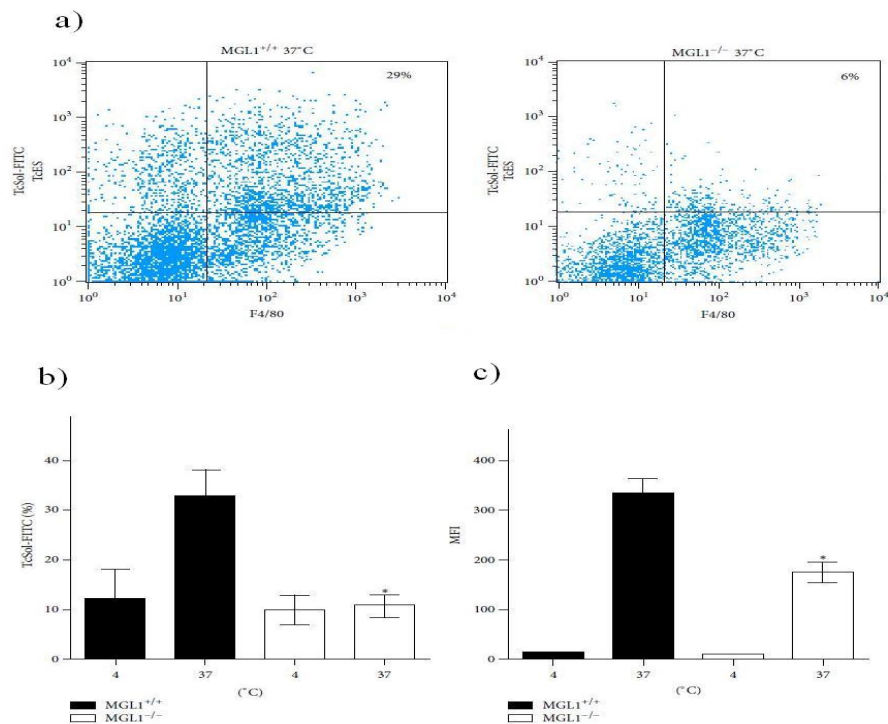


Figura 2 MGL1 participa en el reconocimiento del antígeno de *T. crassiceps* en los Mφ peritoneales. Se incubaron Mφ de ratones MGL1^{+/+} y MGL1^{-/-} con el TcAg marcado con FITC (TcAg-FITC), la fluorescencia se midió por citometría de flujo. a) Dot plots de Mφ de ratones MGL1^{+/+} y MGL1^{-/-} incubados durante 30 min. con TcAg-FITC a 37°C y 4°C. [Representativo de un experimento] b) Porcentaje de Mφ peritoneales positivos para TcAg-FITC incubados durante 30 min. con TcAg-FITC a 37°C y 4°C [Representativo de 3 experimentos *p<0.05] c) Datos representados como intensidad media de fluorescencia MFI, se eliminaron los niveles basales de auto fluorescencia en todos los grupos.

La ausencia de MGL1 en macrófagos afecta la fosforilación de tirosinas en respuesta a TcAg

Recientemente se ha descrito que el receptor MGL en DC de humano activa la vía de señalización ERK1,2 (Napoletano, C., et al 2012, van Vliet S. J, 2013). Esto nos llevó a preguntarnos si la interacción de MGL1 con el TcAg activa alguna vía de señalización intracelular. Para ello estimulamos M ϕ MGL1 +/+ durante 5, 15 y 30 min con TcAg y encontramos que hay fosforilación de tirosinas en proteínas intracelulares de los macrófagos después de estos estímulos. Esta activación intracelular se detectó desde los primeros 5 min posteriores al estímulo, y seguía presente en menor medida después de 15 y 30 min de exposición al TcAg (Fig 3). En contraste, los M ϕ MGL1 -/- expuestos a los mismos estímulos presentaron una menor fosforilación en algunas de las bandas de proteínas y esta fue menos sostenida conforme se incrementó el tiempo del estímulo (Fig 3 flechas).

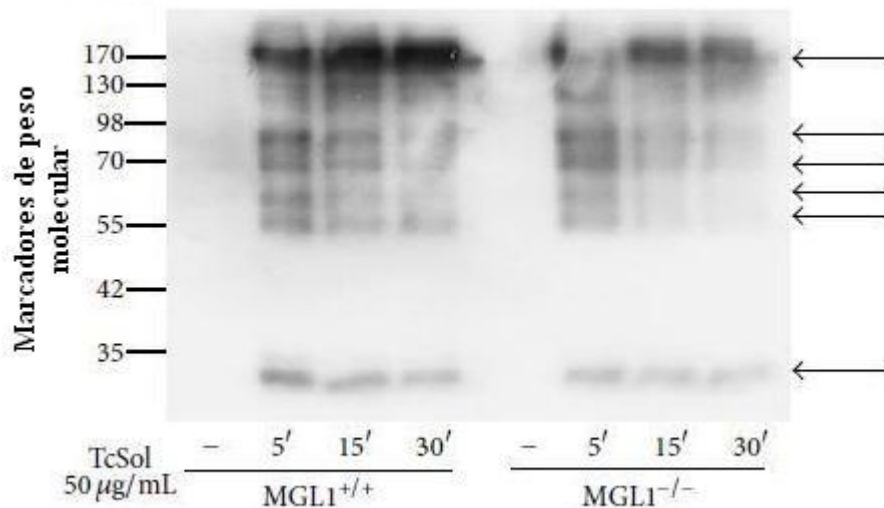


Figura 3. Los M ϕ de ratones MGL1^{-/-} muestran una disminución en la fosforilación de tirosinas en respuesta a TcAg. Western blot con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas. Carril 1: Lisado de M ϕ MGL1^{+/+} s. Carriles 2 a 4, lisados de M ϕ s MGL1^{+/+} estimulados con TcAg durante 5, 15 y 30min, respectivamente. Carril 5, lisado de M ϕ s MGL1^{-/-}. Carriles 6 a 8, lisados de MGL1^{-/-} estimulados con TcAg durante 5, 15, y 30 min, respectivamente. Las flechas indican las proteínas que se fosforilaron después del estímulo. Las proteínas se visualizaron utilizando sistema de detección de quimioluminiscencia y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a HRP. Los Western-blots son representativos de dos experimentos independientes.

Los Ratones deficientes en MGL1 son mas susceptibles a la infección por *T. crassiceps*.

Después de determinar que los antígenos de *T. crassiceps* pueden ser reconocidos por MGL1 y que la ausencia de éste CLR hace que disminuya la fosforilación de tirosinas al estímulo con TcAg, decidimos evaluar cuál era el papel de MGL1 in vivo ante un reto con *T. crassiceps*. Para responder esta pregunta se infectaron vía i.p. ratones hembra MGL1 +/+ y MGL1 -/- con 20 cisticercos de *T. crassiceps*. Como control de susceptibilidad también se infectaron al mismo tiempo ratones hembra BALB/c, con un número igual de parásitos; la cepa BALB/c es altamente susceptible a la infección con *T. crassiceps*. (Reyes, J.L., et al. 2009).

Examinamos la dinámica del crecimiento parasitario de las 2 a las 8 semanas de infección. En la infección aguda (2 semanas) los dos grupos de ratones presentaron una carga parasitaria similar. Durante la cuarta semana de infección los ratones MGL1 -/- presentaron una carga parasitaria significativamente mayor en comparación con los ratones MGL1 +/+. En la semana 8 los ratones MGL1 -/- presentaban una carga parasitaria significativamente mayor en comparación con los MGL1 +/+ Figura 4 a), de hecho los ratones MGL1 -/- presentaron una carga parasitaria similar a la de los ratones BALB/c (Figura 4 b). Estos datos sugieren que el reconocimiento de los antígenos de *T. crassiceps* por MGL1 podría activar una vía involucrada en la resistencia a la infección en el background C57BL/6

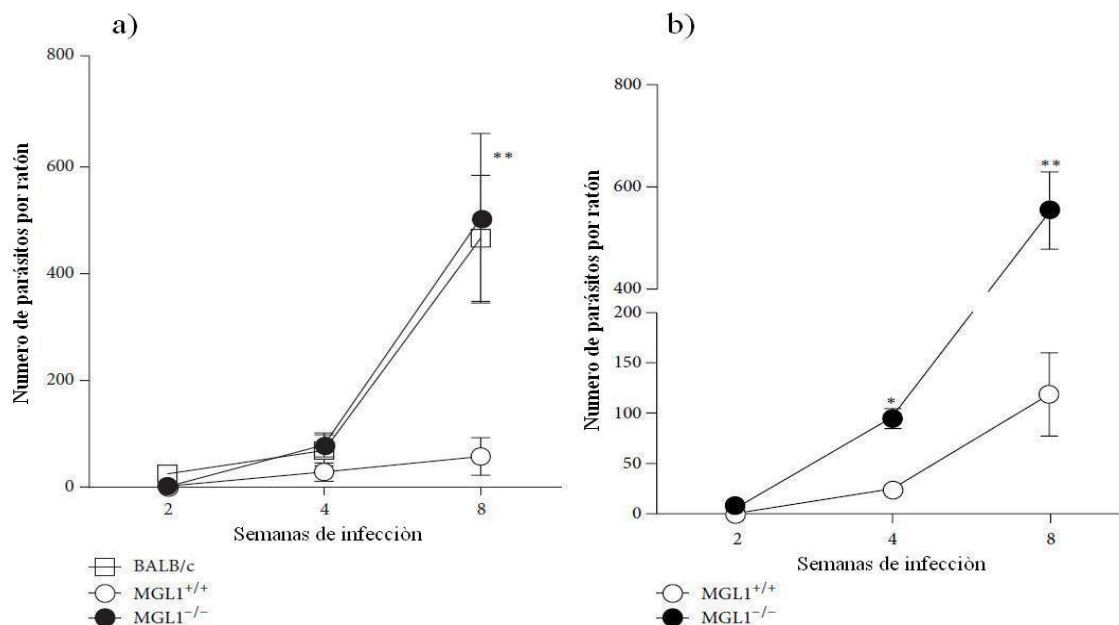


Figura 4: Los ratones MGL1^{-/-} no controlan eficientemente la infección por *T. crassiceps*. (a) Curso de la infección después de la inyección de 20 cisticercos de *T. crassiceps* en ratones MGL1^{-/-}, MGL1^{+/+} y BALB/c. (b) Experimento independiente del curso de la infección en ratones MGL1^{-/-} y MGL1^{+/+}. Los datos están expresados como la media de \pm SE de 6 ratones por grupo * $P < 0.01$ comparando MGL1^{-/-} contra MGL1^{+/+} en los mismos tiempos de infección.

La respuesta inmune contra *T. crassiceps* se altera en los ratones MGL1 -/-

En un siguiente paso medimos los niveles de anticuerpos asociados a respuestas tipo Th1, IgG2a, y anticuerpos asociados a respuestas Th2, IgG1 e IgE, a diferentes tiempos durante la infección causada por *T. crassiceps* en ratones MGL1 +/+ y ratones MGL1 -/-.

En la infección aguda, los ratones MGL1 +/+ y MGL1 -/- infectados con *T. crassiceps* presentaron niveles similares de anticuerpos IgG2a, sin embargo, a la octava semana de infección los ratones MGL1 +/+ produjeron un mayor nivel de anticuerpos IgG2a específicos contra *T. crassiceps* en comparación con los MGL1 -/- (Fig 5a). En contraste, no se observó diferencia significativa en la producción de anticuerpos IgG1 específicos contra *T. crassiceps* durante la infección (Fig 5b).

La inmunidad contra ciertos helmintos está mediada por anticuerpos IgE, sin embargo, en este estudio encontramos que los ratones MGL1 -/- presentaron niveles más elevados de IgE total en comparación con los niveles que presentaron los ratones MGL1+/+. A pesar de ello, los ratones MGL1 -/- desarrollaron una mayor carga parasitaria.

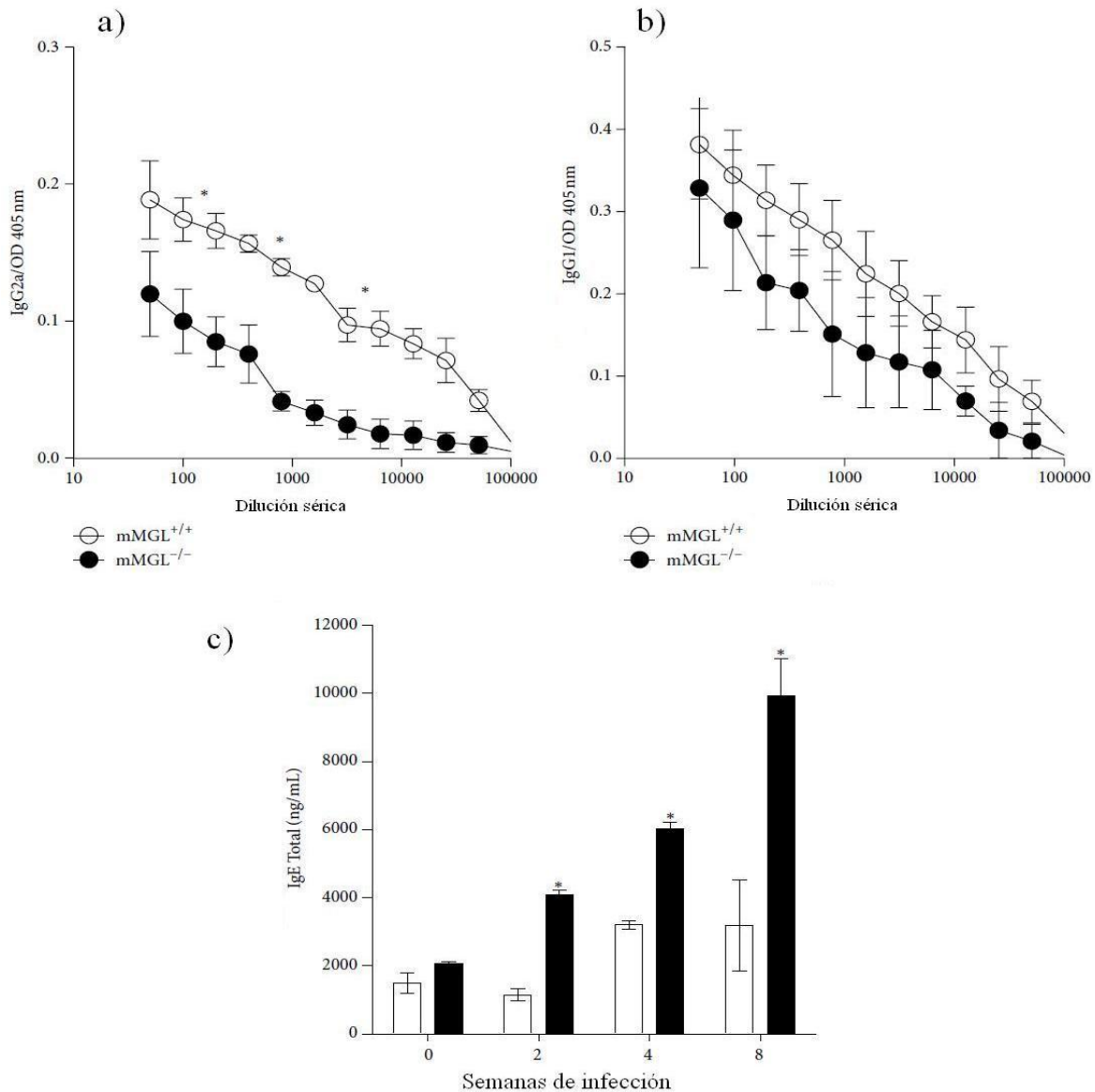


Figura 5: Producción de anticuerpos en ratones *MGL1^{-/-}* y *MGL1^{+/+}* durante la infección causada por *T. crassiceps*. (a) anticuerpos IgG2a específicos contra *T. crassiceps* después de 8 semanas de infección; (b) anticuerpos IgG1 específicos contra *T. crassiceps* después de 8 semanas de infección.. (c) IgE total. Los valores son \pm SE ($n = 6$ ratones) Y son representativos de 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ comparando *MGL1^{-/-}* contra *MGL1^{+/+}* en los mismos tiempos de infección.

Comparamos la producción de citocinas en células totales del bazo extraídas después de la infección de ambos grupos de ratones en respuesta a 25 μ g/ml de TcAg o en respuesta a un estímulo con anticuerpos anti-CD3. La producción de IFN- γ después de un estímulo con anti-CD3 o TcAg fue similar en ambos grupos de ratones después de dos semanas de infección. Sin embargo, en las semanas 4 y 8 de infección, la producción de IFN- γ fue

menor en las células de ratones MGL1^{-/-}. Al medir la producción de IL-4 en ambos grupos de células, la producción de IL-4 fue mayor en las células provenientes de ratones MGL1^{-/-} extraídas a las 2 y 4 semanas de infección, en cambio la producción de IL-4 en las células provenientes ratones MGL^{-/-} con 8 semanas de infección disminuye a valores similares a la producción de células provenientes de ratones MGL1^{+/+} (Fig 6b). La respuesta al estímulo anti-CD3 confirmó que la producción de IL-4 en las células del bazo de ratones MGL1^{-/-} fue mayor en comparación con las células de ratones MGL1^{+/+}. Por lo tanto, conforme la infección progresa las células del bazo de ratones MGL1^{-/-} producen mas IL-4 en comparación con las células de ratones MGL^{+/+} (Fig6c).

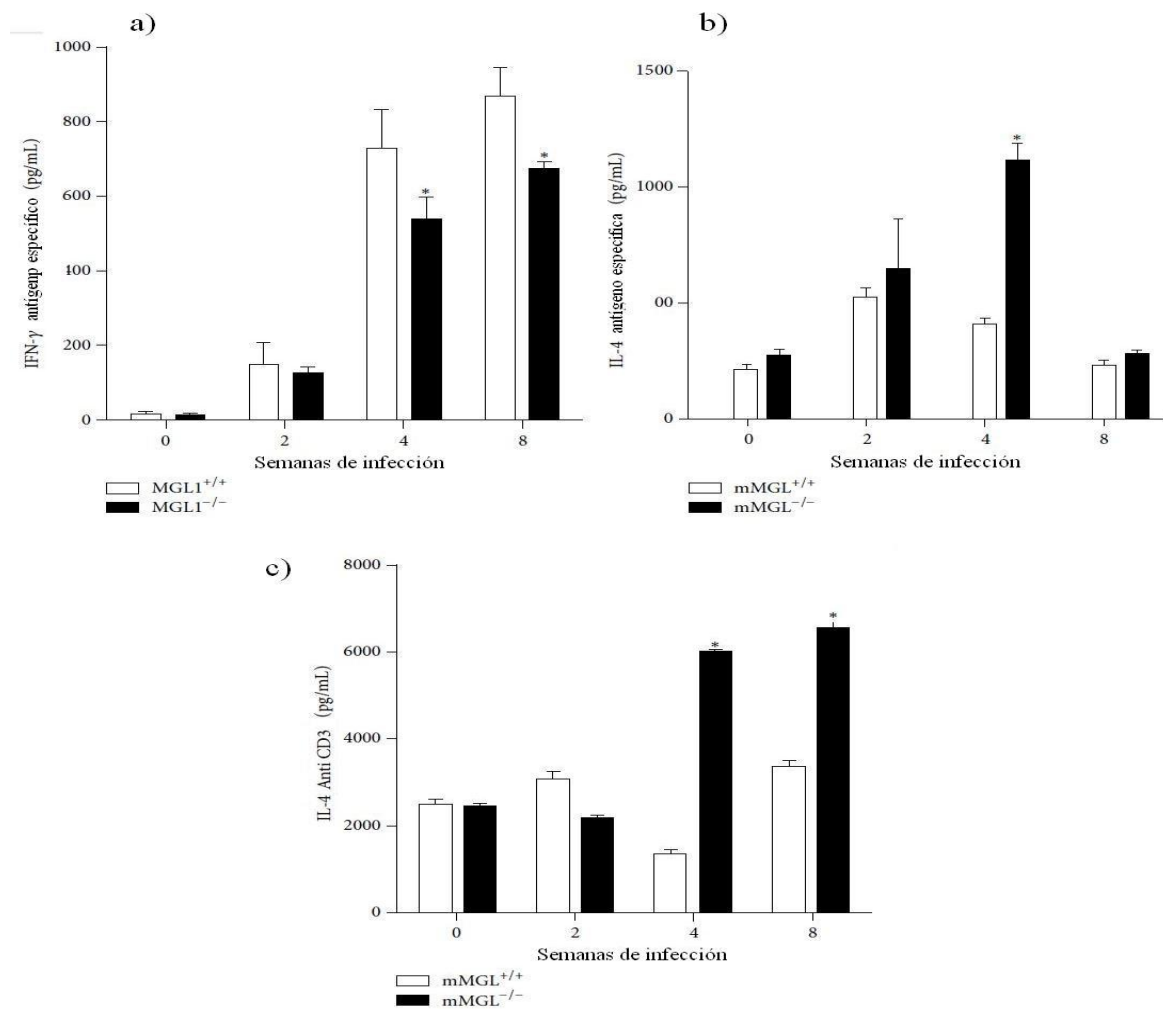


Figura 6: Cinética de la producción de citocinas in vitro de células totales del bazo de ratones MGL1^{-/-} y MGL1^{+/+} estimuladas con TcAg. (a) Producción de IFN- γ de células del bazo después de 72h en respuesta a un estímulo antigénico específico con TcAg (25 μ g/mL) (b) Producción de IL-4 después de 72h en respuesta a un estímulo antigénico específico con TcAg (25 μ g/mL) (c) Producción de IL-4 después de 72h en respuesta a un estímulo policlonal (anti-CD3) in vitro. Los datos son representativos de dos experimentos independientes $P < 0.05$.

Diferencias en la producción de citocinas en Mφ peritoneales MGL1+/+ y MGL1-/-

Para determinar si los ratones deficientes en MGL1 presentaban alguna alteración sistémica en la activación innata, analizamos la respuesta de los macrófagos peritoneales de ratones MGL1-/- infectados o no a estímulos pro inflamatorios. Los macrófagos peritoneales de ambos grupos de ratones infectados se estimularon por 24 horas con LPS 1 μg/ml e IFN-γ (5ng/ml); los valores basales los obtuvimos de macrófagos peritoneales sin ningún tipo de estímulo. Después de esto se analizó la producción de IL-12, TNFα y óxido nítrico en los sobrenadantes. Los macrófagos peritoneales obtenidos después de 2, 4 y 8 semanas de infección de los ratones MGL1 -/- produjeron menos IL-12 comparados con los macrófagos de ratones MGL1 +/+. En ambos grupos la producción de IL-12 decreció conforme avanzaba la infección (Fig 7a). En el caso de TNFα la producción en los Mφ estimulados de ratones no infectados fue mayor en los MGL1+/+ que en los MGL1-/-, sin embargo, a las dos semanas de infección los macrófagos responden con una producción similar en ambos grupos, en este caso aumentó en los MGL1-/- y disminuyó en los MGL1+/+. Conforme avanzó la infección, la producción de TNFα decreció en los MGL1-/- y regresó a niveles basales en los MGL1+/+ (Fig 7b). La producción de óxido nítrico fue mucho menor en los Mφ provenientes de ratones MGL1-/- en comparación con los Mφ de ratones MGL1+/+. Independientemente de la participación de MGL1, en ambos grupos de ratones la producción de óxido nítrico en respuesta a un estímulo pro inflamatorio disminuyó conforme avanzó la infección (Fig. 7c). Diversos estudios han demostrado que la unión de MGL con su ligando aumenta la producción de IL-10 en DC, macrófagos y otros tipos celulares inducidos por DC MGL1^{Pos}, así como un aumento en la producción de TNFα en DC humanas al estimular conjuntamente TLR2 y MGL (Li *et al* 2012, van Vliet S. J, 2013; Saba *et al* 2009), por lo que decidimos analizar los niveles de estas citocinas en suero. Al analizar los niveles basales de TNFα, no se observaron diferencias entre las dos cepas de ratones, sin embargo en los grupos de ratones infectados los niveles de TNFα fueron significativamente mayores en suero proveniente de ratones MGL1+/+ con 8 semanas de infección, en comparación con los niveles encontrados en suero de ratones MGL1-/- con el mismo tiempo de infección (Fig 7d).

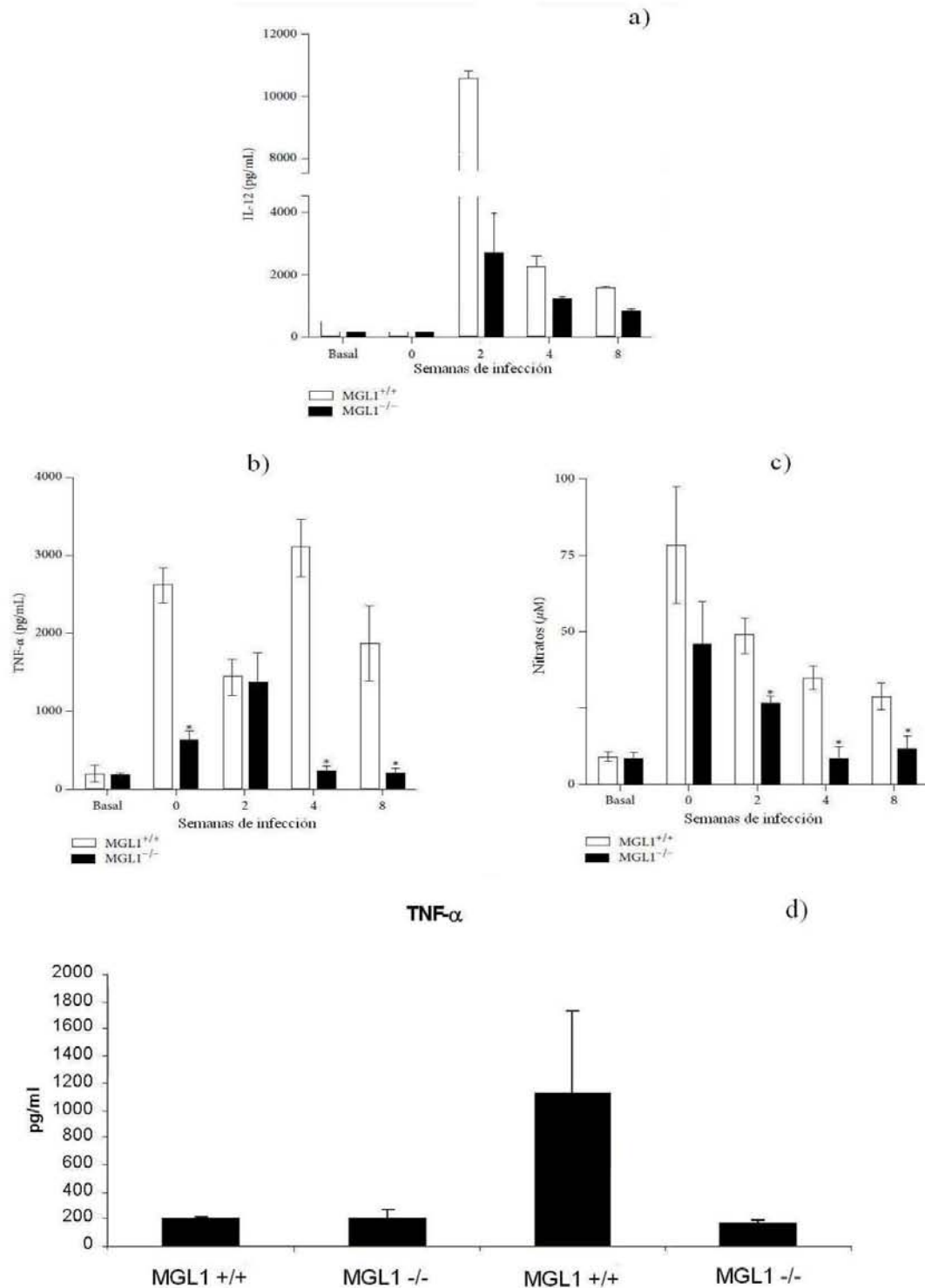
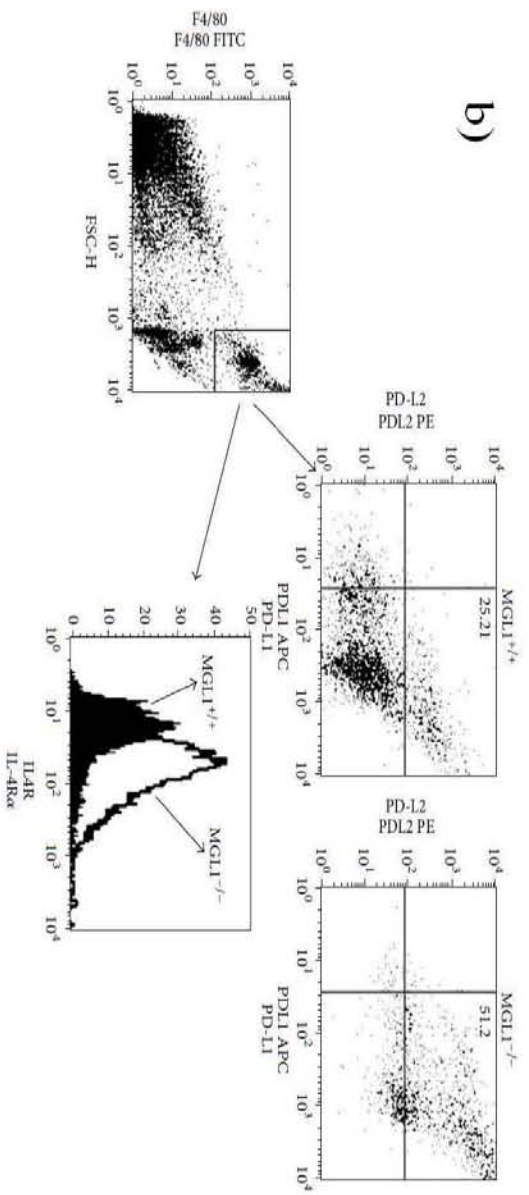
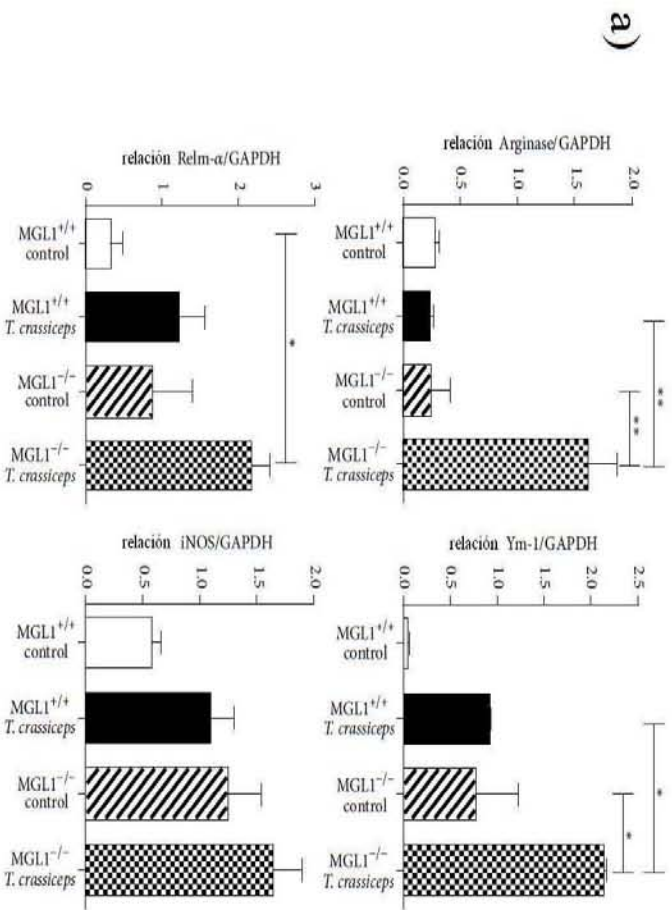


Figura 7: Diferencias en la producción de citocinas entre los Mφ peritoneales MGL1^{-/-} y MGL1^{+/+} provenientes de ratones infectados con *T. crassiceps*. Se obtuvieron Mφ peritoneales a diferentes tiempos de la infección y se estimularon con LPS (1 μg/mL) + IFN-γ (5 ng/ml) por 48h, se analizó en los sobrenadantes, la producción de (a) IL-12; (b) TNF-α; y (c) NO, Los niveles basales representan la producción de citosinas de Mφ provenientes de ratones no infectados sin estímulo de LPS e IFN-γ. (d) Niveles de TNF-α y IL-10 en suero de ratones después de 8 semanas de infección con *T. crassiceps*. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. **P* < 0.05

Los ratones MGL1^{-/-} reclutan M ϕ alternativamente activados. Se realizó una RT-PCR en M ϕ peritoneales adherentes de ratones de 4 y 8 semanas de infección para identificar la expresión de transcritos de marcadores de activación. Los M ϕ de ratones MGL1^{-/-} mostraron mayor expresión de Arg-1, Relm- α y Ym1 en comparación con los M ϕ de ratones MGL^{+/+} (Fig. 8a). También analizamos por Citometría de flujo la expresión de los marcadores membrana PD-L2, IL-4R α y MR, que han sido asociados con activación alternativa, (Terrazas, L.I, et al 2005). A las 8 semanas de infección los macrófagos de ratones MGL1^{-/-} expresaron dos veces más PD-L2 e IL-4R α que los M ϕ de ratones MGL^{+/+}. La expresión de MR también se encontró elevada en los M ϕ de ratones MGL1^{-/-} en comparación con los niveles presentes en los M ϕ de ratones MGL^{+/+} (Fig. 8b-c).



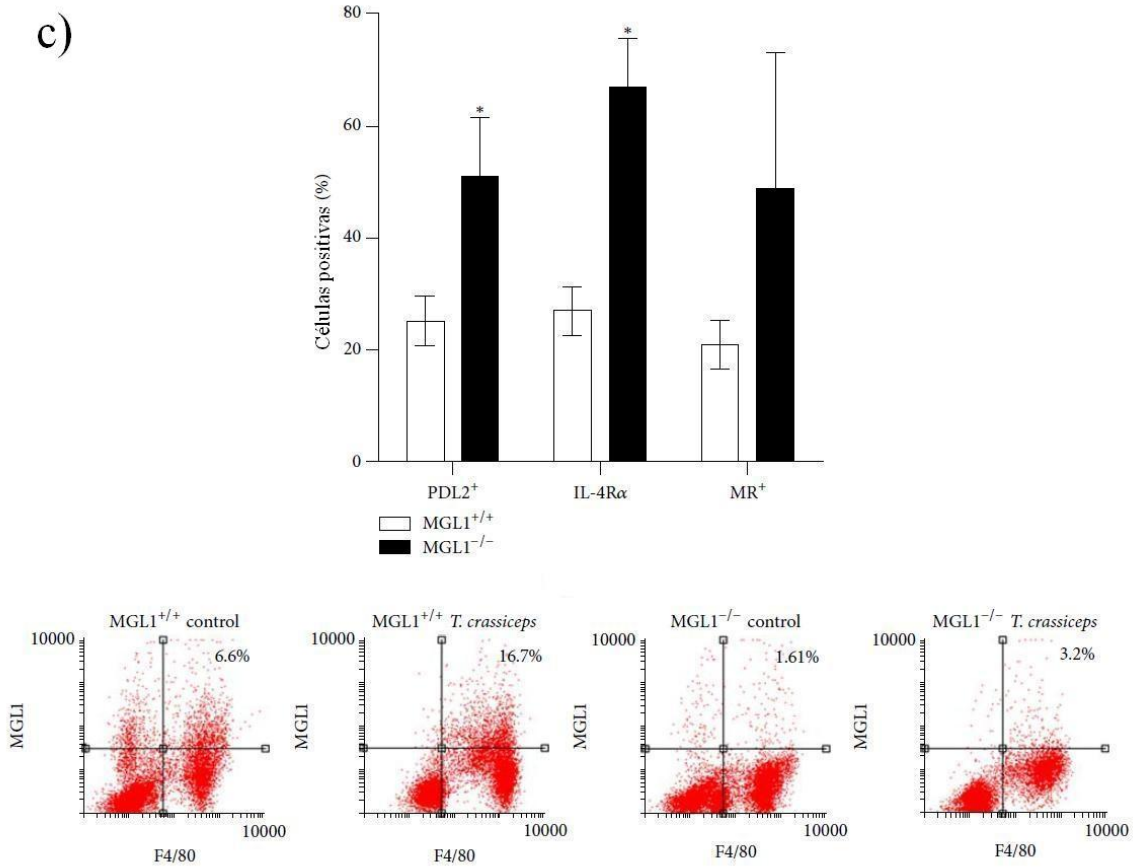


Figura 8: Los ratones MGL1^{-/-} reclutan macrófagos alternativamente activados. Se obtuvieron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones MGL1^{-/-} y MGL1^{+/+} infectados con *T. crassiceps*, y utilizando RT-PCR y Citometría de flujo se analizó la expresión de (a) Expresión de Arginasa-1, Ym1, RELM- α e iNOS en macrófagos extraídos después de 8 semanas de infección con *T. crassiceps* (b) Representación de la Citometría de flujo en dot plots e Histogramas donde se muestra la expresión de PD-L2, e IL-4R α en macrófagos de ratones MGL1^{-/-} y MGL1^{+/+} (c) Dot plots del Porcentaje de expresión de marcadores de la expresión de MGL1 en M ϕ peritoneales de ratones MGL1^{+/+} y MGL1^{-/-} de 8 semanas de infección con *T. crassiceps* y no infectados (controles), los números en los cuadrantes indican el promedio de los porcentajes de células positivas. Los valores son la media \pm SE (n = 6 ratones) y son representativos de tres experimentos independientes. $p < 0.05$ comparando grupos MGL1^{-/-} contra MGL1^{+/+} en los mismos tiempos de infección.

Discusión

En los últimos años es cada vez más evidente el papel de las CLR's en el reconocimiento de glicoconjugados de microbios hongos y parásitos (Vazquez-Mendoza, A., 2013). El conocimiento en esta área ha pasado de “simples receptores endocíticos” a importantes moléculas involucradas en la inmunidad innata capaces de encender vías de señalización intracelular para modificar la respuesta celular ante diferentes patógenos. A pesar de que el papel de las CLR's en la inmunidad contra infecciones bacterianas y fúngicas está ampliamente estudiado, el papel que juegan estas moléculas en la respuesta inmune contra infecciones por helmintos es poco conocido (Prasanphanich, N.S., et al.2013). El reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos por las células presentadoras de antígeno es crucial para el inicio de la respuesta inmune. Diferentes estudios han demostrado que las moléculas derivadas de los helmintos pueden ser reconocidas por CLR's (Guasconi, L., et al. 2011, van Liempt, E., et al. 2007). En nuestro laboratorio hemos demostrado que el TcAg se une a Concanavalina A, lo que indica que hay componentes en el TcAg glicosilados con glucosa, manosa y galactosa, (Terrazas, C.A. *et al.* 2010), mientras que el grupo de Lee et al reportó que los principales glicosilaciones terminales de los N-glicanos en *T. crassiceps* eran manosa, fucosa, galactosa y GlcNAc. También encontraron una estructura antena $Fuc\alpha 1\rightarrow 3GlcNAc$, que es muy parecida a la estructura Lewis^X en las moléculas de *T. crassiceps* (Lee, J. J., et al 2005). MGL1 podría reconocer estas estructuras. Se ha demostrado que las CLR's MGL, MR y DC-SIGN en DC humanas son capaces de reconocer el antígeno soluble de los huevos de *S. mansoni* (van Liempt, E., et al. 2007), por lo que pensamos que MGL1 podría ser uno de los receptores que reconoce los glicoconjugados de TcAg dado que al igual que DC-SIGN reconoce estructuras Lewis^X con residuos terminales de fucosa y galactosa. En este trabajo hemos contribuido al conocimiento de las CLR's como posibles mediadores de la activación y resistencia in vivo de la respuesta inmune contra helmintos la cual podría mediar la activación celular a través de vías de señalización intracelular.

Adicionalmente a las estructuras que son reconocidas por la Concanavalina A, así como estructuras glicosiladas que contienen residuos terminales de Fucosa, Galactosa y N-acetilglucosamina presentes en el antígeno de *T. crassiceps* (Terrazas, C.A. 2010, Lee, J.J., et al. 2005), en este trabajo encontramos que, el antígeno de *T. crassiceps* puede presentar

glicosilaciones con residuos terminales de N-acetilgalactosamina. Dado que se ha demostrado que los carbohidratos de *T. crassiceps* y de otros helmintos son importantes por su actividad moduladora de la respuesta inmune (Terrazas, C.A. 2010, Vazquez-Mendoza, A. 2013), decidimos estudiar el posible papel de MGL1 en el reconocimiento de estructuras glicosiladas del TcAg. La primera evidencia que sugiere que MGL1 juega un papel en la relación hospedero-parásito en la cisticercosis experimental fue la disminución del reconocimiento del TcAg en los M ϕ de ratones deficientes en esta lectina. El reconocimiento de el TcAg por MGL1 sugiere dos posibilidades, una es que hay estructuras Lewis^X presentes en el antígeno de *T. crassiceps*, y la otra posibilidad es que MGL1 sea capaz de reconocer la estructura Fuc α 1 \rightarrow 3GlcNac descrita por Lee. (Lee, J.J., et al. 2005)

Recientemente se describió que en DC humanas, MGL1 es capaz de activar ERK1,2 (Napoletano, C., et al. 2012, van Vliet S. J, 2013). MGL1 también contiene en su dominio citoplásmico un dominio con los aminoácidos YENL, similar al que se encuentra en la lectina DC-SIGN que reconoce estructuras Lewis^X en la cual se ha demostrado que es capaz de activar vías de señalización intracelular. La lectina Receptor de Asialoglicoproteínas (ASGP-R, asialoglycoprotein receptor) también presenta un dominio intracelular similar al de MGL1 en la cual se ha demostrado que la tirosina de este dominio se fosforila (Tsuiji. M, et al. 2002, Gringhuis, S.I. et al. 2007), por ello decidimos estudiar las posibles señales intracelulares que pudiera desencadenar la interacción de MGL1 con un ligando natural. En este trabajo demostramos que la disminución en el reconocimiento del TcAg estaba asociada a una disminución de las señales intracelulares mediadas por fosforilación de tirosinas en los macrófagos. Si bien hemos demostrado que en M ϕ MGL1 activa mecanismos intracelulares de fosforilación de tirosinas, no podemos descartar que en dicha vía de señalización también estén involucrados fenómenos de fosforilación en serinas y/o treoninas, como ocurre en las cascadas de señalización ERK1,2 y como sucede con ASGP-R, el CLR mas cercano a MGL por su similitud en secuencia y localización cromosomal el cual también se fosforila en residuos de serina y en la tirosina del motivo YXX Φ (Spiess M. 1990; van Vliet 2008). Recientemente se describió que MGL1 es capaz de activar la vía de señalización Raf-1 en DC de ratón, al ser estimuladas con los productos de excreción/secreción de *T. crassiceps*. En ese mismo trabajo no se detectaron cambios en la fosforilación de ERK. Esto demuestra la homología que existe entre MGL1 en ratones y

DC-SIGN en Humanos, ambas lectinas son altamente específicas en el reconocimiento de estructuras Lewis^X y en la señalización intracelular de ambas se activa Raf-1.(Gringhuis, S.I. *et al.* 2007, Terrazas, C. A. *et al.* 2013). El ortólogo de DC-SIGN es SIGNR1 en ratones, ambos receptores son CD209, sin embargo SIGNR1 no reconoce estructuras Lewis^X (Saunders *et al.* 2008). Si bien MGL1 se asemeja mas a MGL2, MGL, rMGL y ASGP-R por su secuencia de aminoácidos, las diferencias en su CRD y en su dominio intracelular hace que su función de receptor en ratón sea la mas cercana a DC-SIGN a pesar de no ser ortólogo de esta última, y es la única lectina en Mφ y DC en ratones que cubre las mismas funciones que cubre DC-SIGN en humanos. Actualmente existe una dificultad para establecer un claro homólogo de DC-SIGN en ratones ya que se han identificado 8 posibles homólogos lo que impide contar con un modelo murino para estudiar las funciones de DC-SIGN *in vivo*. Si bien como ya se mencionó antes, MGL1 pareciera ser homólogo funcional de DC-SIGN, la interacción de MGL1 con TLR2 se asemeja mas a lo descrito en la interacción de MGL y TLR2 en DC humanas, por lo que MGL1 no podría considerarse como un modelo de estudio murino para dilucidar las funciones de DC-SIGN *in vivo*.

Realizamos ensayos *in vivo* para determinar el papel que juega el reconocimiento de *T. crassiceps* por MGL1 durante la infección, con esto reportamos que los ratones deficientes en esta lectina son mas susceptibles a la infección. De manera general la falta de MGL1 provoca que la respuesta inmune se polarice hacia una respuesta Th2, la cual confiere protección contra infecciones gastrointestinales causadas por helmintos, sin embargo esta respuesta favorece el establecimiento del parásito *T. crassiceps*, el cual se elimina con una respuesta tipo Th1 (Terrazas, L, I., *et al.*, 2013). El incremento en la producción de IL-4 y la disminución de IFN- γ por parte de los linfocitos T en la ausencia de MGL1 indica que la ausencia de esta lectina en los macrófagos hace que estas células presenten un fenotipo Th2 incrementado. La ausencia de MGL1 también disminuye la producción de IgG2a específica contra *T. crassiceps* por parte de los linfocitos B, probablemente por la disminución en la producción de IFN- γ de las células T. Del mismo modo, el aumento en la producción de IgE específica contra *T. crassiceps* en ausencia de MGL1 puede deberse al aumento de la producción de IL-4. La falta de MGL1 también reduce la producción de oxido nítrico y de las citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF α , lo que concuerda con los resultados obtenidos al estimular DC con anticuerpos policlonales anti-MGL1 en donde el estímulo provoca que

las células produzcan mas IL-12 (Napoletano, C., et al. 2012). Un mecanismo similar podría estar ocurriendo en los macrófagos, donde el TcAg está siendo reconocido por MGL1 y por lo tanto induciendo la producción de IL-12, ya que al faltar este receptor, disminuye la producción de esta citocina pro inflamatoria. Para el caso de la producción de TNF α un estudio reciente demostró que al estimular de manera conjunta a MGL y TLR2 en DC humanas, la producción de TNF α aumentaba considerablemente, sin embargo, al estimular MGL de manera individual no se incrementaba la producción de TNF α (van Vliet S. J, 2013); en nuestro modelo la producción de TNF α aumenta considerablemente en los M ϕ de ratones MGL1+/+. Dos estudios han demostrado que *T crassiceps* expresa ligandos para TLR2 (Reyes, J. L., et al., 2011; Terrazas, C. A. et al 2013) lo que sugiere que al igual que en DC, la estimulación conjunta de TLR2 y MGL1 resulta en una producción elevada de TNF α . En los M ϕ de ratones MGL1-/- la producción de TNF α aumenta ligeramente después de 2 semanas de infección, este aumento puede deberse a la estimulación de TLR2, ante la ausencia de MGL1 la producción de TNF α decrece conforme avanza la infección, en cambio en los M ϕ MGL1+/+ la producción de TNF α se incrementa conforme avanza la infección. Al analizar la producción de TNF α en suero de ratones después de 8 semanas de infección, los niveles de TNF α aumentan hasta 4 veces en comparación con los niveles de ratones MGL1-/-, lo que confirma la posibilidad de que los antígenos de *T crassiceps* estén siendo reconocidos conjuntamente por TLR2 y MGL1. En este caso la producción de TNF α puede provenir tanto de DC como de M ϕ .

Nuestros resultados sugieren que la activación de MGL1 podría estar involucrada no solo en la producción de citocinas pro inflamatorias en la fase aguda de la infección, si no que también podría jugar un papel muy importante en el establecimiento de una respuesta adaptativa tipo Th1 la cual sería esencial para limitar la infección y reducir la patología en la cisticercosis experimental.

Se determinó *in vivo* que los ratones MGL1-/- incrementan significativamente el reclutamiento de M ϕ alternativamente activados como se observa en los transcritos de mRNA de Arg-1, Ym1 y RELM α y en el aumento de la expresión de los marcadores de membrana MR, IL-4 y PD-L2. Estos resultados correlacionan con los trabajos que

demuestran que los M ϕ alternativamente activados se asocian con la susceptibilidad a la infección (Reyes. J. L., *et al.*, 2010), e indican que MGL1 no es necesario para la inducción de M ϕ Alternativamente activados a pesar de ser un marcador de activación alternativa (Raes G *et al.* 2005).

En conjunto el papel que juega MGL1 en el modelo de cisticercosis experimental sugiere que podría ser un factor crítico en la respuesta inmune contra helmintos.

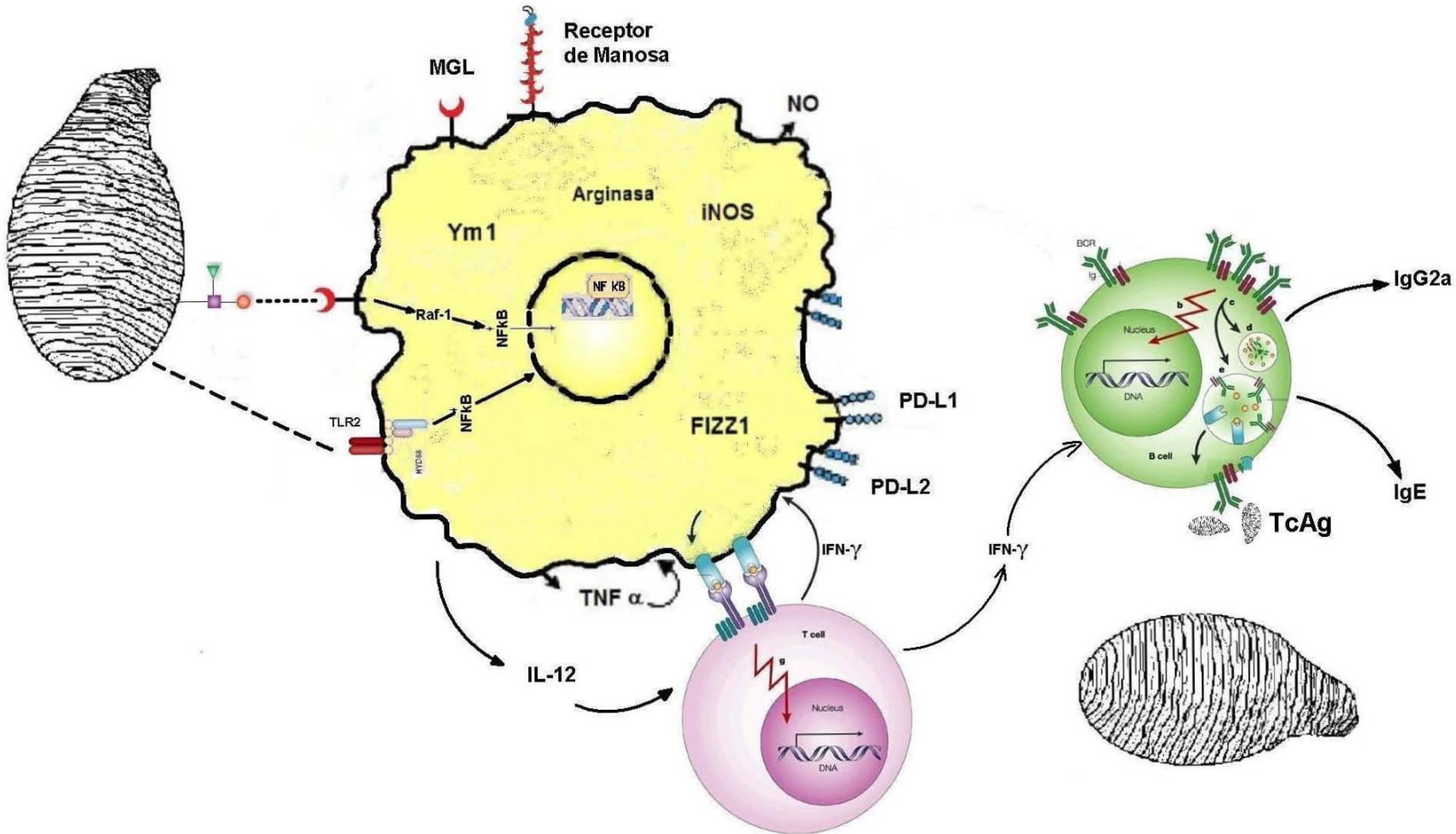
A pesar de que muchos helmintos parásitos expresan gran variedad de carbohidratos, solamente algunas CLR's se han asociado con el reconocimiento de estos y su función *in vivo*, por ejemplo Dectin-2, DC-SIGN, SIGNR-3, SIGNR-1 y MGL reconocen varios componentes de *S mansoni* (Prasanphanich, N.S., *et al* 2013), pero la función de estas durante la infección esta poco estudiada, también se ha descrito que MR puede reconocer la cercaria de *S mansoni* (Paveley, R. A *et al.*, 2011), pero no se ha demostrado que alguna de estas lectinas sea esencial en la resistencia o susceptibilidad de dicha infección.

La función del receptor de manosa se ha estudiado *in vivo* en la infección por *Trichuris muris*, en este caso es capaz de reconocer los productos excretados/secretados del parásito, sin embargo, se demostró que no es necesario dicho receptor para la expulsión del parásito y que tampoco influye en la resistencia o susceptibilidad a la infección (deSchoolmeester, M.L., *et al.*, 2009). En otro estudio *in vitro* con el mismo receptor, en un modelo de neurocisticercosis se demostró que la deficiencia de MR incrementaba la supervivencia a la infección por *Mesocestoides corti* principalmente induciendo una respuesta pro inflamatoria contra el céstodo (Mishra, P.K., *et al.*, 2013). Estas observaciones enfatizan la importancia de diferentes CLR's en combatir diferentes infecciones por helmintos dada la complejidad de las glicomoléculas derivadas de estos, y mas aún sugieren la posibilidad de identificar diferentes funciones de las CLR's dependiendo del tipo de infección al que se enfrenta. Es posible que algunas CLR's estén involucradas en respuestas proinflamatorias o reguladoras por sí mismas, mientras que otras complementen, regulen o potencien la activación de los TLR's.

El haber encontrado que los azúcares Lewis X inducen una respuesta pro inflamatoria en los macrófagos al estimular su receptor MGL1 puede tener aplicaciones en ciertos casos de neurocisticercosis (NC). Dependiendo de dónde se localicen los cisticercos en el sistema nervioso central, la NC se divide en Parenquimatosal y extraparenquimatosal. En la

parenquimatosal, los cisticercos se localizan como su nombre lo indica adentro del parénquima, embebidos entre las neuronas, y sus principales manifestaciones son las convulsiones. Los pacientes generalmente responden bien al tratamiento con medicamentos anti-helmínticos y antiepilépticos. En la NC extraparenquimatosal los cisticercos se localizan generalmente en el espacio subaracnoideo de las cisternas basales, en la hendidura entre los hemisferios cerebrales, en las fisuras Sylvianas, en las cisternas basales o en las cavidades ventriculares. La cisticercosis subaracnoidea se asocia generalmente con una inflamación en todo el espacio subaracnoideo que puede provocar vasculitis, aracnoiditis e hidrocefalia (García HH *et al* 2014, Cárdenas G *et al* 2014). En este tipo de cisticercosis, debido a una menor eficiencia de los fármacos cisticidas, se requieren a menudo prolongados ciclos de tratamiento con antihelmínticos; sin embargo la degradación del cisticerco puede resultar en una inflamación exacerbada que puede provocar trombosis, isquemia, endarteritis e incluso hemorragia, por lo que es obligatorio utilizar corticosteroides para contrarrestar estos efectos. Pero el uso prolongado de corticosteroides puede generar efectos secundarios severos e incapacitantes (en particular aumento de la susceptibilidad a infecciones) y son un riesgo en regiones con alta incidencia de tuberculosis (García HH *et al* 2014).

Tomando en cuenta nuestros resultados y para tratar de mejorar la eficacia del tratamiento, una alternativa en este tipo de NC que debería evaluarse en los modelos de NC experimental, consistiría en administrar junto con los anti helmínticos y los corticosteroides albúmina sintética con múltiples acoplamientos de azúcares con estructuras Lewis X, lo que induciría una respuesta pro inflamatoria en los Macrófagos lo cual junto con el tratamiento podría ayudar a que el parásito sea eliminado más rápidamente y se disminuyan los tiempos del tratamiento y por consiguiente se disminuya el tiempo de uso de los corticosteroides.



Esquema 2.

Participación de MGL1 en macrófagos durante la infección causada por *T. crassiceps*. La infección causada por *T. crassiceps* genera la producción de IgE e IgG2a por parte de los linfocitos B, y los azúcares del parásito en conjunto inducen la activación alternativa en los macrófagos. El antígeno de *T. crassiceps* contiene glicoproteínas con estructuras Lewis X las cuales son reconocidas en los macrófagos por el receptor MGL1, este reconocimiento activa vías de señalización intracelular donde está involucrado Raf-1, al mismo tiempo el receptor TLR-2 reconoce glicopéptidos de *T. crassiceps* activando el factor de transcripción NFκB, esta activación conjunta induce la producción de TNFα. Las funciones del receptor MGL1 no interfieren con la activación alternativa en los Macrófagos.

Conclusiones

En este estudio hemos demostrado que moléculas derivadas de un cestodo son reconocidas por MGL1 en macrófagos, y que tal interacción activa vías de señalización intracelular, mediadas en parte por fosforilación de tirosinas, que al parecer inducen respuestas pro inflamatorias en los macrófagos haciendo que estos produzcan proteínas proinflamatorias así como proteínas de membrana. Esta respuesta en los Mφ a su vez afecta a la respuesta inmune así como la posible resistencia a la infección causada por *T. crassiceps*.

Bibliografía

- Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
- Aliberti, J., et al., *Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(5): p. 485-90.
- Alvarez, J.I., J. Rivera, and J.M. Teale, *Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(4): p. e218.
- Brodskyn, C., et al., *Glycoinositolphospholipids from Trypanosoma cruzi interfere with macrophages and dendritic cell responses*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3736-43.
- Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition of fungal beta-glucans*. Cell Microbiol, 2005. **7**(4): p. 471-9.
- Cárdenas G, Fragoso G, Rosetti M, Uribe-Figueroa L, Rangel-Escareño C, Saenz B, Hernández M, Sciutto E, Fleury A, *Neurocysticercosis: the effectiveness of the cysticidal treatment could be influenced by the host immunity*, Med Microbiol Immunol, 2014 Dec;203(6):373-81.
- deSchoolmeester, M.L., et al., *The mannose receptor binds Trichuris muris excretory/secretory proteins but is not essential for protective immunity*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 246-55.
- Donnelly. S, Stack. C. M, O'Neill. S. M, Sayed. A. A, Williams. D. L, Dalton. J. P; 2008, *Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated Macrophages*. FASEB J. **22**, 4022–4032
- Fritz-Laylin, L.K., et al., *The genome of Naegleria gruberi illuminates early eukaryotic versatility*. Cell, 2010. **140**(5): p. 631-42.
- Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH, *Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis*, Lancet Neurol. 2014 Dec;13(12):1202-15.
- Gomez-Garcia, L., et al., *Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells*. Parasite Immunol, 2005. **27**(10-11): p. 395-405.
- Gomez-Garcia, L., et al., *Carbohydrate components of Taenia crassiceps metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen*. Parasitol Res, 2006. **99**(4): p. 440-8.
- Gringhuis, S.I. et al. (2007) *C-type lectin DC-SIGN modulates toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kB*. Immunity **26**, 605–616
- Guasconi, L., et al., *C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to Fasciola hepatica products*. Immunology, 2011. **133**(3): p. 386-96.

- Hokke . C. H, Yazdanbakhsh. M: 2005, *Schistosome glycans and innate immunity*, Parasite Immunology , **27** , 257 – 264
- Jitrapakdee, S., et al., *Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase*. The Biochemical journal, 2008. **413**(3): p. 369-87.
- Kaur S. S, Streng-Ouwehand I, Litjens M, Weelij D. R, Garcia Vallejo Juan Jesus, van Vliet S. J, Sealand E, van Kooyk Y; *Characterization of murine MGL1 and MGL2 c-type lectins: Distinct glycan specificities and tumor binding properties* Mol immunol 2009 ahead of print
- Kumamoto Y, Higashi N, da-Nagai K, Tsuiji M, Sato K, Crocker P. R, Irimura T; 2004; *Identification of sialoadhesin as a dominant lymph node counterreceptor for mouse macrophage galactose-type C-type lectin I*. J. Biol. Chem. 279, 49274-49280.2004
- Kumar. H, Kawai. T, Akira S; 2011; *Pathogen Recognition by the Innate Immune*; International Reviews of Immunology, 30:16–34
- Lee, J.J., et al., *Mass spectrometric characterisation of Taenia crassiceps metacestode N-glycans*. Mol Biochem Parasitol, 2005. **143**(2): p. 245-9.
- Li, D., Romain, G., Flamar, A.L., Duluc, D., Dullaers, M., Li, X.H., Zurawski, S., Bosquet, N., Palucka, A.K., Le Grand, R., O'Garra, A., Zurawski, G., Banchereau, J., Oh, S., 2012. *Targeting self- and foreign antigens to dendritic cells via DC-ASGPR generates IL-10-producing suppressive CD4+ T cells*. J. Exp. Med. 209,109–121.
- Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. J Immunol Methods, 1999. **223**(1): p. 77-92.
- Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh, *Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 733-44.
- McGreal, E.P., J.L. Miller, and S. Gordon, *Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 18-24.
- Migliorini, P., G. Corradin, and S.B. Corradin, *Macrophage NO₂- production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-gamma*. J Immunol Methods, 1991. **139**(1): p. 107-14.
- Mishra, P.K., et al., *Increased accumulation of regulatory granulocytic myeloid cells in mannose receptor C type 1-deficient mice correlates with protection in a mouse model of neurocysticercosis*. Infect Immun, 2013. **81**(4): p. 1052-63.
- Montero-Barrera D, Valderrama-Carvajal H, Terrazas CA, Rojas-Hernández S, Ledesma-Soto Y, Vera-Arias L, Carrasco-Yépez M, Gómez-García L, Martínez-Saucedo D, Becerra-Díaz M, Terrazas LI. *The macrophage galactose-type lectin-1 (MGL1) recognizes Taenia crassiceps antigens, triggers intracellular signaling, and is critical for resistance to this infection*. Biomed Res Int. 2015; 2015:615865
- Napoletano, C., et al., *Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation*. Eur J Immunol, 2012. **42**(4): p. 936-45.

Nono, J.K., et al., *Excretory/secretory-products of Echinococcus multilocularis larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. 6(2): p. e1516

Okano, M., et al., *Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on Schistosoma mansoni egg antigens*. J Immunol, 1999. 163(12): p. 6712-7.

Paveley, R.A., et al., *The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth Schistosoma mansoni and modulates IFN γ production*. Int J Parasitol, 2011. 41(13-14): p. 1335-45.

Prasanphanich, N.S., et al., *Glycoconjugates in host-helminth interactions*. Front Immunol, 2013. 4: p. 240.

Raes G, Brys L, Dahal BK, Brombacher. F, et al ; 2005; *Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation*. J Leukoc Biol;77:321-327.

Reyes, J.L., et al., *Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to Taenia crassiceps infection*. Infect Genet Evol, 2009. 9(6): p. 1115-27.

Reyes, J.L., et al., *Early removal of alternatively activated macrophages leads to Taenia crassiceps cysticercosis clearance in vivo*. Int J Parasitol, 2010. 40(6): p. 731-42.

Reyes JL, González MI, Ledesma-Soto Y, Satoskar AR, Terrazas LI. *TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis*. 2011; Int J Biol Sci. 2011;7(9):1323-33.

Saba. K, Denda-Nagai. K, Irimura. T; 2009; *A C-Type Lectin MGL1/CD301a Plays an Anti-Inflammatory Role in Murine Experimental Colitis*; Am J Pathol;, 174:144–152

Sakakura, M Oo-Puthinan. S, Moriyama. C, Kimura. T, Moriya. J, Irimura. T, Shimada. I; *Carbohydrate Binding Mechanism of the Macrophage Galactose-type C-type Lectin 1 Revealed by Saturation Transfer Experiments*. JBC 2008; 283, 48: p. 33665-73

Saunders. S. P, Walsh. C. M, Barlow. J. L, Mangan. N. E, Taylor. P. R, McKenzie. A. N. J, Smith. P, Fallon. P. G; 2008, *The C-Type Lectin SIGNR1 Binds Schistosoma mansoni Antigens In Vitro, but SIGNR1-Deficient Mice Have Normal Responses during Schistosome Infection*, INFECTION AND IMMUNITY, Vol. 77, p. 399–404

Sciutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. 2007. *The immune response in Taenia solium cysticercosis: protection and injury*. Parasite Immunol, 29(12):621-36. Review.

Spieß, M. *The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors*. Biochemistry, 1990. 29, 10009–10018

Terrazas, C.A., L. Gomez-Garcia, and L.I. Terrazas, *Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to Taenia*

excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. Int J Parasitol, 2010. **40**(9): p. 1051-62. 27

Terrazas C. A, Alcántara-Hernández M, Bonifaz L, Terrazas LI, Satoskar AR. 2013 *Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway.* FASEB J. Nov;27(11):4547-60.

Terrazas, L.I., et al., *Immunology and cell biology of parasitic diseases 2013.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 101268.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979. **76**(9): p. 4350-4.

Tsuiji. M, Fujimori. M, Ohashi. Y, Higashi. N, Onami. T. M, Hedrick. S. M, Irimura. T. M; *Molecular Cloning and Characterization of a novel Mouse Macrophage C-type Lectin, mMGL2, Wich Has a Distinct Carbohydrate Specificity from mMGL1.* JBC; 2002, Vol. 277, No. 32, pp28892-28901.

Tundup, S., L. Srivastava, and D.A. Harn, Jr., 2012 *Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans.* Ann N Y Acad Sci., 1253: p. E1-E13.

Valladeau, J *et al* *Inmature human dendritic cells express asialoglycoprotein receptor isoforms for efficient receptor-mediated endocytosis.* J Immunol; 2001 167, 5767-5774

van Liempt, E., et al., *Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation.* Mol Immunol, 2007. 44(10): p. 2605-15.

van Vliet SJ, van Liempt E, Saeland E, Aarnoudse CA, Appelmelk B, Irimura T, Geijtenbeek TB, Blixt O, Alvarez R, van Die I, van Kooyk Y; 2005; *Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells.* Int Immunol;17(5):661-9.

van Vliet SJ, Aarnoudse CA, Broks-van den Berg VC, Boks M, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y; 2007; *MGL-mediated internalization and antigen presentation by dendritic cells: a role for tyrosine-5* Cancer Res.; 67(17):8358-67

van Vliet. S. J, Saeland. E, van Kooyk Y; *Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function.* Trends in immunology; 2008, Vol 29 No 2 p. 83-90.

van Vliet SJ, Bay S, Vuist IM, Kalay H, Garcia-Vallejo JJ, Leclerc C, van Kooyk Y; 2013; *MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF- α secretion.* J Leukoc Biol. 2013 Aug;94(2):315-23

Vazquez-Mendoza, A., J.C. Carrero, and M. Rodriguez-Sosa, *Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors.* Biomed Res Int, 2013: p. 456352.

Vázquez A, Ruiz-Rosado Jde D, Terrazas LI, Juárez I, Gomez-Garcia L, Calleja E, Camacho G, Chávez A, Romero M, Rodriguez T, Espinoza B, Rodriguez-Sosa M. *Mouse macrophage*

galactose-type lectin (mMGL) is critical for host resistance against Trypanosoma cruzi infection, International Journal of Biological Sciences, 2014, vol. 10, no. 8, pp. 909–920, 2014

Vukman, K.V., et al., *Mannose receptor and macrophage galactose-type lectin are involved in Bordetella pertussis mast cell interaction*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(3): p. 439-48.

Research Article

The Macrophage Galactose-Type Lectin-1 (MGL1) Recognizes *Taenia crassiceps* Antigens, Triggers Intracellular Signaling, and Is Critical for Resistance to This Infection

Daniel Montero-Barrera,¹ Héctor Valderrama-Carvajal,¹ César A. Terrazas,² Saúl Rojas-Hernández,³ Yadira Ledesma-Soto,¹ Laura Vera-Arias,¹ Maricela Carrasco-Yépez,⁴ Lorena Gómez-García,⁵ Diana Martínez-Saucedo,¹ Mireya Becerra-Díaz,¹ and Luis I. Terrazas¹

¹Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Avenue de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

²Department of Pathology, The Ohio State University Medical Center, Columbus, OH, USA

³Sección de Estudios de Postgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Mexico

⁴Proyecto CyMA, UIICSE, FES Iztacala, UNAM, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

⁵Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," 14080 Mexico, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Luis I. Terrazas; literrazas@campus.iztacala.unam.mx

Received 9 August 2014; Revised 14 October 2014; Accepted 15 October 2014

Academic Editor: Abraham Landa

Copyright © 2015 Daniel Montero-Barrera et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

C-type lectins are multifunctional sugar-binding molecules expressed on dendritic cells (DCs) and macrophages that internalize antigens for processing and presentation. Macrophage galactose-type lectin 1 (MGL1) recognizes glycoconjugates expressing Lewis X structures which contain galactose residues, and it is selectively expressed on immature DCs and macrophages. Helminth parasites contain large amounts of glycosylated components, which play a role in the immune regulation induced by such infections. Macrophages from MGL1^{-/-} mice showed less binding ability toward parasite antigens than their wild-type (WT) counterparts. Exposure of WT macrophages to *T. crassiceps* antigens triggered tyrosine phosphorylation signaling activity, which was diminished in MGL1^{-/-} macrophages. Following *T. crassiceps* infection, MGL1^{-/-} mice failed to produce significant levels of inflammatory cytokines early in the infection compared to WT mice. In contrast, MGL1^{-/-} mice developed a Th2-dominant immune response that was associated with significantly higher parasite loads, whereas WT mice were resistant. Flow cytometry and RT-PCR analyses showed overexpression of the mannose receptors, IL-4R α , PDL2, arginase-1, Ym1, and RELM- α on MGL1^{-/-} macrophages. These studies indicate that MGL1 is involved in *T. crassiceps* recognition and subsequent innate immune activation and resistance.

1. Introduction

Pattern recognition receptors (PRRs) function to rapidly detect pathogen invasion as well as to control innate immune activation leading to inflammation. The PRRs of dendritic cells (DCs) and macrophages (M ϕ s), among others, recognize and bind to conserved pathogen motifs such as LPS in gram-negative bacteria, flagellin, viral RNA, and several molecules in intracellular protozoa [1], including cyclophilin from *Toxoplasma gondii* [2] and GIPL from *Trypanosoma cruzi* [3].

Among the PRRs, the Toll-like receptor (TLR) family is the main group of receptors known to be involved in maturation and inducing inflammatory cytokines in DCs and M ϕ s [1]. Other types of PRRs are the C-type lectin receptors (CLRs), which have selective affinity for a carbohydrate or group of carbohydrates in a Ca²⁺-dependent manner; CLRs also play a role in recognizing different pathogens, including bacteria, fungal, and viral glycoconjugates [4–7]. However, there is a less-defined function for CLRs in response to helminth infections.

It has been largely demonstrated that helminths display a variety of glycan moieties on their antigens, which may participate in the induction of Th2 responses [8, 9] and in immune downregulation, both characteristics of helminth infections [10]. Nevertheless, given the complexity of these molecules, it may also be expected that some helminth glycoconjugates display immunostimulatory activities [11].

Some helminth parasites have been reported to be recognized by different CLRs, for example, dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing integrin (DC-SIGN), mannose receptor (MR), macrophage galactose-type lectin (MGL), and SIGN-related 1 (SIGNR1) bind different glycans on soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* *in vitro* [12, 13]. *Trichuris muris*, a nematode, is also recognized by the MR, but such CLRs appear to play a limited role in protection or susceptibility in both parasitic infections given that mice lacking the MR or SIGNR1 mount a normal immune response and clear these infections as usual [14].

Taenia crassiceps is a cestode that is useful for understanding the host-parasite relationship in cysticercosis. Glycoconjugates of *T. crassiceps* and other cestodes have been shown to induce strong Th2-biased responses *in vivo* [15] and to modulate both human and mouse DC activity *in vitro* [16–18]. We have previously reported that most of the *T. crassiceps* antigens bind to concanavalin A, indicating that they are glycosylated with glucose, mannose, or galactose [15, 17, 19]. The natural candidates for such carbohydrate recognition are CLRs, such as the MR, MGL, and DC-SIGN. As mentioned before, DC-SIGN and the MR have been shown to be irrelevant for *Schistosoma* or *Trichuris* protection. We therefore focused our study on MGL. MGL is mainly found on Mφs and immature DCs, although it was recently reported to be expressed on mast cells [4], and it recognizes glycoconjugates expressing galactose and N-acetyl-galactosamine residues. Because the ability of MGL to act as an autonomous receptor has been appreciated only recently, the molecular regulation of its signaling pathway is partly known [20], but its biological role in response to helminth infections is still unrevealed. Recently, it has been shown that upon strong MGL engagement with polyclonal anti-MGL antibodies, this receptor is able to signal through tyrosine phosphorylation and induce ERK signaling [20], however, whether MGL signals after a “natural” ligation is also unknown.

To clarify the role of MGL in the recognition and defense against a helminth infection, we infected wild-type and MGL1-deficient mice (MGL1^{-/-}) with *Taenia crassiceps*. Our data demonstrated that MGL1-deficient mice exhibited reduced parasite clearance, despite strong induction of Th2 responses. MGL1^{-/-} macrophages displayed reduced intracellular signaling in response to *Taenia* antigens and lower TNF-α and NO production. Taken together, our data suggest that MGL1 plays a key role in driving macrophage responses *in vivo* and thus may act as an important mediator of resistance to this helminth infection.

2. Materials and Methods

2.1. Mice. Six- to eight-week-old female MGL1^{-/-} mice on a C57BL/6 background were donated by Glycomics Consortium (USA). MGL1^{-/-} mice have been backcrossed for more

than 7 generations on a C57BL/6NHsd genetic background with mice from Harlan Laboratories (México). In some experiments BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratories (México). All mice were maintained in a pathogen-free environment at the FES-Iztacala, UNAM animal facilities, according to the Faculty Animal Care and Use Committee and government guidelines (official Mexican regulation NOM-062-ZOO-1999), which are in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health, USA.

2.2. Parasites and Infection. Metacercariae of *T. crassiceps* were harvested from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2 to 3 months of infection. The cysticerci were washed four times in sterile phosphate-buffered saline (PBS) (0.15 M, pH 7.2). Experimental infection was achieved by intraperitoneal (i.p.) injection with 20 small (approx. 2 mm in diameter) nonbudding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 mL of PBS per mouse.

2.3. Lectin-Blot Analysis on *T. crassiceps* Soluble Antigens. *T. crassiceps* was lysed by sonication with one 10-s pulse at 100 W of amplitude (Fisher Sonic Dismembrator model 300). The resulting suspension was centrifuged at 4°C for 1 h at 2700 g, and the pellet was discarded and we keep the supernatant. Soluble antigen was concentrated and quantified by the Bradford method. A total of 20 μg of protein of *T. crassiceps* soluble antigens (TcSol) was separated by SDS-PAGE (10%) and electroblotted (400 mA for 1 h) onto a nitrocellulose membrane [21].

For the detection of carbohydrates with residues of galactose or N-acetylgalactosamine, strips of nitrocellulose were blocked with 1% BSA diluted in PBS-T (10 mM sodium phosphate buffer, 150 mM NaCl and 0.5% Tween 20) and incubated overnight at 4°C. The membranes were treated with a biotinylated lectin (Hp or RCA) at a concentration of 5 μg/mL diluted 1:500 in PBS-T and incubated overnight at 4°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The next day, the membranes were incubated with SBHP, the strips were washed with PBS, and enzyme activities were then detected by a substrate solution (0.1% H₂O₂, 17.5% methanol, 0.15% 4-chloro-α-naphthol and 82.5% PBS) following a 15-min incubation. The proteins that reacted with the lectins were identified on the nitrocellulose strips.

2.4. FITC Labeling of *T. crassiceps* Antigens. *T. crassiceps* soluble products (TcSol) were labeled with FITC (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1 mg/mL TcSol was prepared in 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 9. FITC was dissolved in DMSO at 1 mg/mL, and 500 μL of the FITC solution was slowly added to TcSol in 5 μL aliquots while gently stirring. The TcSol-FITC solution was incubated for 8 h at 4°C in the dark and washed 3 times with PBS; protein was quantified by the Bradford assay and maintained at 4°C.

2.5. Cell Preparations and Culture Conditions. The spleen was removed from infected mice under sterile conditions. Single-cell suspensions were prepared by gently teasing apart the

spleen in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units of penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, 25 mM HEPES buffer and 1% nonessential amino acids (all from GIBCO, BRL Grand Island, New York). The cells were centrifuged, and the erythrocytes were lysed by resuspending the cells in Boyle's solution (0.17 M Tris and 0.16 M ammonium chloride). Following two washes, the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer, and the splenocytes were adjusted to 3×10^6 cells/mL in the same medium. Aliquots (100 μ L) of the adjusted cell suspensions were placed into 96-well flat bottom culture plates (Costar, Cambridge, Massachusetts) and stimulated with a soluble extract of *T. crassiceps* (25 μ g/mL) or with plate-bound anti-CD3 antibody (1 μ g/mL) at 37°C for 72 h. The supernatants from these cultures were analyzed for IL-4 and IFN- γ (PeproTech, México) production by ELISA.

2.6. Cytokine and Nitric Oxide Production by Peritoneal Macrophages. Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from uninfected thioglycolate-injected mice and from mice following 2, 4, and 8 weeks of *T. crassiceps* infection. PECs were adjusted to 5×10^6 /mL in supplemented RPMI and plated in 6-well plates (Costar). After 2 hours at 37°C and 5% CO₂, nonadherent cells were removed and adherent cells were gently scrapped using cold PBS and readjusted to 1×10^6 /mL. Viability at this point was >90%. These cells were >90% macrophages according to FACS analysis (F4/80⁺, BioLegend, San Diego, CA). Then, 1 mL of the cell suspension was plated, and cells were activated in 24-well plates (Costar) with LPS (1 μ g/mL, *E. coli* 111:B4; Sigma, St Louis, MO.), followed by incubation for 24 h. TNF- α , IL-12 (PeproTech) and nitric oxide (Griess reaction) were examined in supernatants.

2.7. Generation of Bone Marrow Derived M ϕ s (BMDM ϕ s). BMDM ϕ s from WT or MGLI^{-/-} mice were obtained as previously described [22]. Briefly, bone marrow cells were isolated by flushing femurs and tibias with culture media. Bone marrow cells were plated at 1×10^6 cells/mL in medium supplemented RPMI medium supplemented with 10% SFB and penicillin/streptomycin plus 20 ng/mL murine recombinant macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, Peprotech Mexico). On day 3, fresh media containing M-CSF was added. On day 7, nonadherent cells were removed, and adherent cells were detached and centrifuged at 1500 rpm at 4°C for 15 min. Adherent cells (F4/80⁺) were resuspended in fresh media and cultured for an additional 24 h in 12-well plates.

2.8. In Vitro Stimulation of BMDM ϕ s and Protein Extraction. Bone marrow cells were differentiated as described above. On day 7, the M ϕ s were harvested and plated at 2.5×10^6 cells/mL in six-well plates. The cells were used 24 hours after plating to eliminate any residual effects from M-CSF. M ϕ s were stimulated with the TcSol (50 μ g/mL) for 5, 15, or 30 min. After stimulation, the cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and washed with PBS. The cells were then lysed with lysis buffer for 15 min, and the lysates were quantified using the BCA assay (Thermo Scientific) and then frozen at -80°C until further use.

2.9. Western Blot Assays. Whole-cell lysates were resolved by SDS-PAGE (40 μ g of protein was loaded into each well) using 10% acrylamide mini-gels, followed by electrophoretic transfer to PVDF membranes (Immobilon-P MILLIPORE) for 2 h. Membranes were blocked with 5% fat-free milk in PBS for 2 h and incubated with primary antibodies overnight. The detection step was performed with peroxidase-coupled anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG (BioLegend, 1:2000) and anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) for 2 h. The primary antibodies included antiphosphotyrosine (Santa Cruz Biotechnology) and β -Actin (BioLegend). All primary antibodies were diluted 1:500 in 1% fat-free milk in PBS. Blots were developed with the ECL detection system according to the manufacturer's instructions (Amersham). Blots are representative of two separate experiments.

2.10. Detection of Nitric Oxide Production. Nitric oxide production by macrophages was assayed by determining the increase in nitrite concentration [23] by the Griess reaction adapted to microwell plates (Costar). Briefly, 50 μ L of culture supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent and incubated for 10 min at room temperature in the dark; the absorbance was measured at 570 nm in an automatic microplate reader (Organon Technika Microwell System). Values were quantified using serial dilutions of sodium nitrite.

2.11. Flow Cytometry Analysis. Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from naïve or infected mice by injecting 10 mL of ice-cold PBS. For flow cytometry, single cell suspensions of the PECs obtained during the sacrifice were stained with anti-F4/80, anti-PDL2, anti-IL-4R α , anti-MGL1, and anti-MGL2 antibodies (Biolegend, San Diego, CA), for 30 min at 4°C. The cells were washed twice and analyzed using the FACSCalibur system and Cell Quest software (Becton Dickinson, USA).

2.12. Reverse Transcription (RT)-PCR Analyses. The levels of arginase 1 (Arg-1), Ym-1 and resistin-like molecule- α (RELM- α) mRNA transcripts in adherent peritoneal macrophages (which were allowed to adhere for 2 h at 37°C and 5% CO₂) were determined using RT-PCR. At the indicated time points, adherent peritoneal macrophages from *T. crassiceps*-infected MGLI^{+/+} and MGLI^{-/-} mice were aseptically removed and without any further stimulation (basal) or LPS + IFN- γ -stimulation (1 μ g and 20 ng/mL, resp.) were processed for RNA extraction using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and the propanol-chloroform technique. The RNA was quantified, and 3 μ g of RNA was reverse transcribed using the Superscript II First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) and an oligo dT primer, as recommended by the manufacturer. Once cDNA was obtained, conventional PCR was performed. The PCR reactions contained (in a 25 μ L final volume) 5X PCR Buffer blue, 10 mM dNTP, 40 nM each of the forward and reverse primers (Table 1), 1 U Taq DNA polymerase (Sacace Biotechnologies, Italy) and 2 μ L of the cDNA. The program used for the amplification of each gene contained an initial denaturation step at 95°C for 5 min; 35

TABLE 1: The following primer pairs were used in this study.

Gen	Sequence	Melting temperature	Number of cycles
GAPDH	Forward -CTCATGACCACAGTCCATGC- Reverse -CACATTGGGGGTAGGAACAC-	54°C	35
Arg-1	Forward -CAGAAGAATGGAAGAGTCAG- Reverse -CAGATATGCAGGGAGTCACC-	54°C	35
Ym-1	Forward -TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG- Reverse -TTTGTCTTAGGAGGGCTTCCTC-	56°C	35
Fizz-1	Forward -GGTCCCAGTGCATATGGATGAGACCATAG- Reverse -CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTGGCAGC-	65°C	35
iNOS	Forward -GCCACCAACAATGGCAACAT- Reverse -AAGACCAGAGGCAGCACATC-	60°C	30

cycles of 95°C for 40 s, the indicated melting temperature for 50 s and 72°C for 40 s; and a final extension step at 72°C for 4 min. All reactions were performed in a thermal cycler (Corbett Research, Australia). Finally, to observe the amplified products, a 1.5% agarose gel was prepared, and samples were loaded with blue juice buffer containing SYBR Green (Invitrogen). The gels were visualized using a Fujifilm FLA 5000 scanner (Fuji, Japan) with FLA 5000 image reader V2.1 software to capture the images. The specificity of the PCR was verified by the absence of signal in the no-template controls of macrophage samples. The sequences of the primers used have been previously reported [24].

2.13. Antibody ELISAs. Peripheral blood was collected at 2-wk intervals from tails snips of the *T. crassiceps*-infected MGL1^{+/+} and MGL1^{-/-} mice. *T. crassiceps*-specific IgG1 and IgG2a levels were determined by ELISA as previously described. The results are expressed as the maximal serum dilution (endpoint titer) at which Optical Density was detected (OD). Total IgE production was detected by Opt-ELISA from Biologend.

2.14 Statistical Analysis. Comparisons between the wild-type and MGL1^{-/-} groups in this study were performed using Student's unpaired *t* test. *P* < 0.05 was considered significant. The statistical significance of the serum titers was determined by nonparametric tests using the Mann-Whitney *U*/Wilcoxon Rank tests.

3. Results

3.1. *Taenia crassiceps* Soluble Antigens Express Glycoconjugates Containing N-Acetylgalactosamine and Galactose Residues. To detect the expression of glycoconjugates on soluble antigens of *T. crassiceps*, a lectin-blot assay was performed using *Helix pomatia* (specific for N-acetylgalactosamine residues) and *Ricinus communis* (specific for galactose residues) lectins. Several glycoconjugates were recognized by both lectins, those of 310, 287, 250, 210, 182, 161, 79, 77, 75, 49, 47, and 41 kDa (Figure 1(a)), whereas two bands at 51 and 39 kDa were only recognized by *H. pomatia*. However, using only streptavidin peroxidase (Figure 1(b)), two glycoconjugates were recognized on TcSol antigens, those of 250 and 124 kDa. Therefore,

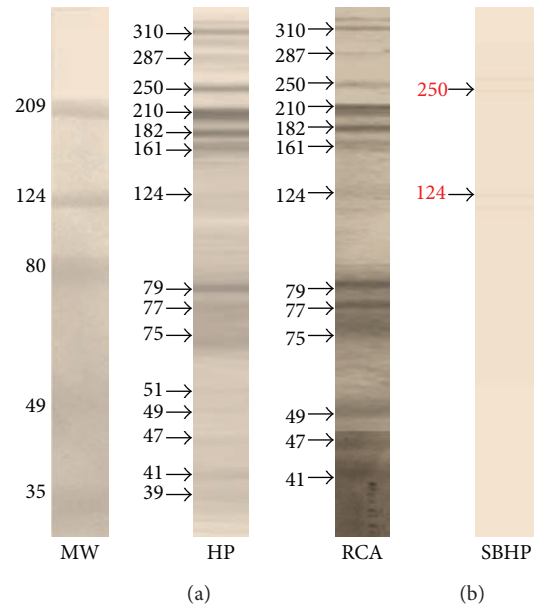


FIGURE 1: Lectin-blot analysis of *Taenia crassiceps* soluble antigens. *T. crassiceps* soluble proteins were subjected to electrophoresis on a 10% SDS-polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membrane, and revealed with a couple of different biotinylated lectins. (a) MW-molecular weight, HP-*Helix pomatia* and RCA-*Ricinus communis*. (b) The strips were incubated only with SBHP-streptavidin-bound horseradish peroxidase.

the presence of these two biotin-containing proteins most likely corresponds to biotin-dependent carboxylases recognized by streptavidin alone [25, 26]. These findings indicate that TcSol antigens express high levels of glycoconjugates with N-acetylgalactosamine and galactose residues.

3.2. MGL1^{-/-} Macrophages Display Reduced Binding to *Taenia crassiceps* Soluble Antigens. The innate recognition of pathogen-associated molecules by antigen-presenting cells is crucial to the initiation of the immune response. Different studies have shown that helminth-derived molecules can be recognized by C-type lectins [27, 28]. In our model, we previously reported that most TcSol bound to concanavalin

A, indicating that TcSol are glycosylated with glucose, mannose or galactose [17], whereas Jang Lee et al. reported that the main N-glycan structures in *T. crassiceps* were mannose, fucose, galactose and GlcNAc. They also found a rare Fuc α 1 \rightarrow 3GlcNAc antenna on *T. crassiceps* molecules [29]. Thus, the natural candidates for carbohydrate recognition on *T. crassiceps* are CLRs, such as the MR, MGL, and DC-SIGN. Thus, we hypothesized that one of the possible receptors that bind the glycomolecules on TcSol may be MGL, given its specificity to recognize both N-acetylgalactosamine and galactose residues. To investigate the role of MGL1 in TcSol recognition, TcSol antigens were labeled with FITC to perform binding assays. TcSol-FITC efficiently bound to MGL1^{+/+} macrophages at 37°C (approximately 30% of cells were positive), indicating that TcSol-FITC can be recognized and internalized by these cells (Figures 2(a) and 2(b)). Incubation of M ϕ s and TcSol at 4°C showed reduced fluorescence (5–10%) indicating a low level of binding. Next, we similarly exposed MGL1^{-/-} M ϕ s to TcSol-FITC at 37°C and found significant reductions in both the percentage of TcSol-FITC-positive cells (approximately 10%) and the mean fluorescence intensity (MFI) of TcSol-FITC on these cells (Figure 2(c)). These data suggest that M ϕ s can recognize TcSol via MGL.

3.3. The Absence of MGL1 on Macrophages Impairs TcSol-Triggered Global Tyrosine Phosphorylation. The fact that TcSol binding was impaired in MGL1^{-/-} M ϕ s, led us to question whether the interaction with MGL-TcSol triggers an intracellular signaling pathway. Recent advances in the understanding of the intracellular signaling induced by strong antibody-mediated crosslinking of MGL have highlighted a possible role for the ERK pathway [20]. To determine whether TcSol can induce intracellular signaling, we exposed BMDM ϕ s from MGL1^{+/+} or MGL1^{-/-} mice to TcSol for 5, 15, and 30 min and found that tyrosine phosphorylation was enhanced in MGL1^{+/+} macrophages; interestingly, tyrosine phosphorylation was detected as early as 5 min and remained for at least 30 min (Figure 3(a)). In contrast, MGL1^{-/-} BMDM ϕ s that were similarly exposed to TcSol displayed a lower and less-sustained tyrosine phosphorylation in several protein bands (Figure 3(a), arrows). To further analyze this response we stimulated both MGL1^{+/+} and MGL1^{-/-} BMDM ϕ s with LPS (500 ng/mL) or TcSol again for 30 min. As observed in Figure 3(b), also we detected a lack of response to LPS and a lower tyrosine phosphorylation in response to TcSol (Figures 3(b) and 3(c), resp.) in MGL1^{-/-} BMDM ϕ s.

3.4. Mice Lacking MGL1 Are Highly Susceptible to *Taenia crassiceps* Infection. After determining that *T. crassiceps* antigens can be recognized by MGL1 and that macrophages deficient in MGL1 are partially refractory to TcSol stimulation, we investigated the *in vivo* role of this molecule in experimental cysticercosis using MGL-deficient mice. To approach this question, we compared the course of *T. crassiceps* infection in MGL1^{-/-} with that in MGL1^{+/+} mice. As a control for susceptibility, we used BALB/c mice, which have consistently

been reported as a highly susceptible strain to *T. crassiceps* infection [30].

We examined the kinetics of parasite growth from 2 to 8 weeks after *T. crassiceps* infection. Early in the infection (2 weeks) both groups of mice displayed comparable parasite burdens (Figure 4(a)). Interestingly, as infection progressed, by the fourth week of infection, the number of larvae in the peritoneal cavity increased significantly in MGL1^{-/-} mice compared to MGL1^{+/+} mice, which successfully reduced the number of parasites by week 8 after infection (Figures 4(a) and 4(b)). In fact, MGL1^{-/-} mice exhibited a parasite burden that was very similar to that in the susceptible strain of mice (BALB/c), which were consistently observed as very susceptible to *T. crassiceps* infection (Figure 4(a)). These findings suggest that the MGL1-mediated signaling pathway is involved in resistance during *T. crassiceps* infection on a resistant genetic background such as C57BL/6.

3.5. MGL1^{-/-} Mice Display an Altered Immune Response to *Taenia crassiceps*. A few studies have demonstrated that MGL can mediate signaling after a strong stimulus such as polyclonal anti-MGL antibodies, but its role in modulating protective immunity against helminth parasites is unknown. Therefore, we measured levels of Th1-associated IgG2a as well as Th2-associated IgG1 and total IgE antibodies in MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} mice at different time points following infection with *T. crassiceps*.

Early in infection, *T. crassiceps*-infected MGL1^{+/+} and MGL1^{-/-} mice displayed comparable levels of *T. crassiceps* Ag-specific Th1-associated IgG2a antibodies (data not shown). However, by week 8 after infection, MGL1^{+/+} mice displayed significantly higher titers of specific IgG2a antibodies against *T. crassiceps* antigens (Figure 5(a)). By contrast, no clear differences were observed in Th2-associated IgG1 production; MGL1^{+/+} mice displayed high titers of anti-*T. crassiceps*-specific IgG1 that were similar to those in MGL1^{-/-} mice at week 8 after infection (Figure 5(b)). Although Th2-associated IgE has been shown to play a role in mediating immunity against certain helminths, we found that *T. crassiceps*-infected MGL1^{+/+} mice harbored a lower parasite burden despite producing significantly lower levels of IgE compared to similarly infected MGL1^{-/-} mice, which displayed higher levels of total IgE (Figure 5(c)).

Additionally, we also compared the cytokine production by splenocytes from these mice in response to either 25 μ g/mL TcSol or 1 μ g/mL plate-bound anti-CD3 antibody. Anti-CD3 (data not shown) or TcSol-stimulated splenocytes from both strains produced similar levels of IFN- γ at 2 wk after infection (Figure 6(a)). However, 4 and 8 weeks after infection, the IFN- γ production by the spleen cells of MGL1^{-/-} mice decreased and did not reach the level produced by MGL1^{+/+} splenocytes (Figure 6(a)). Similarly, as early as 2 wk after infection, the splenocytes from the MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} mice produced comparable levels of IL-4 (Figure 6(b)). However, by weeks 4 and 8 after infection, MGL1^{-/-} mice produced significantly more IL-4 than the

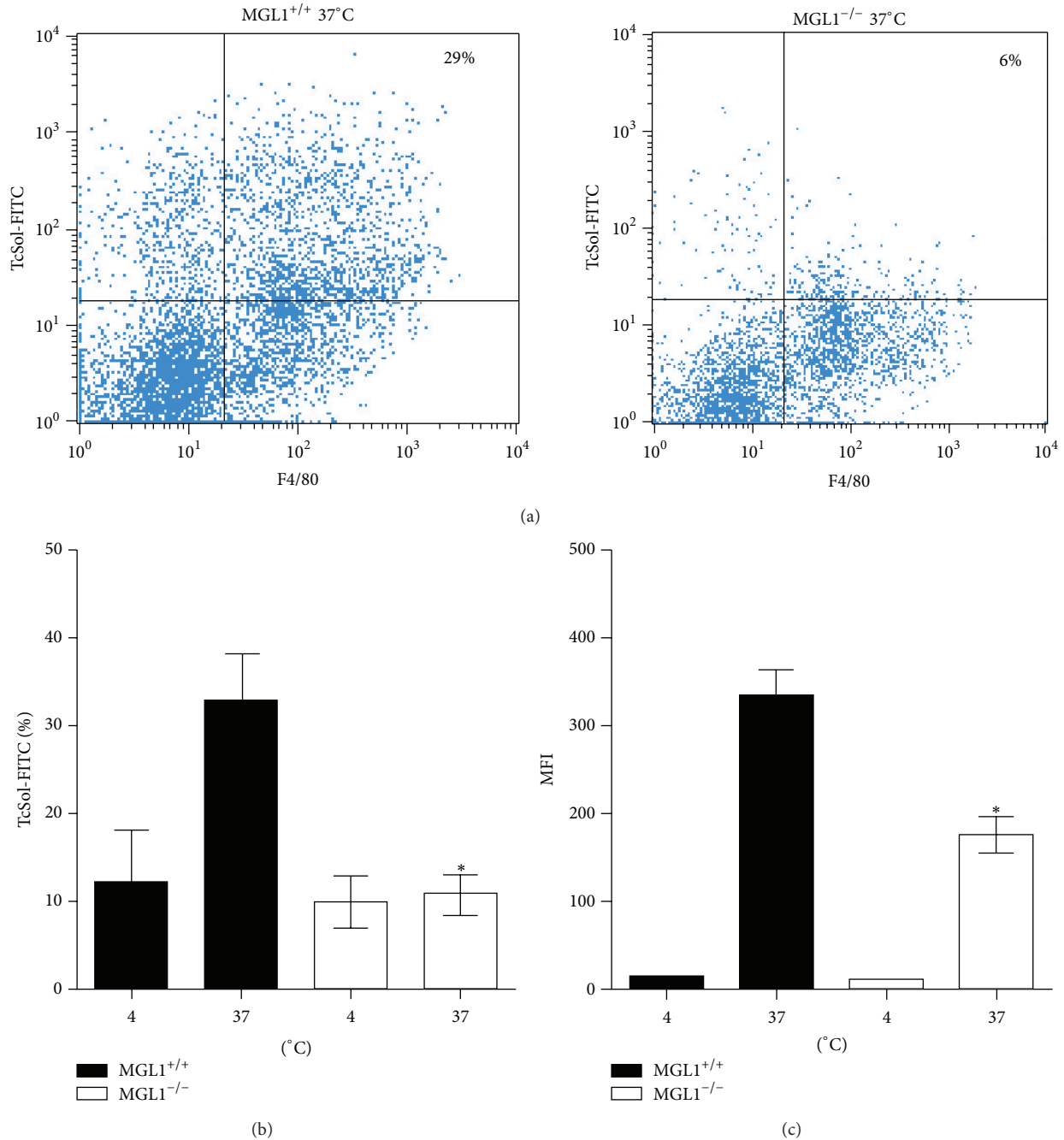


FIGURE 2: Peritoneal $M\phi$ s recognize *Taenia crassiceps* soluble products through MGL1. $M\phi$ s from naïve MGL1^{+/+} or MGL1^{-/-} mice were incubated with fluorescently labeled TcSol and fluorescence was analyzed by flow cytometry. (a) Representative dot plots indicate $M\phi$ s from either MGL1^{+/+} or MGL1^{-/-} mice, incubated for 30 minutes with TcSol at 37°C. (b) Percentage of TcSol-FITC positive naïve peritoneal cells exposed for 30 min. (c) Data are represented as the mean fluorescence intensity (MFI) of naïve $M\phi$ s exposed to TcES-FITC. Basal levels of autofluorescence were subtracted from all treatments. Data are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$.

MGL1^{+/+} splenocytes in response to anti-CD3, whereas antigen-specific higher IL-4 production in MGL1^{-/-} splenocytes was only observed at week 4 after infection compared with MGL1^{+/+} cells (Figures 6(b) and 6(c)). Thus, as the infection progressed, splenocytes from MGL1^{-/-} mice produced significantly greater levels of IL-4 compared with splenocytes

from *T. crassiceps*-infected MGL1^{+/+} mice in response to anti-CD3.

3.6. Differential Cytokine Production in MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} Peritoneal Macrophages. To determine whether MGL1^{-/-} mice had a systemic defect in innate activation, we

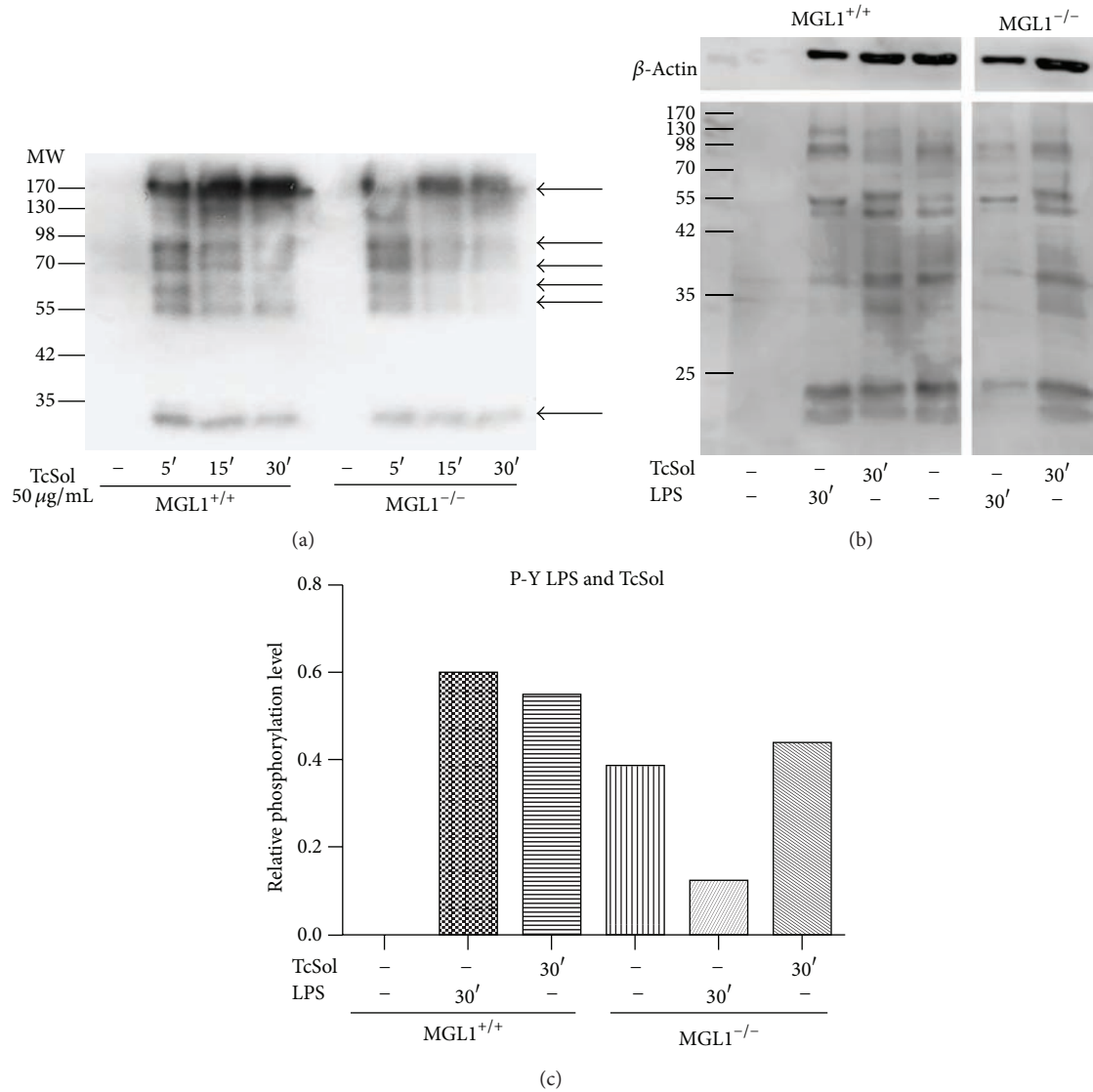


FIGURE 3: MGL1^{-/-} macrophages display deficient tyrosine phosphorylation in response to TcSol. (a) MGL1^{+/+} and MGL1^{-/-} bone marrow-derived Mφ were synchronized in starvation conditions over night and then were stimulated or not with TcSol (50 µg/mL) for 5, 15 and 30 min. Next, total cell extracts were obtained and resolved by electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and probed with monoclonal antiphosphotyrosine antibody. Lane 1, serum-starved MGL1^{+/+} Mφs. Lanes 2–4, serum-starved MGL1^{+/+} Mφs following TcSol exposure for 5, 15 and 30 min, respectively. Lane 5, serum-starved MGL1^{-/-} Mφs. Lanes 6–8, serum-starved MGL1^{-/-} Mφs following TcSol exposure for 5, 15, and 30 min, respectively. Lanes 2–4 show an upregulation of the tyrosine phosphorylation of total proteins, which was sustained for at least 30 min (arrows). Lanes 6–8 show an unsustained tyrosine phosphorylation of proteins after similar TcSol stimulation of MGL1^{-/-} Mφs. (b) Similar experiment using LPS (500 ng/mL) and/or TcSol stimulation for 30 min. (c) Densitometry of western blot placed in (b). Proteins were visualized using a goat anti-mouse secondary conjugated to HRP and a chemiluminescence detection system. Western blots are representative of two independent experiments.

examined the responsiveness of macrophages from MGL1^{-/-} mice to proinflammatory stimuli. Macrophages were isolated from the peritoneal cavities of both strains of infected mice and either left unstimulated (basal) or stimulated for 24 h with LPS (1 µg/mL) and IFN-γ (20 ng/mL). The supernatants were collected and analyzed for IL-12, TNF-α and NO production. As shown in Figure 7, macrophages from MGL1^{-/-} mice obtained during the early phase of infection with *T. crassiceps* (2 wks) produced lower levels of IL-12 and

TNF-α compared with those from MGL1^{+/+} mice (Figures 7(a) and 7(b)). As the infection became chronic, macrophages from infected MGL1^{-/-} mice produced decreased levels of TNF-α (Figure 7(b)), and the NO levels dropped significantly (Figure 7(c)) in both groups, but even more in MGL1^{-/-} macrophages. These patterns of macrophage response were in contrast to those observed in MGL1^{+/+} macrophages, which showed a better proinflammatory response throughout the infection with higher production of TNF-α and NO in late

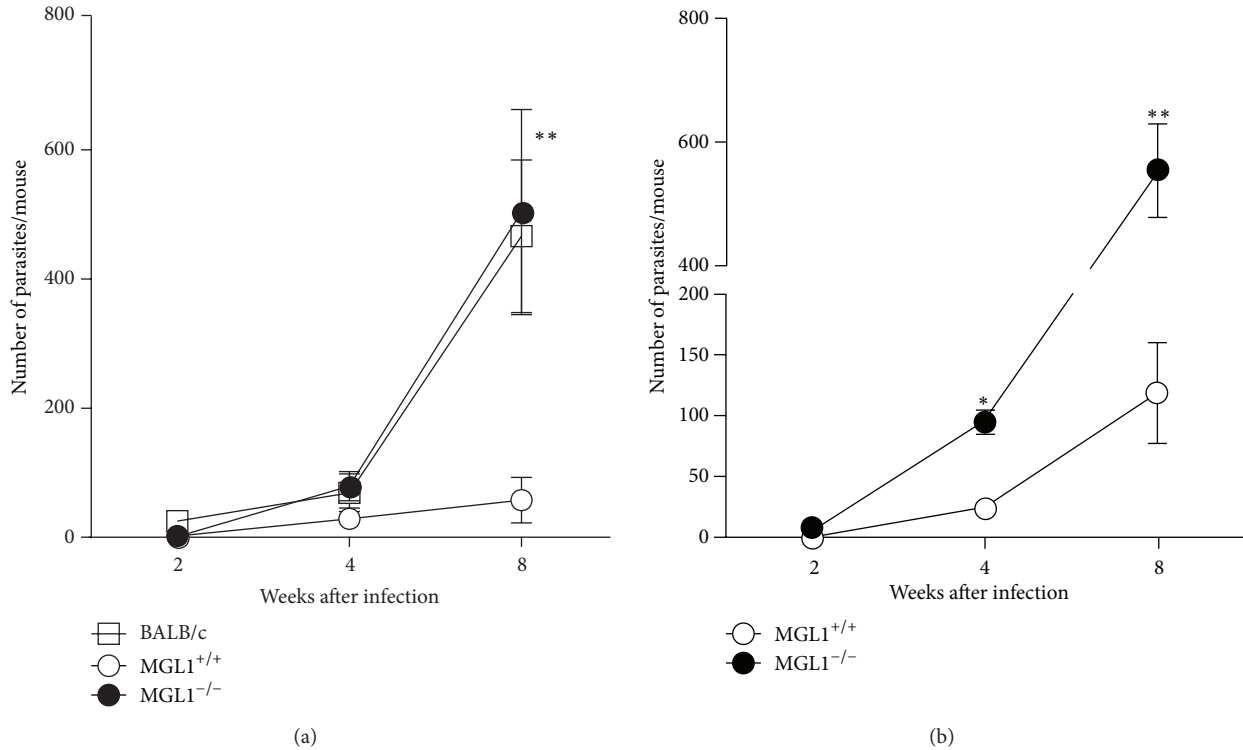


FIGURE 4: MGL1^{-/-} mice do not efficiently control *T. crassiceps* infection. (a) Course of i.p. *T. crassiceps* infection in MGL1^{-/-}, MGL1^{+/+} and BALB/c mice after infection with 20 cysticerci. (b) An independent experiment of the course of i.p. *T. crassiceps* infection in MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} mice that were similarly infected. Data are expressed as the mean \pm SE of 6 mice per group. * $P < 0.01$ comparing MGL1^{-/-} versus MGL1^{+/+} at the same time point.

infections compared to MGL1^{-/-} macrophages (Figures 7(b) and 7(c)).

3.7. MGL1^{-/-} Mice Recruit Alternatively Activated Macrophages. Next, the macrophage polarization genotype was evaluated in adherent peritoneal cells at 4 and 8 weeks after infection. RT-PCR was performed to identify mRNA transcripts of AAM ϕ s markers. Infected MGL1^{-/-} mice showed higher expression of arginase-1, Relm- α and Ym-1 than their MGL1^{+/+} counterparts (Figure 8(a)). Moreover, we also analyzed the macrophage surface expression of other markers associated with alternative activation by flow cytometry. Surface expression of the MR, IL-4R α , and PD-L2 has previously been associated with AAM ϕ s in distinct helminth infections [31]. Indeed, we found differences between the two strains in the expression of these molecules during *T. crassiceps* infection. Interestingly, during chronic infection (8 weeks), the macrophages from MGL1^{-/-} mice expressed twice as much PD-L2 as macrophages from MGL1^{+/+} mice, which downregulated PD-L2 expression (Figures 8(b) and 8(c)). The MR and IL-4R α expression were also been significantly elevated in macrophages from *T. crassiceps*-infected MGL1^{-/-} mice when compared with MGL1^{+/+} mice that expressed lower percentages of both markers (Figures 8(b) and 8(c)).

Given that two related MGL molecules do exist in mice, MGL1 and MGL2, with different carbohydrate specificities,

we performed flow cytometry on peritoneal cells for the detection of MGL1 and MGL2 in order to further determine the specific role for MGL1 and not for MGL2 in susceptibility to *T. crassiceps*. As shown in Figure 8(d), peritoneal macrophages (F4/80⁺) from MGL1^{+/+} infected mice did increase MGL1 as well as MGL2 expression after 8 weeks of infection, whereas MGL1^{-/-} macrophages were able to express MGL2 at a similar level than MGL1^{+/+} mice. These data suggest a very fine discrimination between MGL1 and MGL2 to recognize glycan structures on *T. crassiceps* and its antigens.

4. Discussion

The role of CLRs in the recognition of microbial, fungal, and parasitic glycoconjugates has become evident in the last few years [5]. The knowledge in this area has passed from understanding them as “simple endocytic receptors” to important molecules involved in innate immunity with the capacity to trigger intracellular signaling pathways to modify cellular responses to different pathogens [32]. Although the role for CLRs in immunity against fungal and bacterial infections is widely recognized, their role in immunity during helminth infections is much less known [13]. Therefore, in this study, we focused on the role of MGL1 and MGL1-mediated signaling in immunity to the cestode *T. crassiceps*.

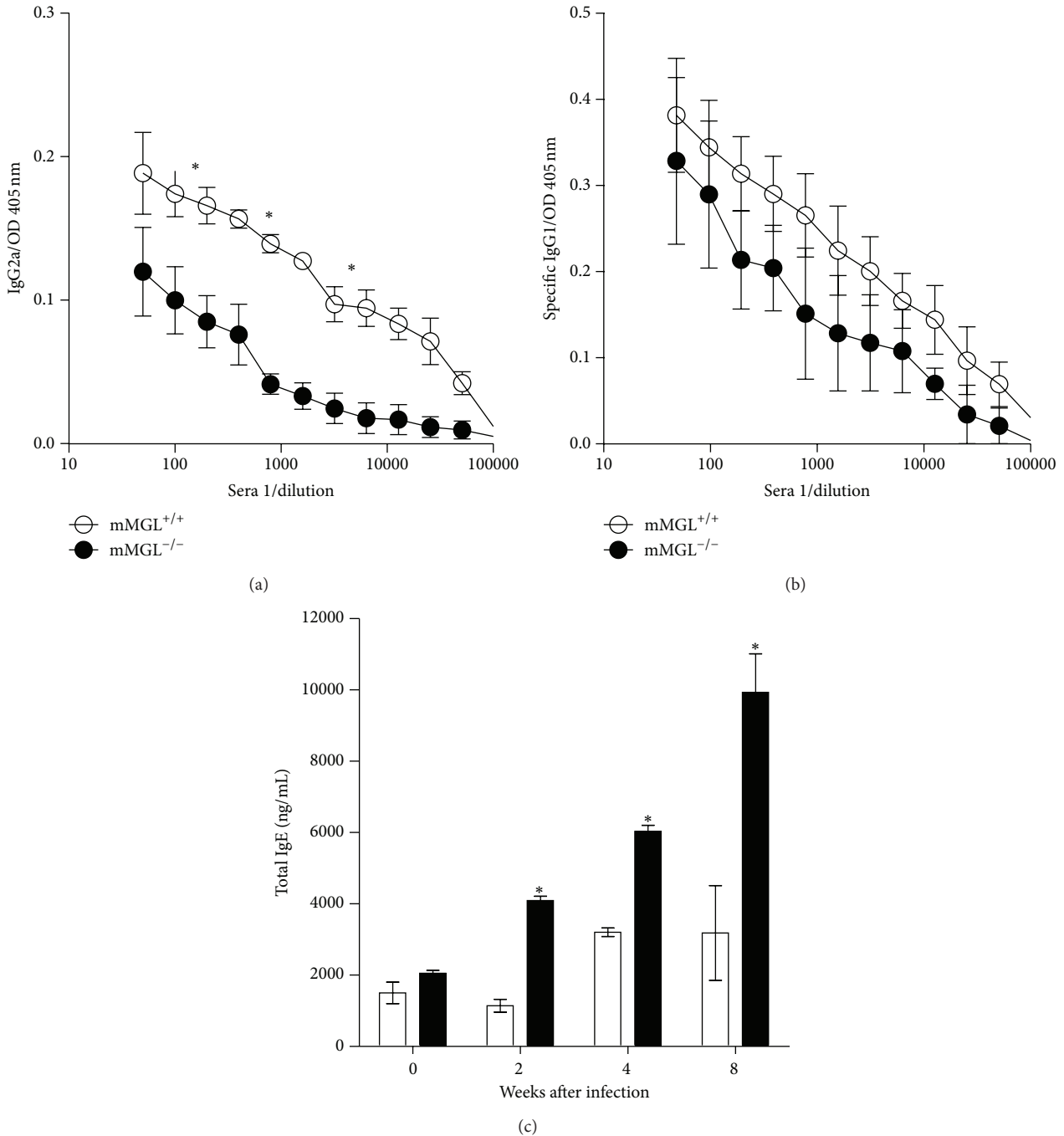


FIGURE 5: Antibody production during *T. crassiceps* infection in $MGLI^{-/-}$ and $MGLI^{+/+}$ mice. (a) Anti-*T. crassiceps*-specific IgG2a; (b) anti-*T. crassiceps*-specific IgG1; (c) total IgE. Values are the mean \pm SE ($n = 6$ animals) and are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ comparing $MGLI^{-/-}$ versus $MGLI^{+/+}$ mice at the same time point.

It has been previously reported that *T. crassiceps* antigens are rich in structures recognized by concanavalin A. Here, we found that in addition to this and to the previously reported fucose [17, 29], glycosylation moieties in *T. crassiceps* such as galactose and N-acetylgalactosamine are also important. Because the carbohydrates in *T. crassiceps* antigens, as well as in those of other helminths, are considered important for their modulatory activities [17], we investigated the role of

MGL in the ability to recognize glycosylated structures on TcSol as well as the possible intracellular signaling pathways that they may trigger. The lower recognition of TcSol by $MGLI^{-/-}$ M ϕ s strongly suggested a role for this C-type lectin in the host-parasite interaction during experimental cysticercosis. Concomitantly, the decreased ability of $MGLI^{-/-}$ macrophages to bind TcSol was associated with weak phosphotyrosine-mediated intracellular signaling. Therefore, we

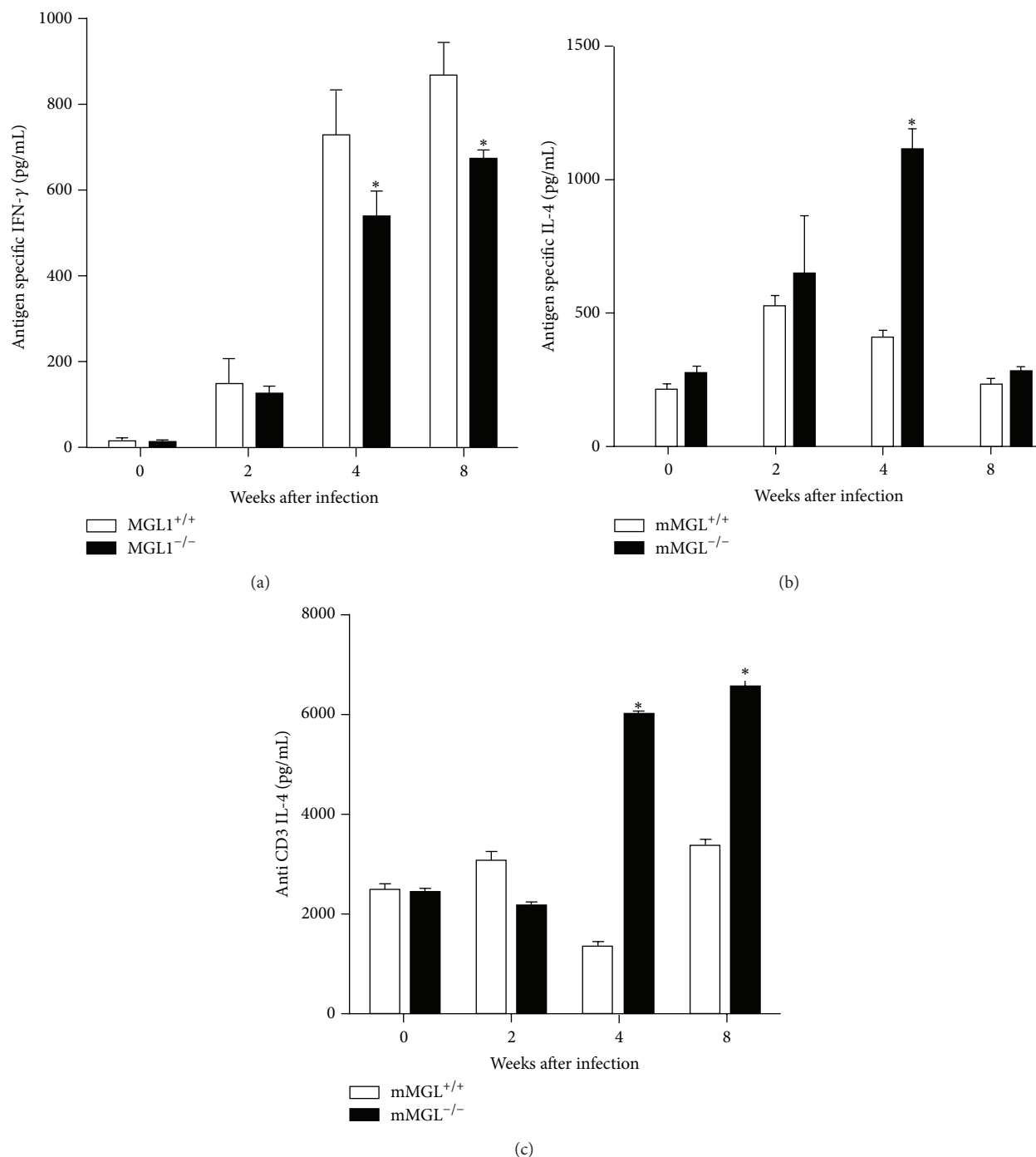


FIGURE 6: Kinetics of *in vitro* cytokine production by TcSol-stimulated spleen cells from MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} mice. (a) Antigen-specific IFN- γ production, (b) antigen-specific IL-4 production, and (c) polyclonal IL-4 production (anti-CD3) in response to *in vitro* stimulation with TcSol (25 μ g/mL) by splenocytes after 72 h. Data are representative of 2 independent experiments. * $P < 0.05$.

performed *in vivo* assays to determine whether MGL1 recognition of *T. crassiceps* plays a critical role in the resistance to this helminth infection. Thus, we demonstrate for the first time that mice deficient in the CLR macrophage galactose-type lectin 1 (MGL1) have increased susceptibility to experimental cysticercosis caused by the cestode *T. crassiceps*, with a reduction in the levels of the proinflammatory cytokines

IL-12, IFN- γ and TNF- α , as well as in NO production. These observations are in line with those reported using anti-MGL antibody engagement on DCs, where MGL-engaged DCs produced higher levels of IL-10 than did DCs treated with the control isotype [20]. In contrast, higher levels of IL-4 and IgE were detected in these mice compared to similarly infected MGL1^{+/+} mice. Although Th2-associated responses and high

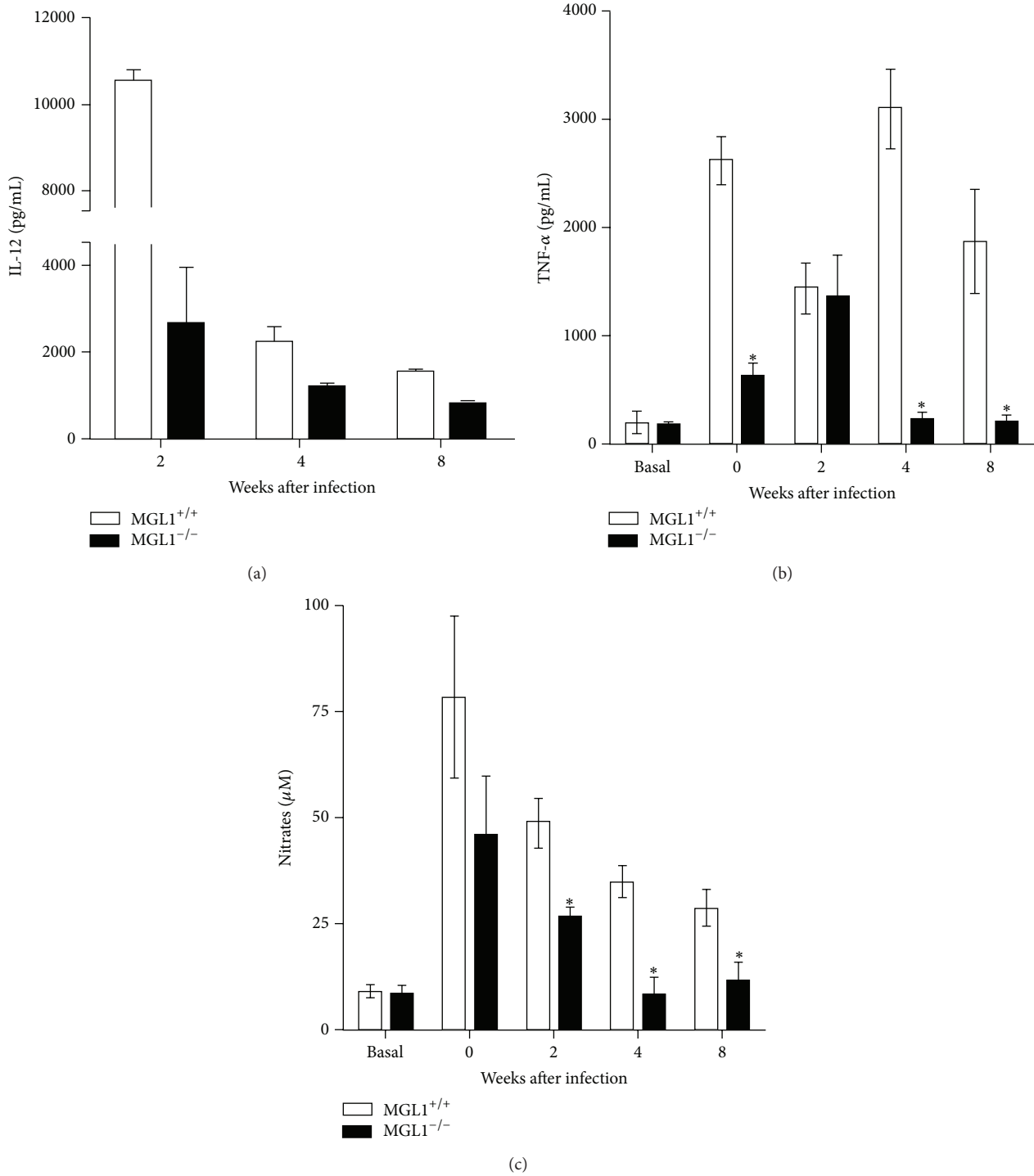
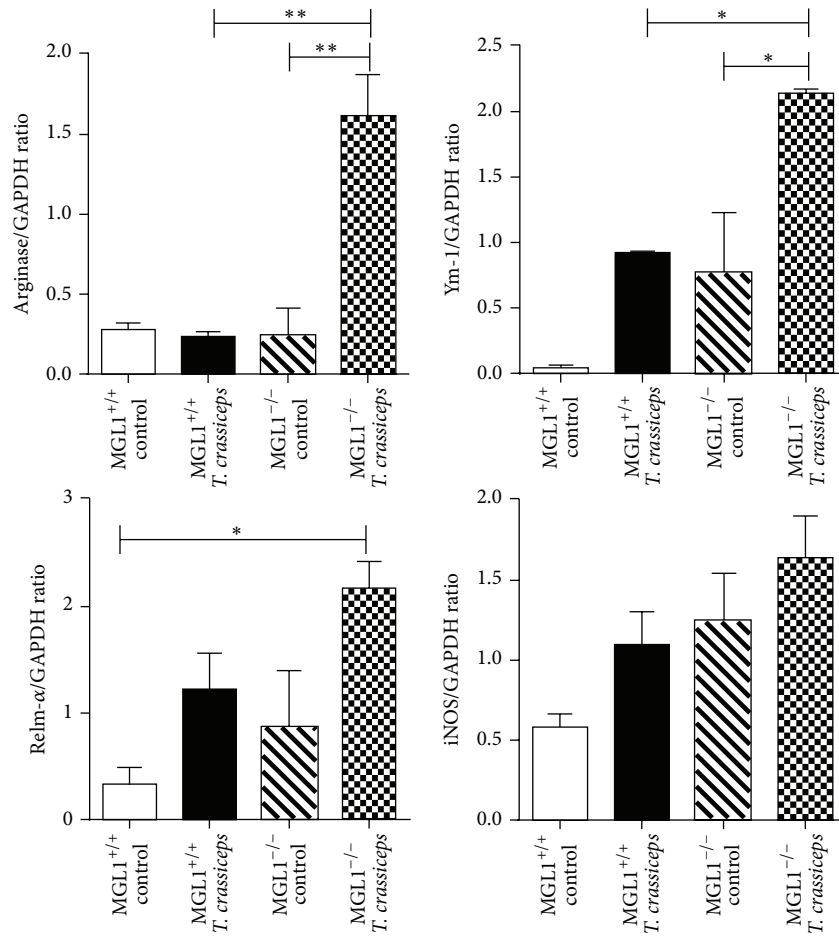
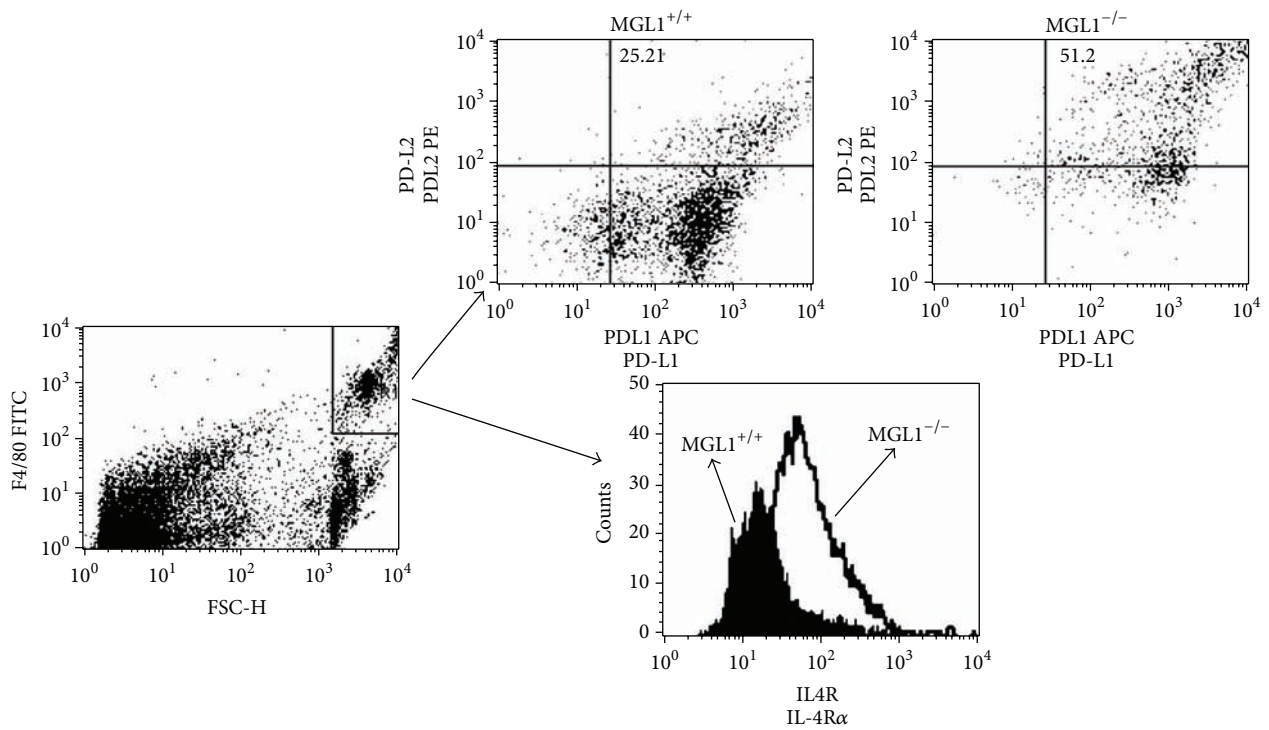


FIGURE 7: Peritoneal macrophages from MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} *T. crassiceps*-infected mice display different responses. Macrophages were obtained at different time points after infection and stimulated with LPS (1 μ g/mL) plus IFN- γ (5 ng/mL) for 48 h; supernatants were analyzed for (a) IL-12; (b) TNF- α ; and (c) NO production. Data are expressed as in Figure 2. *P < 0.05. Data are representative of 2 independent experiments. *P < 0.05.

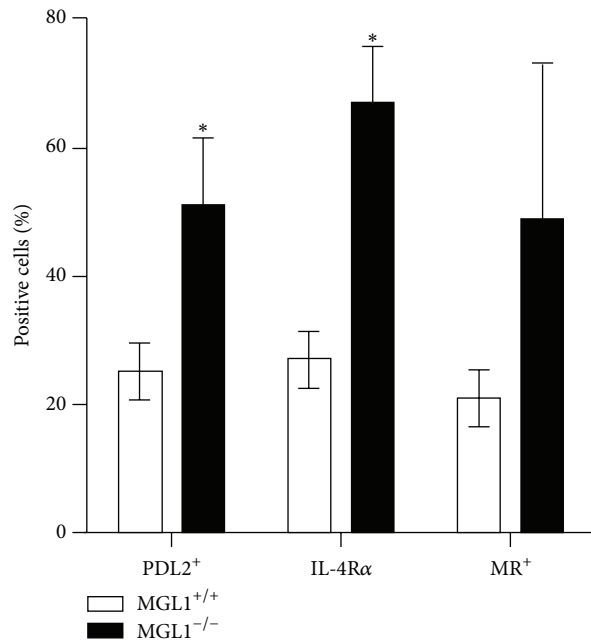


(a)

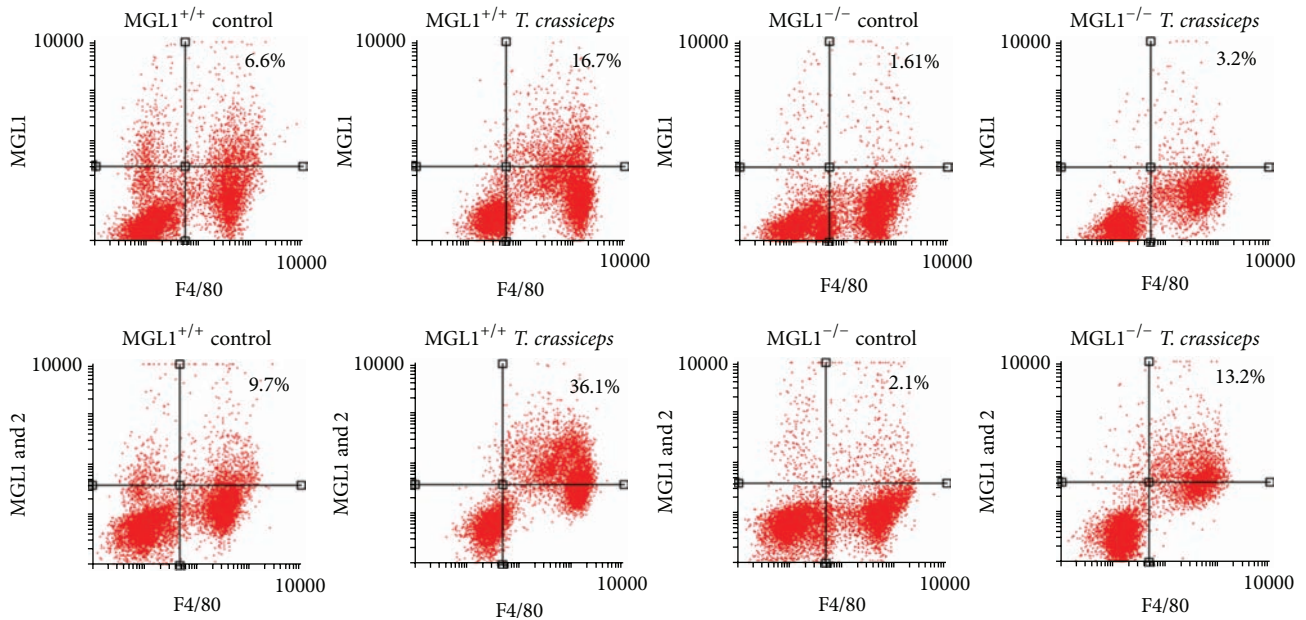


(b)

FIGURE 8: Continued.



(c)



(d)

FIGURE 8: MGL1^{-/-} mice recruit alternatively activated macrophages. Peritoneal macrophages were obtained from MGL1^{-/-} and MGL1^{+/+} *T. crassiceps*-infected mice and processed for RT-PCR or flow cytometry analyses. (a) RT-PCR showing the expression of arginase-1, Ym1, RELM-α and iNOS on macrophages obtained at 8 weeks after infection with *T. crassiceps*. (b) Representative dot plot and histograms demonstrating increased expression of PD-L2, and IL-4Rα on MGL1^{-/-} macrophages. (c) Percentages of expression of different surface markers on peritoneal macrophages. (d) Dot plots from PECs showing the expression of MGL1 and MGL2 from uninfected (control) and 8 weeks-infected *T. crassiceps* MGL1^{+/+} and MGL1^{-/-} mice, numbers on the quadrants indicate average percentage of positive cells. Values are the mean ± SE (*n* = 6 animals) and are representative of two independent experiments. **P* < 0.05 comparing MGL1^{-/-} versus MGL1^{+/+} mice at the same time point.

levels of IgE correlate with protection in gastrointestinal helminth infections [33], our data suggest that IgE may have a limited role in mediating protective immunity against *T. crassiceps*. Notably, despite the greater Th2-associated antibody response in MGL1^{-/-} mice, these mice displayed greater susceptibility to *T. crassiceps*. These data agree with those reported by others [34, 35] and indicate a new and finely tuned role for MGL1 in activating innate and adaptive immune responses against this parasite. These results also suggest that the MGL1-dependent signaling pathway is not only required for inflammatory cytokine production in the early phase of the host response to *T. crassiceps* infection but also that MGL may play a critical role in the development of Th1-adaptive immunity, both of which may be essential for limiting infection and reducing pathology during experimental cysticercosis.

In vivo, MGL1^{-/-} mice significantly increased recruitment of alternatively activated macrophages, as determined by mRNA transcripts for arginase-1, Ym-1 and FIZZ1, and higher expression of the MR, IL-4R α , PD-L2 and MGL2 in their membranes. Thus, a clear alternative activation status in macrophages was observed only in MGL1^{-/-} mice. These findings are in line with previous reports showing alternatively activated macrophages associated with susceptibility in this model [24] and also indicate that MGL1 expression is not necessary for the induction of AAM ϕ s [36]. Together, these data indicate a role for MGL1 in the regulation of inflammation in a model of experimental cysticercosis and suggest that MGL1 may be a critical innate factor in the response to helminths and may be to other parasites.

Although many helminth parasites express a large number of carbohydrates, few CLRs have been associated with helminth recognition and *in vivo* function; for example, Dectin-2, DC-SIGN, SIGNR3, SIGNRI, and MGL have been shown to recognize several components of *S. mansoni* [13], but their roles *in vivo* are unclear. On the other hand, the MR has been associated with uptake of cercariae [12], but no one CLR has been demonstrated to be essential for resistance to such infection. Moreover, in another helminth infection, the absence of the MR during *Trichuris muris* challenge was irrelevant for either an immune response or resistance to this worm infection [14]. However, MR^{-/-} mice were recently demonstrated to exhibit increased survival to *Mesocestoides corti* infection, a neurocysticercosis model, mainly through the downregulation of inflammatory responses [37]. These observations highlight the role of different CLRs in addressing distinct helminth infections and also suggest that it is possible to identify differential roles of CLRs depending upon the type of helminth challenge.

The specificity of rodent MGL1 has been addressed in at least two papers [38, 39] where was shown MGL1 has a primary specificity for the Lewis X determinant, and it may additionally bind biantennary glycans ending in LacNAc or LacDiNAc. We have previously shown that Tcsol contains glycoconjugates binding ConA, may be N-glycans and the *T. crassiceps* metacestode N-glycans described by Jang Lee et al. [29] include biantennary and triantennary LacNAc-terminated structures that could explain our MGL1 binding observed. Alternatively or complementarily, the Fuc alpha-3 GlcNAc antenna might constitute MGL1 targets, as the motif

is related to Lewis X. The fact that MGL2 expression was unaffected by MGL1 deletion, suggest that such targets may be useful to trigger better immunity against this helminth.

Here, we add to the knowledge of the role of CLRs in mediating possible immune activation and resistance *in vivo* to the helminth *T. crassiceps*, which may mediate cellular activation via tyrosine phosphorylation. These data agree with those recently reported by Mishra et al. [37], who described a potential role for the MR in inducing proinflammatory responses to the cestode *M. corti*. Thus, it is possible that some CLRs are involved in proinflammatory responses, whereas other CLRs may induce regulatory responses, as has been observed *in vitro* for different helminth antigen-derived molecules that are rich in carbohydrate residues [40, 41]. In fact, several helminth-derived glycoconjugates have been shown to downregulate the inflammatory response of DCs in response to different TLR ligands [41, 42], and a possible signaling through the c-RAF-dependent pathway has recently been proposed as a modulator of TLR-mediated inflammatory responses [40]. All these data support the idea previously suggested by Teale's group [11], indicating that given the complexity of helminth-derived glycomolecules it may be expected that they play distinct roles, including roles in strong regulatory mechanisms as well as the induction of protective responses, which in turn are likely dependent on the specific CLRs that bind such glycoconjugates.

In summary, in this study, we have demonstrated for the first time that cestode-derived molecules are recognized by MGL1 on M ϕ s and that such interaction triggers phosphotyrosine-mediated intracellular signaling, which most likely induces inflammatory responses in M ϕ s and affects the immune response as well as possible resistance to *T. crassiceps* infection.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Dirección General de Apoyo al Personal Académico-UNAM IN213512, Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal 319/2010 and PINV11-16 (301/2001), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 167799. It is part of the requirements to obtain the PhD degree in the postgraduate program Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM for Daniel Montero-Barrera, who was supported by a fellowship from CONACYT-Mexico.

References

- [1] S. Akira and K. Takeda, "Toll-like receptor signalling," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, no. 7, pp. 499–511, 2004.
- [2] J. Aliberti, J. G. Valenzuela, V. B. Carruthers et al., "Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells," *Nature Immunology*, vol. 4, no. 5, pp. 485–490, 2003.

- [3] C. Brodskyn, J. Patricio, R. Oliveira et al., "Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses," *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 7, pp. 3736–3743, 2002.
- [4] K. V. Vukman, A. Ravidà, A. M. Aldridge, and S. M. O'Neill, "Mannose receptor and macrophage galactose-type lectin are involved in Bordetella pertussis mast cell interaction," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 94, no. 3, pp. 439–448, 2013.
- [5] A. Vázquez-Mendoza, J. C. Carrero, and M. Rodríguez-Sosa, "Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 456352, 11 pages, 2013.
- [6] G. D. Brown and S. Gordon, "Immune recognition of fungal β -glucans," *Cellular Microbiology*, vol. 7, no. 4, pp. 471–479, 2005.
- [7] E. P. McGreal, J. L. Miller, and S. Gordon, "Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors," *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, no. 1, pp. 18–24, 2005.
- [8] 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.
- [9] M. Okano, A. R. Satoskar, K. Nishizaki, M. Abe, and D. A. Harn Jr., "Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens," *Journal of Immunology*, vol. 163, no. 12, pp. 6712–6717, 1999.
- [10] S. Tundup, L. Srivastava, and D. A. Harn Jr., "Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1253, pp. E1–E13, 2012.
- [11] J. I. Alvarez, J. Rivera, and J. M. Teale, "Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 2, no. 4, article e218, 2008.
- [12] R. A. Paveley, S. A. Aynsley, J. D. Turner et al., "The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production," *International Journal for Parasitology*, vol. 41, no. 13–14, pp. 1335–1345, 2011.
- [13] N. S. Prasanphanich, M. L. Mickum, J. Heimburg-Molinaro, and R. D. Cummings, "Glycoconjugates in host-helminth interactions," *Frontiers in Immunology*, vol. 4, article 240, 2013.
- [14] M. L. Deschoolmeester, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, and K. J. Else, "The mannose receptor binds *Trichuris muris* excretory/secretory proteins but is not essential for protective immunity," *Immunology*, vol. 126, no. 2, pp. 246–255, 2009.
- [15] L. Gómez-García, I. Rivera-Montoya, M. Rodríguez-Sosa, and L. I. Terrazas, "Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacystodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen," *Parasitology Research*, vol. 99, no. 4, pp. 440–448, 2006.
- [16] J. K. Nono, K. Pletinckx, M. B. Lutz, and K. Brehm, "Excretory/secretory-products of echinococcus multilocularis larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 2, Article ID e1516, 2012.
- [17] C. A. Terrazas, L. Gómez-García, and L. I. Terrazas, "Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: a critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling," *International Journal for Parasitology*, vol. 40, no. 9, pp. 1051–1062, 2010.
- [18] L. I. Terrazas, F. Sánchez-Muñoz, M. Pérez-Miranda et al., "Helminth excreted/secreted antigens repress expression of LPS-induced let-7i but not mir-146a and mir-155 in human dendritic cells," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 972506, 6 pages, 2013.
- [19] L. Gómez-García, L. M. López-Marín, R. Saavedra, J. L. Reyes, M. Rodríguez-Sosa, and L. I. Terrazas, "Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells," *Parasite Immunology*, vol. 27, no. 10–11, pp. 395–405, 2005.
- [20] C. Napoletano, I. G. Zizzari, A. Rughetti et al., "Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation," *European Journal of Immunology*, vol. 42, no. 4, pp. 936–945, 2012.
- [21] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [22] M. B. Lutz, N. Kukutsch, A. L. J. Ogilvie et al., "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow," *Journal of Immunological Methods*, vol. 223, no. 1, pp. 77–92, 1999.
- [23] P. Migliorini, G. Corradin, and S. B. Corradin, "Macrophage NO $_2^-$ production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- γ ," *Journal of Immunological Methods*, vol. 139, no. 1, pp. 107–114, 1991.
- [24] J. L. Reyes, C. A. Terrazas, J. Alonso-Trujillo, N. van Rooijen, A. R. Satoskar, and L. I. Terrazas, "Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo," *International Journal for Parasitology*, vol. 40, no. 6, pp. 731–742, 2010.
- [25] S. Jitrapakdee, M. St Maurice, I. Rayment, W. W. Cleland, J. C. Wallace, and P. V. Attwood, "Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase," *The Biochemical Journal*, vol. 413, no. 3, pp. 369–387, 2008.
- [26] L. K. Fritz-Laylin, S. E. Prochnik, M. L. Ginger et al., "The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility," *Cell*, vol. 140, no. 5, pp. 631–642, 2010.
- [27] E. van Liempt, S. J. van Vliet, A. Engering et al., "Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation," *Molecular Immunology*, vol. 44, no. 10, pp. 2605–2615, 2007.
- [28] L. Guasconi, M. C. Serradell, A. P. Garro, L. Iacobelli, and D. T. Masih, "C-type lectins on macrophages participate in the immunomodulatory response to *Fasciola hepatica* products," *Immunology*, vol. 133, no. 3, pp. 386–396, 2011.
- [29] J. Jang Lee, S. Dissanayake, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, and S. M. Haslam, "Mass spectrometric characterisation of *Taenia crassiceps* metacystode N-glycans," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 143, no. 2, pp. 245–249, 2005.
- [30] J. L. Reyes, C. A. Terrazas, L. Vera-Arias, and L. I. Terrazas, "Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 9, no. 6, pp. 1115–1127, 2009.
- [31] L. I. Terrazas, D. Montero, C. A. Terrazas, J. L. Reyes, and M. Rodríguez-Sosa, "Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 13, pp. 1349–1358, 2005.

- [32] J. C. Hoving, G. J. Wilson, and G. D. Brown, "Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity," *Cellular Microbiology*, vol. 16, no. 2, pp. 185–194, 2014.
- [33] J. E. Allen and R. M. Maizels, "Diversity and dialogue in immunity to helminths," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 6, pp. 375–388, 2011.
- [34] L. I. Terrazas, A. R. Satoskar, M. Rodriguez-Sosa, and J. Morales-Montor, "Immunology and cell biology of parasitic diseases 2013," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 101268, 4 pages, 2013.
- [35] A. N. Peón, A. Espinoza-Jiménez, and L. I. Terrazas, "Immunoregulation by taenia crassiceps and its antigens," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 498583, 13 pages, 2013.
- [36] G. Raes, L. Brys, B. K. Dahal et al., "Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 77, no. 3, pp. 321–327, 2005.
- [37] P. K. Mishra, E. G. Morris, J. A. Garcia, A. E. Cardona, and J. M. Tealea, "Increased accumulation of regulatory granulocytic myeloid cells in mannose receptor C type 1-deficient mice correlates with protection in a mouse model of neurocysticercosis," *Infection and Immunity*, vol. 81, no. 4, pp. 1052–1063, 2013.
- [38] M. Tsuiji, M. Fujimori, Y. Ohashi et al., "Molecular cloning and characterization of a novel mouse macrophage C-type lectin, mMGL2, which has a distinct carbohydrate specificity from mMGL1," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 28892–28901, 2002.
- [39] P. J. Coombs, M. E. Taylor, and K. Drickamer, "Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling," *Glycobiology*, vol. 16, no. 8, pp. 1C–7C, 2006.
- [40] C. A. Terrazas, M. Alcántara-Hernández, L. Bonifaz, L. I. Terrazas, and A. R. Satoskar, "Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway," *The FASEB Journal*, vol. 27, no. 11, pp. 4547–4560, 2013.
- [41] E. J. Klaver, L. M. Kuijk, L. C. Laan et al., "*Trichuris suis*-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated," *International Journal for Parasitology*, vol. 43, no. 3-4, pp. 191–200, 2013.
- [42] P. G. Thomas, M. R. Carter, O. Atochina et al., "Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism," *The Journal of Immunology*, vol. 171, no. 11, pp. 5837–5841, 2003.