



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Papel de la molécula mMGL en la respuesta
inmune y resistencia al céstodo
Taenia crassiceps”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

M.C LAURA MARGARITA VERA ARIAS.

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

MEXICO, D.F

JUNIO

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A los apoyos recibidos por:

CONACYT 60956-M

PAPIIT IN212909-3

PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO
SE CONTO CON EL APOYO DEL
PROGRAMA DE APOYO A LA SUPERACIÓN DEL PERSONAL ACADÉMICO (PASPA)

A los miembros del Jurado:

Dr. Abraham Landa Piedra.

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés.

Dr. Pedro Ulises Ostoa Saloma

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

Dra. Leticia Moreno Fierros.

Por sus importantes comentarios en la elaboración de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FES, IZTACALA

A LA UNIDAD DE BIOMEDICINA

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por su apoyo, asesoría y conocimientos

A los miembros del Comité Tutorial:

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés.

Dr. Abraham Landa Piedra

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Por sus importantes observaciones, sugerencias y supervisión durante el desarrollo de la presente investigación

A mis compañeros y amigos del laboratorio 5 y 8

DEDICATORIAS

A MI MADRE Y HERMANAS POR SU ORIENTACIÓN, ENSEÑANZA Y APOYO A LO LARGO DE TODA MI VIDA.

A MIS SOBRINOS JESÚS, ADRIANA, ANDREA, YAIR, BRENDA, JESSY, ALEJANDRO, MONY Y ALDO POR SER LA BENDICIÓN DE MI VIDA.

A MI SEGUNDA MADRE; EVA CORTES POR SU APOYO CUANDO MÁS LO HE NECESITADO.

A LA DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA, JOSÉ LUIS, IMELDA Y ARLETTE POR SU ORIENTACIÓN Y APOYO EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS DEL
LABORATORIO 5 Y 8: DANI, CESAR,
LAURA PEREA, AXEL, IBET, MAXIN,
IRMA, DIANA, ALBERTO, LAURA
RANGEL, JUAN DE DIOS, FERNANDO,
ESPERANZA GARCÍA, VICTOR,
RODRIGO, ALICE, IMELDA, YURI....
GRACIAS POR SU APOYO Y AYUDA EN
LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO
Y AMISTAD.

•

AL DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
POR SU APOYO INCONDICIONAL,
ORIENTACIÓN Y SABIOS CONSEJOS.

INDICE GENERAL

	Pagina
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIACIONES	4
INTRODUCCIÓN	6
Características DE los receptores tipo lectinas	6
Características de Mmgl	8
Papel de los azúcares de la superficie de los patógenos y el huésped, interacciones y modulación de la respuesta inmune	10
Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T _H 2	11
Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T _H 1	13
Mecanismos de regulación de la respuesta inmune por helmintos	14
<i>Taenia crassiceps</i> y respuesta inmune	16
Macrófagos	21
Papel de los MøaA en la infección por helmintos	25
Céstodos	
<i>Taenia crassiceps</i>	25
<i>Echinococcus multilocularis</i>	26
Hymenolepis diminuta	26
Nemátodos	
<i>Brugia malayi</i>	26
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	27
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	28
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	29
Tremátodos	
<i>Schistosoma mansoni</i>	29
<i>Fasciola hepática</i>	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	33

OBJETIVOS	34
DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA	35
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	76
PROPUESTA	77
BIBLIOGRAFÍA	79

RESUMEN TESIS

mMGL (Mouse macrophage galactose- type C lectin) es una glicoproteína transmembranal tipo II, miembro de la familia de las lectinas, funcionalmente dependiente de calcio; muestra alta afinidad por glicoproteínas con terminales galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GalNac). mMGL se expresan en la superficie de macrófagos (M \emptyset) y células dendríticas inmaduras (DCs) ^{10, 20, 28, 30, 36}.

Con el objetivo de conocer si la molécula mMGL participa en la resistencia o susceptibilidad, así como en la respuesta inmune ante la infección con *Taenia crassiceps*, se utilizaron ratones C57 B/L6 silvestres (mMGL +/+) y ratones deficientes en dicha molécula (mMGL -/-). Ambos grupos de ratones se infectaron con 25 o 15 metacéstodos de este parásito. Se evaluó la cinética de la respuesta inmune humoral y celular de los tiempos 0 a 8 semanas p.i. A los mismos tiempos se evaluó el crecimiento del parásito.

Se observó susceptibilidad significativamente mayor en los ratones mMGL -/- en comparación con los ratones mMGL +/+. Esta mayor susceptibilidad se asoció a una respuesta T_H2 dominante en los ratones mMGL -/-, los cuales presentaron mayor producción de IL-4, IL-13, así como mayores niveles de IgE. En contraste el grupo de animales mMGL +/+ presentaron menores cargas parasitarias y mayor producción de IFN- γ .

Por RT-PCR se analizó la expresión de genes asociados a la activación alternativa de M \emptyset (YM-1, ARG-1, iNOS, FIZZ); en M \emptyset de la cavidad peritoneal de ambos grupos ratones y en los diferentes tiempos de infección, se observó que a las 4 y 8 semanas post-infección los M \emptyset provenientes de ratones mMGL -/- mostraron transcritos de estos genes antes que las células provenientes de ratones mMGL +/+.

Por otro lado se observó que la producción de óxido nítrico (ON) fue mayor en los ratones mMGL +/+ lo que coincide con un menor número de parásitos en este grupo de ratones.

Por citometría de flujo se analizó la expresión de las moléculas PDL-1 y PDL-2 en Mø de ambos grupos de ratones, los resultados mostraron que en los Mø provenientes de animales mMGL -/- se sobre expresan PDL-1 y PDL-2 lo que sugiere un potencial papel supresor de éstos Mø. Se observó también que IL4-R e INF γ -R están sobre expresadas en las células del grupo de ratones mMGL -/-.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la molécula mMGL tiene un papel importante en el reconocimiento de antígenos parasitarios que pudieran participar en la respuesta inmune para controlar la infección por *Taenia crassiceps*.

ABSTRACT

mMGL (Mouse macrophage galactose C-type lectin) is a type II transmembranal glycoprotein, member of the C-type lectin family, which depends on cellular calcium concentration. Such lectin has high affinity for the Galactose and N-acetylgalactosamine ending glycoproteins. Furthermore, this lectin is expressed on macrophages and Dendritic Cell (DC) surface. However a role for mMGL in helminthic infections has not been described.

In order to know whether mMGL coordinates immune response as well as resistance against *Taenia crassiceps* challenge, we infected i.p. mMGL deficient (mMGL^{-/-}) and wildtype mice (mMGL^{+/+}) with 25 or 15 non-budding *T. crassiceps* metacestodes both with C57BL/6 genetic background. Parasite burden, cellular and humoral responses were measured during 8 weeks of infection.

An increased susceptibility in mMGL^{-/-} mice can be observed compared to mMGL^{+/+} mice. Concomitantly, susceptibility was associated with higher levels of Th2 cytokines (IL-4,IL-13) and IgE. In contrast, mMGL^{+/+} mice presented lower number of parasites and increased IFN γ production.

Next, macrophage polarization genotype was evaluated in adherent peritoneal cells at 4 and 8 weeks after infection. RT-PCR assay was performed to test mRNA transcripts of classic and alternative macrophage markers. mMGL^{-/-} infected mice showed higher expression of Relm- α and Ym-1 than their mMGL^{+/+} counterparts. Thus, a clear alternative activation status in macrophages is observed only in mMGL^{-/-} mice consistent with previously reported findings showing alternative macrophages only in susceptible hosts.

According to above mentioned Nitric Oxide production was higher in LPS/IFN γ -stimulated mMGL^{+/+} macrophages than mMGL^{-/-} cells which was associated with lower parasite burden.

Finally, flow cytometry analysis showed over expression of IL-4R α , PDL1 and PDL2 on macrophage surface in mMGL^{-/-} group unrevealing alternative and suppressive phenotypes respectively.

Altogether these data suggest an important role for mMGL lectin in parasite antigen recognition, which is most likely to turn on an inflammatory protective signal during *T. crassiceps* infection.

ABREVIATURAS

APCs	Células presentadoras de antígeno.
Arg 1	Arginasa 1.
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos.
DCs	Células dendríticas.
DNA	Ácido desoxi nucleico
FACS	
i.p	Intraperitoneal.
IFN- γ	Interferona γ
IgE	Inmunoglobulina E.
IgE	Inmunoglobulina E.
IgG 1	Inmunoglobulina 1.
IgG2a	Inmunoglobulina G 2a.
IgG4	Inmunoglobulina G 4
IL-10	Interleucina 10.
IL-12	Interleucina 12.
IL-13	Interleucina 13.
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible.
LPS	lipopolisacáridos.
MALDI	Análisis de espectrofotometría de masas.
ml	Mililitro
mMGL	macrophage galactose-Type C-type lectin.
M ϕ	Macrófagos.

MøaA	Macrófagos alternativamente activados.
MøaC	Macrófagos activados clásicamente.
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
ON	Óxido Nitrico
p.i	Post-infección.
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
pb	Pares de bases.
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ .
PRR	pattern recognition receptors.
TGF-β	Factor de necrosis tumoral β.
TLRs	Receptores de células T.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa.
μg	Microgramo

INTRODUCCIÓN.

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa que impide la invasión y diseminación de los patógenos. Las células del sistema inmune innato reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos [PAMPs (Pathogen associated molecular patterns)] a través de los receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (pattern recognition receptors). Los PRRs se expresan fundamentalmente en la superficie de las células que primero entran en contacto con el patógeno durante la infección y en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y monocitos/macrófagos). La respuesta inmune efectiva depende del reconocimiento de los patógenos por células presentadoras de antígeno como las células dendríticas y los macrófagos a través de sus PRRs. Estos receptores inducen una vía de señalización específica que inicia la inducción de la respuesta inmune contra los patógenos. Los diferentes tipos de PRRs incluyen a los receptores tipo Toll (TLRs), las lectinas tipo C (CLRs), receptores de la familia NOD-Like (dominio de oligomerización para la unión a nucleótidos) y CARD (proteínas que contienen un dominio para la activación y el reclutamiento de las caspasas) helicinas. Los TLRs son PRRs que se unen a PAMPs presentes en los patógenos tales como lípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), ácidos nucleicos o DNA bacterial, ácido lipoteico, secuencias de DNA CpG no metiladas, manosa y RNA bicatenario característico de virus, así como estructuras presentes en parásitos intracelulares tales como *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* ^{10, 17, 24, 29, 53}.

Características de los receptores tipo lectinas C (CLRs).

Los receptores lectina tipo C, son proteínas de unión a carbohidratos que están involucradas en una variedad de procesos inmunes tales como fagocitosis, presentación de antígenos, adhesión celular, y apoptosis. Los CLRs reconocen patrones de carbohidratos expresados por microorganismos invasores y tienen un importante papel en la inmunidad innata y adaptativa. La capacidad de los receptores lectina tipo C de detectar microorganismos depende de la densidad de

los PAMPs presente en la superficie de los patógenos invasores, así como del grado de oligomerización del CLR ^{8, 10}.

Las lectinas tipo C son muy prominentes en el sistema inmune de mamíferos, algunos ejemplos incluyen las selectinas como mediadores de la inflamación a través de la unión de leucocitos (CD11 α /CD18 β) a selectina-E expresados en células epiteliales activadas. Adicionalmente, las CLR en la superficie de células inmunes incluye CD23, receptor Fc ϵ de baja afinidad a IgE, receptor de manosa (CD206), macrophage galactose-Type C-type lectin (mMGL), Dectina-1, L-SIGN y DC-SIGN (CD209). En particular DC-SIGN, que es una lectina tipo C, tiene un papel importante en la inducción de la respuesta inmune contra numerosos patógenos incluyendo micobacterias, hongos y virus ^{10, 18}.

Los CLR se expresan en macrófagos y células dendríticas inmaduras (DCs) presentes en la mayoría de los tejidos; y están implicados con actividad tumoricida, fagocitosis y endocitosis; se considera que tienen un papel importante en el paso inicial de la captura de antígenos que contienen carbohidratos ^{20, 34}. Se ha postulado que como parte de las funciones de las CLR es su participación en la adhesión célula-célula, el reconocimiento de antígeno y como molécula de señalización influyendo en el balance entre tolerancia e inmunidad ^{27, 35}.

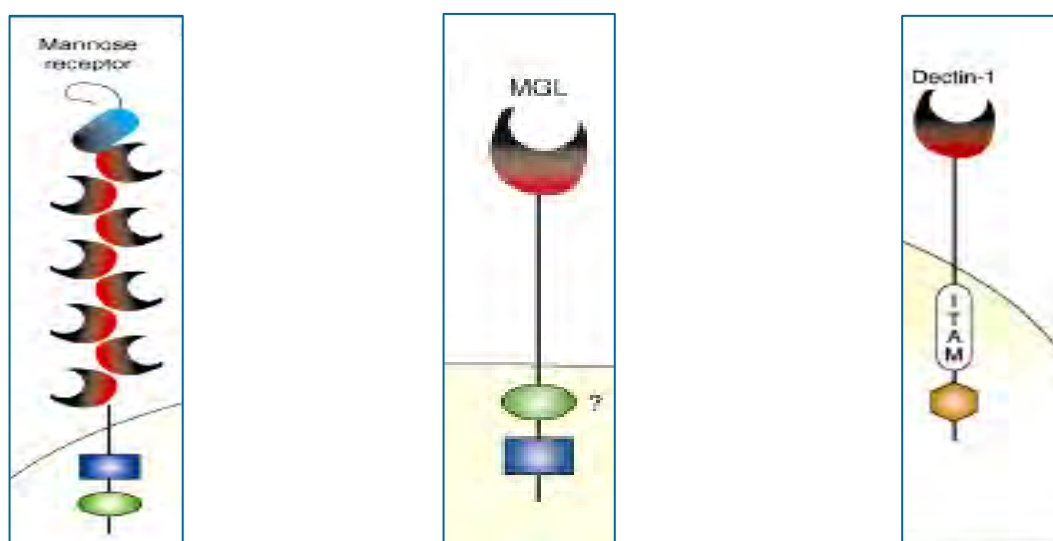


Fig. 1. Ejemplos de lectinas. Tomado de referencia 55.

Características de mMGL.

mMGL (macrophage galactose-Type C-type lectin), estructuralmente, es una glicoproteína transmembranal de $\sim M_r$ 42 kDa; posee un dominio citoplásmico, un dominio transmembranal, un dominio de cuello y un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que es una estructura estabilizada por dos o tres puentes disulfuro; responsable de unir carbohidratos, y una secuencia QPD de Gln-Pro-Asp que facilita el reconocimiento de carbohidratos. Se caracterizan por conservar 115 a 130 aminoácidos en su CRD, con múltiples sitios de unión a Ca^{2+} . Sin embargo, el perfil de reconocimiento de carbohidratos está fuertemente influido por la oligomerización del receptor y el espacio de los carbohidratos con el ligando ^{18, 34, 35, 41, 51, 52, 54}.

Los CRD se unen a residuos de carbohidratos, en forma dependiente de Ca^{2+} . Los iones Ca^{2+} están directamente involucrados en la unión con el ligando, así como en el mantenimiento estructural y la integridad del CRD que es necesario para la actividad de la lectina. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos, los CRD son específicos para manosa y galactosa. Sin embargo, la interacción de estas estructuras de carbohidratos con las diferentes lectinas depende de la estructura de los carbohidratos y sus valencias ⁸.

En humanos sólo se ha encontrado un gen para MGL (CD301), sin embargo en ratones existen dos copias del gen el mMGL 1 y mMGL 2, (CD301a y CD301b). Ambas moléculas son proteínas transmembranales tipo 2 altamente homólogas en su secuencia de aminoácidos, idénticas en el 91.5%, particularmente en sus dominios de cuello y 86% en el CRD (Tabla 1). Por detección de mRNA de mMGL 2 en células que expresan MGL1 se identificaron células doble positivas, en lámina propia de intestino delgado, dermis y nódulos linfáticos, sugiriendo que ambas pueden ser expresadas en la misma célula ^{35, 51}.

Ambos se expresan en la superficie de Mø y DCs. A pesar de la alta similitud entre la secuencia primaria de estas dos lectinas, ellas tienen afinidad por ligandos específicos. mMGL 1 tiene alta afinidad por trisacáridos Lewis X, mientras que mMGL 2 muestra alta afinidad por N-acetilgalactosamina ⁴⁴.

Las células que expresan MGL están ampliamente distribuidas en el tejido conectivo. A mMGL 1 se le atribuyen una variedad de funciones biológicas tales como reconocimiento y endocitosis de glucoproteínas con residuos Gal/GalNAc, también contribuye a la defensa contra células tumorales metastásicas y limpia a los embriones de células apoptóticas. MGL 2 tiene el mismo patrón de distribución que MGL 1 ^{44, 55}.

89

111

MGL1	FEKGFKNW	APLQPDNWF	GHGLGGGEDCAH	ITTGGPWND	DVCQRHYHWIC
MGL2	FDKGRKNW	RPLQPDNWH	GHMLGGGEDCAH	FSYDGRWND	DVCQRTFRWIC

Comparación de la secuencia de aminoácidos entre MGL1 y MGL2. Los aminoácidos en color son los sitios de unión con los carbohidratos de *T. crassiceps*.

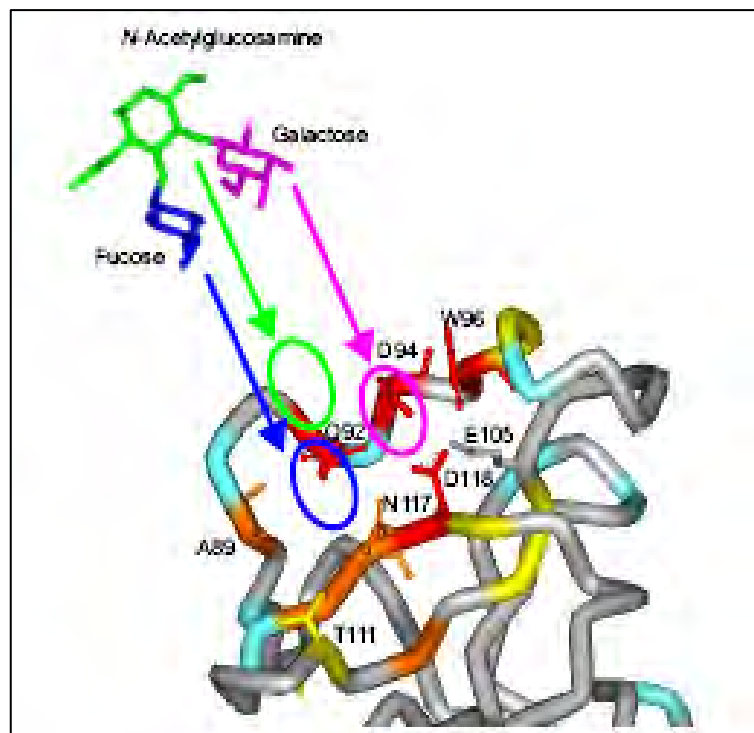


Fig. 2. Modelo de la unión de mMGL 1 y carbohidratos con estructura Lewis X. Tomado de referencia 44.

Tabla 1. MGL ortólogos en humano, ratón y rata.

Especie	Otra nomenclatura	Patrón de expresión	Carbohidrato específico	Localización cromosómica
Humano	ASGP-R (H1/H2)	Hepatocitos	Glicanos tri- o tetra- antenarios con terminal gal/GalNAc	17p13.2
Humano	MGL (CD 301 corto) DC-ASGPR (CD 301 largo)	CDs inmaduras macrófagos CDs inmaduras macrófagos ?	Terminal Gal/NAc Antígenos Tn, LDN) No determinado	17p13.1 17p13.1
Ratón	mMGL 1	CDs inmaduras Macrófagos	Lewis X Terminal galactosa Terminal GalNAc	11 B3
Ratón	mMGL 2	CDs inmaduras Macrófagos	Terminal GalNAc	11 B3
Rata	rMGL (M – ASGP-BP)	Macrófagos CDs ?	Glicanos bi-antenarios com terminal Gal/GalNAc, Lewis X, Lewis A	10q24

Tomada de referencia 55.

Papel de los azúcares de la superficie de los patógenos y el huésped, interacciones y modulación de la respuesta inmune.

Los azúcares en forma de monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y glucoconjugados (glicoproteínas y glicolípidos) son componentes vitales de los microbios infectantes y las células del huésped, se involucran en la señalización celular y se asocian con la modulación de la inflamación en todos los tejidos. Ellos tienen un papel importante en la adherencia, colonización y formación de biopelículas de los microbios. La abundancia de varios tipos de carbohidratos en la superficie de las células animales es una razón por la que éstos son involucrados en la adherencia a los receptores de azúcares en forma específica para iniciar el proceso de la infección y colonización del hospedero ²³,

Por ejemplo, se sabe que los componentes de la superficie de la pared celular de los hongos median la adherencia de éste a las células del huésped. Los polisacáridos de la pared celular pueden activar la cascada del complemento y provocar una

reacción inflamatoria; son escasamente degradados por el huésped y se pueden detectar con colorantes especiales. Las paredes celulares liberan antígenos inmunodominantes que pueden inducir respuesta inmunitaria celular y anticuerpos diagnósticos ⁶.

Las bacterias utilizan a los polisacáridos extracelulares como un mecanismo protector que, por ejemplo, pueden brindar protección contra los posibles agentes mortales como los antibióticos o los iones de metales pesados. Las grandes cantidades de polisacáridos producidos por un gran número de células dentro de una colonia pueden permitir a las células del interior resistir la exposición, a una concentración tal de un agente mortal capaz de matar a células aisladas ⁶.

Estudios en una serie de protozoarios indican que las respuestas inmunes a estos parásitos en los animales infectados y los seres humanos se dirigen a los factores determinantes de glúcidos en la superficie celular y glicoconjugados secretadas que son importantes en las interacciones huésped-parásito ⁶.

Los parásitos helmintos como *Schistosoma mansoni* y *Taenia crassiceps* expresan carbohidratos Lewis X y sus derivados, los cuales parecen modular la respuesta inmune del huésped hacia una dirección T_H2; por lo tanto establecen una infección crónica con crecimiento exponencial del parásito. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de carbohidratos intactos en antígenos de *T. crassiceps* induce activación alternativa de los macrófagos (MøaA). ^{14, 17, 22, 26}.

Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T_H2.

La principal función efectora de los linfocitos T_H2 es favorecer las reacciones inmunitarias mediadas por IgE y eosinófilos/mastocitos, que se han asociado a protección en infecciones por helmintos, el aumento del número de mastocitos y eosinófilos, así como las altas concentraciones de IgE e IgG 4 son característicos de los individuos infectados por helmintos ^{1, 2}. Los linfocitos T_H2 secretan IL-4, IL-5 IL-13. La IL-4 y la IL-13 estimulan la síntesis de anticuerpos IgE específicos contra el helminto ^{1, 4}.

Por el contrario, la IL-5, puede activar directamente los eosinófilos próximos a los helmintos. Los eosinófilos activados liberan el contenido de sus gránulos, incluyendo la proteína principal básica y la proteína principal catiónica, que son capaces de destruir tegumentos de los helmintos ^{1,5}.

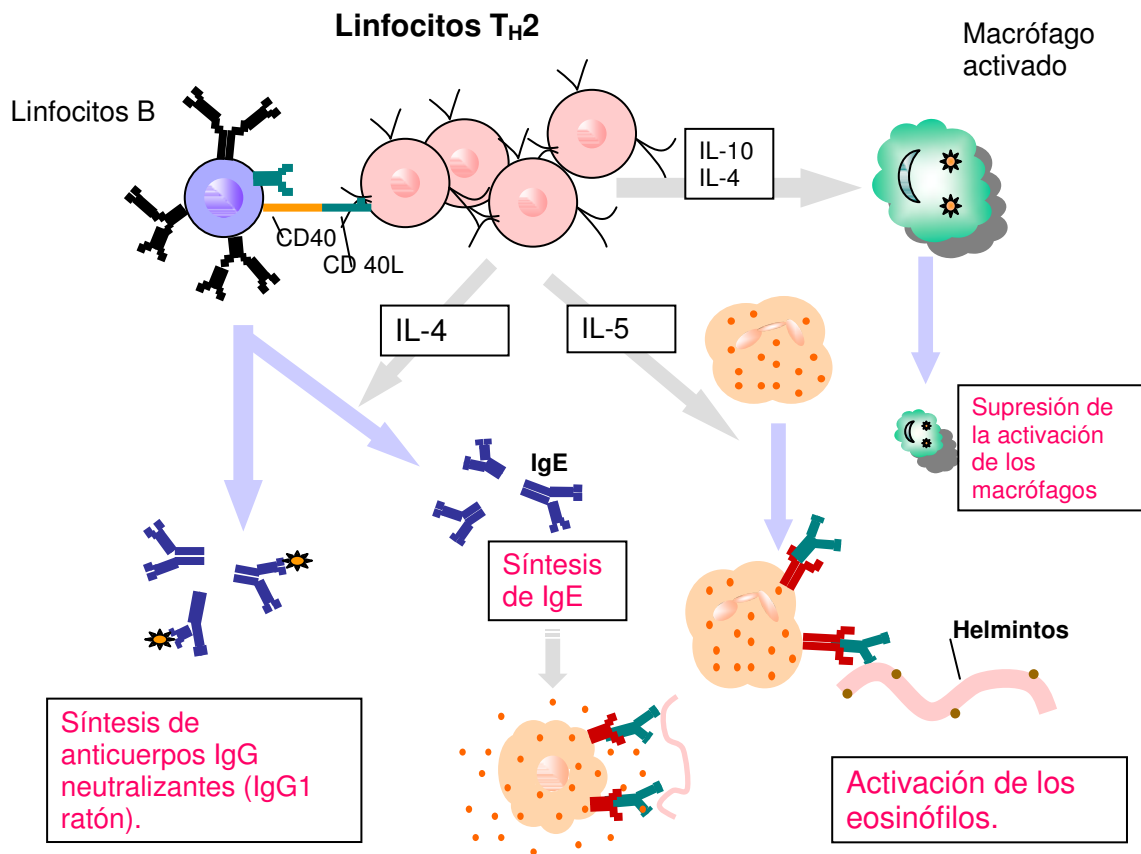


Fig. 3. Funciones efectoras de los TH2. Tomado de 1.

En la helmintiasis intestinal, se ha demostrado que la expulsión del gusano parásito está controlada por citocinas del grupo TH2 que induce una mastocitosis en la mucosa, eosinofilia intestinal y concentraciones elevadas de IgE en suero. De aquí que los helmintos tienen una fuerte asociación con las reacciones de hipersensibilidad, atestiguada con los altos valores de IgE encontrados en la mayoría de las helmintiasis ⁴.

Respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T_H1.

La principal función de los linfocitos T_H1 es la defensa mediada por las citocinas contra las infecciones, especialmente por microorganismos intracelulares. El IFN- γ , IL-12 y TNF- α sintetizados por las células T_H1 estimula las actividades microbicidas de los macrófagos favoreciendo de esta forma la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados. El IFN- γ también estimula la síntesis de anticuerpos IgG opsonizadores y fijadores del complemento, que favorecen la fagocitosis de los microorganismos^{1,4}.

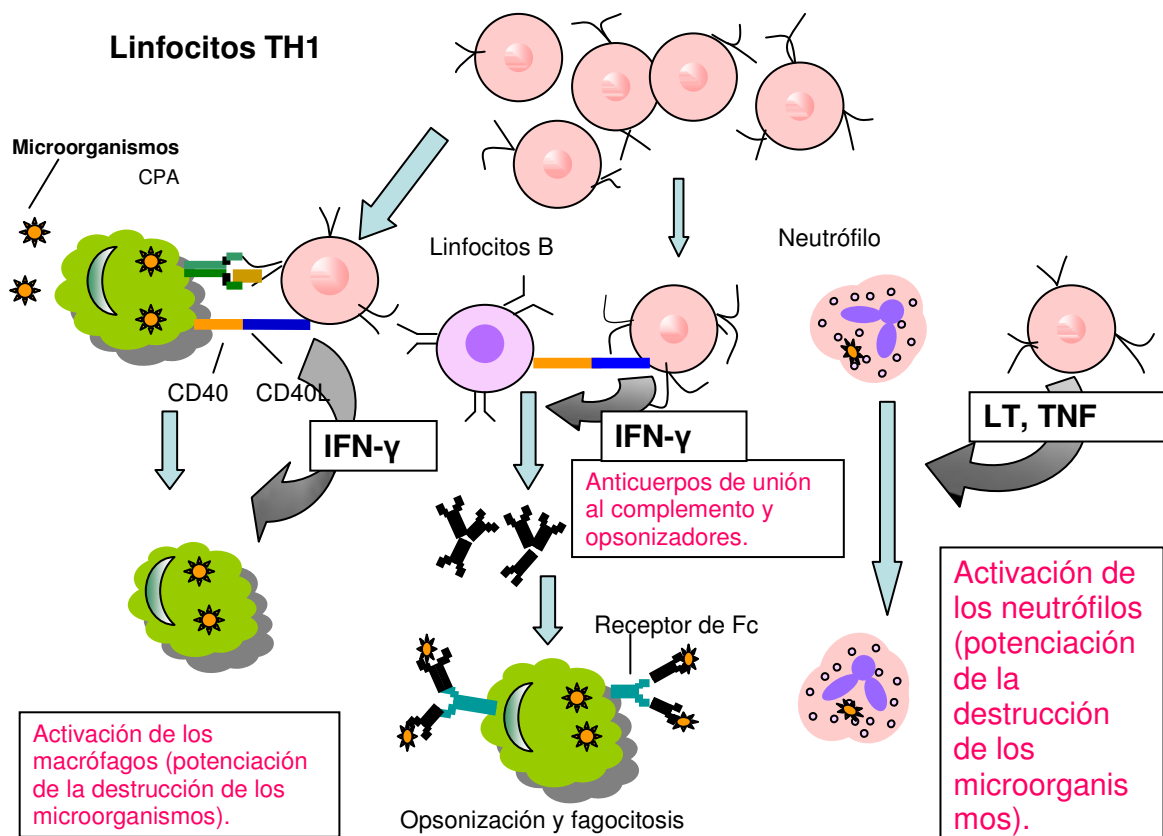


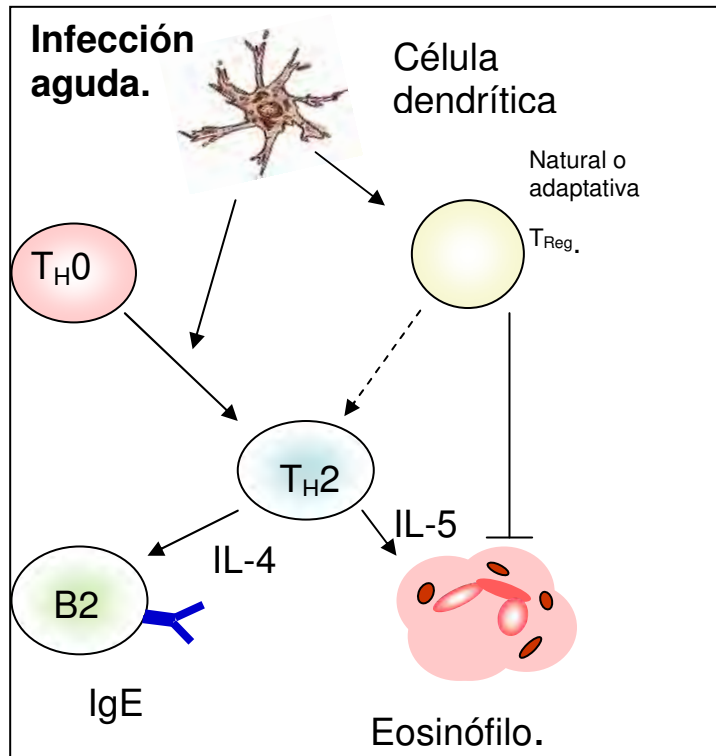
Fig. 4. Funciones efectoras de los linfocitos T_H 1.

Mecanismos de regulación de la respuesta inmune por helmintos.

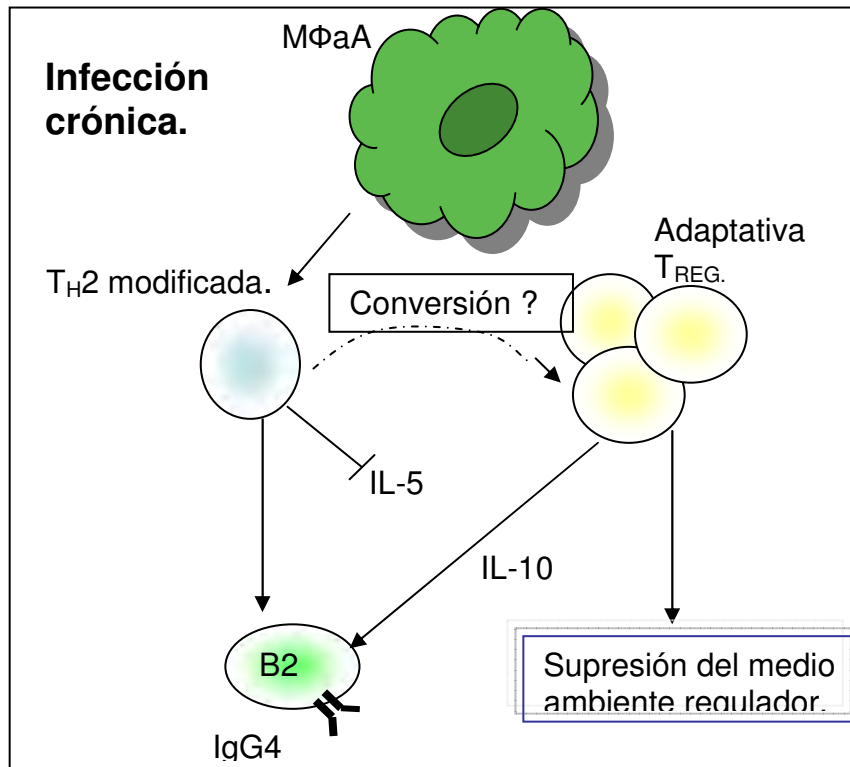
Actualmente es bien conocido que los helmintos parásitos son capaces de modular la respuesta inmune del huésped, mayormente hacia un perfil T_H2 . Esta inmunomodulación puede manifestarse como un cambio en el equilibrio entre la respuesta de tipo T_H1 y T_H2 inducida por el parásito, según el microambiente, con efectos benéficos o perjudiciales para el huésped. Aunque los mecanismos implicados en este fenómeno aún no están claramente definidos, se ha propuesto que las células presentadoras de antígeno (APCs), como las DCs y macrófagos ($M\phi$) podrían desempeñar un papel importante en este proceso ya que son las encargadas de activar y polarizar a las células T ^{13, 48, 50}.

Se ha propuesto que el mecanismo de regulación de la respuesta inmune por helmintos (Fig. 3 A), inicia con la entrada del helminto que lleva a activación de células dendríticas en tejidos periféricos. Se sabe que se activan células T vírgenes a T_H2 . También es posible que una reacción cruzada estimulada por los antígenos del helminto pueda estimular la participación de células T reguladoras naturales. La pronta participación de las células T reguladoras se piensa impide la respuesta T_H2 ²⁵.

En la Fig. 5. B) Se encuentra el mecanismo propuesto de regulación de la respuesta inmune en infección crónica por helmintos, se propone que el incremento de los niveles de antígeno parasitario transmite una fuerte regulación sobre las células T_{Reg} . En estado crónico de infección se sabe que los macrófagos adquieren un fenotipo de alternativamente activados ($M\phi_{aA}$) que puede suprimir la proliferación de células T y promover el desarrollo de células de tipo T_H2 . La interacción de células dendríticas y macrófagos recientemente diferenciados con células T en infecciones crónicas por helmintos son menos claras, pero las armas efectoras del sistema inmune permanecen con un estado modificado, por ejemplo, disminución en la producción de IL-5, y altos niveles de IL-10 (producidos por células T_{Reg} adaptativas) la cual cambia la respuesta de las células B hacia la producción de IgG4 y no hacia IgE. También induce la producción de TGF- β que modula la anergia celular ²⁵.



A). Mecanismo propuesto de regulación de la respuesta inmune en infección aguda por helmintos.



B). Mecanismo propuesto de regulación de la respuesta inmune en infección crónica por helmintos. **Fig. 5** Tomado de referencia 25.

***Taenia crassiceps* y respuesta inmune.**

Taenia crassiceps es un cestodo que naturalmente afecta a los roedores y sus hospederos finales son los caninos. Sin embargo, se ha reportado que humanos inmuno comprometidos pueden desarrollar la infección por este céstodo. El estado metacéstodo de *T. crassiceps* tiene la ventaja de reproducirse en forma asexual. Este fenómeno biológico permite la inducción de infecciones en ratones de laboratorio al inocular el parásito intraperitonealmente y después de varias semanas, cientos de parásitos macroscópicos pueden encontrarse en la cavidad peritoneal³³. En la Fig. 4 se muestra el ciclo de vida de *Taenia crassiceps*, con flecha roja se marca la infección como modelo experimental¹⁶.

La cisticercosis experimental causada por *T. crassiceps* induce una fuerte respuesta de tipo T_H2 e inhibe la capacidad de proliferación de las células de bazo en respuesta a un estímulo antigénico específico y/o policlonales. Los mecanismos involucrados en este proceso aún no son claramente conocidos¹⁶.

Por análisis de espectrofotometría de masas MALDI, se identificó la estructura terminal de los carbohidratos de *Taenia crassiceps* que consisten en Fuc- α - (1- 3)-GlcNAc y Gal – β (1 – 4)-GlcNAc residuos como componentes dominantes los cuales pueden ser reconocidos por mMGL. El alto contenido de estos azúcares en la membrana de *Taenia crassiceps* influye en el desarrollo de una fuerte respuesta de tipo T_H2^{7, 10}.

Típicamente, la respuesta T_H2 involucra producción de las citocinas interleucina-4 (IL-4), IL-5, e IL-13, así como inmunoglobulina E (IgE) y la expansión y movilización de células efectoras como mastocitos, eosinófilos y basófilos²⁵.



Fig. 6. Ciclo del vida de *Taenia crassiceps*.

En el modelo de cisticercosis experimental murina en la cavidad peritoneal causado por *Taenia crassiceps* se han identificado factores genéticos, sexuales e inmunológicos asociados a la susceptibilidad en esta parasitosis. Por ejemplo, estas infecciones se caracterizan por la polarización de la respuesta inmune de un perfil T_H1 inicial hacia un perfil T_H2 , con progresión de la infección; y un incremento notable en el número de parásitos ^{16, 36, 46}.

Aunque los mecanismos involucrados en este fenómeno no están claramente definidos, las células presentadoras de antígeno tienen un papel importante en este proceso, nuestro grupo analizó la respuesta de macrófagos provenientes de ratones con infección aguda, y observaron que éstas células producen niveles altos de IL-12 y Oxido Nítrico (NO), paralelamente con niveles bajos de IL-6 y prostaglandina E_2 (PGE_2) y con la habilidad de inducir la proliferación de células antígeno-específicas $CD4^+$ en respuesta a antígenos no relacionados. En contraste, los macrófagos que provenían de ratones con infecciones crónicas produjeron niveles superiores de IL-6 y PGE_2 y mostraron una supresión en la producción de IL-12 y ON, asociados con una pobre habilidad para inducir la proliferación de células $CD4^+$ antígeno específicas ³⁶.

Como y porque los helmintos inducen una respuesta inmune tipo T_H2 no esta completamente claro, pero se propone la participación de varios factores, tanto del parásito como del huésped; por ejemplo: se ha propuesto que los carbohidratos con estructuras tipo Lewis X [D-GlcNAc β (1-3), D-Gal β (1 – 4), D-Glc, L-Fuc α - 1] que expresa *T. crassiceps* son detectados en particular por las CLR de las APCs y ello favorece la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil T_H2 ^{8, 10, 13, 36, 46}.

Lo mencionado anteriormente fue corroborado en un estudio del mismo grupo¹⁶ donde se observó que los antígenos de *T. crassiceps* son ricos en carbohidratos, los cuales al ser inyectados en ratones sanos favorecen la respuesta inmune con un perfil T_H2 , ya que la inyección de antígenos solubles de éste parásito condujo a una alta producción de IgE total e IgG1 en los ratones, mientras que se produjeron bajos niveles de IgG2a¹⁶.

Los carbohidratos de los antígenos de *T. crassiceps* también tienen un papel crítico en la inducción o expresión de genes de macrófagos alternativamente activados; varios de estos genes de activación alternativa ya están bien identificados, como arginasa 1 (arg 1), una enzima hepática que metaboliza ornitina y urea a partir de arginina.¹⁶

También se sabe que la vía de señalización STAT-6 tiene un papel importante para el desarrollo de respuesta inmune T_H2 , ya que ésta media la señalización de IL-4/IL-13. Por ejemplo, ratones STAT6^{-/-} no montan respuesta inmune T_H2 significativa y controlan las cargas parasitarias después de la infección con *T. crassiceps*. Rodríguez-Sosa et al, encontraron que ratones STAT6^{+/+} tuvieron un incremento progresivo en el número de parásitos de su cavidad peritoneal conforme avanzaba el tiempo de infección, mientras que el grupo de ratones STAT6^{-/-} controló con éxito la infección en la semana 12 y sus células de bazo produjeron mayores niveles de IFN- γ que aquellas provenientes de ratones STAT6^{+/+}. En contraste, conforme la infección progresaba, las células de bazo provenientes de ratones STAT6^{+/+} que se estimularon in vitro con Ag. de *Taenia crassiceps* produjeron niveles significativamente mayores de IL-4 e IL-13 que los ratones STAT6^{-/-}, que produjeron niveles bajos de estas citocinas. Estos resultados demostraron que la vía

de señalización STAT6 está involucrada en la patogénesis de la infección con *Taenia crassiceps*⁴¹.

En esta investigación se comprobó que ratones resistentes a la infección montaron una fuerte respuesta T_H1 con niveles altos de IgG2a, IFN- γ e IL-17, e incrementos de la transcripción de TNF- α y óxido nítrico sintasa. Mientras que ratones hembra del mismo fondo genético, STAT6 -/- que recibieron L- NAME (nitro-D-arginina metil ester, un inhibidor de iNOS) montaron una respuesta inmune similar pero con baja transcripción de iNOS, por lo tanto con bajos niveles de óxido nítrico, éstos animales presentaron una carga parasitaria significativamente mayor. Lo que sugirió que los M ϕ clásicamente activados (M ϕ aC) y la producción de ON son mecanismos efectores que contribuyen a que el huésped sea resistente a la infección con *Taenia crassiceps*⁴¹.

Por otro lado, otro factor de transcripción como STAT4, que es una proteína de 89 kDa, que está implicado fundamentalmente en la vía de señalización de IL-12. A su vez, STAT4 es crucial para la producción de interferon - γ . Con el propósito de confirmar sus hallazgos previos, este mismo grupo de investigadores estudió el papel de ésta molécula en la cisticercosis experimental. Encontraron que los ratones STAT4 +/+ con un fondo genético C57BL/6 resolvieron rápidamente la infección, mientras que un grupo de ratones STAT4 -/- fueron muy susceptibles a la cisticercosis y mostraron grandes cargas parasitarias. Por otra parte, la incapacidad de los ratones STAT4 -/- de controlar la infección se asoció con la inducción de una respuesta antígeno-específica de tipo T_H2, caracterizado por niveles significativamente altos de inmunoglobulina G1 (IgG1) e IgE total, así como IL-4, IL-10 e IL-13; mientras que los ratones STAT4+/+ produjeron significativamente más interferón- γ . Por otra parte, poco después de la infección, los macrófagos provenientes de ratones STAT4 -/- produjeron niveles más bajos de citocinas pro inflamatorias como IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , y ON que aquellos provenientes de ratones STAT4+/+, lo que apoyó la hipótesis del papel fundamental de los M ϕ en la mediación de la protección contra la cisticercosis experimental. En conjunto éstos resultados demostraron que la vía de señalización STAT4 tiene un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune tipo T_H1,

que es esencial para mediar la protección contra la fase larvaria de *Taenia crassiceps*^{1, 42}.

El fondo genético del huésped también influye en como se desarrollan las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, en infección por *Leishmania major*, los ratones C57BL/6 montan una fuerte respuesta T_{H1} y resuelven la infección. En contraste, ratones BALB/c montan una respuesta inmune de tipo T_{H2} y desarrollan lesiones crónicas. En otras infecciones por protozoarios, por ejemplo *Toxoplasma gondii*, los ratones de la cepa C57BL/6 sucumben ante la infección a pesar de presentar una respuesta inmune de tipo T_{H1}, mientras que los ratones BALB/c mostraron resistencia y sobreviven por un largo periodo de tiempo³⁸.

En infecciones por helmintos, el fondo genético del huésped también tiene un papel importante en el desarrollo de la infección. Por ejemplo en cisticercosis experimental causada por *Taenia crassiceps* la respuesta inmune en ratones BALB/c inicialmente es de tipo T_{H1} pero después de 3 o 4 semanas se polariza hacia una respuesta inmune de tipo T_{H2}³⁸. La resistencia a este parásito se ha asociado con una temprana respuesta tipo TH1, así como con el fondo genético (Sciutto 1991- 1995, Terrazas 1998). Estos ratones BALB/c (MHC haplotipo H2^d) son susceptibles a la infección, mientras que los C57BL/6 (MHC haplotipo H2^b) son relativamente resistentes a la infección con *T. crassiceps*. Por lo que el mecanismo inmunológico asociado con las diferencias en la susceptibilidad a *T. crassiceps* no esta claramente definido³⁸. En nuestro grupo de trabajo se analizó la expresión de diferentes genes de activación alternativa en macrófagos de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *Taenia crassiceps* a las semanas 2, 4 y 8 post-infección. A la semana 2 post-infección los macrófagos provenientes de ratones BALB/c tuvieron una regulación a la alta de genes codificadores de proteínas que son asociadas con activación alternativa, tales como Arg-1, RELM- α , Ym-1 y TREM-2. Así como una débil expresión de iNOS. Sin embargo, conforme progreso la infección se observaron cambios en estos marcadores, mientras que el gen de Ym-1 disminuyo para la semana 8 post-infección, y la expresión de Arg-1 se mantuvo sin cambios en las semanas 4 y 8; la transcripción de RELM- α y TREM-2 fue mayor para la semana 8 post-infección en macrófagos de ratones BALB/c infectados con *Taenia crassiceps*, en contraste, la transcripción de iNOS que fue inhibida. En el grupo de animales

C57BL/6 la expresión de Arg-1 y TREM-2 fue débil en tiempos tempranos post-infección, así como incremento en la transcripción de iNOS. La expresión de iNOS fue sostenida hasta la semana 4, y la expresión de Arg-1, TREM-2 y RELM- α fueron reguladas a la baja conforme progreso la infección en esta cepa de ratones. Adicionalmente, los macrófagos aislados de ratones C57BL/6 expresaron niveles similares de mRNA para citocinas pro-inflamatorias como TNF- α y MIF a lo largo de toda la infección comparados con los macrófagos provenientes de ratones BALB/c, sin embargo, los genes transcriptores para IFN- γ estuvieron elevados en la semana 8 post-infección, en los ratone C57BL/6. El hecho de que para semana 8 post-infección, los macrófagos provenientes de ratones C57BL/6 expresaron un claro perfil pro-inflamatorio, mientras que los macrófagos de ratones BALB/c expresaron transcripción mixta de activación alternativa y marcadores proinflamatorios. (Terrazas et. Al 2009) ³⁸.

Macrófagos (M ϕ)

Los M ϕ son una de las poblaciones más ampliamente distribuidas del sistema inmune, presentes en todos los tejidos del cuerpo, son efectores en la inmunidad innata y están involucrados en el inicio y regulación de la respuesta adquirida; están implicados en diversos procesos patogénicos. Tienen funciones homeostáticas que incluyen reparación, modelación y angiogénesis de los tejidos; proveen protección al poner en marcha mecanismos inmunes innatos e iniciar el desarrollo de respuestas inmunes específicas a través de fagocitosis, reconocimiento y presentación de antígenos, la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas ^{15, 32}.

Los M ϕ tienen un papel central en la respuesta a las infecciones. La generación de metabolitos como los metabolitos de oxígeno y nitrógeno, permite atribuirle a estas células una potente actividad microbicida. Concomitantemente, es necesario que se disparen mecanismos de control que les permitan evitar la excesiva activación del sistema inmune cada vez que el organismo enfrente a un antígeno extraño ^{39, 46}.

En la respuesta inmune se atribuye a los M ϕ las siguientes funciones. Primero son detectores de patógenos a través de los PRRs tales como los receptores tipo Toll y

las lectinas tipo C; son células presentadoras de antígeno en el inicio de la respuesta inmune del huésped; participan como células efectoras directamente en la muerte del patógeno, como cuarta función participan como células reguladoras y supresoras en infecciones parasitarias y tumores del huésped ³⁹.

Los M ϕ pueden estar involucrados en respuestas pro y antiinflamatorias, en destrucción de tejidos, así como en actividades de restauración. Hay evidencias que sugieren que los macrófagos activados en ambiente T_H2 tienen como función primaria la reparación de tejidos. Esta hipótesis fue bien aceptada ya que se conoce a la prolina, producida por macrófagos alternativamente activados (M ϕ aA) como un importante precursor de colágena y poliaminas que están involucradas en la proliferación celular ²⁶.

Macrófago activado. Describe cambios intrínsecos en la resistencia y capacidades fagocíticas y digestivas ¹⁴. Señales encontrados por los M ϕ durante su desarrollo y migración determinan sus propiedades funcionales en sitios de inflamación e infección. Las características de los macrófagos activados incluyen cambios en la membrana plasmática como cambios en el contenido de colesterol, de fosfodiesterasa alcalina 1 y disminución de la 5'-nucleotidasa; con incremento de adherirse a objetos de vidrio y plástico, en la fagocitosis y en la pinocitosis, y, por ende, en el número de fagolisosomas y vesículas endocíticas. Tienen la capacidad de reconocer y destruir células singénicas neoplásicas. Además, en respuesta a la inflamación o a la infección microbiana *in vivo*, o a linfocinas *in Vitro*, secretan altas cantidades de proteinasas neutras, que incluyen el activador de plasminógeno, elastasa y colagenasa, presentan un incremento en las actividades de las hidrolasas ácidas y un alto consumo de oxígeno durante la fagocitosis ^{15, 1}.

◆ **Activación clásica del macrófago (M1; M ϕ aC).** Este tipo de activación es Inducida por exposición a IFN γ , TNF- α o inductores de este tales como ligandos de los receptores tipo Toll (TLR), LPS, peptidoglicanos y señales endógenas (de HSP de 60 y 70 kDa) ⁴⁶.

◆ Los M ϕ aC tienen la capacidad de detonar mecanismos efectoras: muerte de parásitos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción

de IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF α , CCL3, CXL9, CXCL10, generación de óxido nítrico, cambios fagolisosomales y aumento en la expresión de MHC-II, CD86 y de la presentación antigénica asociada con células T_H1^{3, 14}. Una de las características principales de estas células es la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que actúa sobre la L-arginina produciendo óxido nítrico (ON) y citrulina. La iNOS es inducida en macrófagos a través de citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-12^{15, 26, 30, 46}.

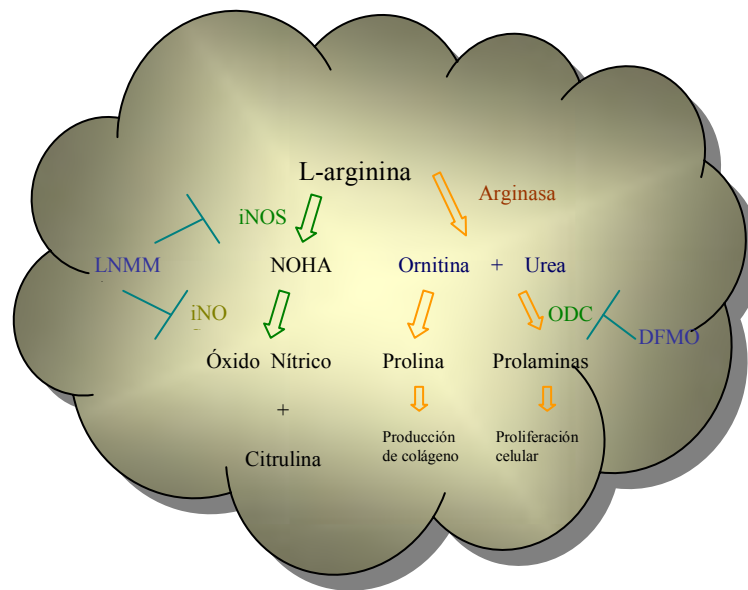


Fig. 7 Metabolismo de L-arginina en Macrófagos. LNMM: N-G-metil-arginina, DFMO: di-fluor-metil ornitina, ODC: ornitina descarboxilasa, NOHA: NG-hidroxi- L-arginina.

La arginina puede ser metabolizada por dos vías diferentes. Por un lado, es oxidada por la enzima iNOS, inducida por citocinas pro-inflamatorias, para generar óxido nítrico (ON) y citrulina. Durante este proceso se genera un compuesto intermediario NG-hidroxi-L-arginina (NOHA), que es un potente inhibidor de la arginasa. Por otra parte, L-arginina puede también ser hidrolizada a urea y ornitina a través de la acción de la enzima arginasa. Existen dos isoformas de esta enzima en células de mamíferos; arginasa I, citosólica inducida por citocinas T_H2 en M ϕ , mientras que arginasa II es mitocondrial y se expresa de manera constitutiva. Luego, por la acción de ornitina descarboxilasa (ODC), la ornitina es transformada a poliaminas

(putrescina, espermidina y espermita). Estas últimas son aminas de bajo peso molecular, cuya función está relacionada a la proliferación y división celular. Por otra parte la prolina producida a partir de la ornitina es un componente clave para la síntesis de colágena^{30, 46}.

Criterios funcionales y bioquímicos de los MøaC. Estas células muestran un incremento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y de moléculas co-estimuladoras, tienen mayor capacidad para presentar antígenos y para eliminar patógenos intracelulares. Presentan incremento en la producción de especies tóxicas del oxígeno. En este contexto, el ON actúa como una molécula efectora citotóxica del sistema inmune⁴⁶.

◆ **Activación alternativa del macrófago (M2; MøaA).** Se propuso como nombre genérico para formas alternativas de activación que, además, comparten propiedades funcionales generalmente involucradas en respuestas tipo Th2, como inmunoregulación y remodelación de tejidos. Los MøaA son inducidos por IL-4 e IL-13; por la exposición a complejos inmunes y agonistas de los TLRs. IL-10 y glucocorticoides, algunos autores consideran que TGF- β es activador alternativo de este fenotipo. Además, los MøaA en condiciones normales (individuos sanos), han sido identificados en tejidos en los cuales es necesario evitar la inflamación, como pulmón y placenta^{3, 39}.

◆ Los macrófagos M2 tienen propiedades anti-inflamatorias, inhiben la producción de IFN- γ , antagonizan las respuestas a ésta incluida la activación de M1 y son inducidos por IL-4 e IL-13, participan en alergias y se reclutan ante infecciones por parásitos^{15, 26}.

En respuesta a la inducción de la enzima arginasa, éstos Mø producen urea y ornitina y luego poliaminas y prolina (Fig. 5). Estos Mø exhiben una gran capacidad de endocitosis y fagocitosis. La actividad supresora de estos Mø alcanza a células T activadas por mitógenos, las cuales muestran una respuesta proliferativa y secretoria significativamente disminuida en presencia de MøaA. Las citocinas características producidas por estos MøaA son la IL-10, el receptor antagonista del IL-1 (IL-1RA) y TGF- β ^{30, 46}.

En Mø tratados con IL- 4, frecuentemente incrementan la expresión de genes que codifican para la citocina secretoria Ym1 y para arginasa. Los MøA producen altos niveles de fibronectina y proteínas asociadas a la matriz extracelular, la formación de colágena y la reparación de tejidos (Fig. 5). Además, la producción de citocinas antiinflamatorias podría frenar el proceso inflamatorio inducido por los MøaC^{30, 46}.

Papel de los MøaA en la infección por helmintos.

Céstodos.

Taenia crassiceps.

Al inicio de la infección intraperitoneal (i.p) con *Taenia crassiceps* el huésped presenta una rápida pero transitoria respuesta inmune T_H1, la cual cambia a un tipo de respuesta T_H2, seguida de una respuesta mixta T_H/T_H2. Conforme esto sucede los Mø reclutados en la cavidad peritoneal cambian con el progreso de la infección ya que durante la infección aguda producen niveles altos de IL-12 y ON, paralelamente presentan niveles bajos de IL-6 y tienen la habilidad de inducir proliferación de células T CD4+ antígeno específicas. En contraste, los Mø, durante la infección crónica producen patrones diferentes de citocinas y quimiocinas, asociadas con una pobre habilidad de inducir proliferación de células T CD4+ antígeno específicas³⁹.

Los Mø reclutados de la cavidad peritoneal durante la infección con *Taenia crassiceps* presentaron aumento en la expresión de genes de MR, lectinas tipo C (mMGL 1 y mMGL 2), Arg-1, Fizz1, Ym1 y TREM-2 confirmando que estos Mø son alternativamente activados³⁹. Posteriormente se demostró que estos macrófagos tienen actividad supresora sobre linfocitos T activados, la cual fu contacto-dependiente y las moléculas involucradas fueron PD-L1 y PD-L2⁴⁵.

Echinococcus multilocularis.

Al igual que en el modelo de *T. crassiceps* se presenta una respuesta transitoria de tipo T_H1, pero progresa a un tipo de respuesta T_H2. Los Mø parecen desempeñar un papel en la interface huésped- parásito. Los parásitos aislados de la cavidad peritoneal a las 6 semanas p.i tuvieron una reducción significativa en la respuesta de células T aún con antígenos no relacionados (péptidos OVA), en comparación con Mø de la cavidad peritoneal de ratones no tratados previamente. Estos Mø inducidos por *E. multilocularis* suprimen la proliferación de linfocitos en forma contacto dependiente, cuando son estimulados con Con-A, aunque los datos anteriores sugieren que factores solubles (NO) participaron en la baja respuesta proliferativa durante la infección con *echinococcosis*³⁹.

Hymenolepis diminuta.

En ratones infectados con *H. diminuta* se producen IL-10, TGF-β e IL-4. Por RT-PCR se detectaron marcadores de membrana celular en Mø en el día 8 post-infección para establecer si los Mø de intestino de ratones infectados con *H. diminuta* eran del grupo de MøaA. Aunque la actividad de regulación no ha sido probada, los autores correlacionaron la aparición de MøaA con el momento de la expulsión del gusano; lo que sugiere que los MøaA podrían participar en la protección contra la infección por este cestodo³⁹

Cabe hacer notar que los MøaA han sido identificados en forma consistente durante las infecciones con las tres clases de helmintos parásitos. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que la inducción de MøaA es una característica común en la infección por helmintos³⁹.

Nemátodos.

Brugia malayi.

En el modelo de infección con *B. malayi* se induce un alto número de Mø F4/80+ junto con una respuesta T_H2 a lo largo de la infección. Cuando los Mø peritoneales

aislados por adhesión fueron co-cultivados con antígeno específico se observó una inhibición de la respuesta proliferativa. Estos Mø mostraron alta actividad de Arg-1 en lugar de actividad de iNOS. Otros estudios realizados por el mismo grupo de investigadores mostró una regulación a la alta de estos Mø, con expresión de otros dos genes como Fizz 1 y Ym1 y fueron considerados desde entonces como marcadores para MøaA en varias infecciones por nemátodos. Del mismo modo el incremento en la producción de IL-10 y TGF-β se asoció con MøaA. Se determinó que esta actividad inhibitoria y la expresión de genes eran IL-4 dependientes, dado que los ratones que carecen de IL-4 fueron incapaces de producir MøaA, mientras que los ratones IL-10 ^{-/-} presentaron ambos,. En este tipo específico de infección los MøaA fueron nombrados NeMø, éstos tienen habilidad de suprimir la proliferación de células T ya que se encontró que la respuesta es contacto dependiente y parcialmente dependiente de TGF-β. Sin embargo, las moléculas involucradas en el contacto células-célula no fueron definidos. No obstante se considera que estos NeMø inducidos por *B. malayi* tienen un papel anti-inflamatorio en el sitio de infección ³⁹.

Litomosoides sigmodontis.

Se conoce que la infección por *L. sigmodontis* induce MøaA F4/80+ (NeMø) donde Fizz1 y Ym1 son regulados a la alta en los sitios de migración del parásito. De forma similar que en la infección por *B. malayi* la actividad supresora es macrófago-dependiente y presentaron el patrón similar de expresión de Arg-1, Fizz1 y Ym1.. La actividad supresora de NeMø inducidos por *L. sigmodontis* fue contacto dependiente y se asoció mínimamente con TGF-β. En contraste, el bloqueo del receptor de IL-10 y CTLA-4 no tuvo ningún efecto en la actividad supresora de NeMø. Los NeMø se encuentran con frecuencia cerca del parásito, también aparecen diseminados en el nodo linfático (LN) solo cuando la filaremia aparece en la cavidad pleural. No se conoce otro papel funcional de los MøaA en la filarías, pero es evidente que poseen actividad supresora ³⁹.

Nippostrongylus brasiliensis.

La infección es inducida subcutáneamente y el parásito maduro migra hacia los pulmones donde *N. brasiliensis* induce una fuerte respuesta T_H2 en pulmones y nódulos linfáticos asociados a ellos. Además los altos niveles de IL-4 e IL-13, se encontró que otros genes fueron altamente expresados en pulmones de ratones infectados, como Fizz1 y Ym1, sugiriendo la presencia de M ϕ aA. Este conjunto de marcadores de M ϕ aA recientemente se asoció con la expresión de IL-21R durante la infección con *N. brasiliensis*; se demostró que este receptor aumenta la actividad de los M ϕ aA principalmente por incremento en la expresión de IL-4R α e IL-13R α . Además, la fibrosis pulmonar causada por la infección por *N. brasiliensis* se asoció con la presencia de M ϕ aA, dado que los ratones que carecen IL-21R indujeron menos M ϕ aA y por lo tanto la fibrosis pulmonar se redujo. Por lo tanto, una fuerte respuesta Th2, junto con la presencia de M ϕ aA está asociada con la patología observada en los pulmones de *N. brasiliensis* de ratones infectados. En contraste, otras observaciones recientes indican que los M ϕ aA expresan Arg-1, Ym1, Fizz1 y RM, pueden ser inducidos en los pulmones en la ausencia de células T CD4 en respuesta a la infección *N. brasiliensis*. En este estudio se detectaron in situ (pulmones) M ϕ aA GSL-1+ a los 4 días post-infección (pi) en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) o silvestres. Sin embargo, estas poblaciones se mantuvieron justo después de 8 días post-infección en los ratones silvestres, los cuales mostraron una resolución muy rápida tanto de los daños mecánicos y la inflamación causada por la *N. brasiliensis*. Por el contrario, la inflamación y el daño en pulmones de los ratones SCID persistió después de 8 días p.i. En base a estos resultados, se lograron dos conclusiones importantes. En primer lugar, los M ϕ aA se pueden presentar en las respuestas inmunitarias innatas, cuando no hay respuesta T_H2 concreta, lo que sugiere que *N. brasiliensis* puede inducir directamente M ϕ Aa o que una de las primeras fuentes de IL-4 es a partir de células innatas (por ejemplo, los mastocitos y células NK) que pueden ser suficientes para inducir M ϕ aA. En segundo lugar, los M ϕ aA también pueden desempeñar un papel como células reguladoras, al evitar la inflamación pulmonar excesiva así como la función de remodelación. Un informe más reciente demostró que la inducción M ϕ aA durante la infección por *N. brasiliensis* depende estrictamente de la vía de señalización STAT-6. En conjunto, estos resultados

implican una clara dependencia de IL-4/IL-13 para que los MφaA migren durante infección con este nemátodo ³⁹

Heligmosomoides polygyrus.

Los ratones adquieren al parásito en fase de larva y 36 horas después éstas migran al intestino delgado, donde pueden penetrar la mucosa e invaden la capa muscular interna donde se enquistan. *H. polygyrus* desencadena una respuesta polarizada hacia un tipo T_H2 y puede inducir infecciones crónicas. Si se eliminan los parásitos después de una infección primaria el huésped tiene memoria contra una reinfección. Como se observa en *B. malayi*, *L. sigmodontis* y las infecciones de *N. brasiliensis*, estos MφaA eran escasos en ratones STAT6 -/- e IL-4 -/- que mostraron mayores cargas de parásitos y huevos. Sorprendentemente, éstos datos sugieren, por primera vez, un papel de protección de los MφaA en una infección por helmintos, además de la clásica participación de eosinófilos. Como se mencionó anteriormente, la actividad arginasa es una característica de los MφaA. En este estudio, cuando la arginasa fue bloqueada químicamente en ratones resistentes, se observó mayor una recuperación de larvas, lo que sugiere un papel para arginasa en las respuestas de acogida y protección contra la fase intestinal de *H. polygyrus*. Se concluyó que la arginasa no desempeña ningún papel en las respuestas de protección en enfermedades infecciosas ³⁹

Tremátodos.

Schistosoma mansoni.

A principios de los años 90, el grupo de Stadecker descubrió que los macrófagos aislados de granulomas hepáticos de ratones infectados con *S. mansoni* fueron capaces de anergizar las respuestas de células T ante estímulos específicos y policlonales. Los Granulomas de esquistosomiasis presentaron un crecimiento máximo 7 u 8 semanas después de la infección, tiempo en el que el huésped ha desarrollado una fuerte respuesta T_H2. El grupo de Stadecker también encontró que la actividad supresora de la IL-2 fue reversible y demostró que estos macrófagos fueron capaces de conducir las respuestas T_H2. No obstante, los mecanismos que

participan en la respuesta T_{H2} y las actividades supresoras fueron indefinidos. Estos macrófagos aislados de granulomas hepáticos no se han definido como $M\phi A$ en ese tiempo. Estos macrófagos supresores también se determinaron que son $M\phi A$. Por otra parte, los ratones que carecen de la cadena IL-4R α específicamente en sus macrófagos (LysMCreIL - Ratones 4R α -/-) sucumbieron a la esquistosomiasis aguda. Este resultado se asoció con el deterioro de la capacidad de los ratones LysMCreIL-4R α -/- de reclutar $M\phi A$ al granuloma a pesar de tener una respuesta tipo T_{H2} normal en otros tejidos. En contraste, un elevado número de CAM ϕ se detectaron en los granulomas hepáticos de estos ratones. Por lo tanto, la inducción de $M\phi A$ dependiente de IL-4/IL-13 fue esencial para evitar los daños inmuno patológicos y para sobrevivir a la esquistosomiasis aguda ³⁹.

Fasciola hepática.

Al igual que otros helmintos, *F. hepática* induce respuesta de tipo Th2. Recientemente se ha informado, la inducción de marcadores de $M\phi A$ en las primeras etapas de la infección. Esta inducción puede ser imitada en ratones mediante la inyección de productos de excreción/secreción de *F. hepática*.

Actualmente, la presencia de macrófagos alternativamente activados se considera otra característica de las infecciones por helmintos y su acción parece ser diversa; y dependiendo del parásito de que se trate es la función de este tipo de macrófagos. Por otro lado, el hecho de que factores solubles ya sea extraído, liberado o excretado por este tipo de parásitos parecen inducir también la aparición de esta población de macrófagos. Dentro de estos productos de excreción/secreción de los helmintos las moléculas ricas en carbohidratos han acaparado la atención de los investigadores dado que se han detectado que pueden alterar el desarrollo de una respuesta inmune. Sin embargo, los receptores para tales moléculas glucosiladas no han sido claramente identificados, ni tampoco se ha estudiado si la ausencia de algún receptor que pudiera reconocerlas podría afectar el desarrollo de una infección. Por lo tanto en este trabajo se hizo una primera investigación en el posible papel de un CLR en la respuesta inmune y susceptibilidad a un helminto.

Helmintos que inducen MøaA.

Parásito	Incremento de la expresión de marcadores de MøaA	Función de las APC	Actividad supresora
Nemátodo			
<i>Brugia malayi</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1	Habilidad de polarización T _H 2	Si (TGF/ β contacto dependiente /parcialmente dependiente.
<i>Litomosoides sigmodontis</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1	Desconocido	Si (contacto dependiente/TGF- β
<i>Nippostrongylus brasiliensis.</i>	Fizz1, Fizz2, Ym1, Arg-1, MMR, AMCase IL-21R	Desconocido	Desconocido
<i>Heligmosomoides polygirus</i>	Fizz1, Ym1, MR, AMCase, IL-4R	Desconocido	Desconocido

Tremátodos			
<i>Schistosoma mansoni</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1 AMCase, MR, IL-21R	Habilidad de polarización T _H 2	Si (PD/PDL1 dependiente)
<i>Fasciola hepática</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1	Desconocido	Desconocido.

Cestodos			
<i>Taenia crassiceps</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1, MR, 12/15 LOX, mMGL, CD23, CCR5, OX40L, SLAM, TREM2.	Habilidad de polarización T _H 2	Si (PD1- PDL dependiente y ROS parcialmente dependiente.
<i>Hymenolepis diminuta.</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1	Desconocido	Desconocido
<i>Echonicoccus multilocularis</i>	Fizz1, Ym1, Arg-1 ND	Desconocido	Desconocido

Tabla 2. Tomado de referencia 39.

JUSTIFICACIÓN

Dado la estructura compleja de las glicoproteínas, es importante estudiar a las lectinas. Hay antecedentes acerca del receptor de manosa (MR), que es un tipo de lectina tipo C, estructuralmente es una glicoproteína presente en la superficie de las células de algunos microorganismos patógenos (*Schistosoma mansoni*) mediando la opsonización directamente o por medio de la activación del complemento por la vía de las lectinas. Ratones deficientes en MR no sufren modificación de la susceptibilidad a éste parásito.

Debido a que no existen estudios sobre la posible modificación inmunológica ni susceptibilidad a la infección parasitaria relacionados con la molécula mMGL; recientemente el Consortium for Functional Glycomics (USA) desarrollo ratones deficientes en la molécula mMGL (mMGL $-/-$), en ratones de fondo genético C57 BL/6. En este contexto, los animales mMGL $-/-$ pueden ser útiles para entender la interacción entre ésta molécula y los carbohidratos Lewis X del cestodo *T. crassiceps*.

Por lo mencionado, creció nuestro interés en conocer el papel de la interacción de la molécula mMGL del huésped; con los carbohidratos Lewis X del cestodo *T. crassiceps* y el desarrollo de la respuesta inmune y susceptibilidad a este parásito; y decidimos utilizar a los animales mMGL $-/-$, que tuvieron una reproducción normal y sin problemas inmunológicos.

HIPÓTESIS.

Debido a que los carbohidratos son relevantes para el reconocimiento de los parásitos por las células de la inmunidad innata; la deficiencia de la molécula mMGL-1 que reconoce algunos de ellos, ocasionará que las células no se activen en forma correcta; por lo tanto los ratones deficientes para esta molécula serán más susceptibles a la infección por *Taenia crassiceps* y la respuesta inmune será permisiva para el crecimiento del parásito.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel que desempeña la molécula mMGL-1 (receptor de galactosa/N-acetilgalactosamina) en la respuesta inmune y susceptibilidad al céstodo *Taenia crassiceps*.

Objetivos particulares

1.- Caracterizar el desarrollo de la infección con *Taenia crassiceps* y la respuesta inmune asociada a esta infección en ratones relativamente resistentes mMGL +/+ y en aquellos deficientes en la molécula mMGL -/-; ambos grupos con fondo genético C57BL/6.

2.- Definir el papel de los macrófagos en la respuesta al parásito en el posible efecto de mMGL sobre el desarrollo de la infección.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

RATONES. Se utilizaron ratones hembra de 6 – 8 semanas de edad, genéticamente deficientes en el receptor mMGL1 (mMGL -/-) con un fondo genético C57BL/6. Estos animales nos fueron donados por el Consortium for Functional Glycomics (USA). Como controles se utilizaron ratones C57BL/6 silvestres (mMGL +/+) de la misma edad y género (Harlan, México). Además se infectó también un grupo de ratones BALB/c silvestres (mMGL +/+) del mismo género y rango de edad. Los ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el bioterio de la FES – Iztacala de acuerdo con las normas institucionales y nacionales.

Taenia crassiceps. Se infectó con metacestodos de *T. crassiceps*, cepa ORF. De aproximadamente 2 mm de diámetro, sin gemaciones

GENOTIPIFICACIÓN. Todos Los animales fueron genotipados para determinar la ausencia del gen mMGL por PCR.

Obtención de la muestra: Se cortaron aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de los ratones mMGL -/- y silvestres, y se llevó a cabo la digestión de éstas en tubos Eppendorf de 1.8 ml previamente identificados, en la que se colocó el tejido con 500 µl de Amortiguador de lisis y 20 µl de proteinasa K (100 µg por muestra) la cual se dejó durante toda la noche en un incubador a 55 °C.

Obtención del DNA: Una vez digerida la cola se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se pasó a otros tubos Eppendorf a los que se les agregaron 500 µl de isopropanol frío, se homogéneos invirtiéndolos de manera suave hasta que la precipitación del DNA fue evidente. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 1 minuto; para concentrar el precipitado y se decantó la fase líquida para después lavar el botón de DNA con etanol frío al 75% en el mismo tubo, se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos; se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por lo menos 1 hora.

Una vez seco el botón de DNA se resuspendió en el tubo con 200 µl de agua grado biología molecular, para nuevamente incubarlo toda la noche a 55 °C.

PCR: Para la amplificación del gen de mMGL se utilizaron los siguientes primers específicos.

mMGL (F) CTTGGTCCCAGATCCGTATC
mMGL (R) ATGTCATGACTCAGGATC

El producto esperado de amplificación para mMGL es de 633 pb.

Para amplificar el gen de selección Neomicina (NEO) se utilizaron los siguientes primers específicos:

NEO (U) 5´AGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG3´
NEO (D) 5´AAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG3´

El producto esperado de amplificación NEO es de 492 pb

Modelo experimental. Se indujo la infección por ratón, a través de la inyección intraperitoneal de 25 metacéstodos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro y sin gemaciones, suspendidos en aproximadamente 1 ml de solución fisiológica, Este procedimiento se llevó a cabo en los 3 grupos de ratones.

Se realizó una segunda ronda de experimentos induciendo la infección a través de la inyección intraperitoneal con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, por ratón, de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro suspendidos en aproximadamente 1 ml de solución fisiológica.

Se sangró a los ratones al tiempo cero (sanos) y a las 2, 4 y 8 semanas post-infección. Para la obtención de la muestra se realizó una pequeña incisión en el tercio proximal de la cola de los ratones, se colectó la sangre en un tubo ependorf de 1.5 ml y se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 minutos; posteriormente se separó el suero y se congeló hasta su uso.

Obtención de células de peritoneo: Los ratones se sacrificaron con cámara de CO₂. Inmediatamente se les inyectó 10 ml de solución salina estéril intraperitonealmente, recibieron en el abdomen un ligero masaje para despegar los macrófagos del peritoneo, se les hizo una pequeña incisión en la piel y la disección de la misma sin romper el peritoneo, se hizo una pequeña incisión en el peritoneo, teniendo cuidado de no dañar las vísceras; y se colectó el líquido que contenía las células peritoneales y los parásitos el cual se colectó en tubos Falcón de 50 ml, previa rotulación de los mismos. Se dejó reposar los tubos Falcón hasta que sedimentaron los parásitos y se extrajo el sobrenadante que contenía las células peritoneales, se colocó el líquido con las células en tubos Falcón de 50 ml, los cuales se mantuvieron el hielo para la mejor conservación de las células.

A los parásitos se les agregó solución salina estéril hasta cubrirlos, para su posterior conteo.

Los tubos que contenían las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular, se agregaron 3 ml de solución hemolizante de Boyle, se dejó actuar durante 10 minutos, se agregaron 10 ml de solución fisiológica estéril para detener la reacción, se centrifugaron nuevamente los tubos a 2500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla celular y se agregó 1 ml de medio de cultivo DMEM [(DMEM/HIGH GLUCOSE) + 4.00 mM L – glutamine, + 4500 mg/L glucose, + Sodium Pyruvate]. Los tubos se pusieron en hielo e inmediatamente se procedió a contar las células poniéndolas en cámara de Neubauer previamente se puso una muestra de 10 µl con 10 µl de azul tripano. Se ajustaron las células a 1 millón por mililitro y fueron sembradas 500 mil células por pozo en placas de cultivo de fondo plano, de 24 pozos, 4 pozos por ratón; se colocaron las placas de cultivo en incubadora de CO₂ durante 2 horas A 37 °C.

Transcurridas las 2 horas se procedió a lavar los macrófagos con solución salina estéril, 2 veces y se estimuló a los macrófagos con IFN-γ + LPS.

Estímulo de macrófagos: Para cada grupo de ratones (BALB/c, mMGL +/- y mMGL -/-) se prepararon los siguientes estímulos y a cada uno de los 4 pozos de cada grupo de se les estimuló como se cita a continuación:

- ◆ DMEM
- ◆ IFN-γ (20ng/ml)
- ◆ LPS (2.5 µg/ml)
- ◆ IFN-γ (20 ng/ml) + (LPS 2.5 µg/ml)

Las células se mantuvieron en contacto con los estímulos incubándose a 37° C (CO₂ 5%) por 24 horas después de las cuales se colectaron los sobrenadantes para la medición de citocinas por la técnica de ELISA y se procedió a lisar las células adheridas con 500 µl de trizol 1 X 10⁶ células, los cuales se recolectaron y se guardaron a -20° C hasta la obtención del RNA.

Obtención de linfocitos de bazo: Se realizó esplenectomía total y se obtuvieron las células por filtración, con solución salina estéril. Las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos; se tiró el sobrenadante y resuspendió la pastilla celular, se agregaron 3 ml de solución hemolizante de Boyle y se dejó actuar durante 10 minutos, se agregaron 8 ml de solución fisiológica estéril para detener la reacción y se centrifugaron 2500 rpm durante 10 minutos, se tiró el sobrenadante y resuspendió la pastilla celular, después se agregó 1 ml de medio de cultivo DMEM.

Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y se ajustó a 5×10^6 células por mililitro. Se sembraron las células en placas de 96 pozos y se dejó actuar durante 72 horas. Se colectó el sobrenadante celular para la determinación de citocinas por la técnica de ELISA.

Estímulo de linfocitos. Para cada grupo de ratones (BALB/c mMGL +/+ y mMGL -/-) se prepararon los siguientes estímulos y a cada uno de ellos se les agregó como se menciona a continuación:

- DMEM solo.
- Anti CD-3 (1 μ g/ml).
- Antígeno de *T. crassiceps* (50 μ g/ml).

Preparación y cuantificación de antígeno.

Se usaron ratones con 2 a 4 meses de infección intraperitoneal con metacestodos de *T. crassiceps*. En condiciones de esterilidad, se recuperaron los parásitos de la cavidad peritoneal y se lavaron con solución salina. Se homogeneizó usando un sonicador (Polytron Kinermatica) y en presencia de inhibidores de proteasas. Se recuperó el molido y se centrifugo en una ultracentrífuga (SORVALL ULTRA PRO 80) a 20 000xg, durante 30 minutos a 4^o C. Posteriormente se cuantificó con el método de Lowry, con curva estándar de albúmina. Se colectó y congeló a -70°C hasta su uso.

Determinación de citocinas por el método de ELISA sándwich.

Por la técnica de ELISA sándwich, se realizó la medición de citocinas en sobrenadante de macrófagos 24 horas después de haber sido estimulados; esto en los tres grupos de ratones.

Sensibilización de la placa. Se diluyeron 2 µg/ml de anticuerpo de captura en 10 ml de amortiguador de pegado, se homogeneizó y se colocaron 100 µl pozo utilizando una micropipeta multicanal (Finnipipette) en una placa para ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp). Para llevar a cabo la reacción de pegado del anticuerpo a la placa, esta última se cubrió con papel aluminio y se incubó a 4 °C toda la noche.

Muestras y curva. Al día siguiente se lavó la placa con la solución de lavado y se secó, se bloqueó con 200 µl de solución de bloqueo durante 2 horas, posteriormente se lavó y se secó. Se añadieron 100 µl de sobrenadante de cultivo celular por pozo; para poder explorar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la citocina recombinante correspondiente, con diluciones al doble solución de bloqueo para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras líneas de cada placa. Se incubó la placa toda la noche a 4°C.

Revelado de la placa. Se lavó y secó la placa, posteriormente se adicionó el anticuerpo marcado con biotina en un volumen de 100 μ l (1 μ g/ml) en solución de bloqueo, se incubó durante una hora a 37°C, terminado el tiempo de incubación se lavó. Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima estreptoavidina peroxidada (Amersham Biosciences) y se colocaron 100 μ l dejando incubar por 35 minutos a temperatura ambiente. Se lavó por ultima vez, se preparó la solución de sustrato (100 μ l de H₂O₂ al 3 % (J: T. Baker) en 10 ml de ABTS) y se colocaron 100 μ l por pozo, se incubó 10 minutos y se obtuvo la absorbancia en un lector de placas (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent) utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

Determinación de IgE en suero.

Se utilizó el kit: 1-877-BioLegend (246-5343). Se diluyó el anticuerpo de captura en amortiguador de pegado (8.4 g NaHCO₃, 3.56 G Na₂CO₃, agregar H₂O 1.0 L; a un pH 9.5); se agregaron 100 μ l/pozo en placas Maxi-Sorp Nunc de 96 pozos Cat. No. 442404. Se dejó incubar a 2 – 8°C durante 2 horas a 37°C. Se lavó 4 veces en amortiguador de lavado (PBS-Tween 20 al 0.05%) Para el bloque no específico y reducir el fondo se agregó 200 μ l del diluyente (PBS + BSA 1%); se cubrió la placa y se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa 4 veces en amortiguador de lavado.

Mientras que la bloqueó, se prepararon las diluciones de muestras, así que los estándares y las muestras se pueden añadir a los pozos en rápida sucesión. Se añadió 100 μ l / pozo de standards y muestras a la placa. Se realizaron seis diluciones seriadas doble del 10 ng / ml. Así, las concentraciones de IgE son de 10 ng / ml, 5 ng / ml, 2,5 ng / ml, 1,25 ng / ml, 0.625 ng / ml, 0,312 ng / ml y 0,156 ng / ml. El diluyente de la Prueba sirve como el estándar cero (0 ng / ml). Se cubrió la placa e incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación.

Se lavó la placa 4 veces con amortiguador de lavado. Se agregaron 100 μ l de anticuerpo de detección en cada pozo. Se cubrió la placa y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, con movimiento. Se lavó 4 veces con amortiguador de

lavado. Se agregaron 100 µl de Av-HRP (BioLegend's TMB) diluido. Se cubrió la placa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se lavó la placa 5 veces con amortiguador de lavado, dejando la placa en contacto con el amortiguador durante 30 segundos. Se agregó 100 µl/pozo de substrato TMB, se incubó durante 15 minutos en ambiente oscuro. Se agregaron 100 µl /pozo de de solución de parado (2N H₂SO₄). Se realizó la lectura en el lector de elisas Thermo Labsystems Multiskan Ascent a 405 nm.

Determinación de anticuerpos específicos de *T. crassiceps*.

Se sensibilizo la placa (Poly-Sorb) con antígeno de *T. crassiceps*. 1.0 µg/pozo (10µg/ml) en PBS. Se Dejo incubar toda la noche a 4°C, o dos horas a temperatura ambiente. Se lavo la placa 2 veces con PBS-Tween 20 al 0.05%. Se bloqueo con PBS- albumina 1% (200 µl/pozo). Se incubo durante una hora a temperatura ambiente. Se lavo la placa 2 veces con PBS-Tween 20 0.05%. Se pusieron las muestras (sueros) por duplicado diluidas 1:50 en PBS- albumina al 1%. Se dejo incubar durante una hora a 30°C. Posteriormente se lavó la placa 4 veces en PBS-Tween 20 al 1%. Se diluyó el anticuerpo correspondiente (IgG2a, IgG1) en PBS + SFB inactivado (75 + 25). Se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se lavó la placa 4 veces en PBS-Tween 20 al 1%. Al momento se preparó ABTS + H₂O₂ al 3% (10 ml + 100µl) y se agregó 100 µl/pozo. Se dejó desarrollar la reacción durante 10 minutos.

Se realizó la lectura en el lector de elisas Thermo Labsystems Multiskan Ascent a 405 nm.

Determinación de óxido nítrico (ON) en sobrenadante de Mø: Se cuantificó ON en sobrenadante de macrófagos, a las semanas 2, 4 8 y 12 p.i Se ajustaron las células a 10×10^6 después de que las células fueron estimuladas. Poco antes de realizar la prueba, se mezclaron las soluciones A y B a igual volumen (ver apéndice) para tener el reactivo de Griess. En una placa de 96 pozos se colocó una curva de óxido nítrico como control y referencia para extrapolar las concentraciones, se colocaron 100 μ l en cada pozo por duplicado de las diferentes concentraciones que fueron diluidas al doble, se colocaron las muestras 100 μ l por pozo. Se agregó a la curva y las muestras 70 μ l de reactivo de Griess y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizó la lectura a 540 nm en un lector de ELISA.

Extracción de RNA con trizol. Se agregaron 500 μl de trizol 1×10^6 células que contenía los Mø y se pipeteo para romper las células, posteriormente se agregaron 100 μl de cloroformo y se dejó actuar durante 10 minutos, se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 minutos. En un tubo eppendorf nuevo y estéril se colocaron 500 μl de isopropanol frío y se les agregó el sobrenadante de las muestras que se centrifugaron, se pusieron 10 seg en el vortex y se dejó reposar durante 10 minutos, se centrífugó a 13,500 rpm durante 10 minutos y se lavó con etanol frío al 75%, se tiró el sobrenadante, se homogeneizó, después se agregó el etanol al 75% y se resuspendió. Se centrifugaron las muestras a 13,500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no tirar la pastilla y se dejó secar durante 1 hora, para después resuspender en 20 μl de agua Milli Q. Se cuantificó en RNA y se refrigeró a 4 °C hasta su utilización.

RT-PCR.

Obtención del cDNA. Se realizó el cálculo para trabajar con 5000 ng de RNA y se colocó en tubos nuevos y estériles, se agregó 1 μl de dNTPs y 1 μl de oligo DT, se agregó agua Milli Q hasta un volumen total de 10 μl . Se metieron las muestras en el termociclador a 65° C durante 1 ciclo. Se pusieron las muestras 1 minuto a -20° C. Se agregaron 9 μl del mix a cada muestra (ver apéndice). Nuevamente se metieron las muestras al termociclador a 42° C durante 2 minutos, se agregó .7 μl de enzima transcriptasa reversa en cada muestra. Las muestras nuevamente se metieron en el termociclador a 42° C durante 50 minutos y 70° C por 15 minutos. Posteriormente se agregaron .5 μl de RNAsa H y se metieron las muestras al termociclador a 36° C durante 20 minutos.

Determinación de GAPDH. Se preparo el mix y se colocaron 24 μl de éste en tubos para PCR nuevos y estériles, uno por cada muestra y un control, se agregaron 1.5 μl de muestra y se metieron los tubos en el termociclador:

Determinación de Y m-1, Trem-2. Preparar el mix y colocar 24 μl de éste en tubos para PCR estériles y nuevos, se agrego 1 μl de muestra en cada tubo y se metieron al termociclador.

Citometría de flujo. Las células de la cavidad peritoneal se ajustaron a 10×10^6 y se colocaron en tubos de FACs y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se homogeneizó el contenido de los tubos. Se agregaron 300 μ l de buffer de FACs (en la campana de flujo laminar) y 1 μ l de APC anti-mouse F4/80 (BIO legend) por tubo; también se agregó 1 μ l del marcador que buscamos [PDL-1 (PE conjugated anti-mouse B-7 – H1, Bioscience), PDL-2 (PE anti-mouse B7 DC CD 273, BioLegend), IL-4R (Pharmigen), IFN- γ (BioLegend N^o 113603), se dejaron incubar los tubos a 4°C durante 30 minutos.

Se lavó el contenido de los tubos con amortiguador de FACs y al final se les agregaron 500 μ l de este mismo buffer. Se centrifugaron los tubos a 1200 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante, se homogeneizó y se agregaron 500 μ l de buffer de FACs.

Se analizaron las muestras en el citometro de flujo con el programa Cell Quest Pro.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se utilizó el programa Graph pad Prism 4.0 para obtener el promedio y error estándar de los datos así, como para comparar las diferencias por medio de la prueba T de test (y prueba para métrica) y ONE- WAY anova (no paramétrica) no pareada. Los valores de p menores a 0.05 se consideraron significativamente diferentes.

RESULTADOS.

Los resultados que se muestran a continuación son el promedio de 8 experimentos (n=56 ratones) en los que se indujo infección con 25 o 15 metacístodos de *T. crassiceps*

Genotipificación de los ratones del grupo control y el grupo experimental. Para asegurar que los ratones experimentales utilizados cumplieran con la condición de ser MGL +/+ (ratones silvestres) y MGL -/- (ratones deficientes en el gen), se analizó su genotipo por PCR.

En la figura 8 se muestra el gel de agarosa con la amplificación del gen funcional para MGL. Se observa la amplificación del gen de la molécula mMGL del grupo de ratones MGL+/+; el producto amplificado fue de 633 pb. En caso de los ratones MGL -/- se utilizó un gen de inserción llamado neomicina (Neo), el producto de amplificación fue de 492 pb donde la amplificación del gen indicó que los ratones utilizados como MGL -/- eran deficientes para la molécula MGL.

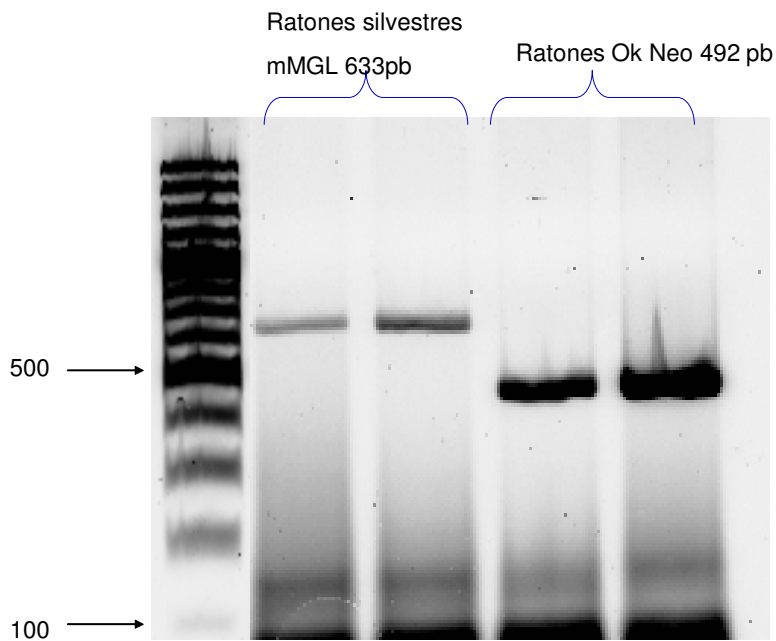


Figura. 8. Genotipo de los ratones experimentales por PCR. Amplificación del gen funcional MGL+/+ y determinación del gen de inserción NEO MGL-/-.

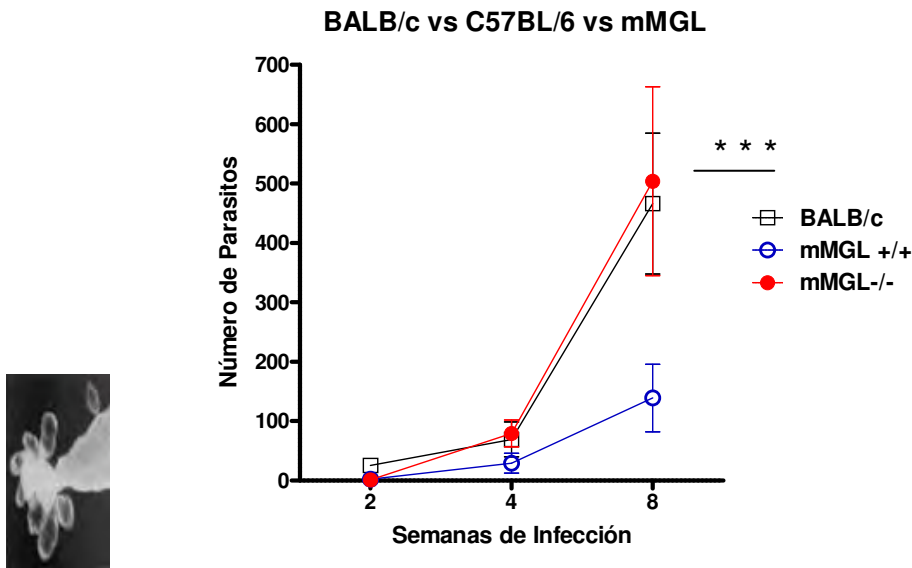
Efecto de la ausencia de mMGL en las susceptibilidad a *Taenia crassiceps*.

Con el objetivo de determinar si la ausencia de mMGL podría afectar la susceptibilidad o resistencia a la infección con *Taenia crassiceps*, se realizó una cinética de crecimiento de la carga parasitaria en los ratones mMGL +/+ (control) y mMGL -/- (experimentales) infectados con 25 o 15 metacéstodos. Como un control interno de la correcta infección se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, de los cuales ya es conocido que son altamente susceptibles a la infección por *T. crassiceps*.

. Después de la infección i.p. con 25 metacéstodos (figura 9 A), se observó que en el inicio de la infección las cargas parasitarias fueron similares entre los animales MGL+/+ y MGL-/-. Sin embargo, a partir de la semana 4 post-infección se observó una mayor carga parasitaria en el grupo de ratones mMGL -/- comparado con los mMGL +/+. También se pudo observar que los ratones mMGL -/- presentaron una susceptibilidad similar a la cepa BALB/c la cual es conocida por ser altamente susceptible a este parásito. En éste caso fue hasta las 8 semanas p.i donde se observó una clara diferencia en la carga parasitaria entre el grupo de ratones mMGL -/- y mMGL +/+, donde los ratones deficientes en mMGL presentaron las mayores cargas parasitarias ($P < 0.05$).

En la figura 9 B, se muestra un experimento diferente en el cual la infección se llevó a cabo con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, donde se observó que en la semana 2 post-infección la carga parasitaria fue similar en ambos grupos de ratones . Sin embargo en la semana 4 post-infección se observó una vez más mayor carga parasitaria en el grupo de ratones deficientes en mMGL. Hacia la semana 8 p.i se observó una clara diferencia en la carga parasitaria entre los grupos, donde el grupo de animales mMGL -/- presentaron una carga parasitaria significativamente mayor que los animales mMGL +/+.

A).



B).

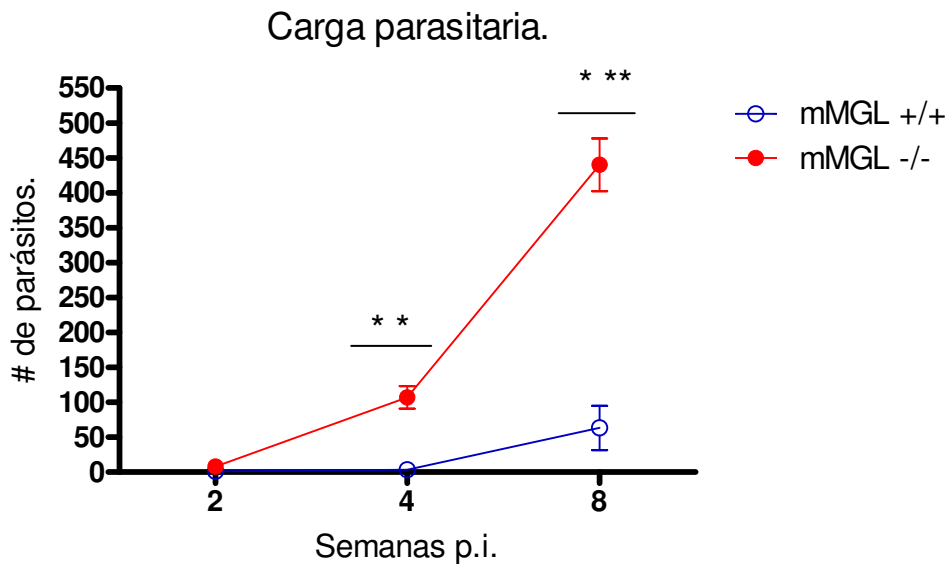


Fig 9. Cinética de la carga parasitaria en ratones mMGL deficientes infectados con *Taenia crassiceps*. A) Los animales fueron infectados con 25 metacístodos, se observó que a partir de la semana 4 hubo mayor susceptibilidad en el grupo de animales mMGL -/-. Esta diferencia fue mayor en la semana 8 post-infección. B). Cinética de la carga parasitaria de ratones infectados con 15 metacístodos de *Taenia crassiceps*. Se observó que a partir de la semana 4 hubo mayor

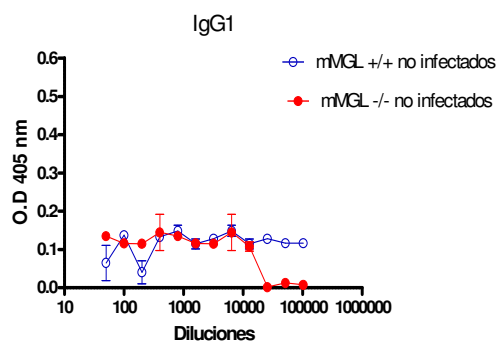
susceptibilidad en el grupo de animales mMGL $-/-$. * $P < 0.05$. *** $P < 0.01$. Los datos son el promedio \pm el error estándar de 8 animales por grupo por tiempo. (n = 24 por grupo).

Respuesta inmune humoral.

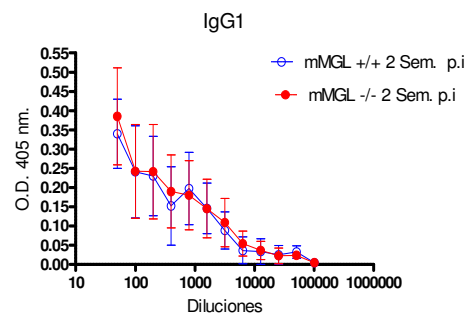
Antes de infectar a los ratones se tomo una muestra de sangre y se realizó una cinética de la producción de anticuerpos específicos contra *T. crassiceps*, no se observó producción de dicho anticuerpo.

Después de la infección i.p con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps* se obtuvo suero y se realizó una cinética de producción de anticuerpos específicos contra *T. crassiceps* en los animales infectados de ambos grupos, incluyendo las semanas 2, 4 y 8 p.i. Se analizaron los anticuerpos de la subclase IgG 1 los cuales se han asociado a una respuesta inmune tipo T_H2 . Se observó que después de la infección i.p con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps* no hubo diferencia significativa en los niveles de este tipo de anticuerpos en ambos grupos de animales. Esta observación se mantuvo en las diferentes semanas de infección, figura 10.

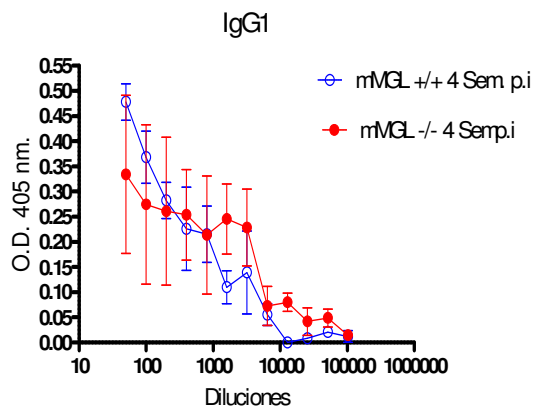
A).



B).



C).



D).

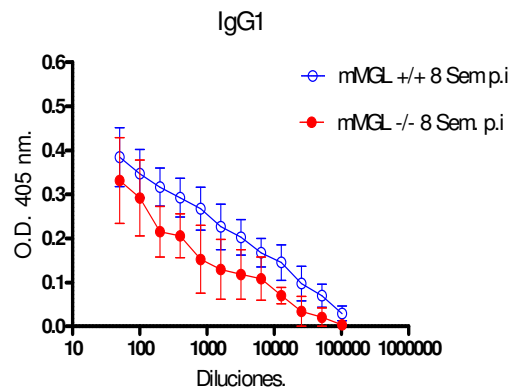
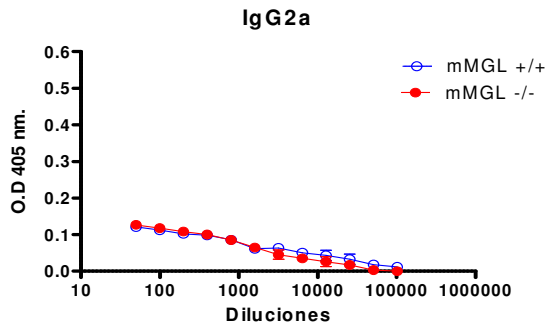


Figura 10.- Cinética de detección de anticuerpos anti-Taenia de la subclase. A) animales no infectados. B). Se observó que después de la infección i.p con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps* no hubo diferencia significativa en ambos grupos de animales; lo que se mantuvo en las diferentes semanas de infección, figuras C) y D). (n = 9 por grupo).

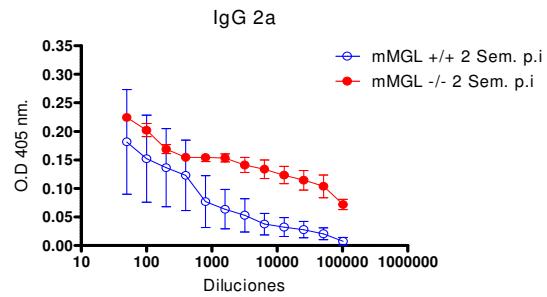
En los mismos sueros también se analizaron los anticuerpos de la subclase IgG 2a los cuales se han asociado a una respuesta inmune de tipo T_H1 . En la Fig. 11 A). No se observó producción de anticuerpos específicos en ambos grupos de animales. B): Se observó que a la semana 2 post-infección hubo mayor producción de este anticuerpo específico en el grupo de animales mMGL -/-, lo que nos indica que hay predominio de respuesta inmune de tipo T_H1 en este grupo de ratones. C) Se observó que a las 4 semanas post-infección hubo mayor producción de este anticuerpo en el grupo de ratones mMGL +/+, que controló la infección y D). Se observó que ambos grupos de animales ya no produjeron este anticuerpo.

IgG2a.

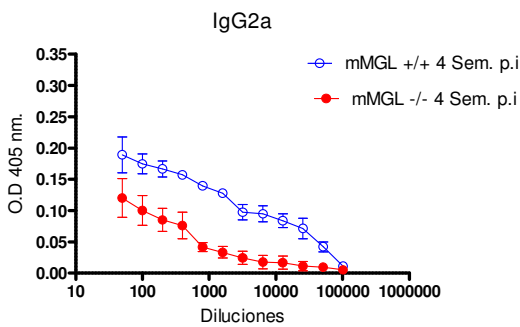
A).



B).



C).



D).

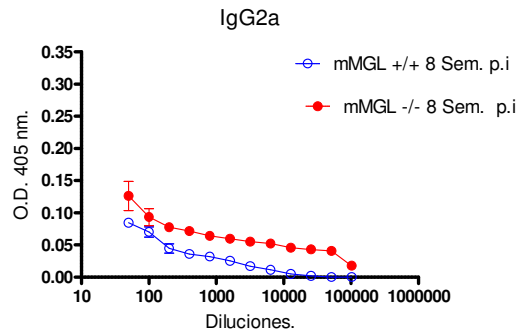


Fig 11. Cinética de detección de anticuerpos anti-Taenia de la subclase IgG2a. A). En animales no infectados no hubo producción de IgG 2^a. B). Se observó que a la semana 2 post-infección hubo mayor producción de este anticuerpo en el grupo de animales mMGL -/-, pero esto se invirtió en las semana 4 y 8 post-infección, figuras C y D), lo que nos habla de pérdida de la respuesta inmune tipo T_H1 en tiempos crónicos de la infección, graficas B) y C). (n = 9 por grupo).

Los datos presentados en las figuras 10 y 11 sugieren que la respuesta de tipo T_H1 solo está presente en las primeras semanas post-infección, mientras que la respuesta de tipo T_H2 está presente en las diferentes semanas post-infección.

Otro de los anticuerpos altamente asociados a una respuesta inmune tipo T_H2 e infecciones con helmintos es la IgE la cual recubre a los helmintos y los convierte en blanco de los eosinófilos, ya que estos expresan FcR específicos para este anticuerpo. La IgE participa en la defensa mediada por eosinófilos frente a las infecciones por helmintos. Los niveles de IgE se analizaron en forma total en animales sanos e infectados con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*. Se observó que los ratones mMGL $-/-$ produjeron mayores niveles de IgE a lo largo de toda la infección. Esto podría reflejar un predominio de la respuesta inmune de tipo T_H2 de manera más pronunciada en los ratones mMGL $-/-$ que en el grupo de ratones mMGL $+/+$.

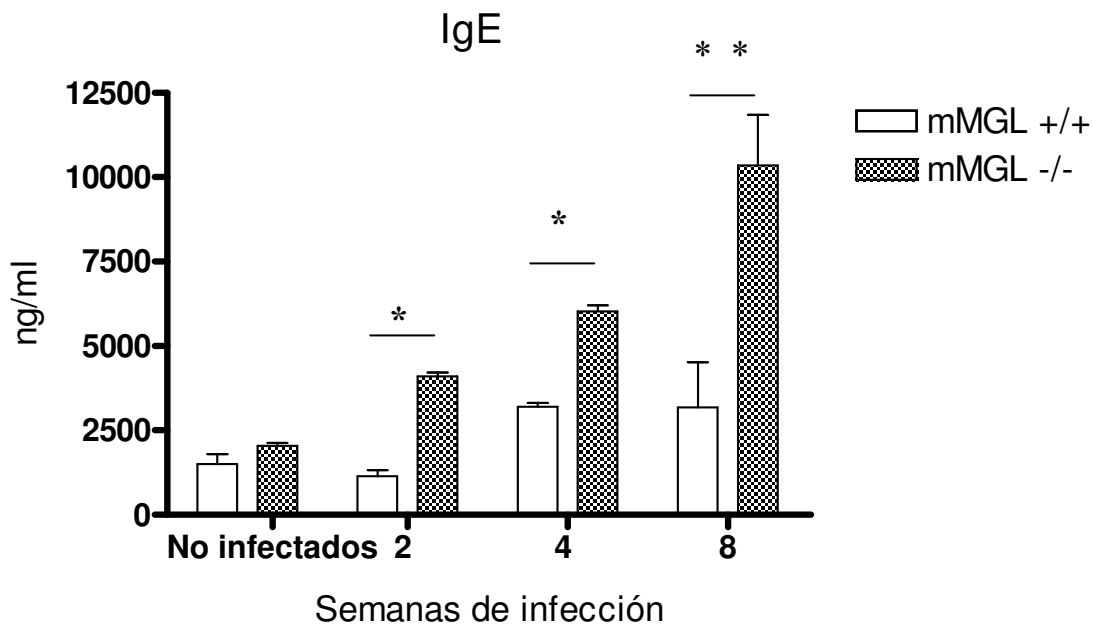


Fig. 12. Determinación de IgE total en suero de animales infectados con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*. Se observó una producción mayor de IgE en

los animales mMGL $-/-$, lo que coincidió con un mayor número de parásitos. (n= 8 por grupo). * P < 0.05. n= 16. *P<0.05; **P<0.01.

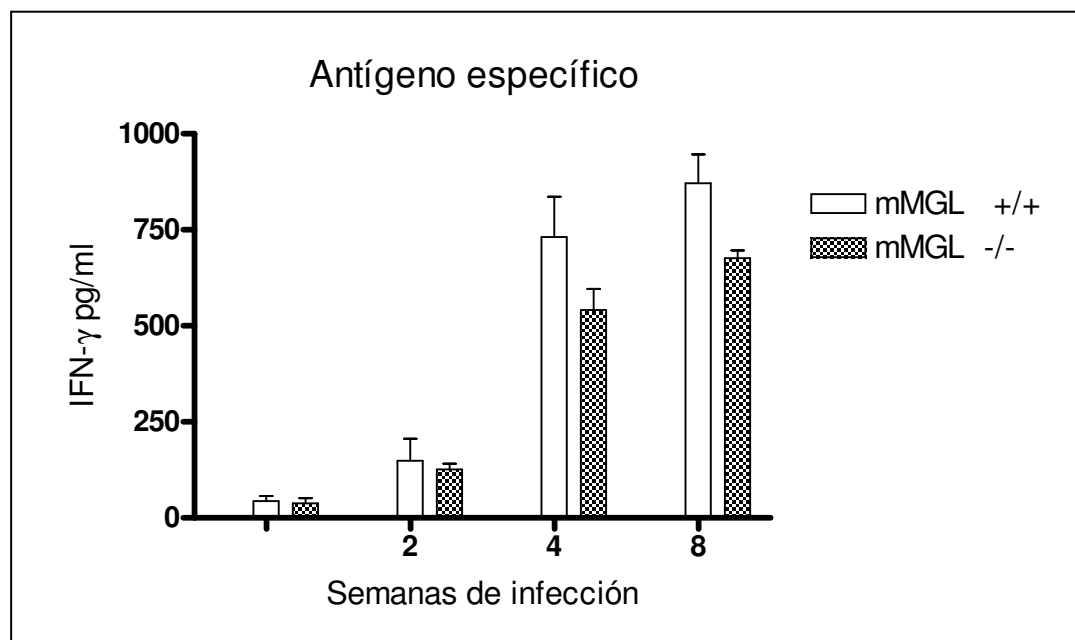
Perfil de citocinas en cultivo de células provenientes de ratones sanos y a las 2, 4 y 8 semanas post-infección.

Con el objetivo de conocer si la respuesta inmune de los grupos de ratones estudiados polarizaba hacia tipo T_H1 o T_H2 realizamos la determinación de citocinas en sobrenadante de cultivo celular.

Determinación de interferón gamma en sobrenadante de linfocitos de bazo.

Después de la infección i.p. con 25 metacístodos de *Taenia crassiceps* se determinó la producción de IFN- γ en sobrenadante de linfocitos de bazo de los distintos grupos de ratones. Se observó que las células estimuladas con antígeno específico de *Taenia crassiceps* en la semana 2 post infección la producción de IFN- γ fue baja en ambos grupos y sin diferencias significativas, a la semana 4 se incrementó la producción en ambos grupos de ratones, pero fue significativamente mayor en el grupo de animales mMGL $+/+$ y a la semana 8 post-infección la producción de IFN- γ permaneció significativamente más elevada en los ratones silvestres (Fig. 13A). También se determinó la producción de IFN- γ en sobrenadante de linfocitos de bazo estimulados con anti-CD3. En la semana 2 post-infección la producción de IFN- γ fue alta en ambos grupos de ratones y sin cambios significativos entre los diferentes grupos; en la semana 4 y 8 post-infección la producción de IFN- γ permaneció elevada y sin diferencias entre los grupos de

ratone
s (Fig
13B).



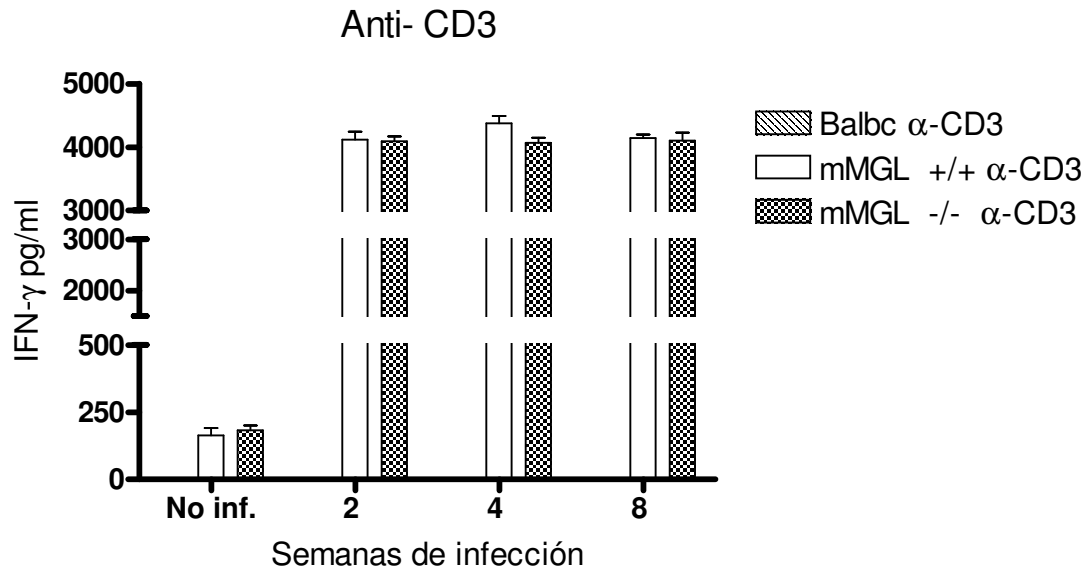


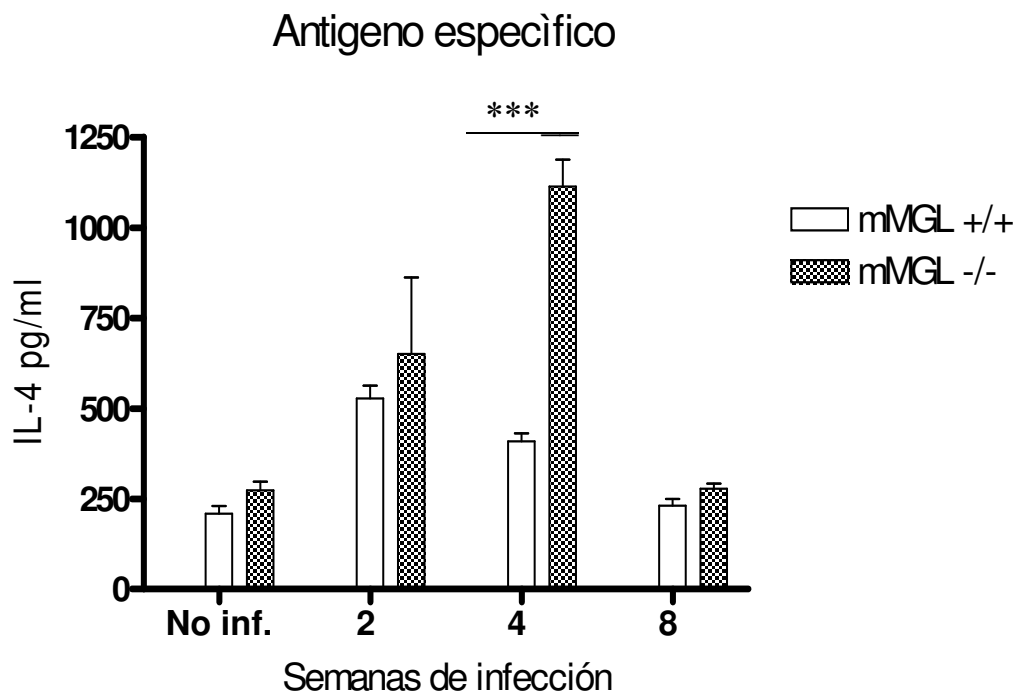
Fig 13. Determinación de IFN- γ en linfocitos de bazo provenientes de ratones no infectados e infectados con 25 metacístodos de *Taenia crassiceps*. A). Determinación de IFN- γ en linfocitos de bazo estimulados con antígeno específico de *Taenia crassiceps*, a las semanas 2, 4 y 8 post-infección (n = 9 por grupo). B). Determinación de IFN- γ en linfocitos de bazo estimulados con anti-CD3, a la semana 2, 4 y 8 post-infección.

* P < 0.05 (n = 12 por grupo).

Determinación de citocinas Tipo T_H2.

La figura 14 muestra la determinación de IL-4 en sobrenadante de linfocitos de animales mMGL^{-/-} y mMGL^{+/+} en respuesta a antígeno específico de *T. crassiceps* y a anti-CD3. Se observó que desde tiempos tempranos de la infección (semana 2 post-infección) había una tendencia a una mayor producción de IL-4 en el grupo de animales mMGL^{-/-}. Lo anterior fue más claramente observado en la semana 4 post-infección donde se detectó una producción significativamente mayor de IL-4 en el grupo de ratones mMGL^{-/-} con respecto al grupo de ratones mMGL^{+/+} (fig. 14A). Sin embargo, hacia la semana 8 post- infección cayó la producción de esta citocina no se mantuvo y dejó de haber diferencias significativas entre los grupos de ratones. En contraste, la producción de IL-4 en respuesta al estímulo con anti-CD3 mostró en las semanas 4 y 8 post-infección un incremento significativo en el grupo de animales mMGL^{-/-}; comparados con el grupo de animales mMGL^{+/+} (Fig 14B). Esto sugiere una polarización de la respuesta inmune hacia un tipo T_H2 principalmente en ratones mMGL^{-/-}.

A).



B).

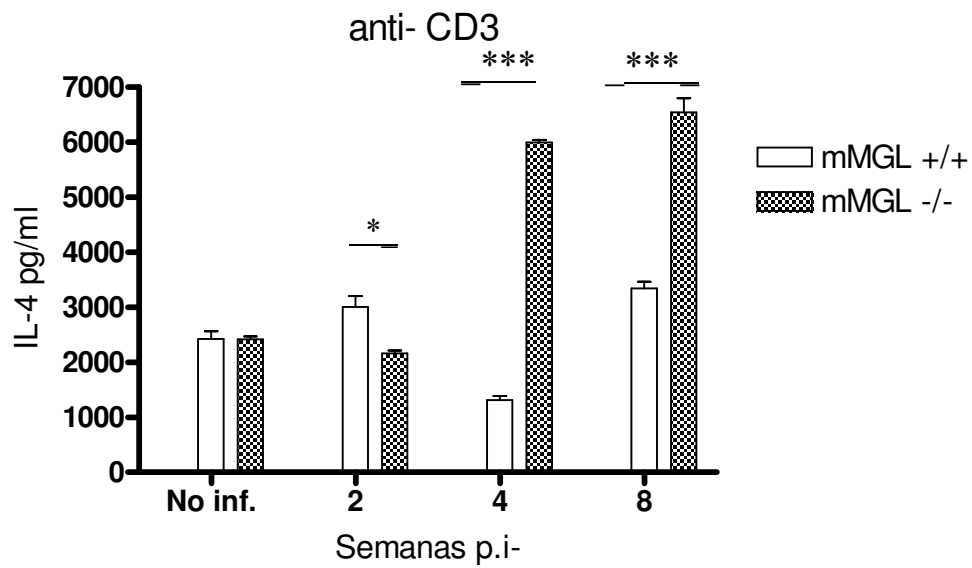


Fig. 14. Determinación de IL-4 en sobrenadante de linfocitos de bazo proveniente de ratones no infectados e infectados con 25 metacéstodos de *T. crassiceps*. A). Linfocitos de bazo estimulados con antígeno específico de *Taenia crassiceps*. B). Determinación de IL-4 en sobrenadante de linfocitos de bazo estimulados con anti-CD3. * $P < 0.05$; * $P < 0.01$. (n = 12 por grupo).

En la Figura 15 (A y B) se muestra la determinación de IL-13 en sobrenadante de linfocitos de bazo estimulados con antígeno específico de *Taenia crassiceps* o con anticuerpo anti-CD3.

Se observa que las células de animales mMGL $-/-$ estimuladas con antígeno específico de *Taenia crassiceps*, tuvieron una producción de IL-13 similar a lo largo de toda la cinética de infección. La figura 15 B muestra la determinación de IL-13 en sobrenadante de linfocitos estimulados con anti-CD3. Después de la infección i.p con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, las células provenientes del grupo de animales mMGL $-/-$ tuvieron una producción mayor de esta citocina, lo que es más notorio en la semana 4 post infección. En la semana 8 post-infección la producción de IL-13 en las células de animales mMGL $+/+$ fue mayor lo que indica que en las primeras semanas de infección el grupo de animales mMGL $+/+$ tuvo mayor respuesta al estímulo con anti-CD3.

A).

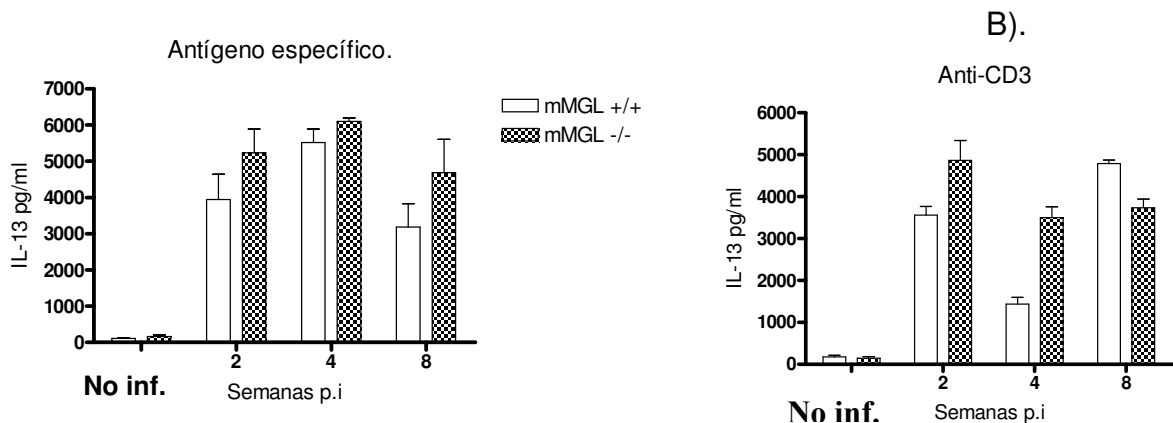


Fig. 15. Determinación de IL-13 en linfocitos de bazo provenientes de ratones mMGL $+/+$ y mMGL $-/-$ estimulados con antígeno específico de *Taenia crassiceps* y anti-CD3. A). Células estimulados con antígeno específico de *Taenia crassiceps* y B). Células estimuladas con anti-CD3 en animales sanos y a las semanas 2, 4, y 8 semanas post-infección. Ratones infectados con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*. ** P = 0.05 (n = 9 por grupo).

Respuesta de Macrófagos

Después de la infección i.p con 25 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, la producción de IL-12 por MøS estimulados con LPS + IFN- γ fue elevada y similar a la semana 2 post-infección en ambos grupos de ratones, sin diferencias significativas entre ellos. En la semana 4 post-infección la producción de esta citocina fue mayor en el grupo de ratones mMGL +/+, lo que se mantuvo hasta la semana 8 post-infección. (Fig 16A). En la infección i.p con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps* se observó que en la semana 2 post-infección los niveles de esta citocina estuvieron significativamente elevados en el grupo de animales mMGL +/+. En la semana 4 post-infección se observó que la producción de IL-12 cayó en ambos grupos, sin embargo se mantuvo más elevada en el grupo de ratones mMGL +/+. Hacia la semana 8 post-infección cayó aún más la producción de IL-12, pero los niveles menores fueron detectados en el grupo de animales mMGL -/-.

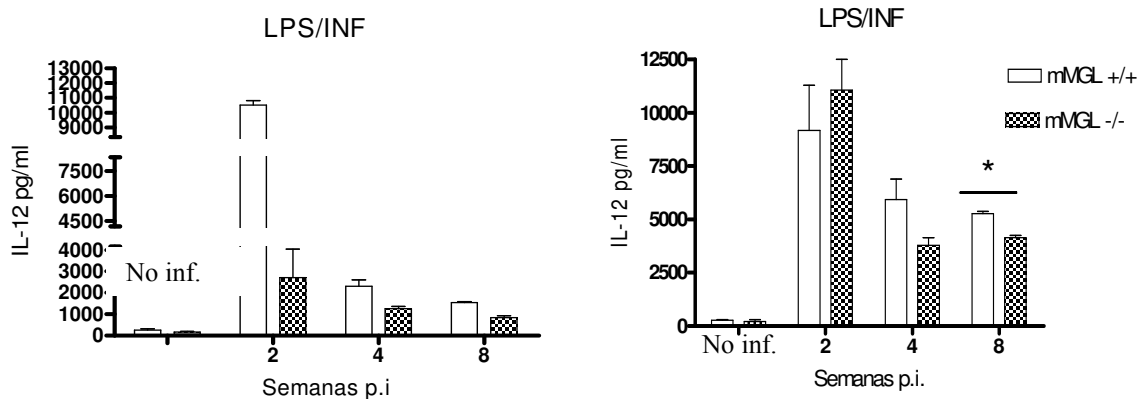


Fig. 16. Determinación de IL-12 en sobrenadante de cultivo de macrófagos provenientes de ratones mMGL +/+ y mMGL ^{-/-}. A) Infectados con 25 metacéstodos de *Taenia crassiceps*. B) Infectados con 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*. Determinación de IL-12 por ELISA. * P < 0.05; *** P < 0.01 (n = 12 ratones por grupo).

En la figura 17A se muestra la determinación de TNF- α en sobrenadante de M ϕ estimulados con LPS+IFN. Después de la infección i.p con 15 metacístodos de *Taenia crassiceps* se observó que en la semana 2 post-infección la producción de TNF- α se mantuvo elevada en ambos grupos de ratones. En la semana 4 post-infección la producción de TNF- α cayó en ambos grupos de ratones, sin diferencias significativas entre ambos grupos. En la semana 8 post-infección hubo mayor producción de TNF- α en el grupo de animales mMGL +/+, probablemente debido a que su respuesta de tipo T_H1 fue mayor que en el grupo de ratones mMGL -/-.

En la infección i.p con 15 metacístodos de *Taenia crassiceps* se observó que en la semana 2 post-infección la producción de TNF- α estuvo elevada en ambos grupos de ratones. En la semana 4 post-infección la producción de TNF- α fue otra vez mayor en el grupo de ratones mMGL +/+. En la semana 8 post-infección la producción de TNF- α se mantuvo elevada en el grupo de ratones mMGL +/+ y disminuyó significativamente en el grupo de animales mMGL -/- (Fig 17B). Esto coincide con la pérdida de la respuesta T_H1 en tiempos crónicos de la infección.

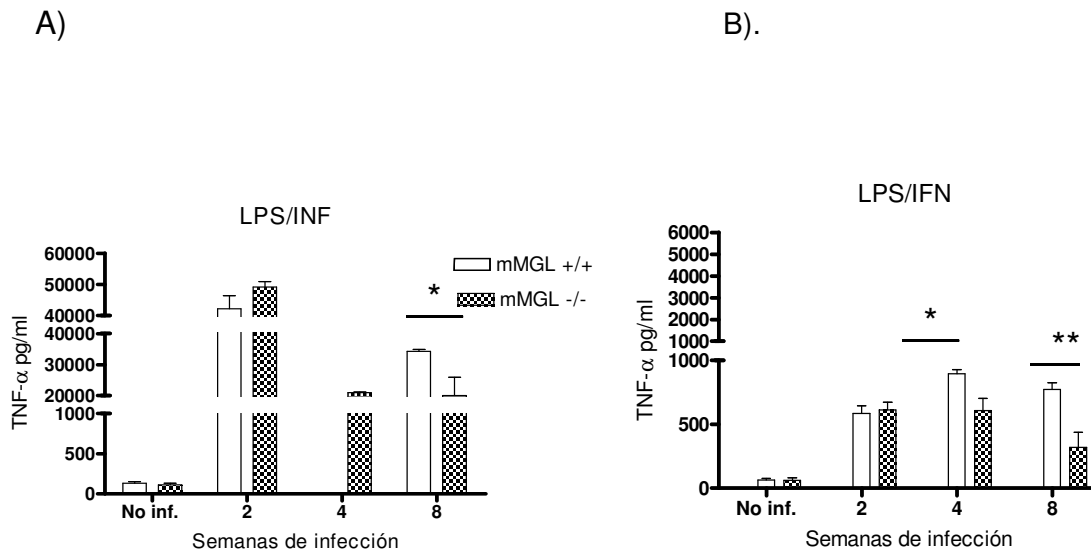


Fig. 17. Determinación de TNF- α en sobrenadante de cultivo de macrófagos provenientes de ratones mMGL +/+ y mMGL -/- A). Infectados con 25 metacístodos de *Taenia crassiceps*. B). Infectados con 15 metacístodos de *Taenia crassiceps*. * P < 0.05; ** P < 0.01 (n = 6 por grupo).

Oxido Nítrico. La producción de óxido nítrico depende de la expresión de iNOS, la cual es inducida en Mø a través de citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-12. Al analizar la producción de ON en respuesta a LPS e IFN-g se observó que después de la infección i.p con 25 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, los niveles de ON fueron mayores en el grupo de animales mMGL +/+ en la semana 2, lo cual se mantuvo en la semana 4 post-infección y coincidió con un menor número de parásitos en este grupo de ratones.

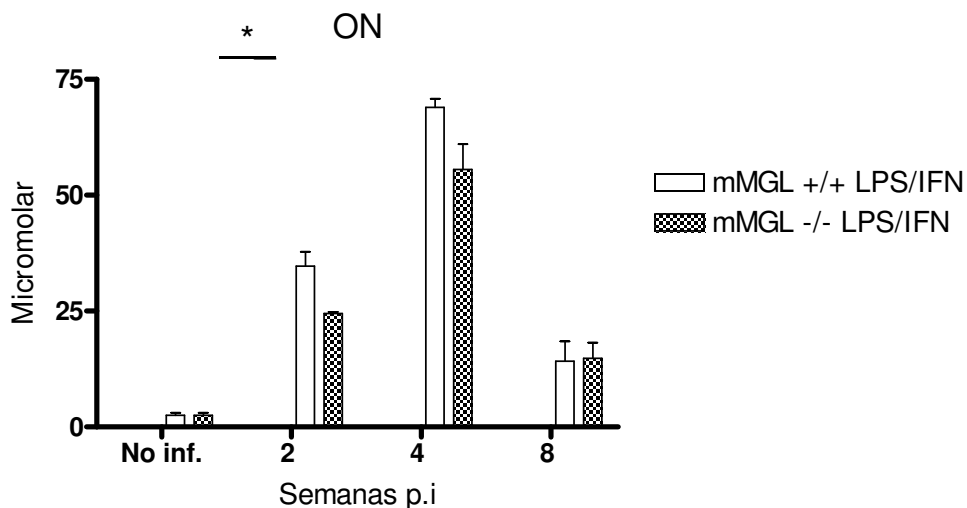


Fig. 18. En la grafica se presenta la determinación de ON en sobrenadante de Mø (los cuales se ajustaron a 1×10^6) en las diferentes semanas de infección. ON en sobrenadante de Mø de animales infectados con 25 metacéstodos de *Taenia crassiceps*. Se observó que en la semana 4 el grupo de ratones mMGL +/+ tienen mayor producción, lo que se asocia con menor número de parásitos, aún cuando en la semana 8 no se observaron diferencias significativas. * $P < 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

RT-PCR en Mø de cavidad peritoneal.

Con el objetivo de investigar si la ausencia de la molécula mMGL durante la infección con *Taenia crassiceps* alteró la expresión de genes asociados a la activación alternativa de macrófagos, se realizó extracción de RNA de Mø de la cavidad peritoneal para evaluar la expresión de los genes de las siguientes moléculas: YM-1, Arg-1, INOS, y FIZZ. En la figura 19 se muestra la imagen de un gel donde se puede apreciar que en la semana 4 post-infección los macrófagos del grupo de ratones mMGL $-/-$ expresan ARG-1 y FIZZ, mientras que el grupo mMGL $+/+$ expresa ARG-1 en menor intensidad. En la semana 8 post-infección se detectó la expresión de RNAm de YM-1 en ambos grupos de animales, pero fue mayor la expresión de esta molécula en los macrófagos provenientes del grupo mMGL $-/-$. Aun en ausencia de estímulo (basal) éstas células presentaron el mismo patrón para los genes de Arg-1 y FIZZ; esto sugiere que los macrófagos provenientes de animales mMGL $-/-$ se hacen alternativamente activadas antes que las células provenientes del grupo mMGL $+/+$.

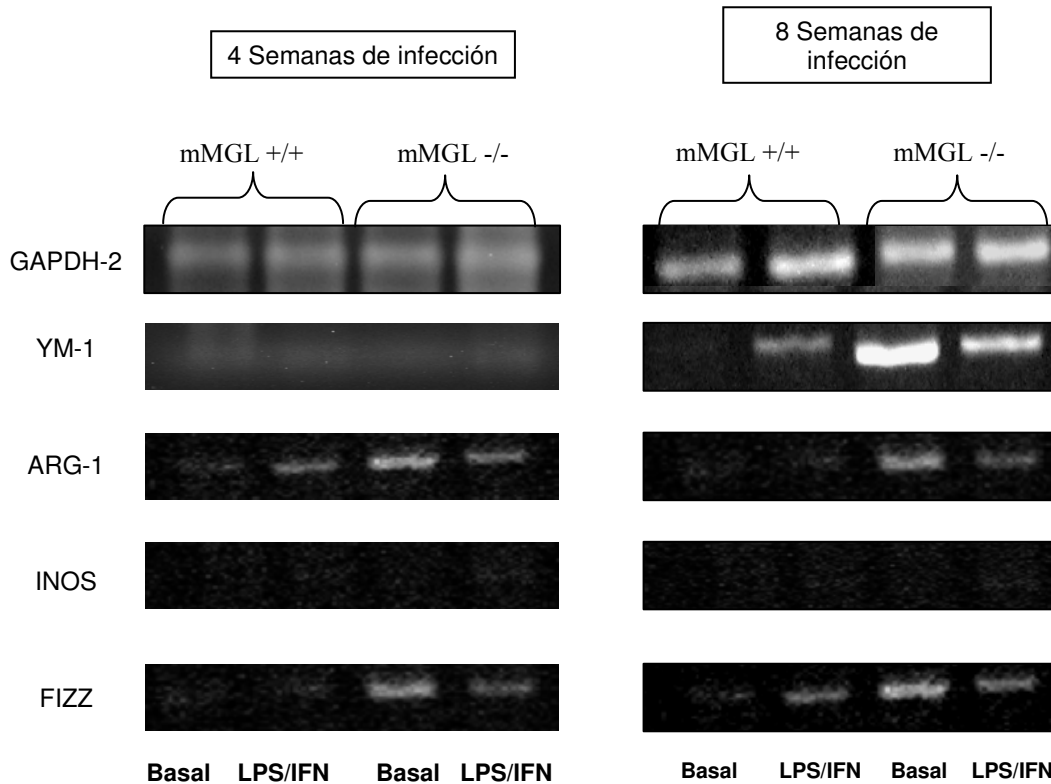


Fig. 19. Cinética de la activación de macrófagos provenientes de ratones infectados con *Taenia crassiceps* en las diferentes semanas de infección. Se aislaron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones mMGL +/+ y mMGL -/- en las diferentes semanas de infección. Se cultivaron sin estímulo (basal) y con estímulo (LPS 2.5 Mg/mL e IFN- γ 20 ng/mL). Se observa que las células provenientes de los animales mMGL -/- expresan Arg-1 y Fizz desde la semana 4 post-infección, en las células que se cultivaron en forma basal y en las que fueron estimuladas con LPS/IFN- γ , lo que indica que se hacen alternativamente activadas antes que las células provenientes de animales mMGL +/+. En la figura se presentaron los resultados de RT-PCR de RNA total de M ϕ de cavidad peritoneal de 2 ratones mMGL +/+ y 2 ratones mMGL -/- infectados con 25 metacéstodos de *Taenia crassiceps*.

Análisis de moléculas de membrana de células de la cavidad peritoneal. Se obtuvieron PECs de ambos grupos de animales a las 8 semanas post-infección y se analizaron por citometría de flujo. Para el análisis se tomaron sólo las células F4/80 positivas, que se delimitan en el recuadro de la figura 20, y en ellas se determinaron las siguientes moléculas: PDL-1, PDL-2, IL-4R, e IFN- γ R.

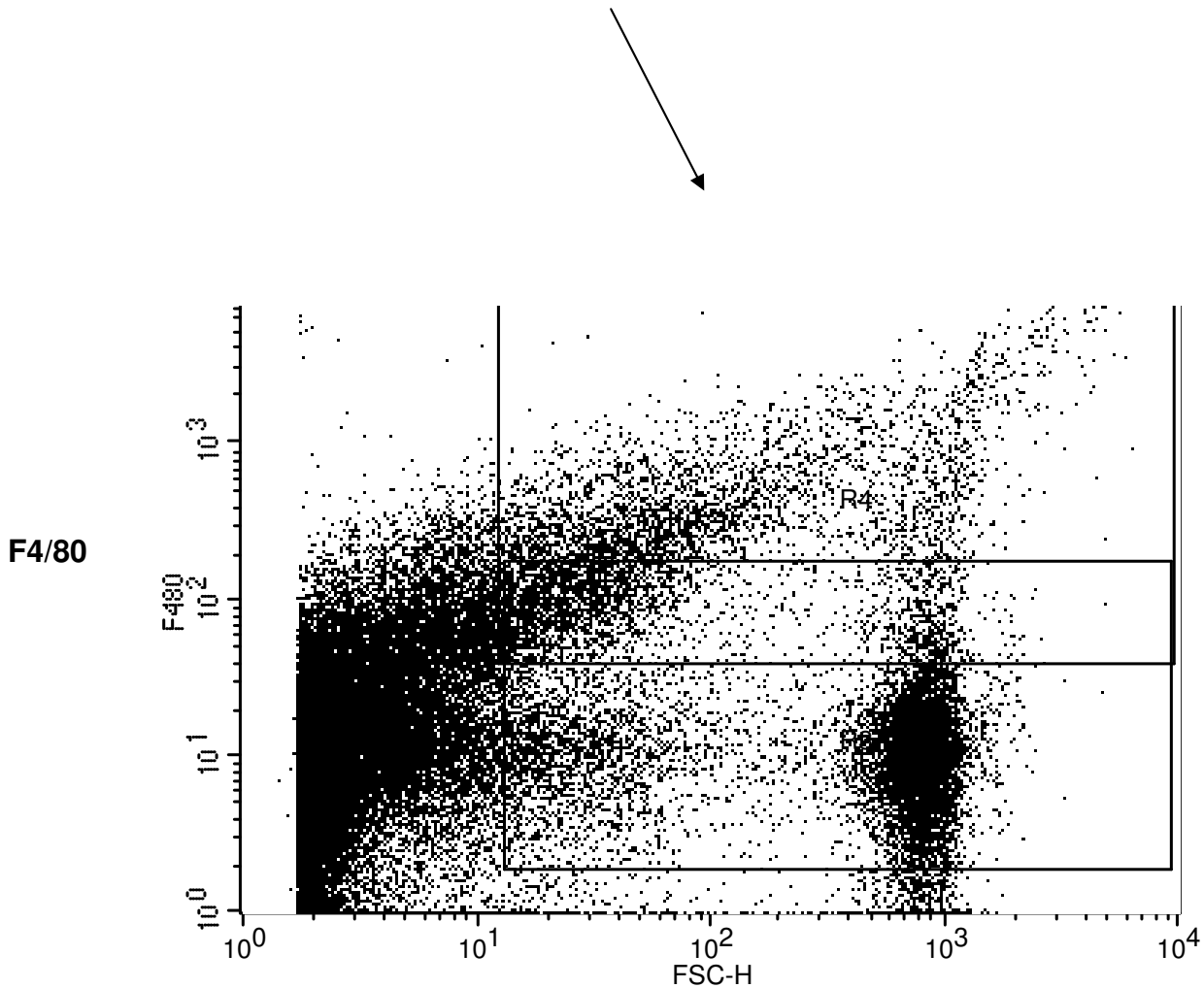


Fig. 20. Análisis de citometría de flujo de macrófagos de la cavidad peritoneal. La población del recuadro se seleccionó para analizar la expresión de moléculas de membrana celular asociadas al estado de activación de macrófagos F4/80+ (marcador de macrófagos).

Ligando del receptor de muerte programada-1 (PDL-1).

El receptor “programmed cell death 1” (PD-1; también llamado CD 279) se expresa en forma inducible en células T CD4⁺, células T CD8⁺, células asesinas naturales, células B y monocitos activados. La expresión de PD-1 es inducida por estimulación con el factor de necrosis tumoral. Existen 2 ligandos para la molécula PD-1, que son PD-L1 y PD-L2. Ambos ligandos de PD-1 difieren en sus patrones de expresión. La expresión de PDL-2 es mucho más restringida que la expresión de PDL-1. La expresión de PDL-2 (también llamado B7-DC o CD 273) es inducible en células dendríticas (DCs), Mø y en células cebadas derivadas de médula ósea. En contraste, PD-L1 (también llamado B7-H1 y CD274) es expresado constitutivamente en células T murinas, células B, DCs, Mø, células mesenquimatosas y cultivo de células cebadas derivadas de médula ósea ^{45, 49}.

PD-L1 y PD-L2 se expresan principalmente en DCs, Mø y linfocitos B; su expresión se intensifica por diversas señales como IL-12 e IFN- γ , y las interacciones CD40-ligando de CD40 ⁴⁹.

Para determinar la expresión de éstas moléculas se extrajeron células totales de cavidad peritoneal de ratones mMGL +/+ y ratones mMGL -/- infectados con metacéstodos de *Taenia crassiceps* a la semana 12 post-infección. En las figuras 21 y 22 se observa que las células provenientes de ratones mMGL -/- presentaron una mayor expresión de PDL-1 y PDL-2 que los ratones mMGL -/-.

Por citometría de flujo se detectó la fluorescencia procedente de células sueltas en suspensión y se determinó así el número de ellas que expresan la molécula a la que se encuentra unida una sonda fluorescente. (mean intensity of fluorescence, MFI); los datos obtenidos sugieren que los macrófagos provenientes de ratones mMGL -/- tienen mayor actividad supresora sobre las células T en la semana 12 post-infección, por lo tanto se presenta un ambiente favorable para la proliferación de *Taenia crassiceps* en tiempos crónicos de la infección.

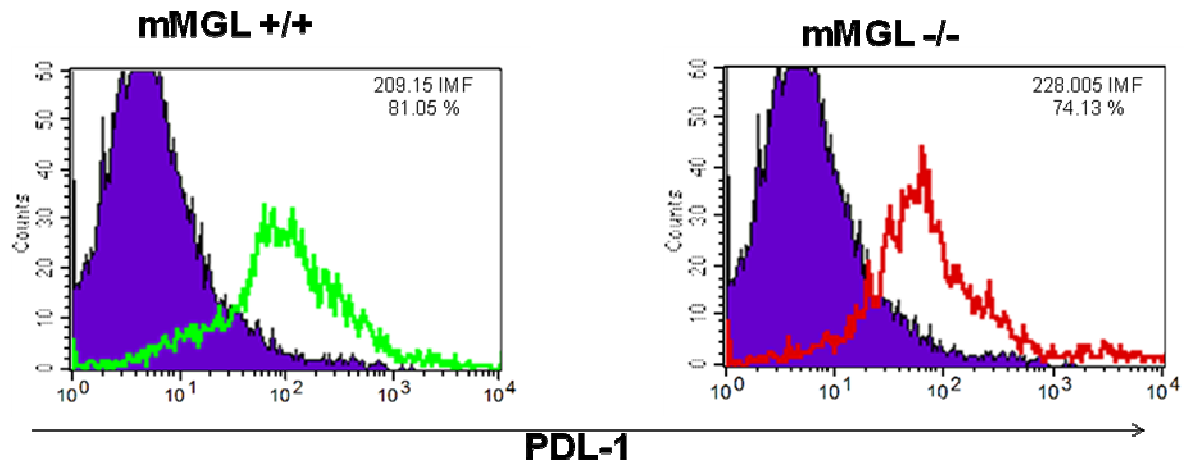


Fig 21. Citometría de flujo para identificar la expresión de PDL-1 a la semana 12 post-infección con *Taenia crassiceps*. Esta figura se muestra mayor índice medio de fluorescencia en las células provenientes de los ratones mMGL -/- que en las células provenientes de los ratones mMGL +/+; sin embargo el porcentaje de la expresión de esta molécula es mayor en las células provenientes de ratones mMGL +/+. Esto significa que las células provenientes de los ratones mMGL +/+ expresan la molécula PDL-1 con mayor intensidad que las células provenientes de los ratones mMGL -/-. La imagen de color morado representa al isotipo y las de color la fluorescencia media de expresión de las moléculas. Promedio de 2 ratones.

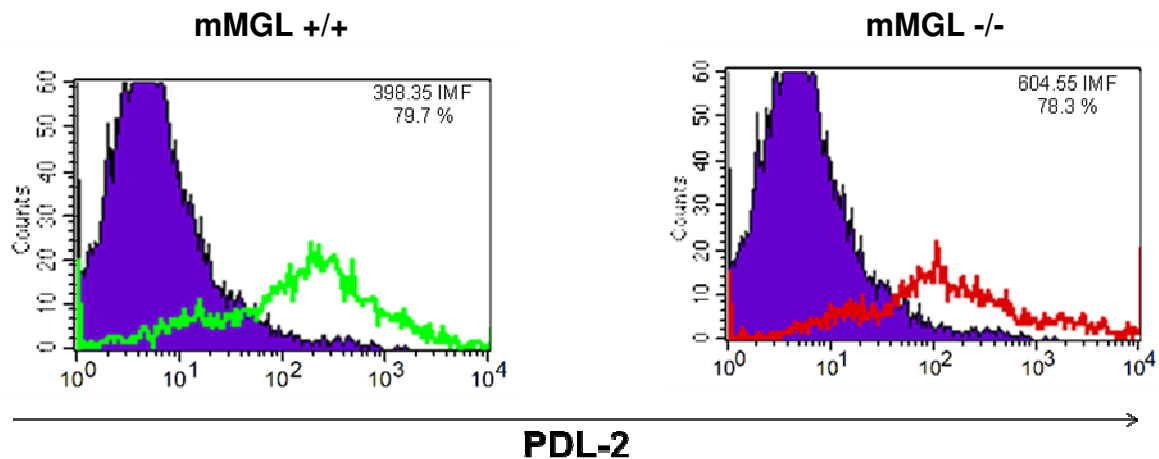


Fig. 22. Citometría de flujo para analizar la expresión de PDL-2 en membrana de macrófagos. En la figura se observa que las células provenientes de ratones mMGL -/- tienen un índice medio de fluorescencia significativamente mayor que las células provenientes de los ratones mMGL +/+, aunque en el porcentaje de expresión de esta molécula no hay diferencia significativa. Lo que significa que aunque el número de células provenientes de los ratones mMGL +/+ que expresan esta molécula es mayor, las células provenientes de los ratones mMGL -/- expresan con mayor intensidad ésta molécula. La imagen de color morado representa al isotipo y las de color la fluorescencia media de expresión de las moléculas. Promedio de dos ratones.

Otra de las moléculas analizadas es **IL4-R**, el cual está formado por una cadena α de unión a la citocina que es un miembro de la familia del receptor de citocinas tipo I, asociada a la cadena β_2 la cual transduce las señales mediante la vía Jak-STAT (Jak 3 o 4 – STAT 6) y mediante una vía en la que participa el sustrato de respuesta a la insulina (IRS) denominado IRS-2¹.

En la figura 23 se observa que las células provenientes de los ratones mMGL -/- tienen un índice medio de fluorescencia significativamente mayor que las células provenientes de los ratones mMGL +/+; sin embargo las células provenientes de los ratones mMGL +/+ tienen un porcentaje significativamente mayor de la expresión de IL4-R.

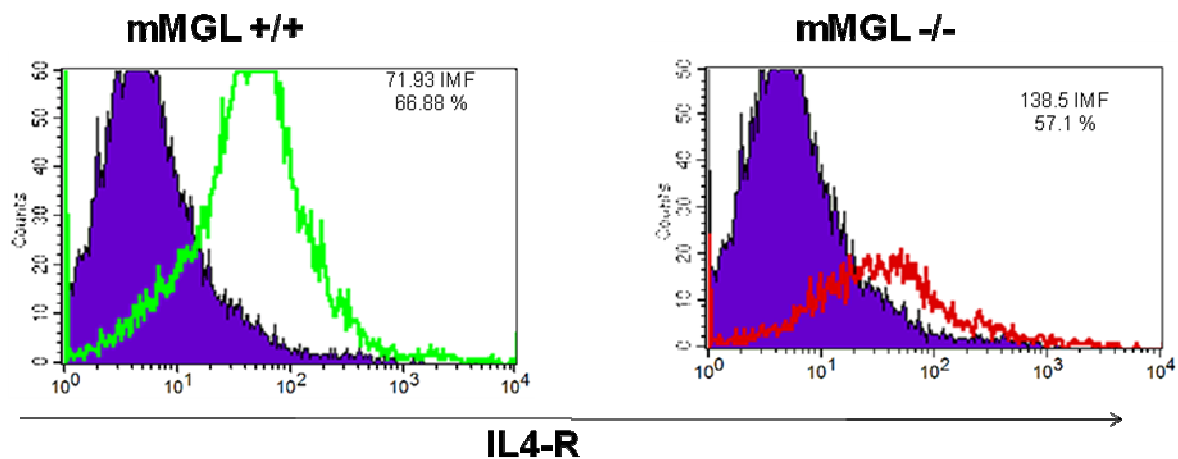


Fig. 23. Citometría de flujo para determinar la expresión de IL4-R. La figura muestra un índice de fluorescencia significativamente mayor en las células provenientes de los ratones mMGL -/-, comparado con la expresión de IL4-R en las células provenientes de los ratones mMGL +/+. La imagen de color morado representa al isotipo y las de color la fluorescencia media de expresión de las moléculas. Promedio de dos ratones.

Determinación de INF- γ -R. El receptor para INF- γ está formado por dos polipéptidos estructurales homólogos que pertenecen a la familia del receptor de citocinas tipo II, denominado INF- γ -R1 e INF- γ -R2. El interferon se une a INF- γ -R1 e INF- γ -R2 e induce su heterodimerización, y éstas moléculas se asocian a las cinasas Jak1 y Jak2 respectivamente¹, las cuales inician la cascada de señalización intracelular que llevan a la célula a responder a ésta citocina.

En la figura 24 se observa que las células provenientes de ratones mMGL -/- expresaron un índice medio de fluorescencia mayor que las células provenientes de los ratones mMGL +/+; aunque el porcentaje de expresión de INF- γ -R es mayor en las células provenientes de los ratones mMGL +/+ comparado con las células provenientes de los ratones mMGL -/-. Esto significa que un número significativamente mayor de células provenientes de los ratones mMGL -/- expresan este receptor, aunque las células provenientes de los ratones mMGL +/+ lo expresan con mayor intensidad.

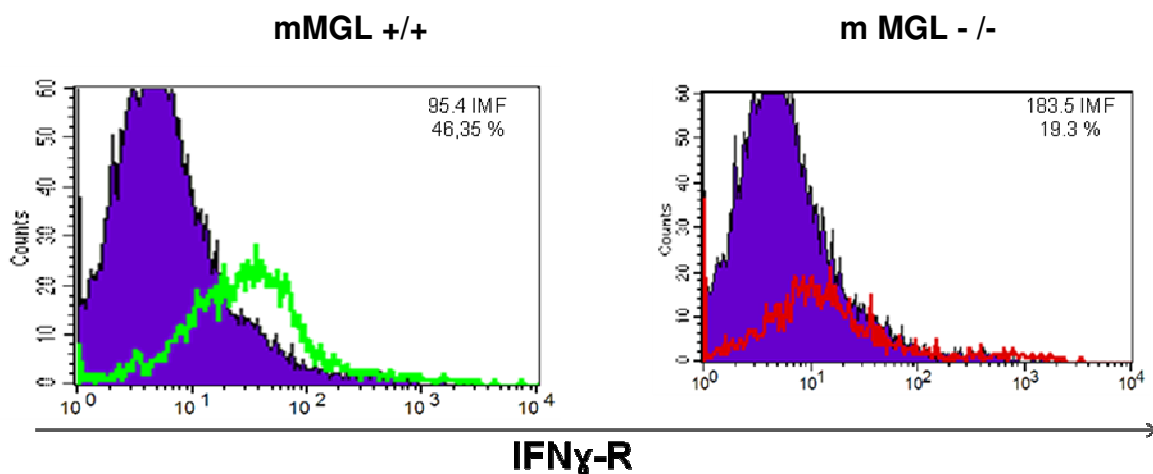


Fig 24. Citometría de flujo para identificar INF- γ -R en la membrana de macrófagos. La figura muestra mayor índice medio de fluorescencia en las células provenientes de los ratones mMGL -/-; aunque el porcentaje de expresión es mayor en el grupo de células provenientes de los ratones mMGL +/+, esto coincide con una respuesta de tipo TH1 mayor en el grupo de animales silvestres. La imagen de color morado representa al isotipo y las de color la fluorescencia media de expresión de las moléculas. Promedio de dos ratones.

DISCUSIÓN.

La capacidad de los helmintos parásitos para modular la respuesta inmune sustenta su longevidad en el hospedero mamífero. En consecuencia existe un gran interés en la comprensión de las bases moleculares de la inmunomodulación generada por helmintos y sus productos derivados. La extraordinaria variedad de los ciclos de vida de éstos parásitos, las estrategias de transmisión y los nichos fisiológicos se reflejan en la variedad de actividades inmunoregulatoras observadas en las tres categorías taxonómicas (nemátodos, tremátodos y céstodos) que componen la agrupación de los helmintos. Los estudios realizados han revelado algunas de los mecanismos en que los helmintos pueden disminuir la inmunidad del hospedero y la inmunopatología que puede derivarse de una mala regulación de la respuesta inmune ante la infección. Una característica clave es que la supresión inmune depende de helmintos parásitos vivos, como se muestra *in vivo* por la recuperación de la capacidad de respuesta después de la quimioterapia curativa, así como por los efectos reguladores de parásitos vivos *in Vitro*. Por lo tanto, hay un enfoque particular en mediadores liberados por los parásitos vivos y el análisis de cómo estos productos, en total y en los componentes individuales, pueden ser responsables de la capacidad de los helmintos para modular al sistema inmune del hospedero ¹⁹.

Previamente nuestro grupo ha reportado que los azúcares presentes en el antígeno total de *Taenia crassiceps* son determinantes para reclutar una población de células mieloides con actividad supresora sobre linfocitos T, sin embargo el papel que tienen los carbohidratos en la infección con *Taenia crassiceps* ha sido poco estudiado, aunque recientemente se ha identificado a las moléculas MGL 1 y MGL 2 sobre-expresadas en macrófagos alternativamente activados en animales infectados con éste céstodo.

Se ha propuesto que los carbohidratos tipo Lewis X presentes en la superficie de la membrana celular de algunos helmintos son capaces de modular la respuesta inmune hacia un tipo T_H2 ¹⁷. Por ejemplo, se ha observado que el SEA de *Schistosoma mansoni* así como la molécula ES-62 de *Acanthocheilonema vitae* están altamente glicosilados lo cual sugiere una importante participación de los

azúcares durante el proceso de polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 inducida por tales antígenos.

La interacción temprana entre antígenos glicosilados de helmintos y sus efectos sobre la susceptibilidad en el hospedero han sido poco estudiados. Por esta razón en este trabajo se comparó el curso de la infección en presencia y ausencia de la molécula mMGL que se sabe reconoce estructuras tipo Lewis X y N-acetilgalactosamina^{17, 25}. Lo primero que observamos es que en ausencia de MGL la carga parasitaria fue 8 veces más alta comparada con aquella de los ratones que tienen el gen funcional de MGL, denotando así un importante papel de esta lectina en la resistencia a *Taenia crassiceps*. Este hallazgo es interesante debido a que sólo existía un trabajo previo donde se había probado la ausencia de una lectina (receptor de manosa) en respuesta al *helminto* nemátodo *Trichuris muris* en donde no se observó ningún cambio significativo en la susceptibilidad a la infección. De modo que éste es uno de los primeros reportes donde se aprecia la importancia del reconocimiento temprano de carbohidratos parasitarios para aparentemente generar una respuesta protectora¹².

Cuando se analizó la respuesta inmune de éstos animales observamos que en ausencia de mMGL (mMGL -/-) predomina una respuesta tipo T_H2, ya que se encontraron mayores niveles de IgE e IL-4, factores asociados a la respuesta tipo T_H2. Esto último es consistente con el hecho de que se ha reportado que en el caso de *Taenia crassiceps* el paso de la respuesta T_H1 temprana hacia T_H2 es crucial para que este parásito prolifere^{38, 41}. En los tiempos indicados se obtuvieron Mø adherentes de la cavidad peritoneal para analizar el estado de activación que esta población presentaba. Tales células adherentes obtenidas de animales mMGL -/- sobre expresan los genes asociados a una activación alternativa de macrófagos y que previamente hemos observado únicamente en la cepa de ratones susceptible³⁸ a *T. crassiceps*, , mientras que las células obtenidas de los ratones mMGL +/+ no presentaron este estado de activación. Confirmando así el hallazgo previo de que únicamente los organismos en los cuales crece en grandes cantidades *Taenia crassiceps* presentan esta subpoblación de Mo.

Por RT-PCR se observó que las células provenientes de ratones mMGL^{-/-} desarrollan una activación alternativa de macrófagos antes que las células provenientes del grupo mMGL^{+/+}, lo que se asocia a mayor susceptibilidad frente a *Taenia crassiceps*. Esta observación está en franco contraste de lo observado en la infección por *H. polygyrus* y *N.brasiliensis* donde se ha reportado que los macrófagos alternativamente activados (MøaA) ayudan de una manera importante a expeler al gusano intestinal^{19, 37}. Aquí nosotros observamos que los ratones que presentaban MøaA alojaron una mayor carga parasitaria. Probablemente esta diferencia se deba al sitio donde residen los parásitos, ya que en las parasitosis intestinales la respuesta T_H2 ayuda a la eliminación del parásito; y en nuestro modelo de trabajo, parasitosis en la cavidad peritoneal, la respuesta de tipo T_H2 favorece el establecimiento de la parasitosis en tiempos crónicos. Entonces estos datos en conjunto sugieren que *Taenia crassiceps* posee ligandos para mMGL 1 que como resultado podrían enviar una señal pro-inflamatoria en los Mø, por lo tanto al estar ausente esta molécula los Mø no reciben dicha señal ocasionando que adquieran el fenotipo de activación alternativa.

Lo poco que se sabe del papel de mMGL en infecciones por helmintos viene del trabajo de Brombacher et al²⁵, quienes identificaron a los MGL como marcadores moleculares en macrófagos alternativamente activados ya que documentaron que la expresión de dos miembros de genes de la familia de las lectinas tipo-C (mMGL 1 y mMGL 2) es inducida en diversas poblaciones de macrófagos alternativamente activados, incluyendo macrófagos peritoneales obtenidos en infecciones con *Trypanosoma brucei brucei* o el helminto *Taenia crassiceps* y macrófagos alveolares obtenidos de una modelo de asma alérgica. Estos autores también demostraron que IL-4 e IL-13 regulan la alta la expresión de mMGL 1 y mMGL 2; así como de que mMGL 2 es dependiente de la señalización del receptor de IL-4, lo que también sucede en monocitos humanos^{22, 36}.

Con el objetivo de conocer como se presentó la respuesta T_H1 se determinó la secreción de IFN- γ en linfocitos de bazo estimulados con antígeno específico de *Taenia crassiceps*, donde observamos una clara tendencia de aumentar la producción de IFN- γ desde el inicio de la infección en ambos grupos de animales, pero significativamente mayor en las células provenientes de ratones mMGL^{+/+}, lo

que coincide con menor número de parásitos en este grupo de ratones, confirmando así que la presencia de mMGL se asocia a una alta producción de citocinas T_H1.

En la determinación de IL-12 observamos que en ambos grupos de ratones se presenta una clara tendencia de disminución de esta citocina conforme avanza el tiempo de infección, lo que es más claro en el grupo de ratones mMGL^{-/-}, a pesar de ser estimuladas con LPS+IFN- γ ; esto representa una disminución en la respuesta de los macrófagos a estímulos inflamatorios como LPS e IFN- γ .

La determinación de IL-4R otra molécula asociada a activación alternativa de macrófagos, mostró que las células peritoneales F4/80+ provenientes de ratones mMGL^{-/-} presentan mayor expresión de este receptor comparado con las provenientes de ratones mMGL^{+/+}.

Otros datos importantes que encontramos fueron una mayor expresión de PDL-1 y PDL-2 en ratones mMGL^{-/-}, lo que nos sugiere un potencial supresor en los macrófagos provenientes de este grupo de ratones, ya que se ha demostrado en *Taenia crassiceps* que la interacción de PD-1 expresado en células T, con los ligandos PDL-1 y PDL-2 puede inducir una señal inhibidora⁴⁸, por lo tanto en ausencia de mMGL los M ϕ con potencial supresor predominan.

Como se comprobó en otra investigación de nuestro grupo de trabajo, ratones resistentes a la infección montan una fuerte respuesta T_H1 con niveles altos de IgG2a e IFN- γ , incremento de la transcripción de TNF- α y óxido nítrico sintasa, y controlan eficientemente la infección por *Taenia crassiceps*. Mientras que ratones hembra del mismo fondo genético, STAT6^{-/-} que recibieron L-NAME (nitro-D-arginina metil ester) montaron una respuesta inmune similar pero con baja transcripción de iNOS, por lo tanto con bajos niveles de óxido nítrico y tuvieron significativamente una mayor carga parasitaria. Lo que sugiere que los M ϕ activados y la producción de NO son mecanismos efectores que contribuyen a que el huésped sea resistente a la infección con *Taenia crassiceps* fenómeno que no se encontró en el grupo ratones mMGL^{-/-}.

En resumen nuestros datos sugieren que la molécula mMGL es importante en el reconocimiento temprano de *T. crassiceps* y que su interacción con antígenos del parásito podrían enviar una señal de activación en células asociadas a la respuesta inmune innata que a su vez activa una mejor respuesta inmunológica contra éste parásito. Estos mecanismos merecen estudios más profundos y detallados.

CONCLUSIONES.

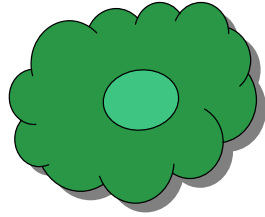
En conjunto los datos obtenidos nos sugieren que:

- Los ratones mMGL *-/-* son más susceptibles a la infección por *Taenia crassiceps*.
- La susceptibilidad establecida en los ratones mMGL *-/-* se debe a que su respuesta de tipo T_H2 es mayor que la respuesta de tipo T_H1.
- La ausencia de mMGL favorece una respuesta T_H2.
- Los macrófagos provenientes de ratones mMGL *-/-* expresan marcadores de activación alternativa en etapas crónicas de la infección, por lo tanto mMGL no es necesaria para la inducción de macrófagos alternativamente activados.

PROPUESTA.

- La molécula MGL podría reconocer antígenos glicosilados de *T. crassiceps* que disparan una respuesta protectora contra la infección por este parásito.

mMGL +/+



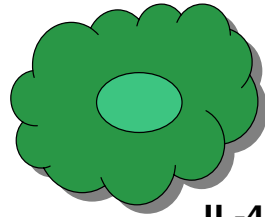
IFN- γ
IL-12

T_H1



Resistencia

mMGL -/-



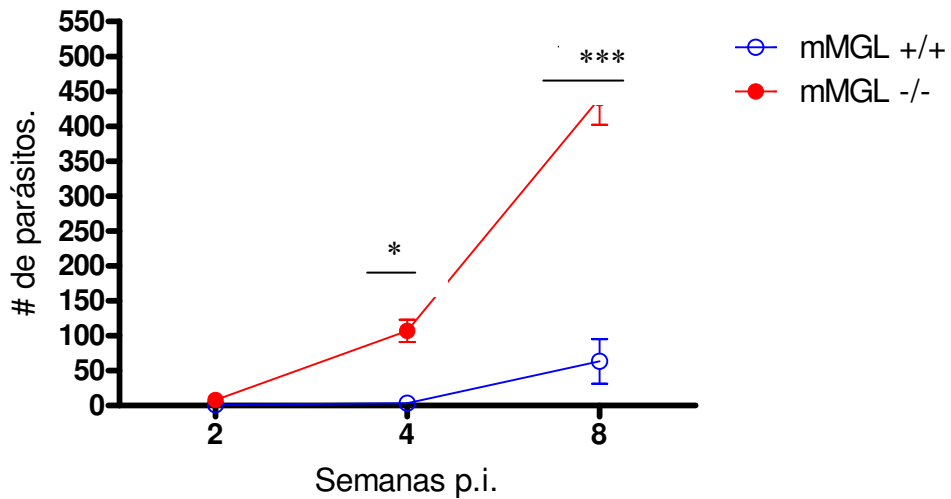
IL-4
IL-13
IgG1
IgE

T_H2



Susceptibilidad

Carga parasitaria.



BIBLIOGRAFÍA.

1. **Abul K. Abbas, Lichtman Andrew H., Pillai Shiv.** 2008. Inmunología celular y molecular. 6^a edición. ELSEVIER. 309 – 319.
2. **Alonso-Trujillo Javier, Rivera-Montoya Irma, Rodríguez-Sosa Miriam, Terrazas-Valdés Luis I.,** 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. Vol.100. 1341 – 1350.
3. **Andrew Penelope J, Mayer Bernd.** 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovascular Research. 43: 521 – 531.
4. **Anthony Robert M., Rutitzky Laura I, Urban Jr. Joseph F, Stadecker Miguel, Gause William C.** 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nature Immunology. Reviews. 975 -985.
5. **Brito Galeana Fabiola, Yamazaki Marco A, Espinosa Padilla Sara, Vázquez Tsuji Óscar, Huerta López José, Berrón Pérez Renato.** 2003. Vol. 12. N° 2. Alergía, Asma e Inmunología Pediátricas. 56 -62.
6. **Butel Janet S.** Microbiología Médica. 16^a Edición. Manual Moderno. 3 -8. 709 – 746.
7. **Caballero Soto M.^a L.** 1998. Inmunología de la infección por helmintos Alergol Inmunol Clin. Vol 13. N°6. 297 – 313.
8. **Cambi Alessandra and Fidgor Carl G,** 2005. Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins. Current Opinion in Immunology, 17: 345 – 351.
9. **Coombs Peter J, Taylor Maureen E, Drickamer,** 2006. Two categories of mammalian galactose-binding receptors distinguished by glycan array profiling. Glycobiology. 16: 1 – 11

10. **den Dunne – Sonja Jeroen, Gringhuis – Teunis B. H. Geijtenbeek.** 2009. Innate signaling by the C- type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol immunother.* 58: 1149 – 1157.
11. **Denda- Nagai Kaori, Kubota Noboyoshi, Tsuiji Makoto, Mika Kamata, Irimura Tatsuro.** 2002. Macrophage C-type lectin on bone marrow-derived immature dendritic cells is involved in the internalization of glycosylated antigens. *J. Immunol.* 168: 443 – 450.
12. **deSchoolmeester, Martínez-Pomares Luisa, Gordon Iamson and Else Kathryn J.,** The manose receptor binds *Trichuris muris* excretory/secretory proteins but is not essential for protective immunity. 2008. *Immunology*, 126, 246 – 255.
13. **Dissanayake Senarath, Amith Ray S, Shahin Allen.** 2004. *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL-6 expression in naive murine macrophages via Toll – like receptors (TLRs). *Molecular Immunology.* 41: 391 – 398.
14. **Dissanayake Senarath, Shahin Allen.** 2006. Induction of interferon- γ by *Taenia crassiceps* glycans and Lewis sugars in naïve BALB/c spleen and peritoneal exudate cells. *Molecular Immunology.* 44: 1623 – 1630.
15. **Duque Correa M.A, Rojas López M.,** 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología.* Vol. 26. Núm. 2. 73 – 86.
16. **Dupasquier Marcel, Stoitzner Patrizia., Wan Hui., Cerqueira Denise, Oudenaren Adri van, Voeman Jane S. A., Denda-Nagai Kaori. Irimura Tatsuro, Raes Geert, Romani Nikolaus, Leenen Pieter J. M.** 2006. The dermal microenvironment induces the expression of the alternative activation marker CD 301/ Mmgl in mononuclear phagocytes, independent of IL-4/ IL – 13 signaling, *Journal of Leukocyte Biology.* Vol. 80. 838 – 849.

17. **Gómez – García Lorena, Rivera Montoya Irma, Rodríguez –Sosa Miriam, Terrazas Luis I.** 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res.* 99: 440 – 448.
18. **Harcus Yvonne, Nicoll Gavin, Murray Janice, Filbey Kara, Gomez - Escobar Natalia, Maizels Rick M.** 2009. C-type lectins from the nematode parasites *Heligmosomoides polygyrus* and *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology International.* 58: 461- 470.
19. **Hewitson James P., Grainger John R., Maizels Rick M.** 2009. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 167: 1 – 11.
20. **Kerrigan Ann M., Brown Gordon D.** 2008. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology.* Doi:10.1016/j.imbio.1008.11.003.
21. **Kilpatrick David C..** 2008. 23rd International Lectin Meeting /Interlec – 23) *Biochem. Soc. Trans.* 36: 1453 – 1456.
22. **Kimura Toshifumi, Imai Yasuyuki, Tatsuro Irimura.** 1995. Calcium-dependent Conformation of a Mouse Macrophage Calcium-type Lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270. N° 27: 16056 – 16062.
23. **Lloyd David H., Viact Jacqueline, Werling Dirk, Reme Christophe A., Gatto Hugues.** 2007. Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation. *The Journal compilation* 18: 197 – 204.
24. **Maizels Rick M., Balic Adam, Gomez – Escobar Natalia, Nair Meera, Taylor Matt D, Allen Judtih E.** 2004. Helminth parasites – masters of regulation. *Inmunological Revius.* 89 – 116.

25. **Rich M. Maizels and Yasdanbakhsh**, 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms, *IMMUNOLOGY*, Vol. 3. September 733 – 744
26. **Mylonas Katie J, Nair Meera G, Prieto – Lafuente Libia, Paape Daniel and Allen Judith E.**, 2009. Alternatively Activated Macrophages Elicited by Helminth Infection Can be Reprogrammed to Enable Microbial Killing, *The Journal of Immunology*. 3084 – 3094.
- 27 **McGreal Eamon P., Martínez-Pomares Luisa, Gordon Siamon.** 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Molecular Immunology*. 41: 1109 – 1121.
28. **McGreal Eamon P., Miller Joanna L, Gordon Siamon.** 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C- type lectin receptors. 17: 18 – 24.
29. **Moreno C, Sánchez – Ibarrola A.**, 2003. Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario, *REV MED UNIV NARRA/ Vol 47, N^a 3.* 29 – 33
30. **Mori Masataka.** 2007. Regulation of Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and Arginine Recycling. *The Journal of Nutrition*. 137:1616S – 1620S.
31. **Nyame A. Kwame, Ziad S. Kawar, and Cummings Richard D.**, 2004. Antigenic glycans in parasitic infections: implications for vaccines and diagnostics, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 426, 182 – 200.
32. **Noël Wim, Raes Geert, Hassanzadeh Ghassabeh Gholamreza, De Baetselier Patrick, Beschin Alain.** 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. Vol.20, N^o 3, 126 – 133.
33. **Ofek Itzhak and Nathan Sharon.** 1988. Lectinophagocytosis: a Molecular Mechanism of Recognition between Cell Surface Sugars and Lectins in the Phagocytosis of Bacteria. *Infection and Immunity*. Vol. 56, N^o 3. 539 – 547.

34. **Onami M. Thandi, Meei – Yun Lin, Page Dawnw M., Reynolds Shirley A., Katayama Karol D., Marth D. Jamey, Irimura Tatsuru, Varki Ajit, Varki Nissi, and Hedrick M. Stephen.** 2002. Generation of Mice Deficient for Macrophage Galactose– and N-Acetylgalactosamine- Specific Lectin: Limited Role in Lymphoid and Erythroid Homeostasis and Evidence for Multiple Lectins. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 22. N° 14. 5173 – 5181.
35. **Oo-puthinan Sarawut, Maenuma Keisuke, Sakakura Masayoshi, Denda – Naigai Kaori, Tsuiji Makoto, Shimada Ichio, Nakamura – Tsuruta Sachiko, Hirabayashi Jun, Bovin Nicolai V. And Irimura Tatsuro.** 2007. The amino acids involved in the distinct carbohydrate specificities between macrophage galactose-type C-type lectins 1 and 2 (CD 301 a and b) of mice. *ScienceDirect*. 1780: 89 – 100.
36. **Raes Geert, Brys Lea, Dahal Bhola K., Brandt Jef, Grooten Johan, Brombacher Frank, Vanham Guido, Noël Wim, Bogaert Pieter, Boonefaes Tom, Kindt Anne, Hassanzadeh Ghassabeh Gholamreza.** 2005. Macrophage galactose-type C–type lectins as novel markers for alternatively activated by parasitic infections and allergic airway inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. Vol 77. 321 – 327.
37. **Reyes José L, Terrzas César A., Alonso – Trujillo Javier, van Rooijen Nico, Satoskar Abbay R., Terrzas Luis I.,** 2010, Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo, *International Journal for Parasitology*, 1 – 12.
38. **Reyes José L., Terrazas A. Cesar, Vera – Arias Laura, Terrazas Luis I.,** 2009, Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*. 580: 1 – 13.
39. **Reyes José L., Terrzas Luis I.,** 2007, The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections, *Parasitic Immunology*, 29, 609 – 619.

40. **Robinson Matthew J., Sancho David, Slack Emma C., LeibundGut-Landmann and Reis e Sousa Caentano.** 2006. Nature Immunology, Myeloid C-type lectins in innate immunity. Vol.7. N° 12. 1258 – 1265.
41. **Rodríguez – Sosa Miriam, David John R., Bojalil Rafael, Satoskar Abbay R., Terraza Luis I.** 2002. Cutting Edge: Susceptibility to the Larval Stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* Is Mediated by Th2 Response Induced Via STAT6 Signaling. Immunology. 168 (7). 3135 – 3139.
42. **Rodríguez – Sosa Miriam, Saavedra Rafael, Tenorio Edna P., Rosas Lucia E., Satoskar Abbay R., Terraza Luis I.,** 2004. A STAT4-Dependent Th1 Response Is Required for Resistance to the Helminth Parasite *Taenia crassiceps*. Infection and Immunity. Vol. 72. N° 8. 4552 – 4560.
43. **Rodríguez – Sosa Miriam, Satoskar Abbay R., Calderón Rodrigo, Gomez-García Lorena, Saavedra Rafael, Bojalil Rafael and Terraza Luis I.** 2002. Chronic Helminth Infection Induces Alternatively Activated Macrophages Expressing High Levels of CCR5 with Low Interleukin-12 Production and Th2-Biasing Ability. Vol.70. N° 7. 3656 – 3664.
44. **Sakakura Masayoshi, Oo-puthinan Sarawut, Moriyama Chifumi, Kimura Tomomi, Moriya Jun, Irimura Tatsuro and Shimada Ichio.** 2008. Carbohydrate Binding Mechanism of the macrophage Galactose-type C-type Lectin 1 Revealed by Saturation Transfer Experiments. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 283. N° 48. 33665 – 33673.
45. **Sharpe Arlene R., Wherry E. John, Rafi Ahmed and Gordon J Freeman,** 2007, The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulation autoimmunity and infection, Nature Immunology, Vol 8, N° 3, 239 – 245.
46. **Stepim Cinthia C., Cerbán Fabio M.,** 2007. Macrophages and arginase induction as a mechanism for parasite escape. Journal Medicine. Vol. 67. 737 – 746.

47. **Suzuki Noriko, Yamamoto Kazuo, Toyoshima Satoshi, Osawa Toshiaki and Irimura Tatsuro.** 1996. Molecular Cloning and Expression of Cdna Encoding Human Macrophage C-Type Lectin. 156 (1); 128 – 135.
48. **Terrazas Luis I, Cruz M., Rodriguez – Sosa Miriam, Bojalil R., Gacrcía – Tamayo F., Larralde C.** 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. Vol. 85. 135 – 141.
49. **Terrazas Luis I, Montero Daniel, Terrazas Cesar A., Reyes J L., and Rodríguez – Sosa Miriam.** 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. International Journal for Parasitology. 35: 1349 – 1358.
50. **Toenjes S.A., Kuhn R.E.** 2003. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. 89: 407 – 413.
51. **Tsuiji Makoto, Fujimori Mayuko, Ohashi Yoshimi, Higashi Nobuaki, Onami Thandi M., Hedrick Stephen M., and Irimura Tatsuro.** 2002. 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. N° 32. 28892 – 28901.
52. **Tsuiji Makoto, Fujimori Mayuko, Seldin Michael F., Taketo Makoto M., Irimura Tatsuro.** 1999. Genomic structure and chromosomal location of the mouse macrophage lectin gene. 50: 67 – 70.
53. **van Kooyk Yvette.** 2008. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. Biochemical Society Transaction. Vol.36. Part 6. 1478 – 1481.
54. **van Vliet Sandra J., Aarnoudse Corlien A., Broks-van Berg Venice, Books Marty}ine, Geijtenbeek Teunis B. H. And van Kook Yvette.** 2007. MGL-mediated internalization and antigen presentation by dendritic cells: A role for tyrosine-5. Journal Immunology. 37: 2075 – 2081.

55. **van Vliet Sandra J., Sealand Eirikur and van Kook Yvette.** 2008. Sweet preferences on MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunology*. Vol. 29. 83- 90.
56. **van Vliet Sandra J., van Liempt Ellis, Sealand Eirikur, Aanoudse Corlien A., Appelmeik Ben, Irimura Tatsuro, Geijtenbeek Teunis B. H., Blixt Ola, Alvarez Richard, van Die Irma and van Kook Yvette.** 2005. Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the Ctype lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *International Immunology*. Vol. 17. N° 5. 661 – 669.
57. **Yu Xiao-Qiang, Tracy Miles E., Ling Erjun, Scholz Frank R., Trenczek Tina.** 2005. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 285 – 295.
58. **Zhang Huan, Wang Hao, Wang Lingling, Song Xiaoyan, Zhao Jianmin, Qiu Limei, Li Ling, Cong Ming, Song Linsheng.** 2009. A novel C-type lectin (Cflec-3) from *Chlamys farreri* with three carbohydrate-recognition domains. *Fish Shellfish Immunology*. 26: 707 – 715.



Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection

José L. Reyes, César A. Terrazas, Laura Vera-Arias, Luis I. Terrazas *

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2009
Received in revised form 30 April 2009
Accepted 3 May 2009
Available online 22 May 2009

Keywords:

Taenia crassiceps
Dendritic cells
Alternatively activated macrophages

ABSTRACT

Antigen presenting cells (APCs) are critically involved in the interaction between pathogens and the host immune system. Here, we examined two different populations of APCs in mice that are susceptible (BALB/c) or resistant (C57BL/6) to *Taenia crassiceps* cysticercosis. Bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) from both strains of mice were exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted antigens (TcES) and, at the same time, to the Toll-like receptor (TLR) ligand LPS. BMDCs from BALB/c mice underwent a partial maturation when incubated with TcES and displayed decreased responses to TLR-dependent stimuli associated with low CD80, CD86, CD40 and CCR7 expression and impaired IL-15 production. These BMDCs-induced impaired allogenic responses. In contrast, BMDCs from C57BL/6 mice displayed normal maturation and induced strong allogenic responses. Moreover, the exposure to TcES resulted in a lower production of IL-12 and TNF- α by LPS-activated DCs from BALB/c mice compared to C57BL/6 DCs. Three parameters of macrophage activation were assessed during *Taenia* infection: LPS + IFN- γ -induced production of IL-12, TNF- α and nitric oxide (NO) in vitro; infection-induced markers for alternatively activated macrophages (Arginase-1, RELM- α , Ym-1 and TREM-2 expression) and suppressive activity. The maximum response to LPS + IFN- γ -induced TNF- α , IL-12 and NO production by macrophages from both strains of mice occurred 2 wk post-infection. However, as infection progressed, the production of these molecules by BALB/c macrophages declined. While the BALB/c macrophages displayed impaired pro-inflammatory responses, these macrophages showed strong Arginase-1, Ym-1, RELM- α and TREM-2 expression. By contrast, C57BL/6 macrophages maintained a pro-inflammatory profile and low transcripts for alternative activation markers. Macrophages from *T. crassiceps*-infected BALB/c mice showed stronger suppressive activity than those from C57BL/6 mice. These findings suggest that APC activation at both early and late time points during *T. crassiceps* infection is a possible mechanism that underlies the differential susceptibility to *T. crassiceps* infection displayed by these mouse strains.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Genetic background influences the outcome of many parasitic diseases. For example, in *Leishmania major* infection, C57BL/6 mice mount a strong Th1 response and resolve the infection (Sacks and Noben-Trauth, 2002). In contrast, BALB/c mice mount a Th2-dominant response and develop chronic lesions (Sacks and Noben-Trauth, 2002). In other protozoan infections, such as toxoplasmosis, an opposite finding it has been observed: C57BL/6 mice succumb to *Toxoplasma gondii* infection despite a Th1 response, whereas BALB/c mice display resistance and survive for a longer period of time to similar challenges (Fux et al., 2003).

In helminthic infections, the genetic background of the host also plays an important role in the outcome of the infection. Intestinal nematodes induce different responses: *Heligmosomoides polygyrus* establishes long-term infections in most strains of mice and induces Th2-polarized responses (Gause et al., 2003). Furthermore, AKR mice clear the parasite faster than BALB/c mice, whereas C57BL/6 mice remain more susceptible to similar infections (Maizels and Yazdanbakhsh, 2003). *Nippostrongylus brasiliensis* infection is relatively short-term (6–10 days) under standard high-dose infections and induces a powerful and protective Th2 response; however, low-dose infections are typically chronic (Finkelman et al., 2004). Susceptibility to *Trichuris muris*, another intestinal nematode, is also linked to the development of a Th1 response; mice that fail to mount a protective Th2 response develop chronic infections (Patel et al., 2009). Furthermore, conflicting data on nematodes that are not strictly gastrointestinal, such as *Litomosoides sigmodontis*, have been reported. C57BL/6 mice are resistant to *L. sigmodontis* in an IL-4-dependent manner,

* Corresponding author at: Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM, Av. De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de Mexico, Mexico 54090, Mexico. Tel.: +52 55 5623 1292x438; fax: +52 55 5623 1138.

E-mail address: literrazas@campus.iztacala.unam.mx (L.I. Terrazas).

while BALB/c mice are susceptible to the same infection, despite their high levels of IL-4 (Le Goff et al., 2002). Moreover, BALB/c IL-4^{-/-} mice develop similar parasite loads to WT mice. Surprisingly, infection of IL-4 receptor (IL-4R α)-deficient BALB/c mice, which cannot respond to either IL-4 or IL-13, led to the accelerated death of the adult stage of the parasite, rather than enhanced parasite survival (Volkman et al., 2003; Maizels et al., 2004). This was associated with a switch to a type 1 response, suggesting that the adult parasite can be killed by Th1 inflammatory responses (Saeftel et al., 2003). Thus, type 2 responses are a critical determinant of the outcome of nematode infection but with very different dynamics depending on the stage of the parasite and strain of the host. In contrast to the well-described adaptive immunity against these helminth infections, the role of antigen presenting cells (APCs) is still unclear. There have only been limited studies on the macrophage and DC response to helminth antigens and the impact of these responses on the outcome of the infection is not known. Neurocysticercosis (NCC) is the most frequent parasitic disease affecting the central nervous system. It is a life-threatening helminth infection caused by the ingestion of eggs or oncospheres of the cestode *Taenia solium*, which after being activated in the intestines, rapidly migrate to the blood and frequently reside in the brain. The infection of the intermediate hosts by the metacystode stage of cestode species, especially *Taenia crassiceps* and *Mesocostoides corti*, appear to be very good models to unveil some of the mechanisms of the host-parasite interplay in cysticercosis and neurocysticercosis (Terrazas, 2008). Cysticercosis, which is caused by *T. crassiceps*, naturally infects rodents and the final hosts are canines. Nevertheless, there are reports demonstrating that immuno-compromised humans can develop *T. crassiceps*-cysticercosis (Heldwein et al., 2006). Additionally, antigenic similarities have been very well established between *T. solium* and *T. crassiceps* metacystodes (Suzuki et al., 2007). Therefore, sera from human patients suffering from NCC can recognize *T. crassiceps* antigens. Similarly, sera from mice infected with *T. crassiceps* are able to recognize *T. solium* antigens.

In experimental cysticercosis caused by *T. crassiceps* the immune response in BALB/c mice is initially Th1-like but becomes highly Th2-polarized 3 or 4 wk after infection (Terrazas, 2008). Resistance to this parasite has been associated with an early Th1-type response, as well as with the genetic background (Sciutto et al., 1991, 1995; Terrazas et al., 1998). Thus, BALB/c (MHC haplotype H2^d) mice are susceptible to infection, whereas C57BL/6 mice (MHC haplotype H2^b) are relatively resistant to a similar challenge with *T. crassiceps*. However, the immunological mechanisms associated with the differential susceptibility to *T. crassiceps* of these two strains of mice have been largely undefined. Even a comparative evolution of the immune response of BALB/c and C57BL/6 mice in response to *T. crassiceps* infection has not been evaluated. Therefore, we explored the mechanisms underlying the differences in susceptibility of these strains of mice. We evaluated and compared the response of APCs, such as dendritic cells and macrophages. Furthermore, we analyzed the antibody levels in the serum and cytokine production by splenocytes from both strains of mice to polyclonal and antigen-specific stimuli and associated our findings with the kinetics of parasite growth.

2. Materials and methods

2.1. Mice

6–8-wk-old female BALB/cAnN mice and C57BL/6 mice were purchased from Harlan Laboratories (México) and were maintained in a pathogen free environment at the FES-Iztacala, U.N.A.M. animal facility in accordance with Institutional and National guidelines.

2.2. Parasites, infection protocol and antigens

Metacystodes of *T. crassiceps* (ORF) were harvested in sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2–4 months of infection. The cysticerci were washed four times in phosphate-buffered saline (PBS; 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and used for mouse infection. Female BALB/c and C57BL/6 mice were infected with an intraperitoneal (i.p.) injection of 10 small non-budding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 ml PBS. The infected mice were sacrificed at weeks 2, 4 and 8 post-infection and the parasites harvested from their peritoneal cavity were counted. To obtain *T. crassiceps* excreted/secreted products (TcES), metacystodes were maintained in culture in PBS at 37 °C, the supernatant was collected after 24–48 h and centrifuged for 10 min at 5000 rpm. The protein was concentrated using Amicon Ultra Filters with a 50 and 100 kDa membrane cutoff (Millipore). The protein concentration was determined using a commercially available Bradford assay, treated with proteases inhibitors and stored at –70 °C until further use.

2.3. Cell preparations and culture conditions

The spleen was removed in sterile conditions from infected mice. 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% non-essential amino acids (all from GIBCO, BRL Grand Island, New York). The cells were centrifuged and the erythrocytes were lysed by resuspending 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, MA) 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 96 or 72 h, respectively.

2.4. Evaluation of cytokine production in vitro

Cell suspensions of lymphoid cells prepared as described above were diluted in supplemented RPMI-1640 to 3×10^6 cells/ml. The cell suspensions (1 ml) were placed in each well of a 24-well plate (Costar) and incubated with 1 μ g/ml of anti-CD3 for 72 h under similar conditions. After centrifugation, the supernatants were collected, aliquoted and stored at –20 °C until used. The IFN- γ , IL-4 and IL-13 levels were measured using a sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions (Peprotech-México, México, D.F.).

2.5. Isolation and activation of peritoneal macrophages

Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from the peritoneal cavity of 2-, 4- and 8-wk-*T. crassiceps* infected mice (BALB/c or C57BL/6 mice). The cells were washed twice with cold PBS and the red blood cells were lysed by resuspending the cells in Boyle's solution. Following two washes, the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer. The PECs were adjusted to 5×10^6 cells/ml in supplemented and cultured in 6-well plates (Costar). After 2 h at 37 °C and 5% CO₂, the non-adherent cells were removed by washing with warm supplemented RPMI medium. The adherent cells were removed using EDTA and readjusted to 1×10^6 cells/ml. The viability was checked at this point again (>90%). The cells (1 ml) were plated in 24-well plates (Costar) and the cells were activated

by the addition of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$, *Escherichia coli* 111:B4; Sigma, St. Louis, MO) plus IFN- γ (20 ng/ml, Peprotech). The cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. After this time, some of the cultured macrophages were processed for cytokine production. The cells were >90% macrophages, as determined by flow cytometry (data not shown).

2.6. RT-PCR assay to evaluate the macrophage activation status

The level of Arginase-1 (Arg-1), triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), macrophage migration inhibitory factor (MIF) and Resistin-like molecule- α (RELM- α) mRNA transcripts in peritoneal macrophages was determined by reverse transcription (RT)-PCR. At the indicated time points, adherent peritoneal macrophages from *T. crassiceps*-infected BALB/c and C57BL/6 mice were aseptically removed and without any further stimulation were processed for RNA extraction using the TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and a propanol–chloroform technique. The RNA was quantified and 3 μg of RNA were 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 μl final volume) 5 \times PCR buffer blue, 10 mM dNTP, 40 nM each forward and reverse primer (Table 1), 1 unit of Taq DNA polymerase (Sacace Biotechnologies, Italy) and 2 μl of the cDNA.

The program used for the amplification of each gene was an initial denaturation at 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 40 s, the indicated melting temperature (Table 1) for 50 s and 72 °C for 40 s and a final extension step of 72 °C for 4 min. All reactions were carried out 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 shown 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 are available in Table 1.

Table 1
Primers sequences used to amplify AAM Φ 's markers and cytokines.

Gene	Sequence	MT (°C)	Cycles	Prod.	Reference
GAPDH	F–CTC ATg ACC ACA gTC CAT gC R–CAC ATT ggg ggT Agg AAC AC	56	35	201	Renshaw et al. (2002)
Ym-1	F–TCA CAg gTC Tgg CAA TTC TTC Tg R–TTT gTC CTT Agg Agg gCT TCC TC	56	35	436	Nair et al. (2003)
Relm- α	F–ggT CCC AgT gCA TAT ggA TgA gAC R–CAC CTC TTC ACT CgA ggg ACA gTT	65	35	290	Nair et al. (2003)
Arginase-1	F–CAg AAg AAT ggA AgA gTC Ag R–CAg ATA TgC Agg gAg TCA CC	54	35	250	Nair et al. (2003)
iNOS	F–CTg gAg gAg CTC CTg CCT CATg R–gCA gCA TCC CCT CTg ATg gTg	62	35	449	Yoshida et al. (2000)
TREM-2	F–TCC CAA gCC CTC AAC ACC A R–TTC CAg CAA ggg TgT CAT CTg CgA	56	35	230	Kim et al. (2005)
IFN- γ	F–AgC ggC TgA CTg AAC TCA gAT TgT Ag R–GTC ACA gTT TTC AgC TgT ATA ggg	57	35	243	Ulett et al. (2000)
TNF- α	F–ggC Agg TCT ACT TTg gAg TCA TTg C R–ACA TTC gAg gCT CCA gTg AAT TCg	59	35	307	Ulett et al. (2000)
MIF	F–gCC AgA ggg gTT TCT gTC g R–gTT CgT gCC gCT AAA AgT CA	58	35	118	Tuncman et al. (2006)

MT, Melt temperature; MIF, macrophage migration inhibitory factor; F, forward primer; R, reverse primer.

2.7. Densitometry analysis

For the different time points each sample expression levels were normalized against the Housekeeping gene GAPDH and values are presented as arbitrary units (an average of 2–3 animals is shown).

2.8. Detection of nitric oxide production

The nitric oxide level in the supernatants of the cultured macrophages were assayed by determining the increase in nitrite concentration (Migliorini et al., 1991) using the Griess reaction adapted to microwell plates (Costar). Briefly, 50 μl of culture supernatant was mixed with an equal volume of Griess reagent, incubated for 10 min at room temperature in the dark and the absorbance was measured at 570 nm in an automatic microplate reader (Multiskan Ascent, ThermoLab Systems). The values were quantified using serial dilutions of sodium nitrite.

2.9. Analysis of cell surface markers in macrophages

The F_c receptors on the peritoneal macrophages were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (Biolegend, CA, USA) and stained with a FITC-conjugated monoclonal antibody against F4/80 (Biolegend, CA, USA) and PE-conjugated antibodies against PD-L1 and PD-L2 (Biolegend). The stained cells were analyzed on a FACsCalibur flow cytometer using Cell Quest software (Becton Dickinson).

2.10. Co-culture of macrophages-CD90 cells

Co-culture of macrophages obtained from infected mice with naive CD90 cells was performed as previously reported (Terrazas et al., 2005). Briefly, macrophages were obtained as described. Splenocytes were prepared from naive mice, and enriched for CD90⁺ cells (95% by FACs analysis) using CD90 magnetic cell sorter beads (MACS, Miltenyi Biotec). CD90 cells were plated in 96 well flat bottom plates which were pre-coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Biolegend) at 1 $\mu\text{g/ml}$. Three hours later macrophages were added to CD90 T cells at ratios of 1:4, 1:8 and 1:16 (macrophages:CD90). Co-cultures were maintained at

37.8 °C and 5% CO₂ for 72 h, and then [³H] thymidine (185 GBq/mmol activity, Amersham, England) 0.5 µCi/well was added and incubated for a further 18 h. Cells were harvested on a 96-well harvester (Tomtec, Finland) then counted using a 1450 micro β-plate counter (Trilux, Finland). Values are represented as counts per minute (CPM) from triplicate wells.

2.11. *In vitro* bone marrow-derived dendritic cell maturation and cytokine production

Dendritic cells (DCs) were obtained as previously described (Lutz et al., 1999). Briefly, femurs and tibias were aseptically harvested from naïve BALB/c or C57BL/6 mice and the bone marrow was flushed. The cells were washed and adjusted to 5×10^5 cells/ml and cultured with 20 ng/ml of recombinant murine GM-CSF (Peprotech, México). Five days later, the BMDCs (10^5) were cultured in 200 µl in 96-well flat-bottom culture plates and stimulated with medium alone, 1 µg/ml LPS (*E. coli* 0111:B4, Sigma) or 20 µg/ml TcES. Some BMDC cultures were first incubated with 20 µg/ml and immediately stimulated with 1 µg/ml LPS. After 24 h, the supernatants of the cell cultures were collected and the IL-12, IL-15 and TNF-α levels were determined using commercially available ELISA kits (Peprotech, México).

2.12. Analysis of cell surface markers in BMDCs

The surface expression of DC maturation markers was analyzed using multicolor flow cytometry. DCs (either untreated or stimulated for 24 h with LPS, LPS + TcES or TcES) were harvested, washed and suspended in cold PBS containing 5% FCS and 0.05% NaN₃. The Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 for 20 min at 4 °C. The cells were washed and triple stained with an APC-conjugated antibody against CD11c, FITC-conjugated monoclonal antibodies against CD40 or MHC-II and PE-conjugated antibodies against CCR7, CD86 or CD80 (all antibodies were from Biologend). The stained cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer using Cell Quest software (Becton Dickinson).

2.13. DC-T cell allogeneic co-cultures

Allogeneic CD4⁺T cells were enriched using a CD4 T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DCs were activated with LPS, TcES or both for 24 h, washed and co-cultured with allogeneic naïve CD4⁺T cells (10^5 cells/well) in complete RPMI 1640 culture medium. The proliferation was quantified by pulsing the cells for 18 h with 0.5 µCi of [³H] thymidine (Amersham Biosciences). The cells were then harvested and the incorporation of radioactivity was assessed.

2.14. Antibody ELISA

Peripheral blood was collected 2, 4 and 8 wk after infection following tail snips of the *T. crassiceps*-infected BALB/c and C57BL/6 mice. *T. crassiceps*-specific IgG1 and IgG2a levels were determined by ELISA, as previously described. The results are expressed as the maximum serum dilution (endpoint titer) in which antibody was still detected. Total IgE production was detected using the Opt-ELISA from Biologend.

2.15. Statistical analysis

The comparisons between the BALB/c and C57BL/6 groups were made using Student's unpaired *t* test. A *p* < 0.05 was considered significant. The statistical significance of the serum titer was determined by non-parametric tests using the Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank test.

3. Results

3.1. Time course of *T. crassiceps* infection in BALB/c and C57

Following i.p. inoculation of ten *T. crassiceps* metacystodes, BALB/c mice developed large parasite loads 8 wk post-infection, whereas similarly infected C57BL/6 mice developed either no or small parasite burdens with significantly fewer parasites per mouse (Fig. 1A). Interestingly, the differences in parasite burden were evident as early as 2 wk post-infection when no parasite was detectable in 75% of the C57BL/6 mice, while 80% of BALB/c mice contained at least 2 larvae. These differences became greater as the infection progressed. After 4 wk of infection, 100% of the BALB/c mice harbored different amounts of parasites in their peritoneal cavity, while only 20% of the C57BL/6 mice harbored a few parasites. The parasite loads increased at 8 wk post-infection. Similarly, antibody responses to *T. crassiceps* infection showed important differences between strains, the BALB/c mice had higher titers of anti-*Taenia* IgG1 and Total IgE (Fig. 1B and C) but lower levels of Ag-specific IgG2a when compared with the infected C57BL/6 mice (Fig. 1D).

3.2. Kinetics of *in vitro* cell proliferation and cytokine production by Ag-stimulated splenocytes from BALB/c and C57BL/6 mice

Splenocytes were isolated from both strains of mice at different time points after infection. The splenocytes (3×10^6 ml⁻¹) were stimulated with either 25 µg/ml of soluble *T. crassiceps* antigen (AgTc) or 1 µg/ml of plate-bound anti-CD3 antibody and cultured for 4 or 3 days, respectively. The proliferative response was measured using ³H-thymidine uptake. Two wk post-infection, the splenocytes from BALB/c mice displayed an increased proliferative response compared to C57BL/6 splenocytes to both types of stimuli. However, as the infection became more chronic, the proliferative response to both AgTc and anti-CD3 in the BALB/c mice declined, whereas the C57BL/6 mice maintained a more consistent response to both stimuli as the infection progressed (Fig. 2A and B).

The culture supernatants from Ag-stimulated proliferation assays were analyzed using an ELISA for the presence of the Th1-associated cytokine IFN-γ and the Th2-associated cytokines IL-4 and IL-13. Ag-stimulated splenocytes from both strains produced similar levels of IFN-γ 2 wk post-infection (Fig. 2C). However, 4 and 8 wk post-infection, the antigen-specific IFN-γ production by the spleen cells from BALB/c decreased and did not reach the level produced by the C57BL/6 splenocytes (Fig. 2C). In contrast, as early as 2 wk post-infection, the splenocytes from the BALB/c mice produced significantly more IL-13 than the C57BL/6 splenocytes. However, both strains of mice displayed comparable levels of IL-4 production. As the infection progressed, the BALB/c mice produced significantly greater levels of both IL-4 and IL-13 compared to splenocytes from *T. crassiceps*-infected C57BL/6 mice (Fig. 2D and E).

3.3. Cytokine production by macrophages

Macrophages were isolated from the peritoneal cavities of both strains of infected mice and either 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 seen in Fig. 3, the macrophages from *T. crassiceps*-infected mice produced lower levels of IL-12, TNF-α and NO than the macrophages isolated from C57BL/6 mice, which maintained a higher pro-inflammatory response throughout the infection (Fig. 3A–C).

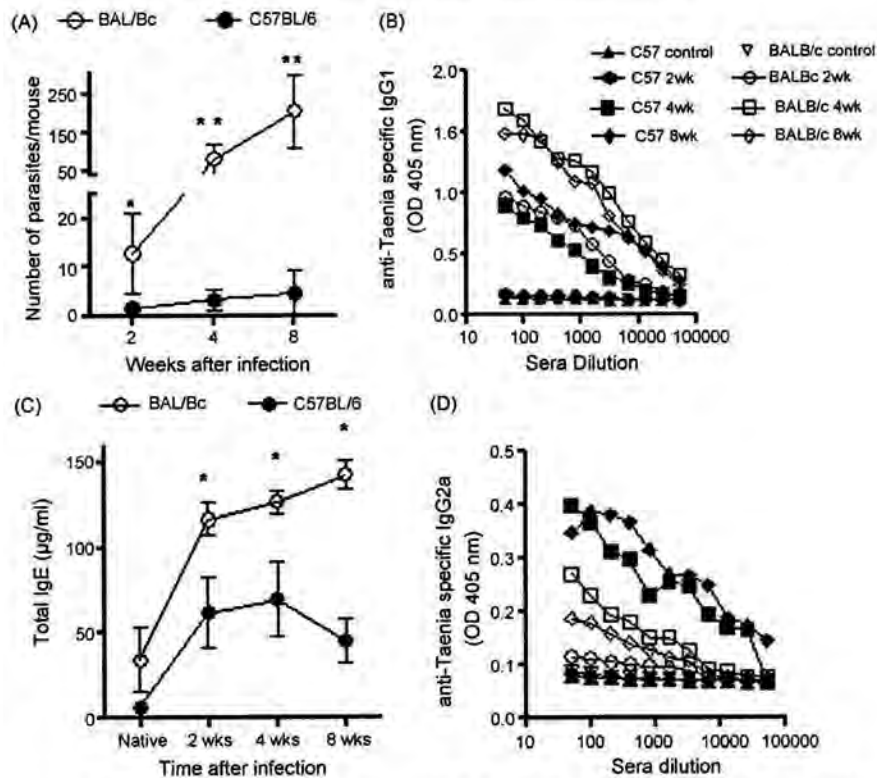


Fig. 1. Time course of *T. crassiceps* infection and antibody response in BALB/c and C57BL/6 mice. (A) Parasite load: Animals were infected i.p. with ten cysticerci and the parasite load was monitored 2, 4 and 8 wk post-infection. The data are expressed as the mean number of parasites per mouse \pm SD. The data are representative of two independent experiments ($n = 10$ mice per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Antibody responses: The mice were bled by tail snipping at different time points following *T. crassiceps* infection and the serum level of the Th2-associated IgG1 (B) and total IgE (C), as well as the Th1-associated IgG2a (D) was measured by ELISA.

3.4. Dynamics of macrophage gene expression at site of infection

Next, we analyzed whether *T. crassiceps* infection of BALB/c or C57BL/6 mice affected the expression of different genes in macrophages at the site of infection. Macrophages were isolated from the peritoneal cavities of both strains of infected mice 2, 4 and 8 wk post-infection. RNA was isolated from the adherent cells (>90% positive for F4/80) without any stimulation. Consistent with our own findings, and in agreement with previous studies (Terrazas et al., 2005; Ghassabeh et al., 2006), the macrophages from BALB/c mice rapidly (2 wk post-infection) and strongly up-regulated genes encoding proteins that are associated with alternative activation, such as Arg-1, RELM- α , Ym-1 and triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM-2). Additionally, at this time point, there was weak expression of iNOS. However, as infection progressed some changes were observed in these markers, whereas Ym-1 transcripts decreased by week 8 p.i. and Arg-1 expression was maintained without changes on weeks 4 and 8; the transcripts of RELM- α and TREM-2 were more elevated by week 8 after infection on macrophages from *T. crassiceps*-infected BALB/c mice, in contrast, transcripts for iNOS were inhibited (Fig. 4A). On the other hand, macrophages from the C57BL/6 mice displayed a weak and transient expression of Arg-1, Ym-1 and TREM-2 early after infection, as well as increased transcripts of iNOS (Fig. 4A and B). While the expression of iNOS was sustained at week 4, the expression of Arg-1, TREM-2, Ym-1 and RELM- α was down-regulated as the infection progressed in this strain of mice (Fig. 4A and B). Additionally, the macrophages isolated from the C57BL/6 mice expressed a similar mRNA level for the pro-inflammatory cytokines TNF- α , and MIF throughout the infection compared to the macrophages from BALB/c mice, however,

transcripts for IFN- γ were higher at week 8 post-infection in C57BL/6 mice. In fact, by week 8 post-infection, the macrophages from C57BL/6 mice expressed a clear pro-inflammatory profile, whereas the BALB/c macrophages displayed mixed transcripts of alternative activation and pro-inflammatory markers (Fig. 4A). A semi-quantitative densitometry analysis using 2–3 samples per time point is presented in Fig. 4B, samples were normalized against their own housekeeping gene. These data further support differences in gene expression between macrophages obtained from BALB/c mice versus macrophages from C57BL/6 mice after infection with *T. crassiceps* metacestodes.

T. crassiceps infection induces greater PD-L2 expression as well as suppressive activity on BALB/c macrophages than C57BL/6 macrophages. To investigate whether the different markers that were altered on the macrophages during *T. crassiceps* infection could also reflect other activities, we analyzed the expression of surface markers on macrophages from both strains and determined their previously reported suppressive activity. The surface expression of PD-L1 and PD-L2 has been associated with alternatively activated macrophages (AAM ϕ) (Smith et al., 2004; Terrazas et al., 2005) and differences in the expression of these molecules during *T. crassiceps* infection were observed between the two strains. Interestingly, PD-L1 expression was similarly increased on macrophages from both strains of mice 2 and 4 wk post-infection. However, in chronic infections, the macrophages from BALB/c mice expressed twice as much PD-L1 than macrophages from C57BL/6 mice, which down-regulated PD-L1 expression to levels observed at 2 wk post-infection. A clear contrast was evident in the expression of PD-L2, 2 wk post-infection the expression was low and similar between the two strains; however, by week 4 post-infection an increase in the expression of PD-L2

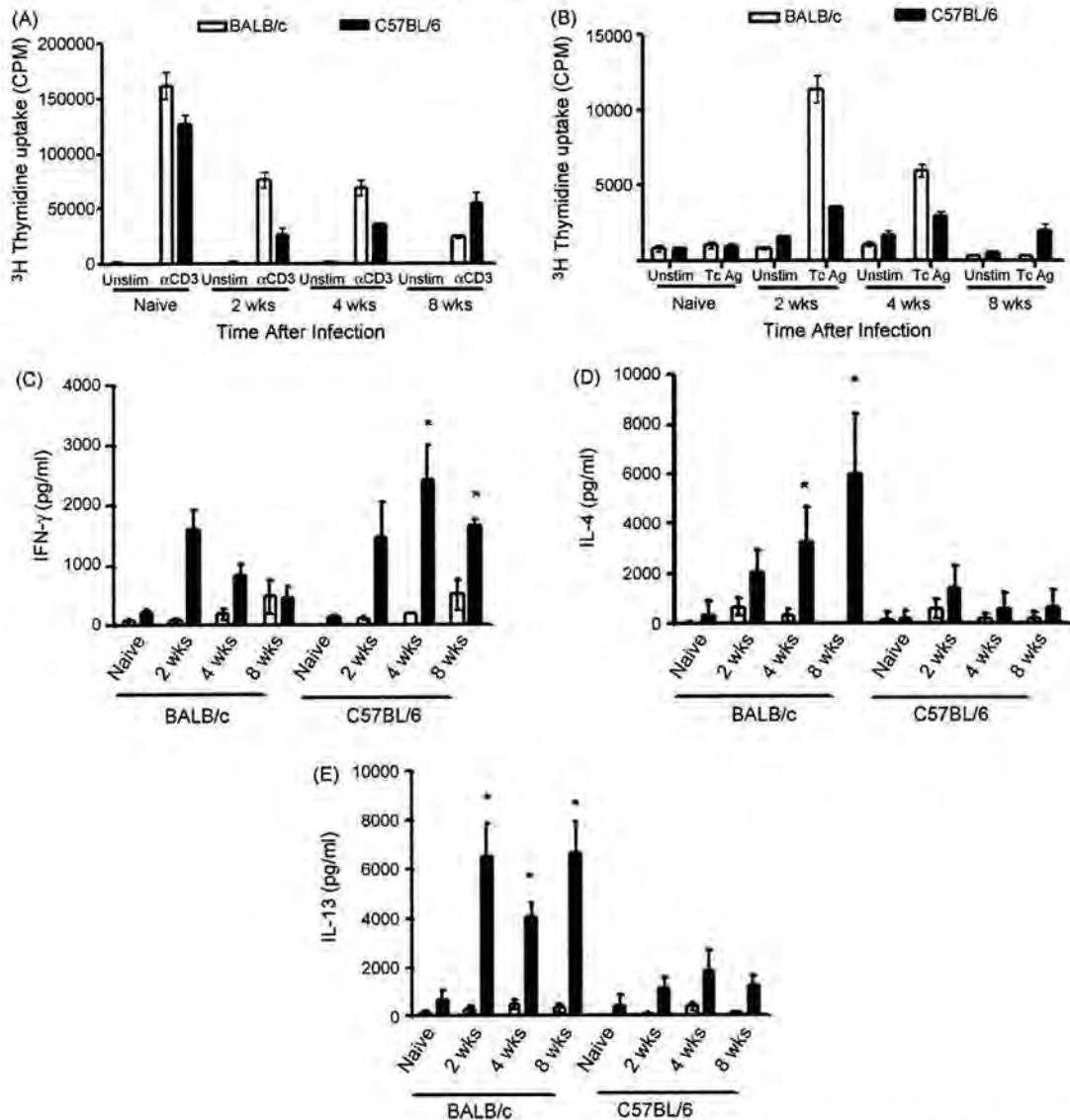


Fig. 2. Kinetics of the adaptive immune response. Spleen cell proliferation in response to anti-CD3 stimuli (A) and to *T. crassiceps* Ag (B). IFN- γ (C), IL-4 (D) and IL-13 (E) production in response to *T. crassiceps* Ag-stimulated splenocytes from *T. crassiceps*-infected BALB/c and C57BL/6 mice as well as from naive mice. The data are the mean of two independent experiments at each time point. An asterisk indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences between the groups.

was detected on BALB/c macrophages and the highest expression was detected 8 wk post-infection. In contrast, PD-L2 expression on the macrophages of C57BL/6 mice remained low throughout the infection (Fig. 5A).

Recently, macrophages in helminthic infections have been associated with suppressive activities (Rodriguez-Sosa et al., 2006; Taylor et al., 2006). Given that we detected a higher expression of PDL-2, a molecule with inhibitory activity when bind to its receptor PD-1 on T cells (Sharpe et al., 2007); we decided to determine whether these macrophages recruited to the site of infection were able to suppress T cell proliferation. Peritoneal macrophages were isolated from BALB/c and C57BL/6 mice 8 wk post-infection and were co-cultured with splenocytes from naive mice previously stimulated with anti-CD3/CD28. Three days later, the T cell proliferation was measured by 3 H-thymidine uptake. As shown in Fig. 5B, the macrophages from *T. crassiceps* infected-BALB/c mice, in a ratio-dependent manner significantly suppressed T cell proliferation. However, the

macrophages from *T. crassiceps*-infected C57BL/6 mice were unable to suppress this response.

TcES induce partial up-regulation of MHC class II and costimulatory-molecules expression on DC and impair full maturation after LPS-mediated stimuli in DCs from BALB/c but not C57BL/6 mice. The ability of excreted-secreted *Taenia* products to up-regulate the expression of MHC-II and costimulatory molecules on BMDC was tested comparing it versus LPS, which was chosen for its known ability to mature and activate DC to produce pro-inflammatory cytokines. DCs were cultured in medium alone (RPMI) or exposed to TcES, LPS, or TcES plus LPS for 24 h prior to analysis of the surface phenotype. As shown in Table 2, the expression of maturation markers, such as CD86, CD80, CD40 and CCR7, on BMDCs from BALB/c mice was affected by the exposure to TcES antigens, whereas MHC-II expression remained unaltered. However, the BMDCs from C57BL/6 mice exposed to the same concentration of TcES did not show alteration in their response compared to LPS-induced maturation.

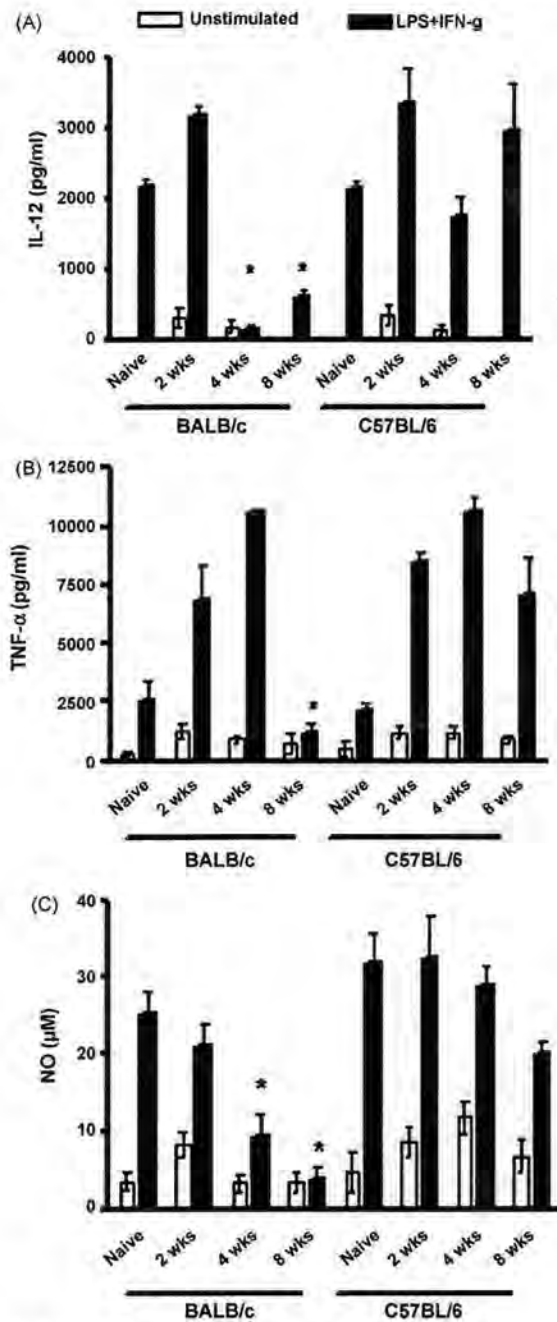


Fig. 3. LPS and IFN- γ activation of macrophages isolated from *T. crassiceps*-infected BALB/c and C57BL/6 mice. Peritoneal macrophages were isolated as described at different time points post-infection and stimulated with LPS (1 μ g/ml) plus IFN- γ (20 ng/ml). Supernatants were collected 24 h later and cytokine production IL-12 (A), TNF- α (B) and NO (C) was measured using an ELISA (A and B) and Griess reaction (C). The data are the mean of two independent experiments at each time point. An asterisk indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences between the groups.

3.5. Allogenic DC activation is inhibited in BALB/c DCs exposed to *Taenia* antigens

In order to know whether the alterations in the expression of the surface maturation markers affects the ability of BMDCs exposed to TcES antigens to induce allogenic proliferation in a

mixed lymphocyte reaction, BMDCs from BALB/c mice were exposed to TcES, LPS or LPS plus TcES for 24 h and immediately co-cultured for 3 days with magnetically purified CD4⁺ cells isolated from healthy C57BL/6 mice. The proliferative response was analyzed using ³H-thymidine uptake. Similar experiments were performed using BMDCs from C57BL/6 mice and CD4⁺ cells from BALB/c mice. As seen in Fig. 6A, the exposure of BALB/c BMDCs to TcES significantly affected their ability to induce an allogenic response (the proliferation was inhibited more than 50%). Interestingly, the C57BL/6 BMDCs were much less affected by the TcES and the allogenic stimulation was significantly better than that induced by BALB/c BMDCs exposed to *Taenia* antigens (Fig. 6B).

3.6. DC activation is modified in BALB/c but not in C57BL/6 mice after exposure to TcES

Finally, to further evaluate whether innate immune responses can be altered directly by *Taenia* antigens, we generated bone marrow-derived DCs from BALB/c and C57BL/6 mice that were similarly exposed to *T. crassiceps* excreted/secreted antigens (TcES), LPS or both and the inflammatory cytokine production was evaluated. The production of pro-inflammatory cytokines showed important differences, as the BALB/c BMDCs produced less IL-15, IL-12 and TNF- α in response to LPS when they were also exposed to TcES. However, the BMDCs from C57BL/6 mice maintained their ability to respond to LPS stimulation (exception for IL-15) with high levels of these pro-inflammatory cytokines even in the presence of *Taenia* antigens (Fig. 7A–C).

4. Discussion

Based on early observations and looking only for the number of parasites after 4 wk of infection with *T. crassiceps*, Sciutto et al. (1991) concluded that C57BL/6 mice were resistant to this parasite, whereas BALB/c mice were susceptible. These results were attributed to the different MHC-II haplotypes of these strains (H2^b and H2^d, respectively). However, no immunological analyses were done. In this study, we have provided, for the first time, a comparative study of the immune response to this helminth in both susceptible and resistant strain of mice. We evaluated the kinetics of parasite growth in both strains of mice. We found that, as early as 2 wk post-infection, BALB/c (H2^d) mice harbored viable parasites, whereas few parasites were found in C57BL/6 (H2^b) mice. As the infection progressed, these differences became more evident and, by week 8 post-infection, the BALB/c mice harbored five- to ten-fold more parasites than the C57BL/6 mice, 80% of which cleared the infection. Interestingly, the susceptible phenotype is seen even though BALB/c splenocytes displayed an increased proliferative response and produced IFN- γ -levels similar to C57BL/6 splenocytes early after infection. However, at later time points, these levels decreased in BALB/c splenocytes, whereas C57BL/6 splenocytes maintained a consistent IFN- γ production and cell proliferation throughout the course of infection. In contrast, the production of the Th2-associated cytokines IL-4 and IL-13 was significantly elevated in BALB/c splenocytes compared to C57BL/6 splenocytes. Furthermore, the IgG1 and IgE levels were significantly higher in BALB/c mice. These data confirm that a Th2-type response is not associated with protection in experimental cysticercosis, as unlike has been observed in other helminthic infections (McKay and Khan, 2003; Patel et al., 2009).

We have also analyzed the response of two types of APCs, macrophages and DCs. APCs play a central role in the activation and differentiation of T lymphocytes into Th1 cells, Th2 cells or Tregs. Both macrophages and DCs take up antigens, become activated and migrate to present the antigenic peptides on MHC

Table 2Expression of surface MHC-II, CD80, CD86, CD40 and CCR7 on CD11c⁺ BMDCs following incubation with TcES, LPS, LPS + TcES or unprimed control (RPMI).

Strain	Treatment	MHCII	CD80	CD86	CD40	CCR7
C57BL/6	RPMI MFI (a)	69.2 ± 7.1	33.8 ± 5.6	58.9 ± 11.9	21.3 ± 2.8	20.7 ± 3.6
	% (b)	50.8 ± 1.8	18.5 ± 2.9	41.4 ± 4.4	43.5 ± 0.5	30.3 ± 10.4
	TcES	229 ± 6.1	42.5 ± 4.7	91.2 ± 15.9	47 ± 0.1	54.8 ± 16.7
		54.8 ± 6.7	71.6 ± 11.6	53.9 ± 3.9	49.9 ± 15.4	45.6 ± 2.2
	LPS	270.8 ± 12	56.1 ± 2.2	157.6 ± 14.8	72.2 ± 1.8	88.9 ± 0.7
		72.1 ± 1.8	90.5 ± 2	79.6 ± 3.4	68.6 ± 3.3	71.3 ± 20.3
	LPS/TcES	317.6 ± 23.9	60.5 ± 4.1	121.9 ± 18	45.1 ± 11.7	42.4 ± 12.9
		66.8 ± 2.6	65.3 ± 14.6	73.93 ± 3.1	68.7 ± 2.5	52.8 ± 14.8
BALB/c	RPMI	101.7 ± 6.3	29.7 ± 2.5	40.4 ± 2.5	27.3 ± 1.3	24.3 ± 1.3
		56.2 ± 1.8	28.9 ± 3.1	52.3 ± 2.3	31.2 ± 4.8	24 ± 3.1
	TcES	163.7 ± 35.2	38.9 ± 2.6	47.6 ± 2.9	35 ± 4.6	20.7 ± 0.13
		71.7 ± 1.6	40 ± 6	58.3 ± 3	48.4 ± 4.7	35.5 ± 4.7
	LPS	251.2 ± 54	72.3 ± 2.7	118.6 ± 8.3	82.2 ± 3.4	50.4 ± 5.5
		80.8 ± 3.6	80.7 ± 17.8	79.3 ± 5.3	79.4 ± 2.3	69.8 ± 4.7
	LPS/TcES	192.2 ± 46.8	47.6 ± 4.6 (<i>p</i> < 0.01)	85.1 ± 6.4 (<i>p</i> < 0.01)	41.7 ± 6.5 (<i>p</i> < 0.01)	30 ± 3.8 (<i>p</i> < 0.02)
		79.4 ± 2.4	44.9 ± 1 (<i>p</i> < 0.01)	61.1 ± 10.3	57.7 ± 8.4 (<i>p</i> < 0.03)	34.5 ± 5.7 (<i>p</i> < 0.01)

Values are the cumulative results of 3 sets of experiments. (a) Data are expressed as mean ± standard deviation of mean geometric fluorescence intensities (MFI) by flow cytometric analysis. (b) These data are expressed as percentage of positive cells for the respective surface marker.

* *p*-value versus corresponding LPS stimulation (Student's *t* test).

molecules. This process involves (among others) phagocytosis, up-regulation of costimulatory molecules, such as CD80, CD86 and CD40 as well as MHC molecules (Lee and Iwasaki, 2007). Failures in this process could modify the outcome of the immune response and the course of the infection. APCs are the first line of contact between parasites and the immune system, thus this interaction is crucial for the relationship between host and parasite.

Macrophages play a key role in directing the host immune response to parasites and they can also function as effector cells.

The recruitment and activation of macrophages by microbial products (e.g., LPS or helminth-derived molecules) results in the release or inhibition of several key cytokines, such as IL-12, IL-6, TNF- α , IL-10 and NO (Rodríguez-Sosa et al., 2002a,b; Goodridge et al., 2004; Smith et al., 2004). These immune mediators play crucial roles in the development of immunity against a variety of pathogens, but their role in helminthic infections is less well understood (Allen and Loke, 2001; Goodridge et al., 2001). In this study, we demonstrated that macrophages from *T. crassiceps*-

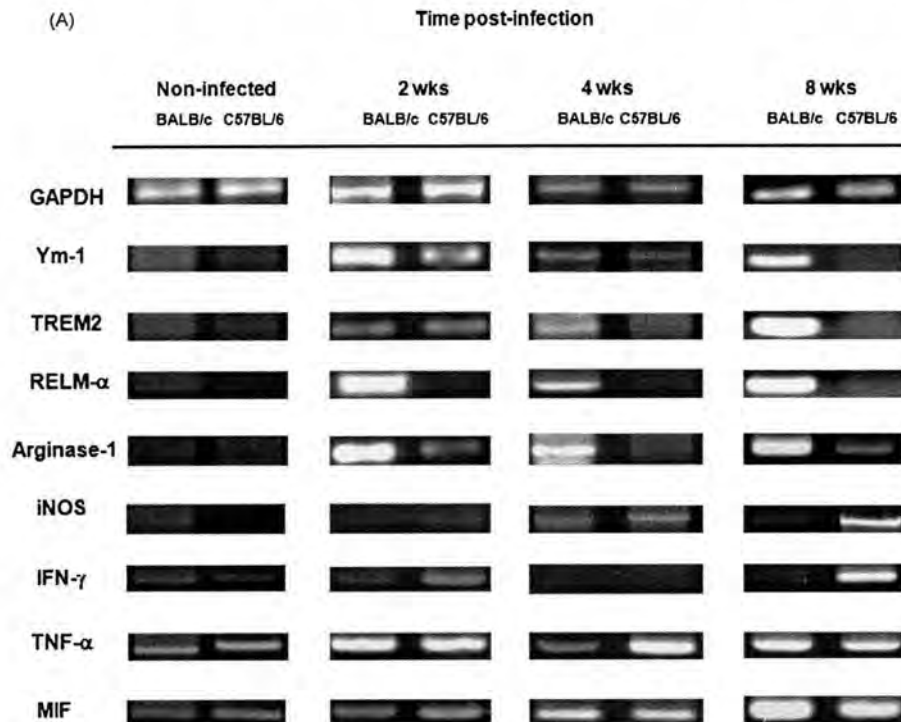


Fig. 4. Kinetics of macrophage activation at site of infection during *T. crassiceps* infection. (A) Macrophages were isolated from the peritoneal cavity of BALB/c and C57BL/6 mice at different time points following infection with ten cysticerci. Without any additional stimulation, RNA was extracted and RT-PCR was performed for GAPDH, RELM- α , Ym-1, Arg-1, TREM-2, IFN- γ , TNF- α and MIF. (B) Densitometry analysis of 2–3 mice per group per time of infection was performed in order to give a semi-quantitative observation. Values represent arbitrary units showing higher or lower density with respect to their own housekeeping gene transcript.

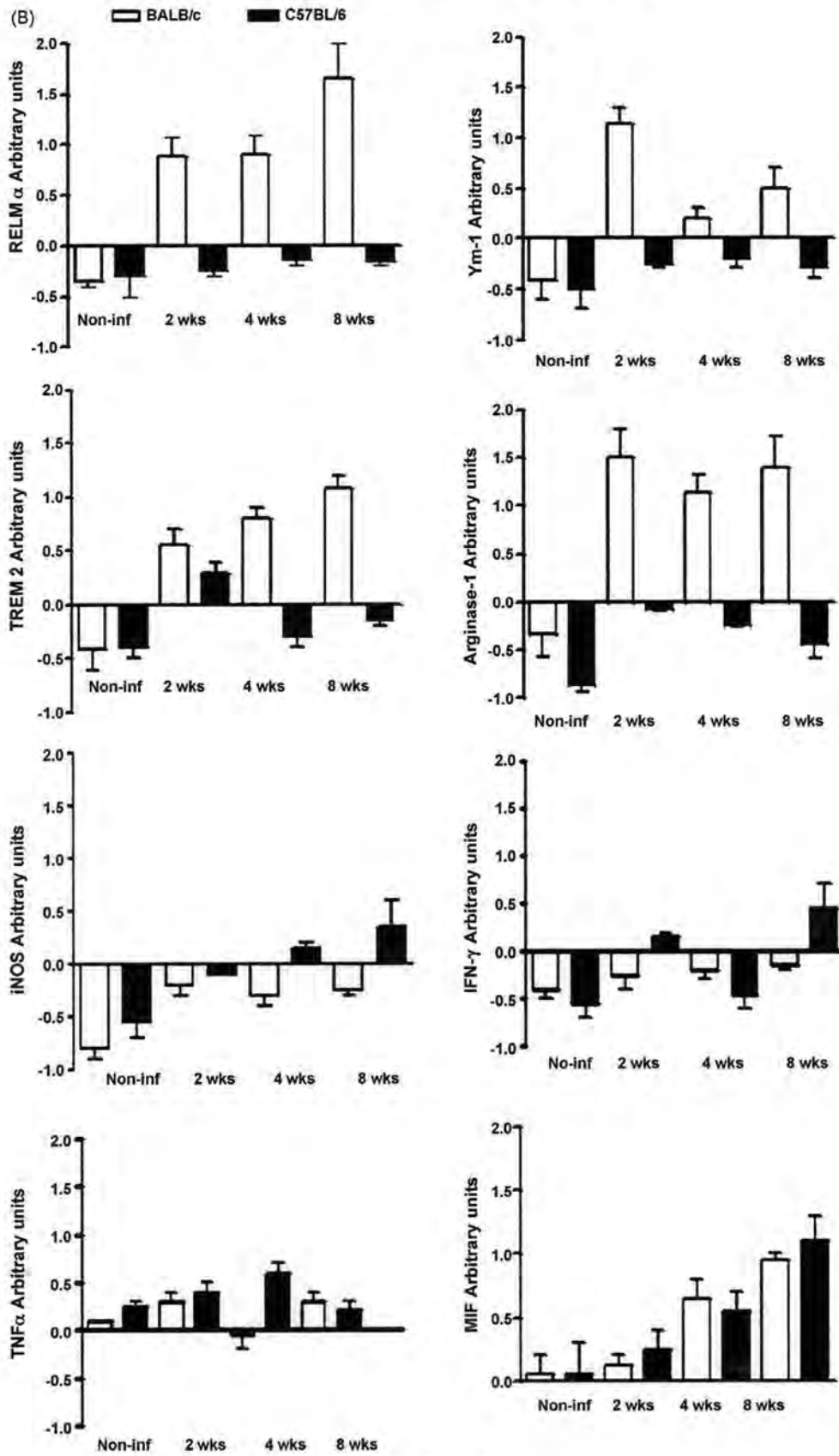


Fig. 4. (Continued).

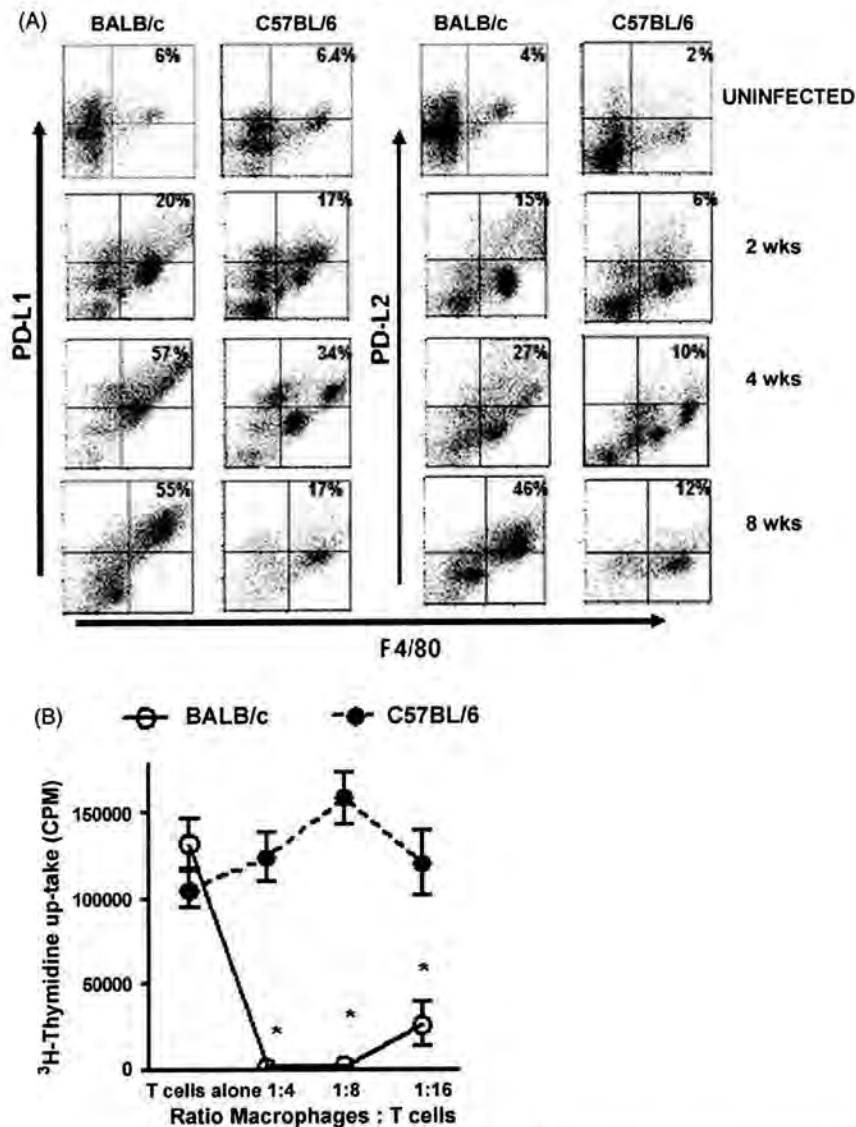


Fig. 5. Kinetics of PD-L1 and PD-L2 expression and suppressive activity of peritoneal macrophages after *T. crassiceps* infection. (A) Peritoneal cells were isolated from BALB/c and C57BL/6 mice at different time points after infection with ten cysticerci. Without any additional stimulation, the cells were processed for flow cytometry and analyzed for the expression of F4/80, PD-L1 and PD-L2. (B) The suppressive activity of the macrophages was assayed in a co-culture with CD90⁺ naïve cells stimulated with plate-bound anti-CD3/CD28 antibodies. An asterisk indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences between the groups.

infected BALB/c mice recruited to the site of infection transiently produced high levels of IL-12, TNF- α and NO in response to pro-inflammatory stimuli, such as LPS + IFN- γ . However, as the infection progressed, these cells showed a substantially reduced capacity to produce these cytokines after similar stimulation. Interestingly, macrophages from C57BL/6 mice maintained the capacity to produce pro-inflammatory cytokines. These data are consistent with the susceptible phenotype observed in IL-12 KO mice (Rodríguez-Sosa et al., 2003) and suggest a major role for macrophages in cysticercosis. The mechanism underlying the inhibition of LPS + IFN- γ -induced pro-inflammatory cytokine production in our system remains to be elucidated, however, as we have previously found high IFN- γ receptor expression in these macrophages (Rodríguez-Sosa et al., 2006), it may be associated with an impaired intracellular signaling in BALB/c mice but not in C57BL/6 mice.

The relevance of these observations is highlighted by the finding that macrophages from BALB/c mice became rapidly alternatively activated after *T. crassiceps* infection, whereas macrophages from C57BL/6 mice presented a transient and incomplete alternate activation. As the infection progressed, the macrophages from BALB/c mice displayed higher transcripts of four genes that are associated with alternative activation (Arg-1, Ym-1, TREM-2 and RELM- α), whereas discrete changes on the expression of pro-inflammatory cytokines could be detected. This suggests a mixed macrophage population. In contrast, the macrophages from C57BL/6 mice mainly over-expressed transcripts for pro-inflammatory cytokines and not for alternative activation markers. Thus, the presence and may be the persistence of AAM ϕ is another striking difference between the susceptible and resistant strains of mice to *T. crassiceps* infection. Interestingly, AAM ϕ have been documented in all three classes of parasitic

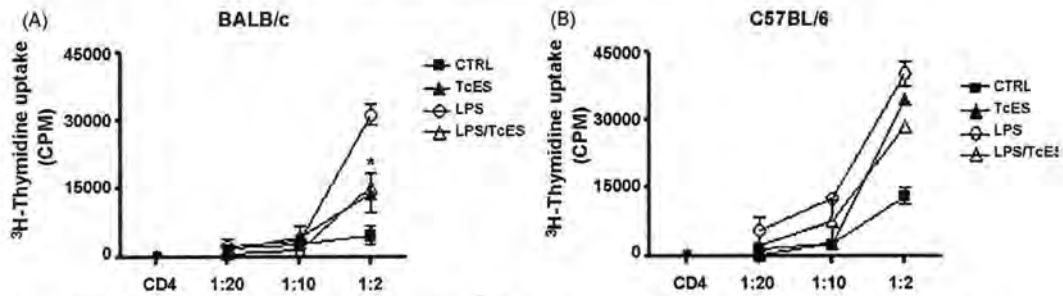


Fig. 6. Co-stimulation of DCs from BALB/c, but not in C57BL/6 mice, with LPS plus TcES decreases DC allogenic stimulation (A) BMDCs from BALB/c mice were stimulated for 24 h with medium alone (CTRL), TcES, LPS or TcES + LPS and co-cultured with CD4⁺ cells from naïve C57BL/6 mice. (B) BMDCs from C57BL/6 mice were stimulated for 24 h with medium alone (CTRL), TcES, LPS or TcES + LPS and co-cultured with CD4⁺ cells from naïve BALB/c mice. Allogenic stimulation capacity was tested using different numbers of BMDCs cultured with 10⁵ allogenic CD4⁺ T cells for 3 days and ³H-thymidine was added for the last 18 h of culture. Data are representative of two independent experiments, **p* < 0.05 (Student's *t* test).

helminths, such as nematodes, trematodes and cestodes (Reyes and Terrazas, 2007). However, divergent roles have been reported for these types of regulatory cells (Reyes and Terrazas, 2007). For example, lung fibrosis caused by *N. brasiliensis* infection has been

associated with the presence of AAMφ (Marsland et al., 2008), whereas in *H. polygyrus* infection a protective role has been proposed (Anthony et al., 2007). In contrast, in filariasis (Taylor et al., 2006) and *Hymenolepis diminuta* infection (Persaud et al.,

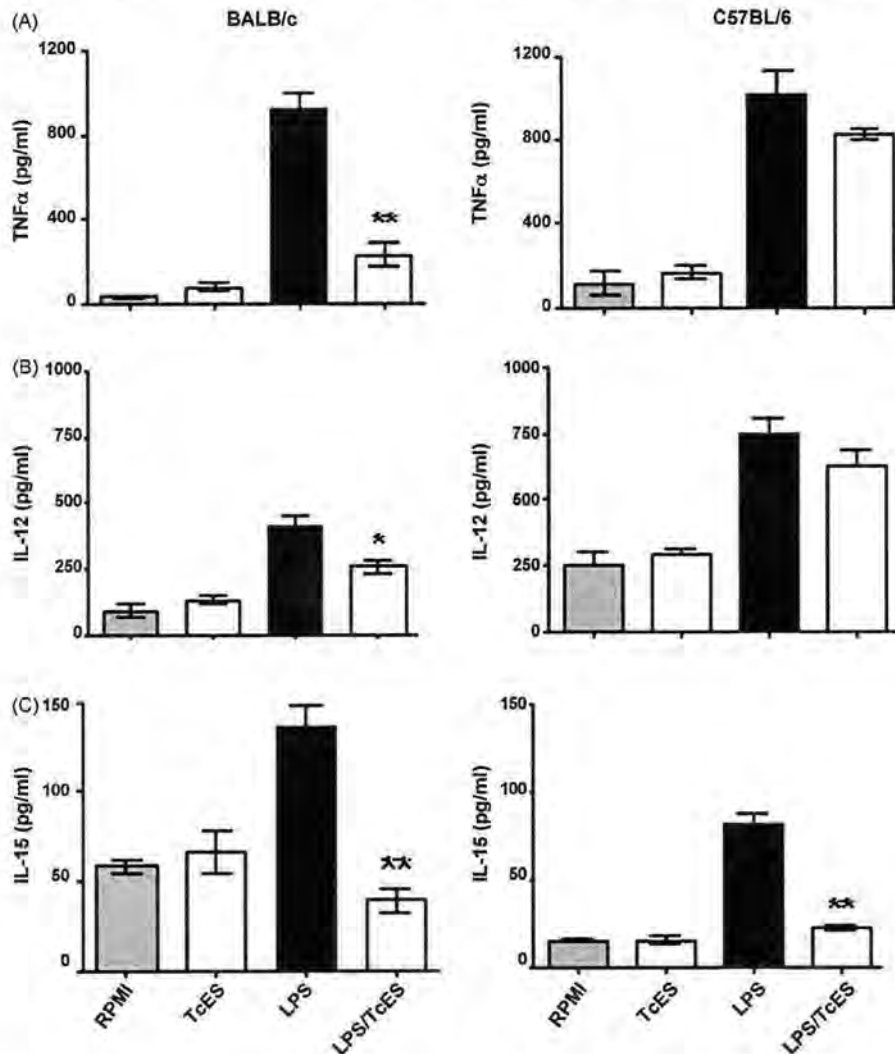


Fig. 7. Differential effects of TcES exposure on the cytokine production by LPS-stimulated DCs. Effect of TcES (20 μg/ml) on the production of TNF-α (A), IL-12 (B) and IL-15 (C) by C57BL/6 and BALB/c BMDCs stimulated with 1 μg/ml LPS. The data are representative of two independent experiments. An asterisk indicates a statistically significant differences (*p* < 0.05).

2007) the functional role for AAM ϕ is still not fully understood, but AAM ϕ have been associated with suppressive activity. Furthermore, AAM ϕ are necessary to avoid exacerbated pathology in experimental schistosomiasis (Herbert et al., 2004). In this study, the suppressive activity of AAM ϕ from *T. crassiceps*-infected BALB/c mice suggests an important role for these regulatory cells in experimental cysticercosis, such suppressive activity was associated with a higher expression of PD-L1 and PD-L2 which is in line with recent observations in this model (Terrazas et al., 2005) and in *N. brasiliensis* infection (Siracusa et al., 2008). In contrast, macrophages from C57BL/6 mice did not show suppressive activity, even though they generated higher levels of NO, which has been proposed as a molecule involved in the down-regulation of T cell proliferation in other helminthic infections (Atochina et al., 2001). Our finding suggest that *T. crassiceps* infection leads to the modulation of classically activated macrophages (CAM) in C57BL/6 mice, and alternatively activated macrophages in BALB/c mice, seems that the early predominant macrophage population, AAM ϕ or CAM could be important in determining the outcome of *T. crassiceps* infection.

Here we also compared the ability of DCs from BALB/c and C57BL/6 mice to up-regulate maturation markers upon exposure to *Taenia* antigens and LPS activation. We found that the response of C57BL/6 DCs to TcES + LPS was associated with an increase in the production of TNF- α and IL-12 and normal maturation. However, the activation of BALB/c DCs in the presence of TcES was associated with a decrease in the expression of CD86, CD80, and CD40 as well as a lower production of IL-12, TNF- α and IL-15. It is known that for an optimal immune response DCs should not only effectively load up and process antigen and produce cytokines, but they also need to migrate to lymph nodes to stimulate T cells, interestingly, after exposure to TcES LPS-stimulated BALB/c DCs displayed a down-regulated expression of CCR7, a chemokine receptor that favors cell migration (Ohl et al., 2004). This may impair the ability of DCs to migrate from the peripheral tissue to the draining lymph nodes or spleen in order to activate T cells (Ohl et al., 2004). Furthermore, this combination of low costimulatory molecule expression, the low pro-inflammatory cytokine production and may be the decreased ability to migrate of the DCs may favor parasite persistence in BALB/c mice, probably by biasing towards Th2 responses given the low production of IL-12 or by inducing a state of "tolerance" given the impaired maturation observed. Moreover, the fact that BALB/c DCs exposed to TcES + LPS displayed a low ability to induce an allogeneic response implies that *Taenia* antigens appear to directly induce a state of DC hyporesponsiveness in BALB/c mice, but not in C57BL/6 mice. Whether all these findings are exclusively a result of the H2 haplotype differences is unknown. Taken together our data on APCs suggest that defective macrophage and DC activation may contribute to *T. crassiceps* susceptibility.

Even though previous studies have associated the MHC-II haplotype H-2^d with susceptibility and the haplotype H-2^b with resistance to cysticercosis (Sciutto et al., 1991), the correlation between resistance, DC activity, Th1 development and the absence of AAM ϕ suggests that inflammatory responses are an important component of the effector mechanisms that limit larval growth, which is difficult to associate with a given H2 haplotype. In support of this, susceptible BALB/c mice lacking the STAT6 gene were resistant to this infection (Rodríguez-Sosa et al., 2002a,b), despite the presence of the H-2^d haplotype. Furthermore, C57BL/6 mice lacking the STAT4 gene were highly susceptible to *T. crassiceps* infection (Rodríguez-Sosa et al., 2004). In further support, the neutralization of IFN- γ and the inhibition of iNOS *in vivo* results in greater susceptibility to *T. crassiceps* infection (Terrazas et al., 1999; Alonso-Trujillo et al., 2007). Therefore, a more complex relationship among several factors, such as host genes, the site of

infection, the immune response, the parasite's genome (Hinojosa-Juarez et al., 2008) and co-evolution, appears to be involved in the outcome of this particular parasitic infection.

In summary, the results presented here demonstrate that the immune response to *T. crassiceps* differs between susceptible and resistant strains of mice. C57BL/6 mice predominantly produced a more sustained Th1-associated IFN- γ response, their DCs were refractory to modulation by *Taenia* antigens, recruited CAM ϕ to the site of infection and effectively controlled the parasite growth following infection with *T. crassiceps*. On the other hand, BALB/c mice mounted an IL-13-associated Th2-type response, their DC activity was highly altered by exposure to TcES, recruited high numbers of AAM ϕ to the site of infection and developed larger parasite loads.

Acknowledgments

This work was supported by grant # 60956-M from CONACYT and grant IN208706 from PAPIIT-UNAM, and it is part of the requirements to obtain the PhD degree in the Postgraduate Program in Biomedical Sciences, Facultad de Medicina, UNAM, for J.L.R. and C.A.T. who contributed equally to this work and were supported by a fellowship from CONACYT-Mexico. We thank to MVZ Leticia Flores and Tomas Villamar for their excellent care of animals, as well as Irma Rivera-Montoya for her technical assistance.

References

- Allen, J.E., Loke, P., 2001. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol.* 23, 345–352.
- Alonso-Trujillo, J., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M., Terrazas, L.I., 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol. Res.* 100, 1341–1350.
- Anthony, R.M., Rutitzky, L.J., Urban Jr., J.F., Stadecker, M.J., Gause, W.C., 2007. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 975–987.
- Atochina, O., Daly-Engel, T., Piskorska, D., McGuire, E., Harn, D.A., 2001. A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.* 167, 4293–4302.
- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., Urban Jr., J.F., 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol. Rev.* 201, 139–155.
- Fux, B., Rodrigues, C.V., Portela, R.W., Silva, N.M., Su, C., Sibley, D., Vitor, R.W., Gazzinelli, R.T., 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 71, 6392–6401.
- Gause, W.C., Urban Jr., J.F., Stadecker, M.J., 2003. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol.* 24, 269–277.
- Ghassabeh, G.H., De Baetselier, P., Brys, L., Noel, W., Van Ginderachter, J.A., Meerschaut, S., Beschin, A., Brombacher, F., Raes, G., 2006. Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited *in vivo* in different pathologic conditions. *Blood* 108, 575–583.
- Goodridge, H.S., Marshall, F.A., Wilson, E.H., Houston, K.M., Liew, F.Y., Harnett, M.M., Harnett, W., 2004. *In vivo* exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology* 113, 491–498.
- Goodridge, H.S., Wilson, E.H., Harnett, W., Campbell, C.C., Harnett, M.M., Liew, F.Y., 2001. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *J. Immunol.* 167, 940–945.
- Heldwein, K., Biedermann, H.G., Hamperl, W.D., Bretzel, G., Loscher, T., Laregina, D., Frosch, M., Buttner, D.W., Tappe, D., 2006. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 108–111.
- Herbert, D.R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossman, H., Claussen, B., Forster, I., Brombacher, F., 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20, 623–635.
- Hinojosa-Juarez, A.C., Sandoval-Balanzario, M., McManus, D.P., Monroy-Ostria, A., 2008. Genetic similarity between cysticerci of *Taenia solium* isolated from human brain and from pigs. *Infect. Genet. Evol.* 8, 653–656.

- Kim, Y., Sato, K., Asagiri, M., Morita, I., Soma, K., Takayanagi, H., 2005. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 32905–32913.
- Le Goff, L., Lamb, T.J., Graham, A.L., Harcus, Y., Allen, J.E., 2002. IL-4 is required to prevent filarial nematode development in resistant but not susceptible strains of mice. *Int. J. Parasitol.* 32, 1277–1284.
- Lee, H.K., Iwasaki, A., 2007. Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin. Immunol.* 19, 48–55.
- Lutz, M.B., Kutsch, N., Ogilvie, A.L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G., 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods.* 223, 77–92.
- Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004. Helminth parasites—masters of regulation. *Immunol. Rev.* 201, 89–116.
- Maizels, R.M., Yazdanbakhsh, M., 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 733–744.
- Marsland, B.J., Kurrer, M., Reissmann, R., Harris, N.L., Kopf, M., 2008. *Nippostrongylus brasiliensis* infection leads to the development of emphysema associated with the induction of alternatively activated macrophages. *Eur. J. Immunol.* 38, 479–488.
- McKay, D.M., Khan, W.I., 2003. STAT-6 is an absolute requirement for murine rejection of *Hymenolepis diminuta*. *J. Parasitol.* 89, 188–189.
- Migliorini, P., Corradin, G., Corradin, S.B., 1991. Macrophage NO₂-production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-gamma. *J. Immunol. Methods* 139, 107–114.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., Forster, R., 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21, 279–288.
- Patel, N., Kreider, T., Urban Jr., J.F., Gause, W.C., 2009. Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *Int. J. Parasitol.* 39, 13–21.
- Persaud, R., Wang, A., Reardon, C., McKay, D.M., 2007. Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the non-permissive mouse host. *Int. J. Parasitol.* 37, 393–403.
- Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., Sambhara, S., 2002. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* 169, 4697–4701.
- Reyes, J.L., Terrazas, L.I., 2007. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol.* 29, 609–619.
- Rodriguez-Sosa, M., Rivera-Montoya, I., Espinoza, A., Romero-Grijalva, M., Lopez-Flores, R., Gonzalez, J., Terrazas, L.I., 2006. Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol.* 242, 61–71.
- Rodriguez-Sosa, M., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I., 2002a. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J. Immunol.* 168, 3135–3139.
- Rodriguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E.P., Rosas, L.E., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I., 2004. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.* 72, 4552–4560.
- Rodriguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., Calderon, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., Terrazas, L.I., 2002b. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect. Immun.* 70, 3656–3664.
- Rodriguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., David, J.R., Terrazas, L.I., 2003. Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int. J. Parasitol.* 33, 703–711.
- Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 845–858.
- Saefel, M., Arndt, M., Specht, S., Volkmann, L., Hoerauf, A., 2003. Synergism of gamma interferon and interleukin-5 in the control of murine filariasis. *Infect. Immun.* 71, 6978–6985.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., De la Cruz, V., Lemus, L., Lamoyi, E., 1995. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Immun.* 63, 2277–2281.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C., 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77, 243–246.
- Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R., Freeman, G.J., 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* 8, 239–245.
- Siracusa, M.C., Reece, J.J., Urban Jr., J.F., Scott, A.L., 2008. Dynamics of lung macrophage activation in response to helminth infection. *J. Leukoc. Biol.* 84, 1422–1433.
- Smith, P., Walsh, C.M., Mangan, N.E., Fallon, R.E., Sayers, J.R., McKenzie, A.N., Fallon, P.G., 2004. *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J. Immunol.* 173, 1240–1248.
- Suzuki, L.A., Arruda, G.C., Quagliato, E.M., Rossi, Q.L., 2007. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40, 152–155.
- Taylor, M.D., Harris, A., Nair, M.G., Maizels, R.M., Allen, J.E., 2006. F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J. Immunol.* 176, 6918–6927.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84, 74–81.
- Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodriguez-Sosa, M., Bojalil, R., Garcia-Tamayo, F., Larralde, C., 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* 85, 135–141.
- Terrazas, L.I., Montero, D., Terrazas, C.A., Reyes, J.L., Rodriguez-Sosa, M., 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 35, 1349–1358.
- Terrazas, L.I., 2008. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 383–392.
- Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., Hotamisligil, G.S., 2006. Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 10741–10746.
- Ulett, G.C., Ketheesan, N., Hirst, R.G., 2000. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 68, 2034–2042.
- Volkmann, L., Bain, O., Saefel, M., Specht, S., Fischer, K., Brombacher, F., Matthaei, K.I., Hoerauf, A., 2003. Murine filariasis: interleukin 4 and interleukin 5 lead to containment of different worm developmental stages. *Med. Microbiol. Immunol.* 192, 23–31.
- Yoshida, A., Maruyama, H., Kumagai, T., Amano, T., Kobayashi, F., Zhang, M., Himeno, K., Ohta, N., 2000. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int. Immunol.* 12, 1117–1125.

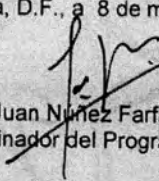
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de marzo del 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **VERA ARIAS LAURA MARGARITA** con número de cuenta **85020650** con la tesis titulada **"EL PAPEL DE LA MOLÉCULA mMGL EN LA RESPUESTA INMUNE Y RESISTENCIA AL CÉSTODO *Taenia crassiceps*"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Vocal: DR. PEDRO ULISES OSTA SALOMA
Secretario: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Suplente: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA
Suplente: DRA. LETICIA MORENO FIERROS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de marzo de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)