



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCIÓN POR
TRYPANOSOMA CRUZI EN AUSENCIA DE LA MOLÉCULA mMGL**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ALICIA VÁZQUEZ MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR
DRA. BERTHA J. ESPINOZA GUTIERREZ
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

MEXICO, D.F. AGOSTO 2015.



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.

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEP el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 362 del 11 de marzo de 2015, designó el siguiente jurado para examen grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **ALICIA VÁZQUEZ MENDOZA**, con número de cuenta **402022101**, con la tesis titulada "**ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE ANTE LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI EN AUSENCIA DE LA MOLÉCULA MMGL.**" dirigida por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

Presidente: Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser
Secretario: Dra. Bertha Josefina Espinosa Gutiérrez
Vocal: Dra. Martha Legorreta Herrera
Vocal: Dra. Emma Cicilia Saavedra Lira
Vocal: Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizará a solicitud del alumno, **con cinco sinodales**, en apego a la nueva normatividad, acogándose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, con base a lo establecido en el **Artículo 31** del Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, a 12 de marzo de 2015



DR. DANIEL PIÑERO DALMAU
COORDINADOR



DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
RESPONSABLE DE ENTIDAD

*DPD/EGP/SMI

DEDICATORIAS

Para mi linda madre una de las mujeres más importantes para mí, no tengo palabras para agradecerte todo y cuanto me has dado, porque gracias a ti aprendí a luchar por lo que se quiere y que todo esfuerzo tiene una recompensa. Te amo Flor.

A mis hijos Marco Orlando y Diana Regina, quienes con su amor, paciencia y apoyo han hecho posible recorrer este camino. A ambos les hago un reconocimiento especial, porque han tenido que aguantar largas jornadas en el laboratorio mientras mamá hacía sus experimentos, indudablemente sin su paciencia y solidaridad esto no hubiese sido posible. Además son lo que más amo en este mundo, son mi más grande inspiración para seguir luchando por ser cada día mejor, son maravillosos mis niños.

A mis queridos hermanos Ramón, Gerardo y Aurelia, porque aún en la distancia me han brindado su apoyo y cariño.

Para mis sobrinos: Ángel, Jesús, Luis, Alejandro, David, Diego y Rodrigo, los quiero muchísimo.

Para Marco, gracias por tu apoyo, indudablemente siempre tendré cosas que aprender de ti.

Para mis mejores amigos de la carrera: Alma, Ana María, David y Berenice, gracias chicos por todos y cada uno de los momentos vividos. Los quiero y extraño muchísimo.

Para Jocho e Ibet, chicos los AMO, son más que amigos, les estoy profundamente agradecida han estado a mi lado en las buenas y en las malas, han escuchado mis lamentos, angustias y alegrías tanto en lo personal como en lo profesional. Con nada puedo pagar el cariño y apoyo que me han brindado. Dios los llene de bendiciones a ustedes y a su bello nene Uriel.

Para Imelda quien me apoyo de manera particular durante la realización de este trabajo, pero además en quien encontré a una amiga y confidente, gracias por todo tu apoyo y paciencia. ¡Te quiero muchísimo flaca!

Para mis muy queridos amigos del laboratorio 8: Mireya, Arlette, Daniel e Irma. Gracias por todos los momentos compartidos durante el Doctorado, jamás olvidare esas charlas camino a CU o esas ricas comidas antes de entrar a clase.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 5: Thalia, Tona, Victor, Betsy, Sandra, Claudia, gracias chicos por todos los momentos compartidos.

Para Esperanza y Cynthia, dos grandes amigas, gracias por la amistad brindada y las porras en los momentos en los que sentía que ya no podía más. ¡Las quiero y admiro mucho mucho!

A ti Mary, mi amiga del alma, no encuentro palabra que te describa eres un ser humano excepcional, siempre te estaré inmensamente agradecida por todas esas noches en las que te dedicabas a escucharme y alentarme para seguir, sin importar lo mal que estuvieran las cosas. ¡Dios te ilumine siempre!

Para Magda, gracias amiga por todo tu apoyo y comprensión. Te convertiste en mi hermana, te quiero hartito mi María Candelaria, ¡¡¡!

Para ti Armando, quien en estos últimos meses me has brindado tu amor, paciencia y apoyo. Gracias por aguantar mi estrés. ¡TQM!

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque día a día me brinda la dicha de estar con la gente que amo y disfrutar las cosas que me apasionan.

A mi familia por su amor y apoyo.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, mi más profundo agradecimiento y admiración, usted ha sido pieza clave en la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, por su invaluable apoyo, consejos y observaciones.

A la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez, por su valiosas y oportunas observaciones y consejos en la realización de este proyecto.

A mis sinodales por su valioso tiempo y acertadas opiniones:

Presidente: Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser.

Secretario: Dra. Bertha Josefina Espinosa Gutiérrez.

Vocal: Dra. Martha Legorreta Herrera.

Vocal: Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira.

Vocal: Dr. Marco Aurelio Rodríguez Muñoz.

A los extraordinarios profesores con los que tuve el honor de tomar clase.

Al personal del Bioterio de FES-Iztacala, particularmente a la MVZ. Leticia Flores Sánchez.

A las Biologas: Ana Federica Chávez Sánchez y Miriam Romero Grijalva del módulo de Instrumentación y laboratorios de Medicina.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 5, “Inmunidad Innata”, de la Unidad de Biomedicina (UBIMED). Y fue parcialmente financiado por: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA), No. de proyecto IN212215, y por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), No. de proyecto 152224.

La sustentante: Alicia Vázquez Mendoza fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), No de becario 298448/228023.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURASiv

ABREVIATURASvi

1 RESUMEN 1

ABSTRACT: 3

1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS 5

1.2. VECTOR 6

1.3. CICLO DE VIDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* 7

1.4. TRANSMISIÓN 8

1.5. Inmunobiología de la enfermedad de Chagas 10

1.6. Receptores lectina tipo C (CLRs). 13

(Fig. 6) [36]. 13

1.7. Función de los CLRs en la Respuesta Inmune..... 16

1.8. Papel de los CLRs en infecciones parasitarias 17

2. JUSTIFICACIÓN 23

3. HIPÓTESIS 25

4. OBJETIVOS 26

4.3. GENERAL 26

4.4. PARTICULARES..... 26

5. MATERIALES Y METODOS 28

5.1. Genotipo de los animales experimentales por técnica de PCR 28

5.2. Infección *in vivo*..... 30

5.3. Evaluación del número de parásitos en sangre 30

5.4. Sobrevida de los ratones infectados..... 31

5.5. Cultivo *in vitro* de parásitos de *T. cruzi* 31

5.6. Obtención de antígeno total de *T. cruzi*, cepa Querétaro 32

5.7. Cuantificación de proteínas totales del antígeno de *T. cruzi* 32

5.8. Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sandwich) 35

5.9. Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal..... 36

5.11. Determinación de los transcritos de moléculas características de macrófagos M1 y M2 por RT- PCR 38

5.12. Análisis del perfil de citocinas en co-cultivos de esplenocitos y macrófagos

5.13. Co-cultivo de macrófagos con esplenocitos	42
6. RESULTADOS	43
6.1. Detección de la presencia de galactosa en el antígeno de <i>T. cruzi</i> cepa Queretaro, por Lectin Blot.....	43
6.2. Determinación del genotipo de los ratones del grupo control (WT) y el grupo experimental (mMGL ^{-/-})	44
6.3. Sobrevida y carga parasitaria	45
6.4. Determinación de citocinas en suero.....	46
6.5. Determinación de dióxido de nitrógeno (NO ₂) y citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en sobrenadante de macrófagos peritoneales de ratones WT y mMGL ^{-/-} a los 21 y 35 días post-infección.....	47
6.6. RT-PCR de TLR-2 y TLR-4, TNF- α , iNOS, Ym-1 y Arg-1 en macrófagos peritoneales de ratones WT y mMGL ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	48
6.7. Expresión de TLR-4 y MHC-II en macrófagos WT y mMGL ^{-/-} infectados <i>in vitro</i> con <i>T. cruzi</i>	50
6.8. Análisis histológico del corazón de ratones WT y mMGL ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	51
6.9. RT-PCR de TNF- α , IFN- γ , TLR-4, IL-10, GATA-3, Y FOXP3 en corazón de ratones WT y mMGL ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	53
6.10. Determinación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el sobrenadante de esplenocitos de ratones WT y mMGL ^{-/-} infectados con <i>T. cruzi</i>	55
6.11. Determinación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en co-cultivos de macrófagos-esplenocitos.....	57
7. DISCUSIÓN.....	59
8. RESUMEN DE RESULTADOS.....	71
9. CONCLUSIÓN.....	75
10. PERSPECTIVAS.....	76
11. APÉNDICES	77
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Fig. 1 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.....	14
Fig. 2 <i>Triatoma dimidiata</i>	15
Fig. 3 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Fig. 4 Signo de Romaña.....	18
Fig. 5. Glicoproteínas tipo mucinas (Tc-MUC) presentes en <i>T. cruzi</i>	21
Fig. 6 Estructura de miembros de la familia de receptores lectina tipo	23
Fig. 7 Propiedades estructurales y funcionales de la familia de receptores tipo lectina.....	24
Fig. 8 Función de los receptores lectina tipo C en infecciones parasitarias..	29
Fig. 9 Curva Estándar de albúmina.....	43
Fig. 10 Lectin Blot del antígeno total de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Querétaro.....	52
Fig.- 11 Gel representativo de una electroforesis del producto de PCR para el gen de mMGL.....	53
Fig.- 12 Sobrevida y parasitemia.....	54
Fig.- 13 Concentración de citocinas en suero.....	55
Fig.- 14 Concentración de ON, TNF- α , IL-12 e IL-10 en macrófagos.....	56

Fig.- 15 Patrón transcripcional de macrófagos WT y mMGL-/- de ratones infectado.....	58
Fig.- 16 Expresión de TLR-4 y MHC-II en macrófagos infectados <i>in vitro</i>.....	60
Fig.- 17 Analisis histológico en corazón de ratones WT y mMGL-/- infectados	61
Fig.- 18 RT-PCR de corazón de ratones infectados.....	63
Fig.- 19 Concentración de citocinas en sobrenadante de esplenocitos.....	65
Fig.- 20 Producción de citocinas en co-cultivo.....	67

ABREVIATURAS

(AgTc) Antígeno de *Trypanosoma cruzi*

(BHI) Medio de cultivo bifásico de infusión cerebro corazón

(CLRs) Receptores tipo lectina C

(Con A) Concanavalina A

(CPA) Células presentadoras de antígeno

(CRDs) Dominios para el reconocimiento de carbohidratos

(CTLDs) Dominio tipo lectina C

(DCs) Células dendríticas

(DC-SIGN) Lectina tipo C de adhesión celular específica de células dendríticas

(Gal) Galactosa

(GalNAc) N-acetilgalactosamina

(GPI) glicosilfosfatidilinositol

(GIPL) glicoinositolfosfolípido

(iDCs) Células dendríticas inmaduras

(ITIM) Motivos inhibitorios de tirosina

(MHC) Complejo principal de histocompatibilidad

(MGL) Lectina tipo C de unión a galactosa en macrófagos

(MR) Receptor de manosa

(Mo) Macrófagos

(ON) Óxido nítrico

(OVA) Ovoalbúmina

(PAMPs) Patrones moleculares asociadas a patógenos

(SFB) suero fetal bovino

(TLR) Receptor tipo toll

(*T. cruzi*): *Trypanosoma cruzi*

1 RESUMEN

El receptor lectina tipo C MGL se expresa exclusivamente en células mieloides presentadoras de antígenos (APC) como células dendríticas (DC) y macrófagos (Mo). Este receptor reconoce glicoproteínas con residuos terminales de galactosa (Gal) y α ó β -N-acetilgalactosamina (GalNAc). Residuos que se encuentran de manera importante en células tumorales, hongos y virus; son en estos organismos donde se ha estudiado de manera más puntual la función biológica de este receptor. Los parásitos tienen membranas ricas en carbohidratos, sin embargo la interacción MGL-parásito no se ha establecido de manera clara. Este trabajo de tesis se enfocó en tratar de establecer la participación de MGL murino (mMGL) en la activación y funcionalidad de los MΦs en la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), parásito con alto contenido de moléculas glicosiladas ricas en Gal y GalNAc.

Los primeros resultados obtenidos por lectin-blot, demostraron la franca presencia de residuos de galactosa en las membranas de *T. cruzi* (cepa Querétaro). Con este conocimiento se procedió a estudiar la participación de mMGL en la infección *in vivo* por *T. cruzi*. Ratones carentes de mMGL^{-/-} y silvestre (WT) con fondo genético C57BL/6 se infectaron vía intraperitoneal (i.p.) con 10⁴ tripomastigotes de *T. cruzi*. Se monitoreo el desarrollo de la parasitemia en sangre periférica por 60 días en ambos grupos de ratones. Los ratones mMGL^{-/-} desarrollaron mayor parasitemia, sucumbieron en mayor número, y en menor tiempo en comparación con los ratones WT. El análisis histológico reveló mas nidos de amastigotes en el corazón de los ratones mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi* respecto al grupo WT

control. En respuesta al antígeno total de *T. cruzi*, los Mo de los ratones mMGL^{-/-} presentaron una baja producción de óxido nítrico (NO), de interleucina (IL)-12 y del factor de necrosis tumoral (TNF- α), moléculas asociadas con resistencia a la infección *T. cruzi*, comparados con los WT. En la infección *in vitro* con *T. cruzi*, los Mo mMGL^{-/-} se infectaron en mayor número con mas parásitos por célula, aun cuando los Mo mMGL^{-/-} se activaran previamente con IFN- γ o LPS/IFN- γ . Esto estuvo asociado a la expresión disminuida de las moléculas MHC-II y TLR-4 en comparación a los WT. En conjunto estos datos sugieren que mMGL juega un papel importante durante la infección por *T. cruzi*, que mMGL se requiere para la activación óptima de los Mo, y que posiblemente interaccione con las vías de señalización inducidas por TLR-4 para producir TNF- α , IL-1 β y NO durante la fase temprana de la infección.

ABSTRACT

The C-type lectin receptor mMGL is expressed exclusively in myeloid antigen presenting cells (APC) such as dendritic cells (DC) and macrophages (M ϕ). This receptor binding to glycoproteins carrying terminal galactose (Gal) and α - or β -N-acetylgalactosamine (Gal/GalNAc) residues. These residues has been found in tumor cells, fungi and viruses; thats the reason the biological function of this receptor have been studied in this organisms. Parasites have membranes rich in carbohydrates, but the MGL-parasite interaction has not been clearly established. This thesis is focused on trying to establish the participation of murine MGL (mMGL) in the activation and functionality M ϕ in *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) infection, a parasite with high content of glycosylated molecules rich in Gal and GalNAc.

First, we showed by lectin-blot that galactose moieties are abundantly expressed on the membranes of *T. cruzi*. With this knowledge we procedeeded to study the role of mMGL *in vivo* inction by *T. cruzi*. Both C57BL/6 deficient (mMGL^{-/-}) and sufficient (WT) mice for the mMGL molecule were intraperitoneally infected with 10⁴ *T. cruzi* blood trypomastigotes (Queretaro strain). Following *T. cruzi* infection, parasitaemia in peripheral blood was monitored for 60 days in both groups. mMGL^{-/-} mice developed higher parasitemia and mortality rates at less time, compared with WT mice. Histological analysis of hearts from *T. cruzi*-infected WT mice presented several amastigote nests, however mMGL^{-/-} mice displayed higher numbers of nests. Also, in response to total soluble *T. cruzi* antigen (TcAg), M ϕ from mMGL^{-/-} mice had lower production of molecules associated to *T. cruzi*

resistance, as a nitric oxide (NO), interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF- α) compared to M ϕ from WT animals. Interestingly, upon *in vitro* *T. cruzi* infection, mMGL^{-/-} M ϕ expressed lower levels of MHC-II and TLR-4 and harbored higher numbers of parasites, even when mMGL^{-/-} M ϕ were previously primed with IFN- γ or LPS/IFN- γ . These data suggest that mMGL plays an important role during *T. cruzi* infection most likely as a molecule required for early and optimal M ϕ activation, and it is possibly that mMGL interacts with the signaling pathways induced by TLR-4 to produce TNF- α , IL-1 β and NO during the early phase of infection.

1. INTRODUCCION

1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

El parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, es el agente causal de la tripanosomiasis americana, también conocida como enfermedad de Chagas. Es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del continente americano [2, 3]. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce a esta enfermedad como una de las 13 enfermedades tropicales más importantes de este continente, se estiman entre 7-12 millones de personas infectadas y 60-80 millones, que están en riesgo de contraer la enfermedad [4-6]. Aún cuando se considera endémica de América Latina, recientemente debido a los patrones de migración humana, desde hace poco más de una década se ha observado un incremento en el número de casos en Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón, Francia, España y Suiza [1, 7-9] (**Fig. 1**). En México se estima que 1.1 millones de personas están infectadas y 30 millones viven en zonas de riesgo [10].



Fig. 1 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas, tomado de Anis Rassi Jr, *et al.* [11]

1.2. VECTOR

La enfermedad de Chagas se transmite al humano y a más de 150 especies de animales domésticos (perros y gatos), así como a animales salvajes (roedores y armadillo), mediante la picadura del insecto vector triatomo perteneciente a la familia Reduviidae, conocido comúnmente como chinche besucona (**Fig. 2**) [11]. Actualmente se conocen 40 especies de triatomos infectados naturalmente por *T. cruzi* en Norteamérica. Los triatomos pertenecientes a los generos *Rhodnius* (*R. prolixus*), *Triatoma* (*T. infestans*) y *Panstrongylus* (*P. megistus*), son los más importantes a nivel epidemiológico. 28 especies se encuentran exclusivamente en México [4].



Fig. 2 *Triatoma dimidiata*.

1.3. CICLO DE VIDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dentro de los tripanosomatidos, *T. cruzi* presenta uno de los ciclos de vida más complejos, involucra diferentes estadios de desarrollo dentro del insecto vector (triatomino), así como en el hospedero (humano). En la **(Fig. 3)** podemos observar que el ciclo inicia cuando un triatomino libre de infección toma, a través de su aparato bucal (proboscis), sangre humana ó de animales infectados con tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos se diferencian en epimastigotes en la parte anterior del tubo digestivo del triatomino, se replican y se mantienen en el intestino medio durante toda la vida del insecto vector. En la porción terminal del aparato digestivo del triatomino, se transforman en tripomastigotes metacíclicos y se mezclan con las heces. Cuando un insecto infectado pica o succiona sangre del hospedero mamífero, defeca y deposita sobre la piel las heces que contienen los tripomastigotes metacíclicos (estadio infectivo para el mamífero). Los tripomastigotes metacíclicos se introducen en el hospedero mediante la ruptura del epitelio, ocasionada generalmente por la picadura del insecto vector. Dentro del hospedero, el parásito se internaliza en las células del sistema inmune innato (monocitos) y se replica intracelularmente en estadio de amastigote (sin flagelo), el parásito se libera al torrente sanguíneo por lisis de la célula hospedero. En el torrente sanguíneo del hospedero lleva a cabo modificaciones morfológicas, origina formas intermedias (promastigote y epimastigote), para finalmente transformarse al estadio de tripomastigote sanguíneo, el cual invade los tejidos de órganos, sistemas y aparatos importantes

como el corazón y plexos nerviosos del tubo digestivo. Este último estadio se ingiere por el insecto vector, a través de su proboscis, cerrando así el ciclo de vida.

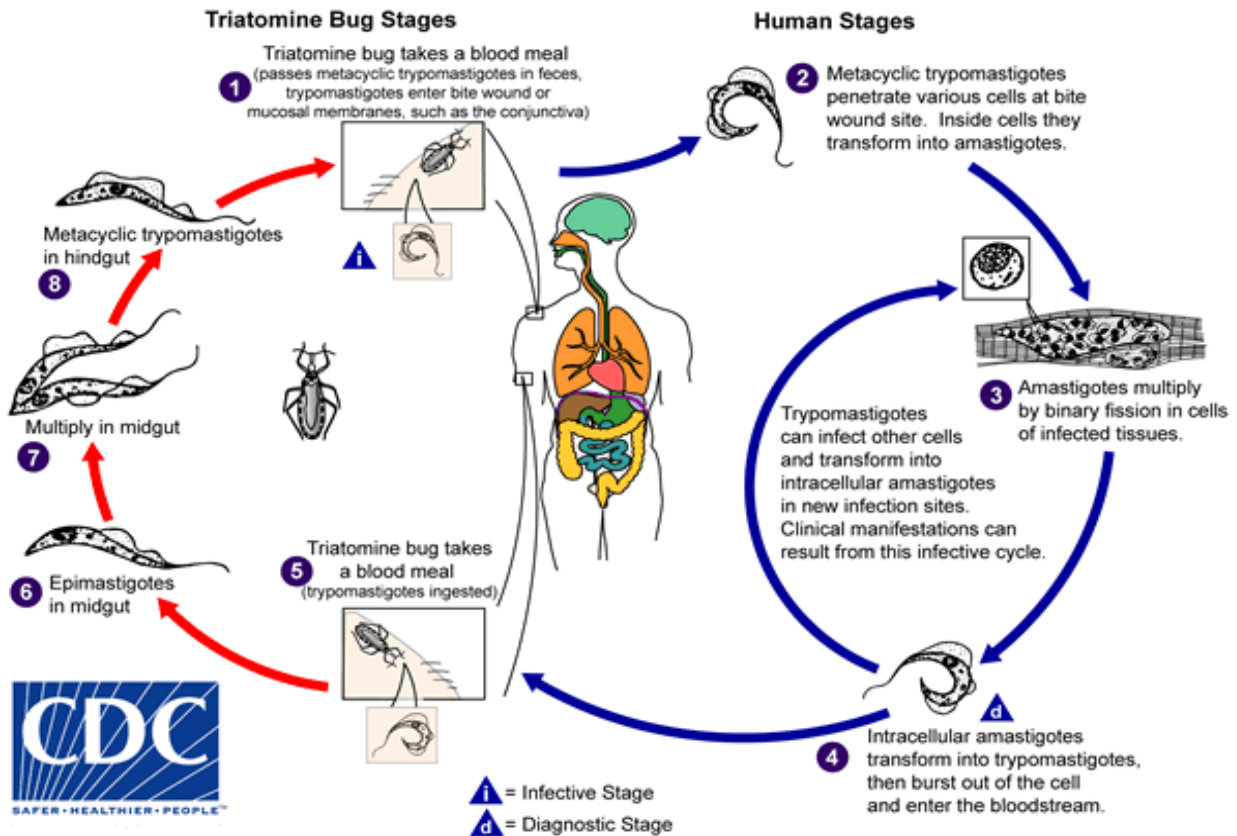


Fig. 3 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

1.4. TRANSMISIÓN

La transmisión de la enfermedad se da principalmente por la presencia del parásito en las heces del insecto vector, sin embargo se han descrito otras vías

como: transfusión sanguínea, trasplante de órganos, de forma congénita, y recientemente por vía oral mediante la ingestión de alimentos ó bebidas [11, 12].

El periodo de incubación de *T. cruzi* oscila entre 3 y 112 días dependiendo del modo de infección. El individuo infectado desarrolla una enfermedad progresiva, la cual inicia con una fase aguda que puede ser sintomática o asintomática. La sintomática se caracteriza por fiebre, parasitemia detectable, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, vómito, diarrea y especialmente, edema subcutáneo (chagoma) y los signos de puerta de entrada, como el ojo de Romaña [13] (**Fig. 4**).

Entre un 5 a 10% de mortalidad se reporta durante esta fase, generalmente afecta a niños quienes mueren por miocarditis o meningoencefalitis [14], la fase intermedia o indeterminada, se caracteriza por la ausencia de síntomas clínicos de la enfermedad. La fase crónica, se presenta entre el 10-30% de los individuos infectados, se caracteriza por afecciones al corazón como (cardiomegalia) y tracto digestivo (mega esófago y megacolon); esta fase se desarrolla después de 10 a 30 años de la infección inicial [15].



Fig. 4 Signo de Romaña.

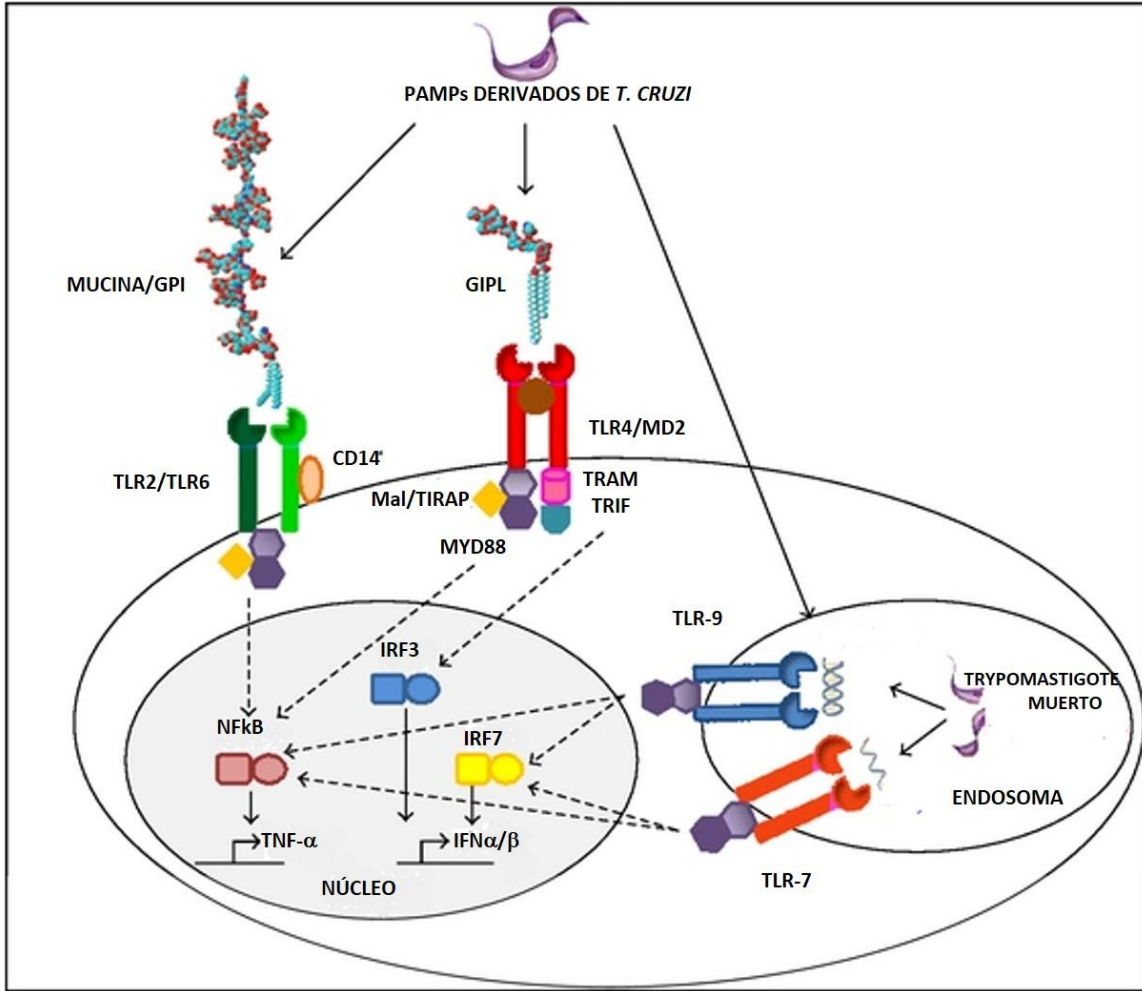
1.5. Inmunobiología de la enfermedad de Chagas

Una de las principales características de la fase aguda de infección es la presencia de *T. cruzi* en el torrente sanguíneo del huésped. Durante esta fase, el parásito tiene la capacidad de internalizarse en diferentes células de los diferentes sistemas u órganos, las células de la respuesta inmune innata como los macrófagos (Mo) son de las primeras células donde los parásitos se internalizan por medio de un evento fagocítico [16]. Este proceso depende de calcio (Ca^{++}) involucra el reclutamiento de lisosomas, los cuales se fusionan con la membrana plasmática al sitio de entrada del parásito, contribuyendo a la formación de la vacuola parasitófora [17, 18].

La acción de la transialidasa neuramidasa, complejo enzimático propio del parásito, permite la transferencia de ácido siálico de la célula huésped a la membrana del parásito, este evento facilita la lisis de la membrana celular y previene la acción lítica de la toxina TC-TOX sobre el parásito. Esta toxina es más activa a pH ácidos y forma poros sobre la vacuola parasitófora lo que favorece la liberación del parásito al citoplasma de la célula huésped donde se lleva a cabo la replicación [18-20].

El control de *T. cruzi* depende tanto de la respuesta inmune innata como de la respuesta adaptativa. Sin embargo, las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales de la respuesta inmune innata como Mo y células dendríticas (DCs) son las responsables del reconocimiento inicial del parásito, así como de iniciar y coordinar la respuesta inmune adaptativa [21, 22].

La familia de receptores tipo toll (TLR) expresados en las CPA, tienen un papel central en el reconocimiento de componentes de membrana del parásito como el glicoinositolfosfolipido (GIPL) y glicosilfosfatidilinositol (GPI), así como RNA o DNA a través de TLR-2, 4 , 7 y 9 respectivamente [1, 23, 24]. Dicho reconocimiento activa una cascada de señalización dependiente de la molécula adaptadora MyD88, la cual culmina con la translocación del factor de transcripción NF- κ B y la consecuente activación de genes pro-inflamatorios (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ), cruciales en la resistencia a la infección por *T. cruzi* [25-27]. Estas citocinas a su vez son capaces de activar uno de los principales mecanismos microbicidas de los Mo, como el óxido nítrico, molécula encargada de eliminar parásitos intracelulares [28, 29]. Sin duda alguna, diversos trabajos han demostrado la importancia de los TLRs, particularmente, 2, 4, 7, y 9 en la respuesta inmune a *T. cruzi* para conferir resistencia al huésped (**Fig. 5**).



Tomado de **Bellio M, et al. [1]**, modificado por Alicia Vázquez

Fig. 5. Glicoproteínas tipo mucinas presentes en la membrana plasmática de *T. cruzi* (Tc-MUC) ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) o glicoinositolfosfolípido (GIPL), son reconocidas por heterodímeros de TLR2/6 y TLR4 respectivamente, mientras que su DNA puede activar a TLR9 y TLR7 mediante el reconocimiento del RNA. Este reconocimiento induce la activación de NF-κB o factores reguladores de interferones (IRFs) a través de moléculas adaptadoras como MyD88, Mal/TIRAP o TRIF y TRAM. La activación de NF-κB conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF-α e IL-12), mientras que los IRFs son requeridos para la transcripción de IFN tipo I.

En contraste con los TLRs, estudios recientes reportan la participación de otro tipo de receptores expresados en Mo y DCs, conocidos como receptores tipo lectina C (CLRs). Estos receptores son funcionalmente diversos, han sido implicados en

diferentes procesos: adhesión, integración y remodelación de tejido, activación de plaquetas y del sistema del complemento, endocitosis y fagocitosis dado que funcionan como receptores para el reconocimiento del patrón (PRR) [30-32].

1.6. Receptores lectina tipo C (CLRs).

La superfamilia de los receptores lectina tipo C (CLRs) incluye a más de 1000 proteínas, clasificadas en 17 grupos con base en su filogenia. Se expresan en plantas, organismos invertebrados y vertebrados, incluidos los mamíferos [33]. La mayoría de CLRs poseen uno ó más dominios para el reconocimiento de carbohidratos (CDRs) o dominio tipo lectina C (CTLDs). El CTLD es un motivo estructuralmente conservado el cual contiene dos asas estabilizadas por dos puentes disulfuro en su base. La segunda asa es más flexible respecto a la primera y generalmente contiene sitios de unión de ligando. La mayoría de los CLR son receptores asociados a membrana plasmática involucrados en la captura y presentación de antígeno [34, 35]. Además, se ha descrito que la endocitosis mediada por CLRs es guiada por sus motivos de internalización intracelular, mientras que algunos contienen motivos inhibitorios de tirosina (ITIM) localizados en el citoplasma, lo que ilustra su potencial función como activadores ó supresores de la respuesta inmune (Fig. 6) [36].

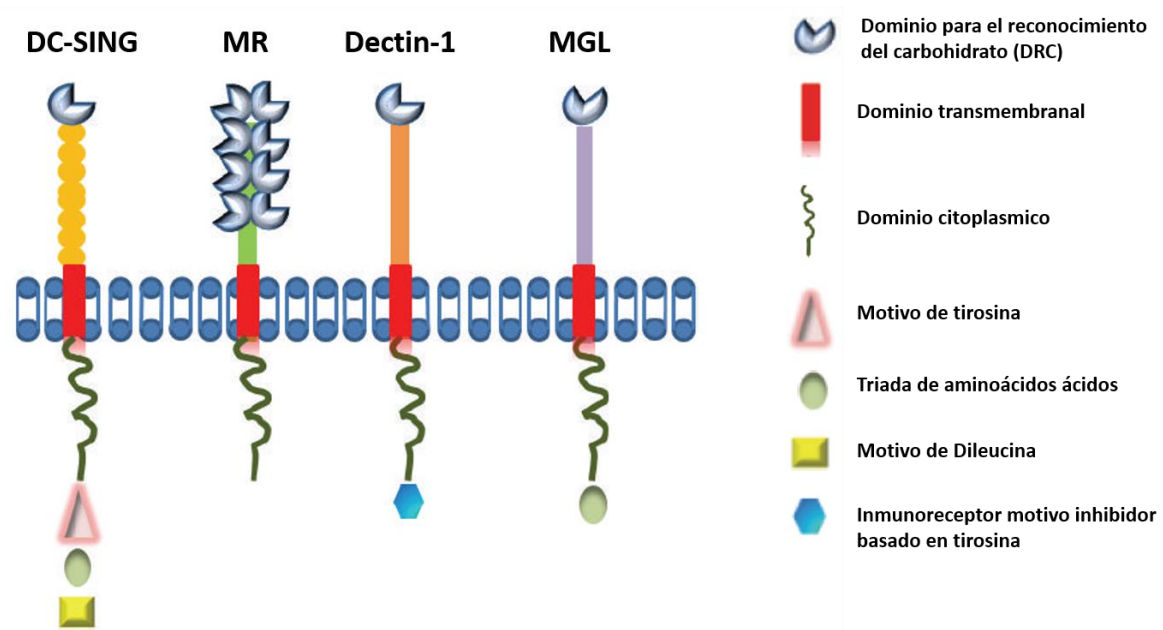


Fig. 6 Estructura de miembros de la familia de receptores lectina tipo C (DC-SIGN, MR, Dectin1 y MGL). Estos receptores presentan uno o más dominios para el reconocimiento de carbohidrato (DRC), un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico (motivo de tirosina, triada de aminoácidos ácidos, (motivo Di-leucina, o inmunoreceptor motivo inhibidor basado en tirosina) (motivo inhibitorio de inmunoreceptor de tirosina) [37].

Con base en la estructura primaria de los CDRs, plegamiento y requerimiento de cationes, las lectinas animales, se clasifican en diferentes familias, entre las que se encuentran las familias C, F, P e I; galactinas y pentraxinas, entre otras. Sin embargo, entre los CLR's más importantes se encuentran: la molécula de adhesión intercelular-3 no integrina específica de células dendríticas (DC-SIGN, del inglés dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), el receptor de manosa (MR, del inglés mannose receptor), DEC205, Dectin-1 y el receptor mMGL (MGL del inglés galactose/N-acetylgalactosamine-specific macrophage C-type lectin) (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades estructurales y funcionales de la familia de receptores tipo lectina

Grupo	Estructura de las moléculas	Miembros	Ligando	Expresión	Función	Ref
Tipo C	Tipo I y II transmembranal	MR (CD206) DC-SIGN (CD209) SIGNR-1 (CD209b) Dentin 1 (CLEC7A) Dectin 2 (CLEC4N) mMGL 1 (CD301a) mMGL 2 (CD301b) L-SIGN(CD209L)	- Manosa, fucosa, N-acetylglucosamina - Manosa, ICAM-3 - β -glucanos - Lewis X - estructuras Lewis X and A - N-GalNAc, galactosa - estructuras Lewis (a, b and y)	- Fagocitos mononucleares, células epiteliales, células de Largerghans, fibroblastos, células de riñón y cardiomiocitos - DCs inmaduras - zona marginal (MZ) del Bazo, nódulo linfático, Mo peritoneales - Mo, DCs, neutrofilos, subpoblaciones de células T -Mo, DCs -DCs, Mo -DCs, Mo - células endoteliales de hígado sinusoidal	- Reconocimiento de patógenos, presentación de Ag, eliminación de moléculas citopáticas endógenas, regulación de hormonas circulantes - Reconocimiento de patógenos, presentación de Ag, migración celular, interacción DC-célula T - eliminación de antígenos en sangre -Defensa contra hongos, inducción de TNF- α , regulación de proliferación de células T - intolerancia inducida por rayo UV - internalización y presentación de Ag, unión a CD45 para inhibir células T -anti-inflamatorio -Receptor de Ag	[30, 38-48]
Tipo P	Tipo I transmembranal	CD-MPR CI-MPR	Man-P-GlcNAc Man-6-P	Generación de lisosomas funcionales dentro de las células	Transporta Man-6-P contenido en hidrolasas ácidas del aparato de Golgi a compartimentos endosomales/lisosomas	[49-51]
Tipo F		AAA MsaFBP32	Fucosa	Hígado y Riñón	Modulación de funciones celulares	[52-56]
Tipo I	Tipo I transmembranal	Dos subgrupos Primero	Ácido sálico unido a N y O-	Células mieloides y linfoides	Regulación de señalización celular De leucocitos	[57, 58]

		(Siglec-1/CD169) Siglec -2/ CD22, Siglec-4/MAG y Siglec-15 Segundo Siglec 3/CD33 comprende 10 miembros humanos (3-5,-6, 7, 8, 9, 10, 11, 14,16. Roedores Siglec-3, E, F,G,H.	glucosilaciones		Receptores endocíticos	
--	--	---	-----------------	--	------------------------	--

Abreviaturas: Tm: transmembrane; Mo: macrófagos; pMo: macrófagos peritoneales; DCs: células dendríticas; iDCs: células dendríticas inmaduras; MoPh: fagocitos mononucleares; Fbls fibroblatos; LCs: células de Langerhans; CMs: cardiomiocitos; Lex: estructuras de Lewis x, a, b e y; Gal: galactosa; MR: receptor de manosa; DC-SIGN: SIGNR-1; mMGL: L-SIGN; CD-MPR: receptor 6-fosfato dependiente de cationes; CI-MPR: receptor 6-fosfato independiente de cationes; Man-6-P: manosa 6-fosfato; Man-P-GlcNAc: manosa 6 fosfato N-acetilglucosamina ester; AAA: aglutinina de *Anguilla anguilla*; MsaFBP32: lectina F presente en robalo rayado (*morone saxatilis*).

1.7. Función de los CLRs en la Respuesta Inmune

Las interacciones proteína-carbohidrato tienen dos funciones importantes en la respuesta inmune al estar involucradas en el reconocimiento del patógeno y en la interacción celular que conduce a su neutralización. En la respuesta inmune innata, participan en el reconocimiento y unión a carbohidratos presentes en la superficie de patógenos, a través de sus CDRs [36, 59, 60]. Los CDRs, en combinación con otros dominios, reconocen residuos de carbohidratos que permiten inducir la aglutinación, la inmovilización, la opsonización por complemento, la lisis, la endocitosis y la fagocitosis [34].

La importancia de los CLR's subyace en el hecho de que diferentes patógenos y antígenos tumorales aprovechan estos receptores para escapar de la degradación intracelular y suprimir la generación de una respuesta inmune eficiente [61, 62]. Estudios recientes han demostrado que algunos CLR's funcionan como receptores de adhesión, señalización ó antigénicos [63, 64]. Además, diferentes CLR's son capaces de endocitar y presentar antígenos en un contexto de moléculas MHC clase I y II, lo que favorece una eficiente respuesta antígeno-específica de células T CD4+ o T CD8+ [65, 66]. De tal forma que el reconocimiento inicial de patógenos por las CPA, como Mo o CDs, mediado por CLR's, es crucial para determinar el tipo de célula T efectora que mediara la respuesta inmune adaptativa [60, 67].

Las CPA están equipadas con receptores altamente especializados como los CLR's y TLR's. Estos receptores son importantes en la activación y maduración de las CPA después de unirse con estructuras conservadas presentes en los patógenos, conocidas como patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs). A diferencia de los TLR's, los CLR's reconocen e internalizan antígenos glicosilados expresados por los patógenos y en tejido del huésped de forma dependiente de Ca^{++} [35, 68, 69].

1.8. Papel de los CLR's en infecciones parasitarias

En la tabla 2 se muestra la participación de diferentes lectinas tipo C en el reconocimiento de antígenos glicosilados presentes en la membrana plasmática de diferentes parásitos. Sin embargo, aun cuando muchos de estos estudios

muestran el reconocimiento a través de estos receptores, ninguno describe su participación en la respuesta inmune al patógeno, llámese resistencia y/o susceptibilidad a las infecciones causadas por estos parásitos. De ahí nuestro particular interés por estudiar el papel de uno de los receptores pertenecientes a esta familia, específicamente el receptor lectina tipo C, MGL (galactose/N-acetylgalactosamine-specific macrophage C-type lectin).

MGL es una glicoproteína transmembranal de 42 kDa con un solo dominio en su región carboxilo-terminal para el reconocimiento de carbohidratos el cual tiene una con alta especificidad por glicoproteínas con presencia de galactosa (Gal) y N-acetylgalactosamina (GalNAc) [70-72]. En humanos se conoce una sola copia del gen *mgl* (*CD301a*), mientras que en ratón se reconocen dos copias funcionales, *mgl1* (*CD301a*) y *mgl2* (*CD301b*), ambos altamente homólogos en sus secuencias de aminoácidos (91.5%) [73, 74].

Por otro lado, los análisis para determinar el perfil de carbohidratos que son reconocidos por el receptor mMGL (galactose/N-acetylgalactosamine-specific macrophage C-type lectin), revelaron especificidad por diferentes carbohidratos; específicamente MGL1 que reconoce estructuras Lewis (Gal β 1-4 [Fuc α 1-3] GlcNAc), mientras que MGL2 reconoce (α - β -GalNAc) [48, 74, 75].

Esta capacidad para reconocer diferentes carbohidratos le provee una función dual, por un lado como una molécula de reconocimiento y por otro lado como un receptor endocítico para antígenos glicosilados. Además, se ha reportado la inhibición de la migración de células mMGL⁺ cuando se usan anticuerpos

monoclonales para bloquear la unión de ligandos para mMGL, sugiriendo que el reconocimiento antigénico mediado por MGL puede influir en la migración celular [76].

Aun cuando se ha demostrado la función de este receptor, poco se sabe en relación a su papel en las infecciones parasitarias. En la tabla 2 del artículo 1, (es mejor insertes la tabla aquí y la referencias como tu artículo) se enlistan estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, donde se demuestra que MGL es capaz de reconocer antígenos glucosilados presentes en *Schistosoma mansoni* y *Taenia crassiceps*. Sin embargo, no existen evidencias de su participación en la respuesta inmune durante las infecciones causadas por estos patógenos.

Estudios más recientes han demostrado que MGL es capaz de activar vías de señalización, induce la fosforilación de cinasas (como ERK 1/2) y factores de transcripción (CREB y NF- κ B). Napoletano *et al*, año en un estudio *in vitro* con células dendríticas inducidas (iDCs) de humano, demostraron que después de la unión con dos ligandos diferentes pero altamente específicos para MGL, se indujo la activación de estas células y la fosforilación de ERK1/2 y de NF- κ B [39].

En línea con la observación anterior, en el 2013 un estudio *in vitro* reportó que el reconocimiento de antígenos glucosilados a través de MGL induce la fosforilación de ERK, además de potenciar la señalización mediada por TLR2, lo que favorece la secreción de IL-10 y TNF- α en DCs derivadas de monocitos humanos [77].

Sin duda alguna estas investigaciones han aportado información valiosa acerca de las funciones que tiene MGL, tanto en el reconocimiento de antígenos glucosilados, así como su capacidad para activar vías de señalización.

Tabla 2. Función de los receptores lectina tipo C en infecciones por parásitos

Parasito	Receptor	Modelo	<i>in vivo/ in vitro</i>	Función	Ref
Protozoos					
<i>L. donovani</i>	MR	Balb/c	<i>in vivo/ in vitro</i>	Internalización de glucoconjugados con manosa	[78]
	MR albino	Raton Swiss	<i>in vitro</i>	Unión a promastigotes	[74]
	MR de	Mo derivados Monocitos	<i>in vitro</i>	Adhesion e ingestion de promastigotes	[79]
<i>L. amazonensis</i>	MR	línea celular	<i>in vitro</i>	Internalización de ligandos manocilados	[40]
	MR	BMDC	<i>in vivo</i>	Fagocitosis	[80]
<i>L. major</i>					
<i>L. pifanoi</i>	DC-DIGN	MDDCs K562	<i>in vitro</i>	Adhesión e internalización	[81]
	DC-SIGN	IMDDCs K562	<i>in vitro</i>	Adhesión a promastigotes	[82]
<i>L. pifanoi</i>					
<i>L. infantum</i>					

<i>T. cruzi</i>	MR		<i>in vivo/</i>	Unión a Cz	[83]
<i>cepa</i>	Balb/c		<i>in vitro</i>		
<i>Tulahuen</i>					
Cepas Y y DM	Linea celular J774 (Mo)		<i>in vitro</i>	Adhesión e internalización	[84]
<i>T. brucei</i>	MR and Mo	CM	<i>in vivo</i>	Marcador de aaMo	[85]
Nematodos	MGL C57BL/6		<i>in vivo/in vitro</i>	Reconoce componentes E/S de <i>T. muris</i>	[86]
<i>T. muris</i>	BALB/c				
Trematodos: Helmintos					
<i>S. mansoni</i>	MR C57BL/6 MR-KO		<i>in vitro</i>	Reconoce glucanos LDN y LDNF	[87]
			<i>in vitro</i>		[88]
	MGL líneas celulares SW948,		<i>in vitro</i>	Internalización de glucolípidos de SEA	[41]
	SKBR3, ZR75-1		<i>in vitro</i>		[89]
	CHO, BLM, FM3.29		<i>in vitro</i>	Adhesión a glucolípidos de SEA	[42]
	FM6, SK23mel				
	MGL DCs humano		<i>in vitro</i>	Reconoce glucanos de SEA	[90]
			<i>in vivo/in vitro</i>		
	DC-SIGN DCs humano		<i>in vivo/in vitro</i>	Adhesión a estructuras Le ^{a,b,y} de SEA	[43]
	DC-SIGN DCs		<i>in vivo/in vitro</i>	Adhesión e Internalización de SEA	[91]
Cestodos: Helmintos	L-SIGN línea celular K562		<i>in vitro</i>	Reconoce Ag de AWA y	[92]

<i>T. crassiceps</i>	L-SIGN línea celular K562	SEA	
	SIGNR1 BALB/c WT o SIGNR1-KO	Adhesión a componentes SEA	[93]
	Dectin-2 C57BL/6	Internalización de E/S de larva schistosome	
	MR C57BL/6 WT o MR- KO	TCEs modula positivamente la expresión de MGL pero modula negativamente DC-SIGN	
	MGL humano DC-SIGN		

Abreviaturas: MR: receptor de manosa; DC:SIGN: Lectina tipo C de adhesión celular específica de células dendríticas; SIGNR-1: homólogo de DC-SIGN; mMGL: Lectina tipo C de unión a galactosa en macrófagos; L-SIGN: molécula de adhesión tipo 3 no integrina específica de nódulos linfáticos e hígado; FbIs: fibroblastos; BMDMs: macrófagos derivados de médula ósea; MDCCs: células dendríticas derivadas de monocitos; IMDCCs: células dendríticas de monocitos inmaduros; Mo: macrófagos; CM: cardiomiocito; Cz: cruzipaina; E/S: excretado/secretado; LND: [GalNAc β 1-4GlcNAc-R]; LDNF: [GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc-R]; SEA: antígeno soluble de huevo; Le: estructuras de Lewis; AWA: antígeno de gusano adulto; TcES: antígenos excretado/secretado de *Taenia crassiceps*.

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias constituyen un importante problema de salud pública en los países en vías de desarrollo. Particularmente, la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es reconocida por la OMS como una de las 13 enfermedades tropicales menos atendidas. A pesar de causar severos daños a la salud desde hace ya varias décadas, desafortunadamente es un gran problema social y económico en América Latina [11].

Diversos estudios han descrito la participación de los TLRs, particularmente 2, 3, 4, 7, y 9 en la resistencia y/o susceptibilidad a la enfermedad de Chagas; sin embargo, ha emergido un profundo interés en el estudio de los CLR. Dentro de la respuesta inmune estas moléculas funcionan como receptores endocíticos capaces de reconocer, internalizar y presentar antígenos glucosilados expresados por los patógenos, lo que contribuye al desarrollo de la respuesta inmune antígeno-específica de las células T.

Aún cuando se han descrito estas funciones, poco se sabe acerca de su participación en el reconocimiento de los parásitos responsables de diversas patologías humanas, como es el caso de la enfermedad de Chagas.

T. cruzi es un patógeno rico en antígenos glucosilados tipo mucina Tc-MUC anclados a (GPI) y (GIPL) [94, 95]. En conjunto, constituyen entre el 60-80% del total de los carbohidratos presentes en la membrana plasmática. Dicha característica los hace blancos para ser reconocidos por miembros de los CLR.

De ahí el interés en estudiar la participación de mMGL en la respuesta inmune a la infección por *T. cruzi*.

3. HIPÓTESIS

El receptor lectina tipo C (mMGL) participa en el reconocimiento de moléculas glucosiladas constitutivas del parásito *T. cruzi* influyendo en el desarrollo de la respuesta inmune innata en el modelo de infección murina.

4. OBJETIVOS

4.3. GENERAL

Definir la participación de la molécula mMGL en la respuesta inmune innata durante la infección murina causada por *T. cruzi*, a través de la caracterización de la actividad de los macrófagos de ratones silvestres y ratones deficientes en la molécula mMGL.

4.4. PARTICULARES

1. Determinar si mMGL participa en la resistencia ó susceptibilidad en la infección por *T. cruzi*.
2. Evaluar si mMGL influye en la carga parasitaria que presenta el hospedero infectado con *T. cruzi*.
3. Determinar si mMGL influye en el perfil Th1/Th2 de citocinas sistémicas en la infección por *T. cruzi*.
4. Analizar si mMGL influye en la producción de óxido nítrico y el perfil de citocinas producidas por Mo en la infección por *T. cruzi*.
5. Determinar si mMGL influye en el genotipo de los macrófagos (M1 o M2) en la infección por *T. cruzi*.
6. Determinar si mMGL influye en la expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86, y MHC-II en macrófagos peritoneales de ratones infectados con *T. cruzi*.

7. Analizar si mMGL influye en la expresión TLR-4 en macrófagos peritoneales de ratones infectados con *T. cruzi*.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Genotipo de los animales experimentales por técnica de PCR

Extracción de DNA genómico. Para confirmar que los animales empleados durante la fase experimental cumplieran con la característica de WT y deficiente para mMGL (mMGL^{-/-}) se realizó la determinación del genotipo de los grupos de ratones a experimentar se empleó el método previamente reportado por Laird, P.W. [96]. Brevemente, se utilizaron ratones machos entre 6-9 semanas de edad, se utilizaron guantes, material nuevo y estéril, libre de DNAsas-RNAsas. Se obtuvieron aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de cada uno de los ratones, el tejido se transfirió a tubos (Eppendorf), de 1.8 ml, para llevar a cabo la digestión del tejido con 500 µl de amortiguador de lisis (Apéndice 1) y 20 µl de protein K (in vitrogen 100µg/µl) se incubó toda la noche a 55 °C.

Se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, se mezclaron de manera suave hasta hacer evidente la precipitación del DNA. Se centrifugó nuevamente a 11000 rpm durante 5 segundos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante se lavó el botón de DNA con etanol frío al 75 % en el mismo tubo; se resuspendió la pastilla y se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se eliminó, se dejó evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente el botón se resuspendió en 200 µl de H₂O grado miliQ (mQ).

Amplificación del gen. Se utilizaron cebadores específicos referidos en el Apéndice 4 para el reconocimiento del gen mgl. Brevemente, se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas de 0.2 ml, la reacción se realizó en un volumen final de 25 µl con los siguientes reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerase, SIGMA) en el siguiente orden:

		Para mMGL	Para NEO
Amortiguador	[10x]	2.5 µl	2.5 µl
Mg Cl ₂	[50mM]	0.75 µl	0.75µl
dNTP's	[10mM]	1.0 µl	0.5 µl
sentido	[15pM]	1.0 µl	3.0 µl
antisentido	[15pM]	1.0 µl	3.0 µl
Red-Taq	[2.5U/µl]	0.5 µl	0.5 µl
H ₂ O	(Sigma)	18 µl	14.5 µl
Muestra DNA		1.0 µl	1.0 µl

Los tubos se colocaron en el termociclador (Bioer) con la temperatura la alineación mencionada en el apéndice 2.

Electroforesis. Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1% en amortiguador TBE 1x (Apéndice 2) y 0.1% de bromuro de etidio (apéndice) sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se incubó a 4° C por 15 minutos para que se solidificara.

A cada uno de los tubos se les agregaron 5 µl de amortiguador de carga blue Juice con Sybr-Green (In vitrogen); una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3 µl del marcador de peso molecular 100 pb (In vitrogen). Las muestras se colocaron en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90

volts, 200 mA durante 40 minutos. Se capturó la imagen con el equipo Fujifilm Fla 5000.

5.2. Infección *in vivo*

Una vez determinado el genotipo de los ratones control (WT) y ratones deficientes para mMGL 1 y en un 80% para la isoforma 2 (mMGL^{-/-}), se inocularon vía intraperitoneal (i.p) con 10,000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Querétaro de infectividad media (donada por la Dra. Bertha Espinosa G, del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM). Los tripomastigotes utilizados se obtuvieron por punción cardiaca a partir de ratones previamente infectados; los parásitos se resuspendieron en 100µl de solución salina estéril (Pisa).

Para mantener la cepa, se realizaron pases sucesivos en ratones BALB/c, infectándolos i.p con 5000 trypomastigotes sanguíneos resuspendidos en 100 µl de solución salina estéril (Pisa).

5.3. Evaluación del número de parásitos en sangre

El número de parásitos en sangre de los ratones infectados de ambos grupos (WT y MGL^{-/-}) se utilizaron 10 µl de sangre periférica obtenida por un ligero corte en la vena caudal de la cola de cada uno de los ratones infectados. A los 10 µl de sangre se les adicionaron 5µL de heparina diluidos 1:50 en solución salina estéril (Pisa) en tubos Eppendorf de 1.8 ml.

De la solución diluida se tomaron 10 µl y los parásitos se contaron en cámara de Neubauer (Hirschmann Techcolor) utilizando los cuadrantes para leucocitos. El número de parásitos por ml de sangre se obtuvo aplicando la fórmula:

$$[(\# \text{ de parásitos}) (\text{dilución})/0.4] (1000) = \text{No. de parásitos/ml.}$$

5.4. Sobrevida de los ratones infectados

La sobrevida de los ratones infectados mMGL^{+/+} y mMGL^{-/-} se determinó mediante monitoreo visual diario durante 60 días posteriores a la infección y se registró el deceso y se graficó (gráfico de sobrevida, GraphPath Prisma 6).

5.5. Cultivo *in vitro* de parásitos de *T. cruzi*

El cultivo de la cepa de *T. cruzi* (Querétaro) se realizó en medio de cultivo bifásico de infusión cerebro corazón (BHI) enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco) con solución salina al 0.85% como fase líquida (Pisa). El agar se preparó de la siguiente forma:

BHI	3.7 gr.
Agar Nutritivo	2.3 gr.
Dextrosa	1.0 gr.
Agua Destilada	100ml

El medio de cultivo, la solución salina y el material de vidrio, como pipetas y matraces se esterilizaron en autoclave por calor húmedo a 15 lbs de presión durante 15 minutos y enfriamiento lento.

Inicialmente los medios se inocularon con 50 µl de sangre periférica de ratones infectados y posteriormente los cultivos se mantuvieron resemebrando 50 µl del

parásito cada 8 días en medios de cultivo previamente esterilizados y suplementados con 1.7 ml de antibiótico (100UI de penicilina, estreptomycin y glutamina 100x GIBCO), entre cada resiembra se verificó la viabilidad y estado axénico por medio de microscopía óptica.

5.6. Obtención de antígeno total de *T. cruzi*, cepa Querétaro

La obtención del antígeno de *T. cruzi* se realizó mediante el cultivo del parásito *in vitro*, descrito en la parte superior. Después de 15-20 días de cultivo, se obtuvo la fase líquida del cultivo y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm en tubos estériles de 50 ml para obtener el paquete celular. El botón se lavó 3 veces con PBS estéril. El botón se resuspendió en 2 ml de PBS conteniendo 10µl de inhibidores de proteasas (Aprotinin, EDTA, PMSF, Peptatin y TLCK, marca Sigma.Aldrich).

Los parásitos se sometieron a congelamiento inmediato con nitrógeno líquido y descongelamiento en baño María a 36 °C por al menos 8-10 veces para lisar a las células, se confirmó por microscopía óptica la destrucción del parásito. Se congeló a -70°C para su uso posterior. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry [97].

5.7. Cuantificación de proteínas totales del antígeno de *T. cruzi*

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

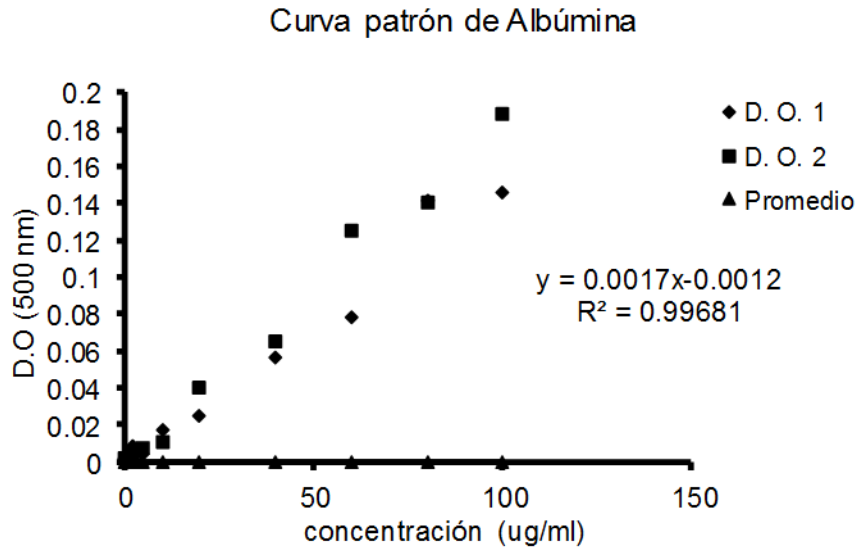
diluciones al doble hasta 0 μg (en un volumen final de 1 ml). De las muestras obtenidas de la lisis de los parásitos se realizaron 5 diluciones diferentes en PBS; 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 y 1:50. Se preparó la solución A (Apéndice 3) y la solución B (Apéndice 3). Una vez preparada la solución A se tomó 1ml de CuSO_4 más 1 ml de tartrato de Na y K y se agregaron a la solución B y se mezclaron. Se tomaron 3 ml y se agregaron a cada tubo tanto de la curva patrón como a las muestras problema. Finalmente a cada tubo se le adicionaron 0.4 ml del reactivo Folin Cilcateau (J.T. Baker) diluido 1:2 en agua destilada, se agitó y dejó reposar durante 30 minutos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 500 nm, se utilizó como blanco PBS.

Estas diluciones se leyeron en un espectrofotómetro utilizando el factor 1 densidad óptica (D.O)= 40 μg .

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

En donde $Y = \text{D.O.}$, $m = \text{pendiente}$, $x = \text{concentración}$ y $b = \text{intersección}$. Se utilizó el despeje $x = (y-b) / m$ para obtener la concentración de las diluciones de las muestra de Ag de Tc.

De las concentraciones obtenidas de las 5 diluciones se tomó el promedio como la cantidad de antígeno obtenido.



Albúmina (µg/ml)	D. O. 1	D. O. 2	Promedio
100	0.146	0.188	0.167
80	0.141	0.140	0.140
60	0.078	0.125	0.101
40	0.056	0.065	0.0605
20	0.025	0.040	0.0325
10	0.017	0.011	0.014
5	0.004	0.007	0.005
2.5	0.008	0.004	0.006
0	0.002	0.002	0.002

Fig. 7.- Curva patrón de albúmina, se graficaron las dos densidades ópticas obtenidas y el promedio de estas contra la concentración de albúmina.

5.8. Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sandwich)

Obtención del suero. De los ratones infectados vía i.p con 10000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (Querétaro) se obtuvo sangre realizando una incisión en la vena caudal a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días post-infección. La sangre se centrifugó en tubos Eppendorf de 1.8 ml de 2 a 3 veces a 3000 rpm por 10 minutos hasta la obtención pura del suero, este se mantuvo en congelación a -70°C hasta su uso.

La concentración de las citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-10 se evaluó por medio de la técnica de ELISA sándwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Pharmingen, Peprotech y Biolegend). En todos los casos el procedimiento fue similar, se siguieron las especificaciones del proveedor descritas en [98]. A continuación una descripción general y breve del procedimiento.

Sensibilización de la placa. El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 2 μ g/ml en amortiguador de fosfatos, pH 9 (0.1 M NaH₂PO₄ pH 9, J.T. Baker) para cada una de las citocinas se adicionaron 50 μ l/pozo a placas de 96 pozos para ELISA (Nunc Maxisorp) y se incubaron toda la noche a 4°C.

Muestras y curva. Al día siguiente las placas se mantuvieron a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con solución de lavado (PBS-tween-20 al 0.05%, Sigma. Se les adicionó 200 μ l de amortiguador de bloqueo (10% FCS en PBS) se incubó a temperatura ambiente por 2 h y posteriormente se lavaron dos veces con

una solución de lavado y se colocaron 50 μ l/pozo de las muestras a determinar por duplicado, se utilizó como control una curva de citocinas recombinante en diluciones seriadas 1:2 en buffer de bloqueo iniciando con una concentración de 4000pg/ml (Pharming). Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

Revelado. Las placas se llevaron a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con amortiguador de lavado y se secaron por aspiración. Se les adicionó el anticuerpo de detección para cada citocina marcado con biotina correspondiente a una concentración de 2 μ g/ml en amortiguador de bloqueo (Pharming). Las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h y se lavaron 5 veces con solución de lavado. Se adicionaron 6 μ l/pozo del conjugado de estreptoavidina peroxidasa (BioRad) a una dilución de 1:2000 en amortiguador de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, se lavaron 6 veces con amortiguador de lavado. Se adicionaron 100 μ l/pozo de sustrato ABTS recientemente preparado (Sigma) (0.5% ABTS en 0.1M ácido cítrico anhidro, pH 4.35 con NaOH más 1% H₂O₂ al 3%, todos los reactivos marca Sigma). La densidad óptica se determinó entre los primeros 30 minutos de iniciada la reacción en un lector de placas de ELISA (SpéctraMax 250, Molecular Devices) a 405nm.

5.9. Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal

Para la obtención de las células de la cavidad peritoneal de ratones WT y deficientes para mMGL, se utilizó el método básico de exudado peritoneal. Este método consiste en inyectar 10 ml de solución salina estéril (Pisa) en la cavidad peritoneal de los animales dando un ligero masaje a fin de remover la mayor

cantidad de macrófagos. Posteriormente se realizó una pequeña incisión en la piel dejando expuesta la cavidad peritoneal para extraer los macrófagos contenidos en la solución salina. El exudado peritoneal obtenido se colocó en tubos Falcon estériles de 15 ml se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100UI de penicilina, estreptomicina y glutamina 100x GIBCO. Una vez resuspendido el botón, se tomaron 10 μ l de la suspensión y se mezclaron con 10 μ l de azul tripano (Sigma-Aldrich), se mezcló y se colocaron 10 μ l en la cámara de Neubauer, una vez contadas fueron ajustadas a 1×10^6 células/ml y se sembradas en placas de 24 pozos fondo plano (Corning), las células fueron estimuladas con 250 ng de LPS (Sigma-Aldrich), o 25 μ g de AgTc cepa Qro.

5. 10. Determinación de dióxido nítrico (NO_2^-) en el sobrenadante de cultivos de macrófagos

La determinación del NO_2^- se realizó en los sobrenadantes de los Mos obtenidos por exudado peritoneal de los ratones silvestres y deficientes para mMGL a los 21, 28 y 35 días post-infección y cultivados *in vitro*. El ensayo consistió en preparar dos soluciones por separado.

Solución A, 0.1% de naphthylenediamine dihydrochloride (ICN Biomedicals) en agua destilada.

Solución B, sulphanimida (ICN Biomedicals) 5 % en H_3PO_4 al 5 %.

Minutos antes de realizar el ensayo las soluciones se mezclaron vol/vol, para obtener el reactivo de Griess. En una placa para ELISA de fondo plano de 96 pozos se colocó una curva (empezando en 100 mM diluciones dobles) de nitrito de sodio (NaNO_2) como control y referencia para intrapolar las concentraciones (densidad óptica) de las muestras. Tanto la curva como las muestras se colocaron en volúmenes de 100 μl y 100 μl de reactivo de Griess. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se leyeron a 550 nm en un lector de ELISA (Metertech S960).

5.11. Determinación de los transcritos de moléculas características de macrófagos M1 y M2 por RT-PCR

Extracción de RNA. Una vez recuperado el sobrenadante de los cultivos de macrófagos, se agregó 1ml de trizol (Ambion) por cada 1×10^6 células. Posteriormente se agregaron 200 μl de cloroformo grado molecular (J.T. Baker 9180-02) se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La muestra fue centrifugada a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase transparente y se le agregaron 500 μl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla, posteriormente se lavó 2 veces con etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 μl de H_2O DEPC y se agregaron 10 μl de inhibidor de RNAsas (RNase Inhibitor. No. Cat.

15518-012, GIBCO BRL). Finalmente se cuantificó a 260nm en el espectrofotómetro utilizando una dilución 1:200 (4µl de muestra + 800µl de H₂O DEPC).

Obtención de cDNA. En un tubo de PCR de 0.2 ml se agregaron 8 µl de RNA total, 1 µl de dNTP's y 1 µl de oligo dT, esta mezcla se incubó en un termociclador a 65°C por 5 minutos 10°C por 1 minuto. Posteriormente se incubó a -20°C durante 1 minuto; se agregaron 2µl de amortiguador 10x RT , 4µl de MgCl₂ (25mM), 2 µl de D.TT (0.1M) y 1 µl de RNAsa OUT por cada reacción y se colocaron en el termociclador a 42°C por 2 minutos y 10 °C durante 1 minuto. Posteriormente se agregó 1µl de super Script a cada reacción y se incubó en el termociclador utilizando el programa RT-3 (42°C por 50 minutos, 70°C 15 minutos y 10°C durante 3 minutos). Finalmente se cuantificó la concentración y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Amplificación de cDNA. Una vez determinada la cantidad de cDNA, se procedió a realizar un análisis semicuantitativo de las diferencias en la transcripción de las diferentes citocinas, TLR y factores de transcripción (TNF- α , IFN- γ , IL-10, TLR-4, GATA-3, TGF- β y FOXP3). Los primers específicos para cada uno, así como la temperatura de alineación que se utilizó en el termociclador (Bioer), están referidos en el (Apéndice 4).

Las reacciones se prepararon en tubos nuevos y libres de DNAsas con 0.2ml de capacidad. Las mezclas se llevaron a un volumen final de 25µl con las siguientes volúmenes.

1 Rx	
Buffer 10x	2.5 μ l
dNTPs 10mM	0.5 μ l
Primer F 50pM	1.0 μ l
Primer R 50pM	1.0 μ l
Red Taq	1.0 μ l
cDNA	2.0 μ l

Electroforesis del producto de PCR. Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) 1% en amortiguador TBE 1x (Apéndice 2) y 0.1% de bromuro de etidio sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a 4° C por 15 minutos para que solidificara.

A cada uno de los tubos se les agregaron 5 μ l de amortiguador de carga blue Juice con Sybr-Green (In vitrogen) una vez mezclados se tomaron 8 μ l de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, en el primero se colocaron 3 μ l del marcador de peso molecular 100 pb (In vitrogen).

Las muestras se colocaron en el extremo positivo de la cámara y se corrió la electroforesis a 90 volts, 200 mA durante 40 minutos. Para observar y capturar la imagen de las bandas obtenidas, se utilizó un transluminador de luz UV (FujiFilm FLA-5000) y se capturó la foto utilizando el programa ImageReader FLA-5000 V2.1.

5.12. Análisis del perfil de citocinas en co-cultivos de esplenocitos y macrófagos

Obtención de células de bazo. A los 20 días post-infección, se sacrificaron ratones deficientes para mMGL. En condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar (Testar), se extrajo el bazo colocándolo en una caja Petri estéril (marca Corning), posteriormente las células se separaron del tejido y se maceraron en separadores celulares (B.D. Falcon, cell strainer) con émbolos estériles de jeringas, finalmente se colectaron en tubos Falcon estériles de 15 ml (marca Nalgen, Nunc Int).

Para concentrar las células se centrifugó a 1500rpm por 10 min, posteriormente se incubaron en 5 ml de solución de lisis (Apéndice 5) durante 15 min para eliminar los eritrocitos restantes, se centrifugaron por 1 min a 1500 rpm el sobrenadante se decantó. A las células libres de eritrocitos se les agregó 5 ml de medio D-MEM (Gibco, suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10 % SFB y streptomycin) para homogeneizar. Para contar las células viables se empleó la prueba de exclusión con azul tripano se adicionaron 10 μ l de la muestra y 10 μ l de azul tripano (Sigma Chemicals co). En la cámara de Neubauer se colocaron 10 μ l con micropipeta estéril del homogeneizado y se contaron cinco cuadrantes para obtener el número de células por mililitro, después las células se ajustaron a 5x10³ células por pozo.

5.13. Co-cultivo de macrófagos con esplenocitos

Posterior al estímulo, los macrófagos de ratones WT y los provenientes de ratones deficientes para mMGL se cocultivaron en relación 1:10 con esplenocitos de ratones WT que tenían 20 días de infección o con esplenocitos provenientes de ratones transgénicos para ovoalbúmina (OVA), se incubaron por 3 días con OVA o 5 días con AgTc a 37°C en estufa de CO₂. Finalmente, el sobrenadante se colectó para determinar la producción de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 por la técnica de ELISA sandwich.

6. RESULTADOS

6.1. Detección de la presencia de galactosa en el antígeno de *T. cruzi* cepa Queretaro, por Lectin Blot

Dado que mMGL reconoce antígenos glucosilados con presencia de galactosa y N-acetilgalactosamina, y la membrana plasmática de *T. cruzi* es rica en antígenos glucosilados, buscamos determinar la presencia de galactosa en el antígeno total de *T. cruzi*, cepa Queretaro. Como se muestra en el, (Fig. 8). El Ag total del parásito tiene una concentración importante de galactosa, reconocida por la especificidad de la lectina *Artocarpus integrifolia* (jacalina) (Sigma-Aldrich). Con este resultado corroboramos que la galactosa de *T. cruzi*, es reconocida por mMGL.

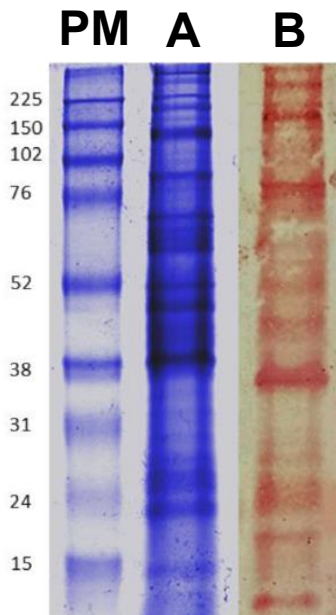


Fig.- 8. El antígeno total de *T. cruzi* es rico en glicoproteínas asociadas a galactosa (Gal) y N-acetilgalactosamina (GAL-Nac). El antígeno total de *T. cruzi* fue separado en (SDS-PAGE) un gel de electroforesis de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio y transferido a nitrocelulosa para realizar un lectin blot para detectar glucanos unidos a N terminales con jacalina conjugada con HRP (horseradishperoxidase). A) Electroforesis del antígeno total de *T. cruzi*. B) Blot con jacalina. Los antígenos fueron de diferentes ratones infectados, el PM indica el marcador de peso molecular en kilodaltons (KDa).

6.2. Determinación del genotipo de los ratones del grupo control (WT) y el grupo experimental (mMGL^{-/-})

Con el objetivo de asegurarnos que los grupos de ratones cumplieran con la condición de silvestre (WT) y/o deficientes para el gen que codifica para *mMGL* (mMGL^{-/-}), todos los ratones se genotipificaron por la técnica de PCR. La (Fig. 9) muestra una electroforesis en gel de agarosa del amplificado del gen funcional para *mMGL*, con un peso 633 pb, en los carriles 1 y 2, del grupo utilizado como control, y para el gen neomicina (NEO), gen de inserción de los ratones deficientes para *mMGL*, con un peso de 492pb, en los carriles 3 y 4. La secuencia de los primers utilizados se muestra en el (Apéndice 4).

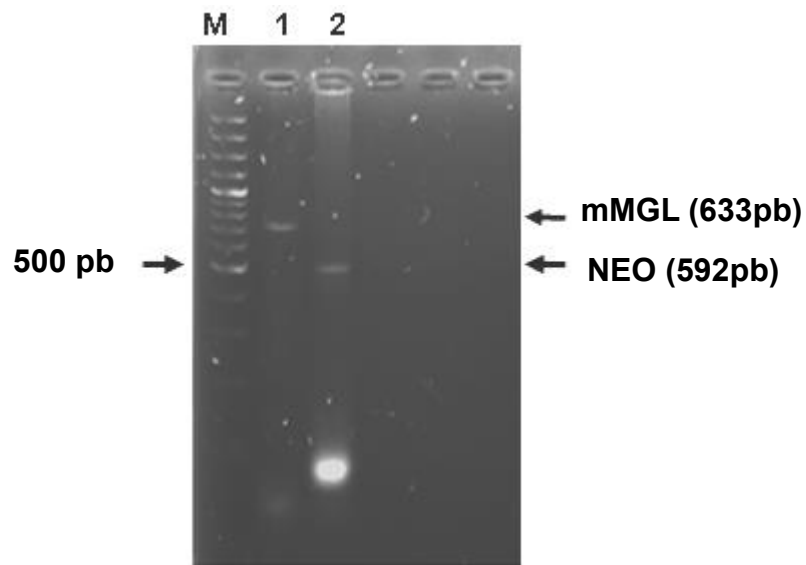


Fig.- 9. Gel representativo de una electroforesis del producto de PCR para el gen de *mMGL* carril 1 (633pb) y Neomicina carril 2 (492pb). MPM= marcador de peso molecular; pb= pares de bases.

6.3. Sobrevida y carga parasitaria

Con el fin de determinar la participación de la molécula mMGL en la respuesta inmune a la infección por *T. cruzi*, se monitoreó la susceptibilidad en ratones WT y mMGL^{-/-} de 6-9 semanas de edad, infectados con 10×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Qro vía intraperitoneal (i.p.). Los resultados obtenidos mostraron una mayor susceptibilidad en los ratones mMGL^{-/-} en comparación con los ratones WT. Mientras que los ratones WT tuvieron una sobrevida del 80 %, los ratones mMGL^{-/-} únicamente el 37 % sobrevivió (**Fig. 10-A**). El incremento en la susceptibilidad en los ratones mMGL^{-/-} estuvo asociado a una mayor carga parasitaria, ya que los ratones mMGL^{-/-} presentaron 3 veces más parásitos en circulación en comparación a los ratones WT (**Fig. 10-B**).

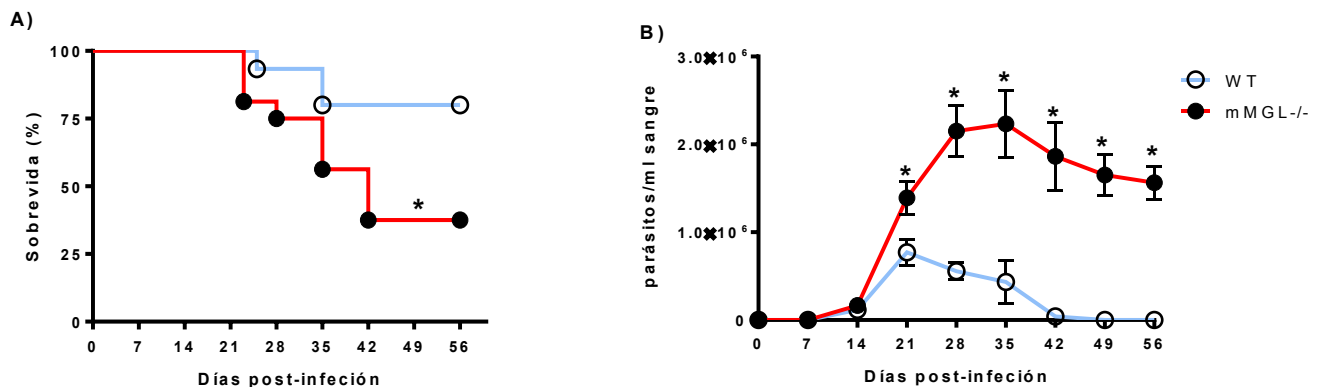
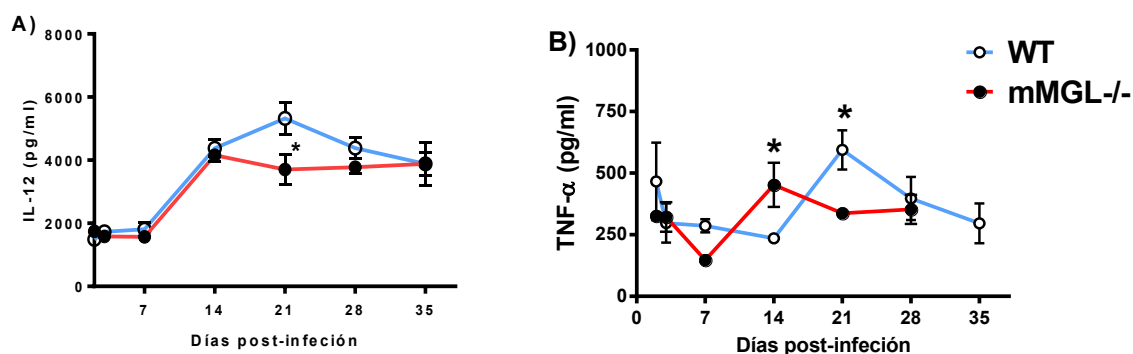


Fig.- 10. Porcentaje de sobrevida (A), y parásitos por ml de sangre (B) de ratones WT y mMGL^{-/-} infectados con 10×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi* vía i.p. Los resultados representan la media de 4 experimentos independientes n= 24; *p< 0.05 prueba "t" student (graphpad Prism 6).

6.4. Determinación de citocinas en suero

Para establecer la participación de la molécula mMGL en la respuesta inmune a la infección por *T. cruzi*, se determinó el perfil de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) y anti-inflamatorias a nivel sistémico (IL-10) (**Fig. 10**). La producción de IL-12 y TNF- α (**Fig. 10 A-B**) respectivamente a los 21 días post-infección se observó disminuida en los ratones mMGL^{-/-} comparados con el grupo de ratones WT. Mientras que, la producción de IFN- γ e IL-10 incrementó en los ratones mMGL^{-/-} comparados con los WT en los días 21 y 35 post infección, (**Fig. 10 C-D**), respectivamente). Las diferencias a nivel sistémico fueron mínimas y no indicaron la participación de mMGL en la respuesta inmune a la infección por *T. cruzi*.



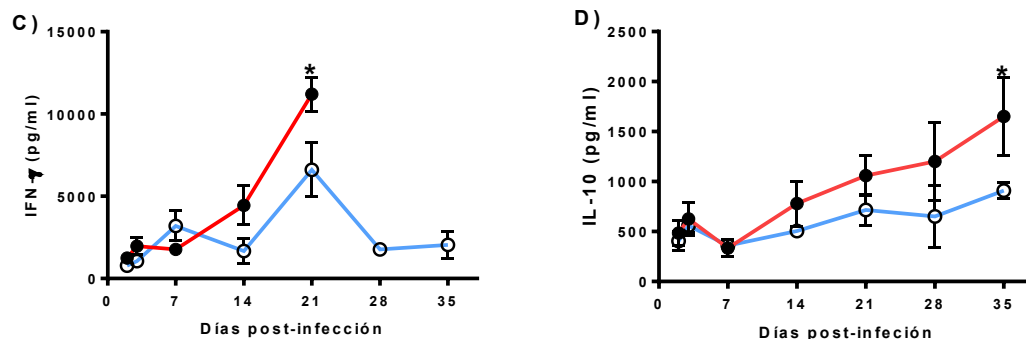


Fig.- 11.- Concentración de IL-12 (A), TNF- α (B), IFN- γ (C) e IL-10 (D) a los 3, 7, 14, 21, 28 y 35 días p.i en suero de ratones WT y deficientes para el receptor mMGL infectados con 10×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. Los resultados representan la media de 4 experimentos independientes n= 24; *p< 0.05 prueba "t" student (graphpad Prism 6).

6.5. Determinación de dióxido de nitrato (NO_2^-) y citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en sobrenadante de macrófagos peritoneales de ratones WT y mMGL^{-/-} a los 21 y 35 días post-infección.

Dado que el receptor mMGL se expresa en Mo y esta célula es blanco durante la invasión por *T. cruzi*; por lo tanto se determinó si la ausencia del receptor, podría afectar la producción de óxido nítrico (ON) así como la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (IL-12 y TNF- α), o anti-inflamatorias (IL-10) implicadas en la resistencia y/o susceptibilidad a la infección.

Los resultados mostraron una disminución en la concentración de ON, IL-12, TNF- α e IL-10 en Mo mMGL^{-/-} a los 21 días post-infección en respuesta al LPS o AgTc, en comparación a las concentraciones que generaron los Mo de ratones WT (Fig. 12).

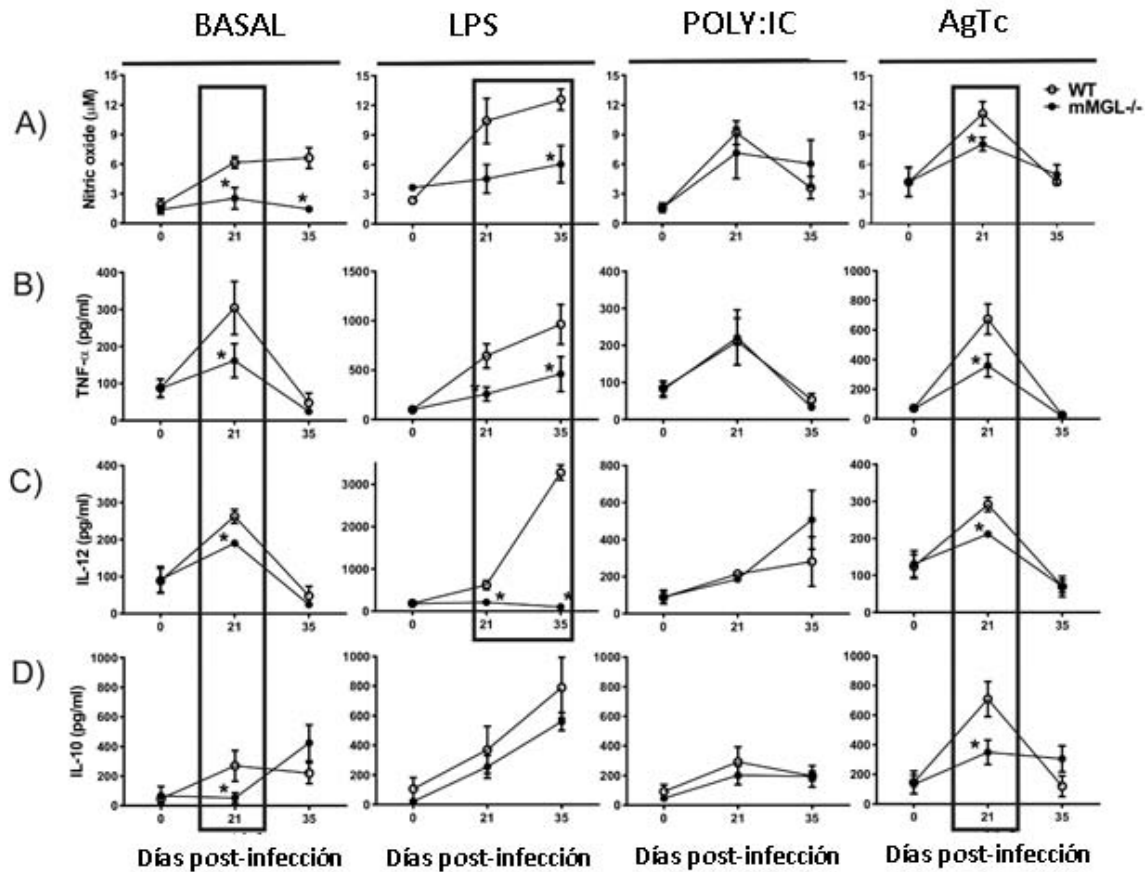
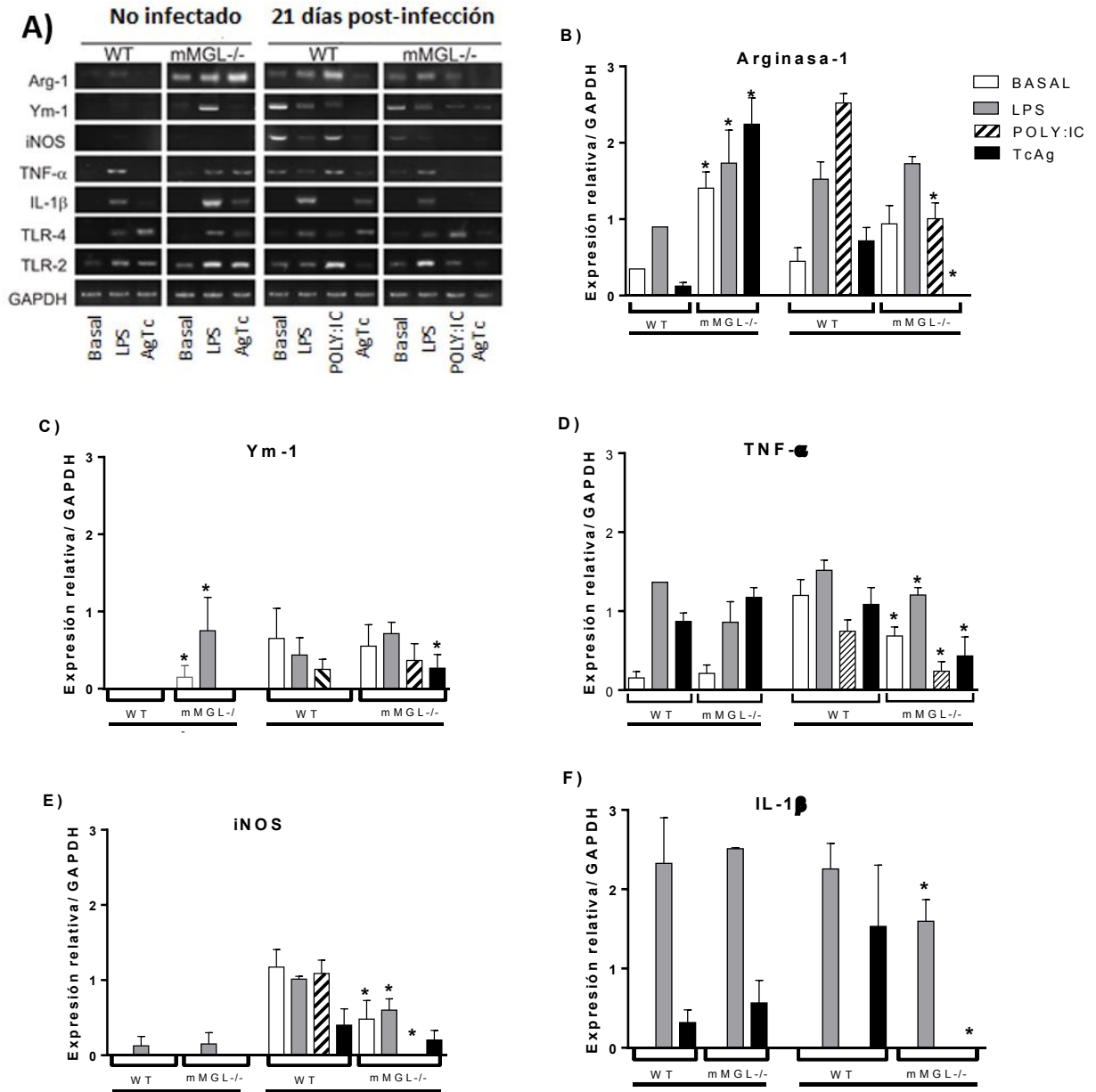


Fig.- 12.- Concentración de NO (A) , TNF- α (B), IL-12 (C) e IL-10 (D) en sobrenadante de cultivo de Mo sin infección o con 21, 28 y 35 dpi con *T. cruzi* . los Mo fueron tratados con LPS (500ng/ml), POLY:IC (25 μ g/ml) o AGTc (25 μ g/ml) por 48 hrs. Los resultados representan la media de 4 experimentos independientes n= 24; *p< 0.05 prueba "t" student (graphpad Prism 6).

6.6. RT-PCR de TLR-2 y TLR-4, TNF- α , iNOS, Ym-1 y Arg-1 en macrófagos peritoneales de ratones WT y mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi*

Estudios previos han demostrado el papel de TNF- α , así como de TLR-2 y TLR-4, en la diferenciación y activación de los Mo tipo M1 asociados a la resistencia a la infección por *T. cruzi* [99-101]. Con el fin de determinar si la ausencia de mMGL puede afectar la expresión de TNF- α , IL-1 β , TLR-2 y/o TLR-4, así como las moléculas características de los Mo tipo M1 ó tipo M2, se realizó un RT-PCR de

Mo provenientes de ratones con 21 días de infección. Aun cuando no se observó un genotipo claro de los Mo, es importante resaltar que se encontró una menor expresión de TLR-4 en Mo mMGL^{-/-} ante el estímulo con LPS y AgTc (**Fig. 13**).



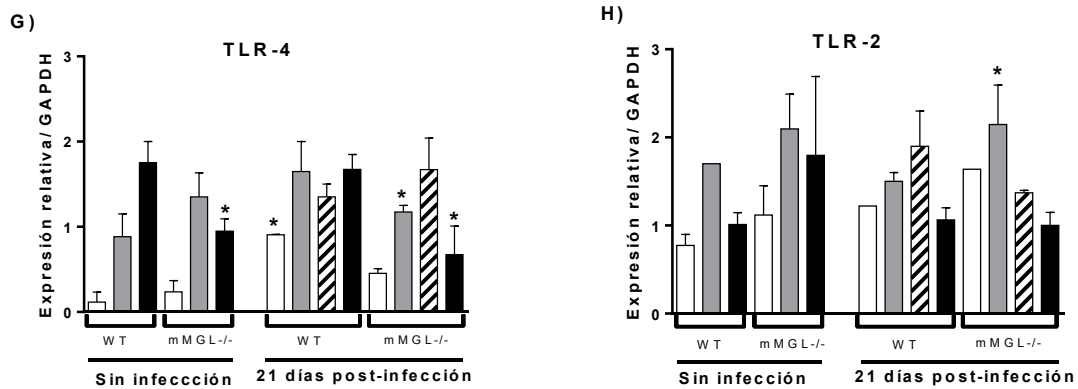


Fig.- 13.- Genotipo de Mo WT y mMGL^{-/-} de ratones a los 21 dpi por RT-PCR. Electroforesis en gel (A) , Arginasa-1 (B), Ym-1 (C) TNF- α , (D) iNOS, (E) IL-1 β , (F) TLR-4, (G) TLR-2 . Los Mo fueron tratados con LPS (500ng/ml), POLY:IC (25 μ g/ml) o AgTc (25 μ g/ml) por 48 hrs. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes n= 24; *p< 0.05 prueba "t" student (graphpad Prism 6).

6.7. Expresión de TLR-4 y MHC-II en macrófagos WT y mMGL^{-/-} infectados *in vitro* con *T. cruzi*

El análisis de citocinas en sobrenadante de Mo, reveló una marcada disminución en respuesta al estímulo con LPS, ligando para TLR-4 en células de ratones mMGL^{-/-}, en comparación al grupo control WT. Además por RT-PCR también se detectó disminución en la expresión del transcrito para TLR-4. Estas observaciones nos llevaron a estudiar si la ausencia de mMGL podría modificar la expresión de TLR-4 o la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II) en los Mo de los ratones mMGL^{-/-}. Para contestar esto, se extrajeron Mo de ratones sanos mMGL^{-/-} y WT y se infectaron *in vitro* con *T. cruzi* por 24 h. Se analizó por citometría la expresión de TLR-4 o MHC-II. El análisis reveló que los Mo de ratones mMGL^{-/-} tienen una menor expresión de TLR-4 y MHC-II, respecto a los WT (Fig.14 A-C).

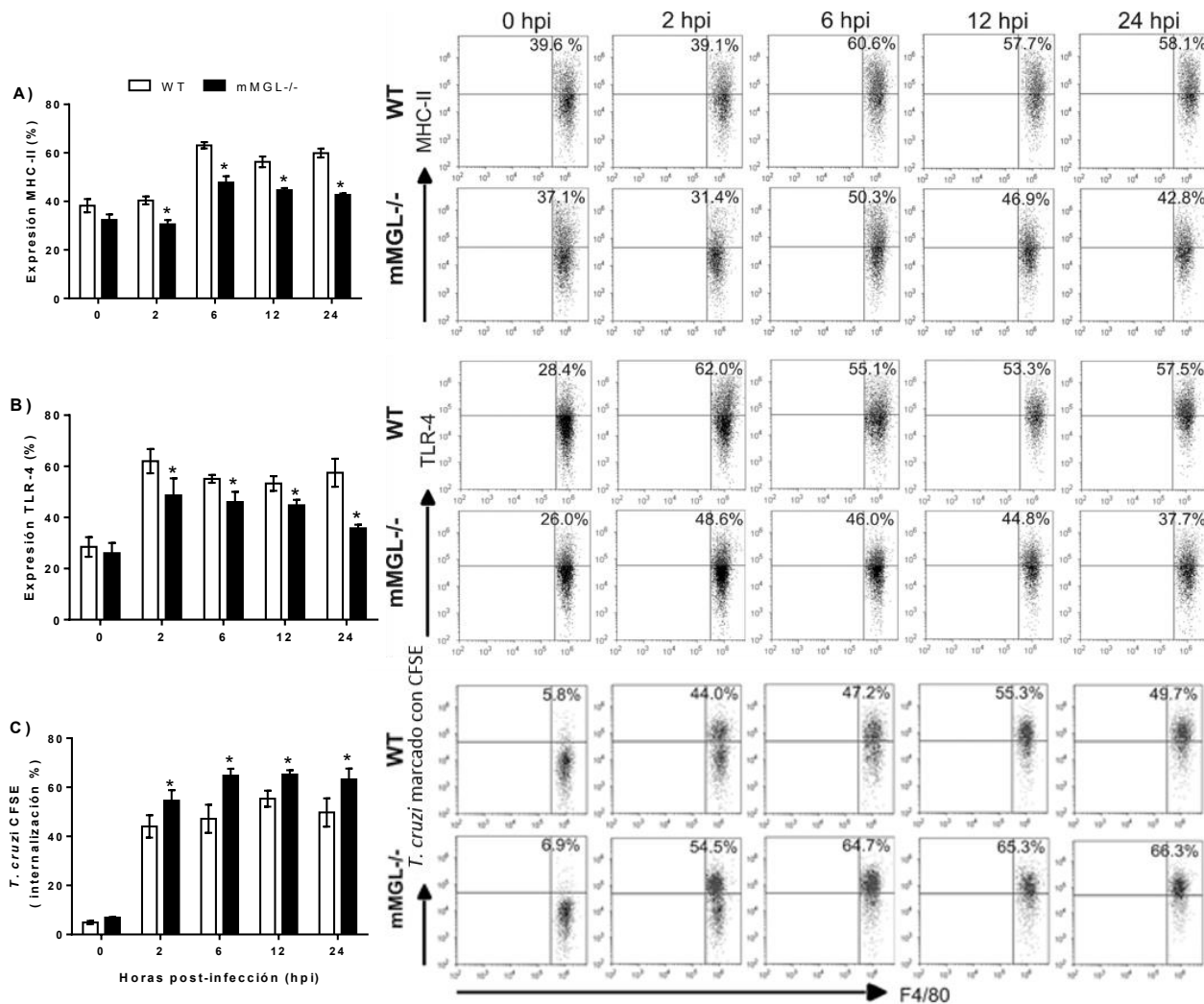


Fig.- 14.- Análisis de la expresión de TLR-4 y MHC-II en Mo WT y mMGL^{-/-} infectados *in vitro* con *T. cruzi*, por citometría de flujo. TLR-4 (A), MHC-II (B), Porcentaje de células infectadas (C). Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes n= 24; *p< 0.05 prueba “t” student (graphpad Prism 6).

6.8. Análisis histológico del corazón de ratones WT y mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi*

Se sabe que *T. cruzi*, tiene tropismo tanto por músculo esquelético como cardíaco, de ahí que se busco determinar si la mortalidad observada en los ratones mMGL^{-/-} podría asociarse a un mayor daño en tejido cardíaco. Para establecer esto, se

realizó un análisis histológico del corazón a los 21 y 28 días post-infección. Dicho análisis reveló un mayor infiltrado celular, así como un mayor número de nidos de amastigotes en corazón de ratones mMGL^{-/-} en comparación al grupo control. Los resultados se muestran en la (Fig. 15 A-C).

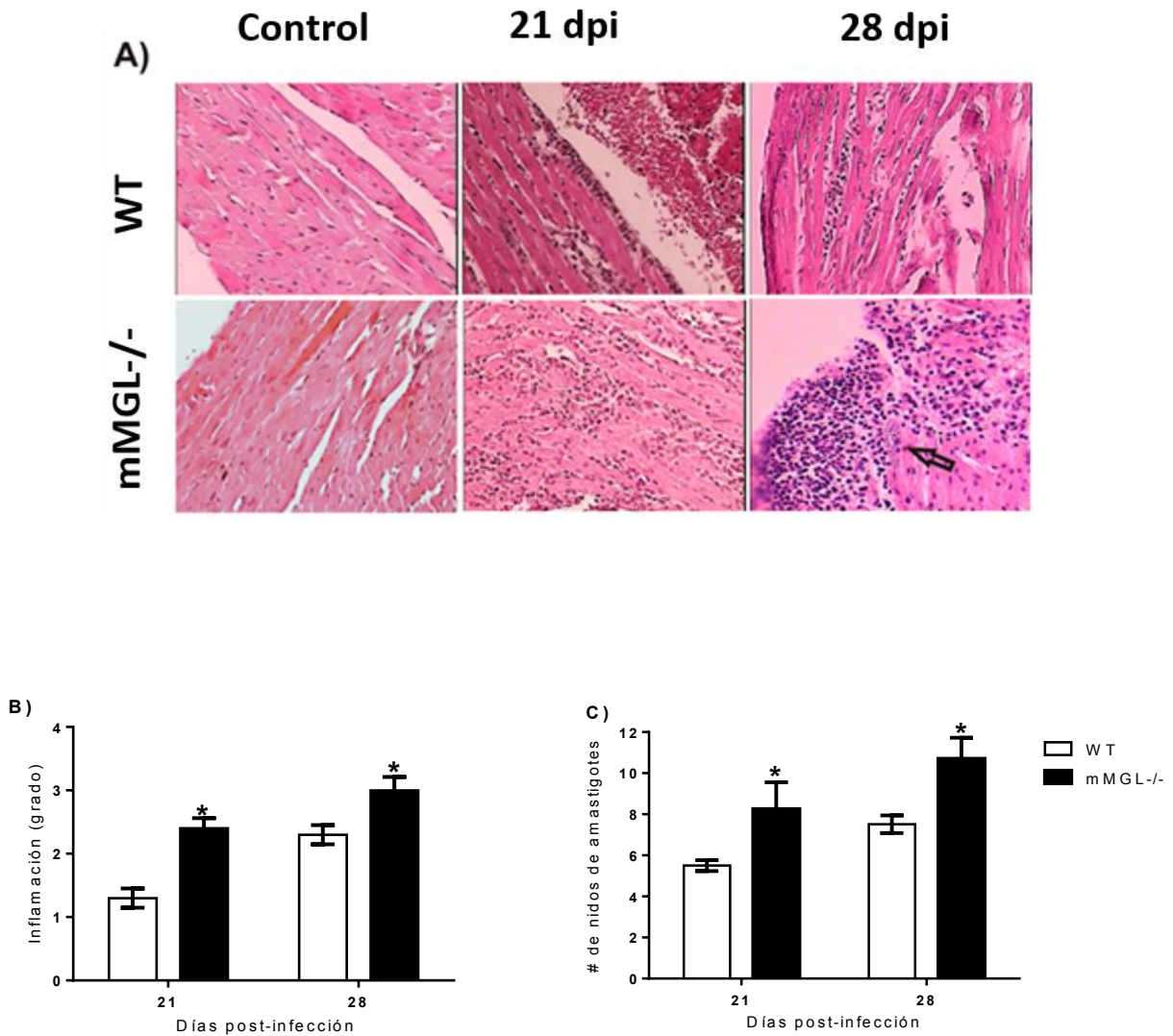


Fig.- 15. Analisis histológico en corazón de ratones WT y mMGL^{-/-} infectados (21 y 28 dpi). (A) Histología de corazón tinción H&E. (B) Grado de inflamación, (C) Número de nidos de amastigotes. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes n= 24; *p< 0.05 prueba “t” student (graphpad Prism 6).

6.9. RT-PCR de TNF- α , IFN- γ , TLR-4, IL-10, GATA-3, Y FOXP3 en corazón de ratones WT y mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi*

Dadas las observaciones encontradas en el análisis histológico del corazón, en los que se observó un mayor infiltrado inflamatorio así como un mayor número de nidos de amastigotes en corazón de los ratones mMGL^{-/-}, nos preguntamos si pudiera haber una respuesta inmune local diferente que pudiera favorecer el establecimiento del parásito en el tejido cardiaco en los ratones mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi*.

Para contestar esta pregunta se realizó un análisis semicuantitativo por RT-PCR de corazón. En la **(Fig. 16-A)** mostramos la electroforesis de los fragmentos amplificados por RT-PCR de corazones de ratones WT y mMGL^{-/-} con 38 dpi, donde se analizó la expresión de TNF- α , IFN- γ e IL-10, TLR-4, GATA3, y FOXP3. Dado que una vez que es esdocitado *T. cruzi* por Mo o CDs, se induce una fuerte respuesta mediada por células T y anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Estas células T específicas migran a los sitios donde el parásito induce inflamación incluido el miocardio en respuesta a quimiciocinas [102]. Se observó que no existieron diferencias en la expresión de TNF- α e IFN- γ **(Fig. 16-B y C)** respectivamente. Se observó una menor expresión de TLR-4 **(Fig. 16-E)**, pero una mayor expresión de IL-10, GATA3 y FOXP3 **(Fig. 16-D, F y G)** en las muestras de ratones mMGL^{-/-}, respecto al grupo control **(Fig. 16 B-H)**. En conjunto estos resultados sugieren que el tejido cardiaco de los ratones mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi* presenta un perfil inmune de tipo regulador, dado que se encontró una mayor expresión de IL-10 y FOXp-3.

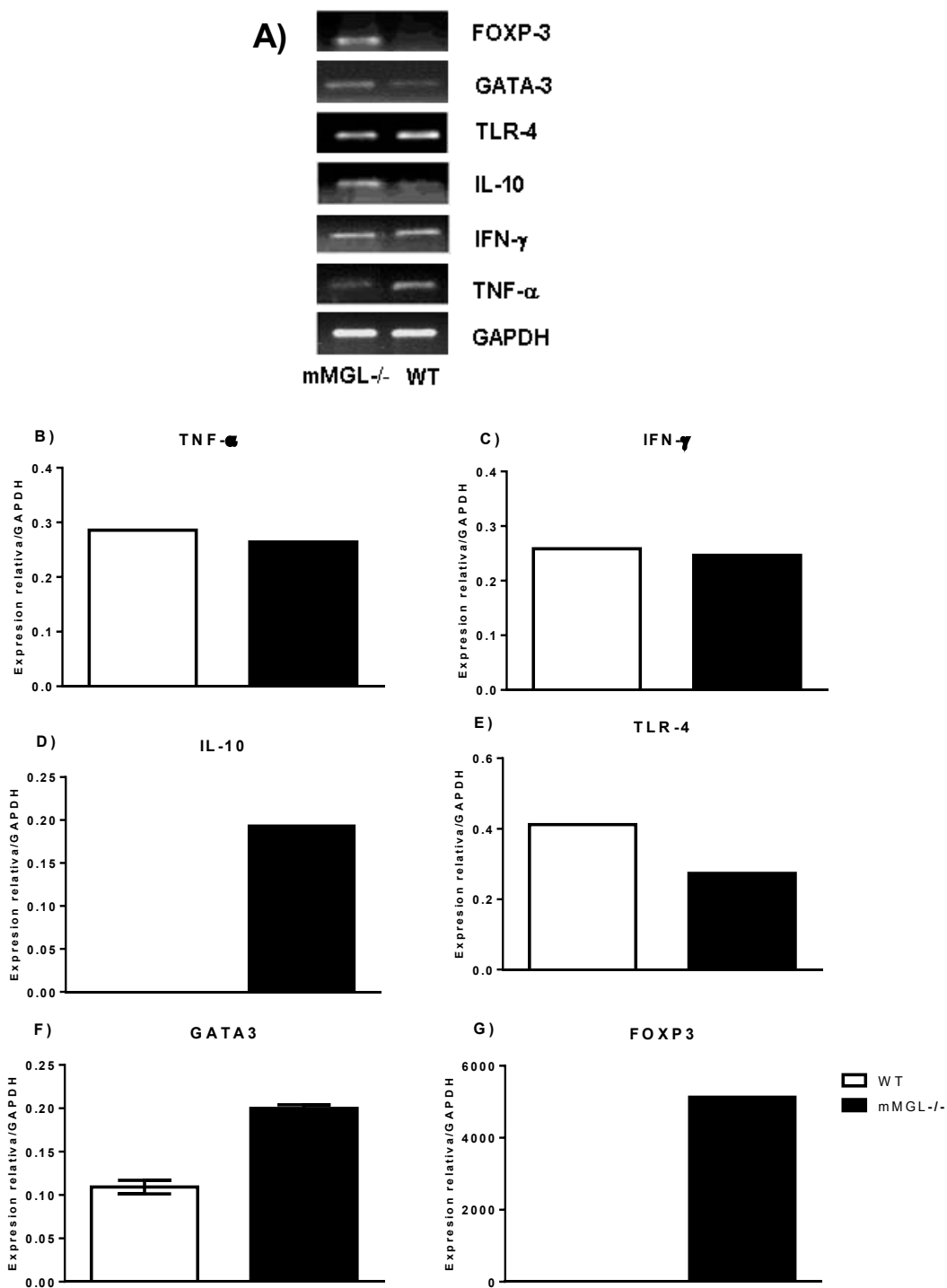


Fig.- 16.-Determinación de la expresión de diferentes genes por RT-PCR en el corazón de ratones infectados (38dpi). (A) electroforesis de fragmentos amplificados por RT-PCR de corazón de ratones WT y mMGL^{-/-}. Donde se analizó la expresión de TNF- α (B), IFN- γ (C), IL-10 (D), TLR-4 (E), GATA3 (F), FOXP3 (G), a los 38 días post-infección con 10,000 tripomastigotes de *T. cruzi*. Los resultados son representativos media de 2 experimentos independientes n= 4; *p< 0.05 prueba "t" student (graphpad Prism 6).

6.10. Determinación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el sobrenadante de esplenocitos de ratones WT y mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi*.

mMGL es una molécula que funciona como un receptor capaz de capturar Ag glucosilados y participa en la internalización de los mismos, para que sean procesados y presentados en moléculas MHC I y II y de esta manera influye en la diferenciación de la célula T efectora [103, 104].

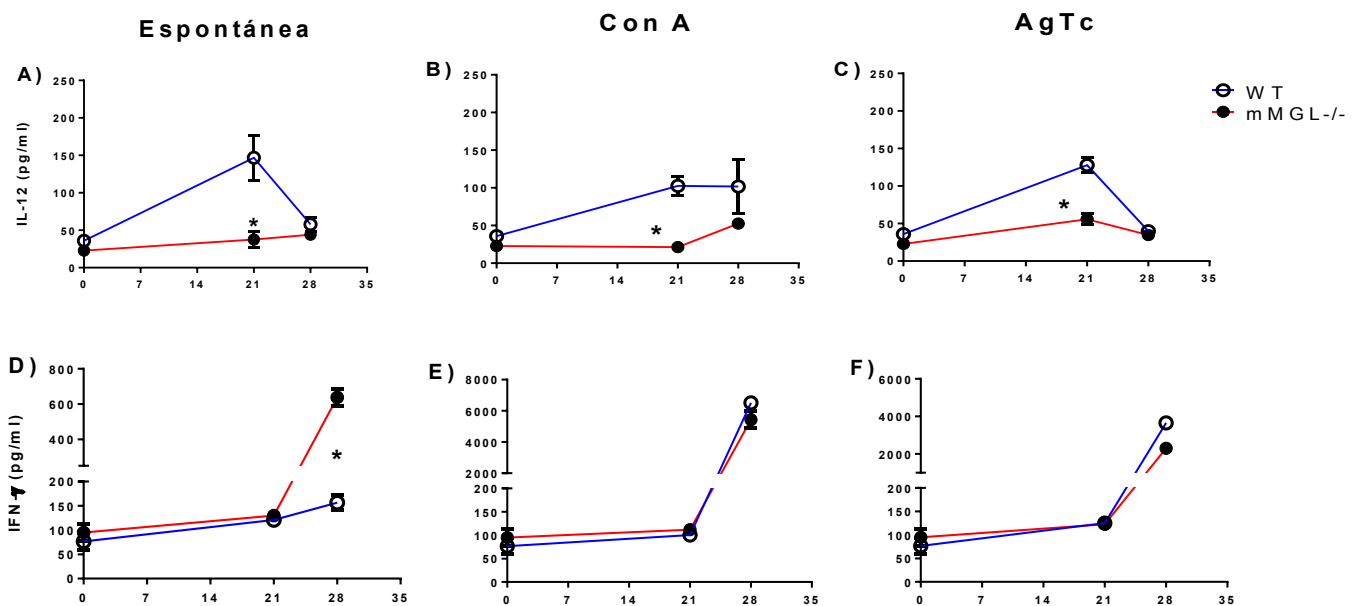
Basados en esta observación se evaluó si la ausencia de mMGL podría influir en el perfil de citocinas secretadas por linfocitos durante la infección por *T. cruzi*. Para contestar esta pregunta se realizaron cultivos de esplenocitos de ratones sanos (0 dpi) y provenientes de ratones infectados con *T. cruzi* a los 21, y 28 dpi de ratones WT y mMGL^{-/-}. Se determinó la producción de IL-12, IFN- γ , IL-4 e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos de ratones infectados sin estímulo (Producción espontánea, 48 h), estimulados con Concanavalina A (Con A, 72 h) y estimulados con Ag total de *T. cruzi* (AgTc, 5 días).

Como se muestra en la (**Fig. 17**), los esplenocitos provenientes de ratones mMGL^{-/-} infectados con *T. cruzi* por 21 días, produjeron una menor cantidad de IL-12 de manera espontánea (**Fig. 17-A**), con el estímulo de ConA (**Fig. 17-B**) y con el estímulo de AgTc (**Fig. 17-C**). Esta diferencia se perdió en los días 28 post-infección, debido a que la producción de IL-12 decayó significativamente en los ratones WT. Cabe destacar que la concentración de IL-12 de los ratones mMGL^{-/-} siempre estuvo por debajo de los WT.

Solo se observaron diferencias en la concentración de IFN- γ , en la producción espontánea en el día 28 post-infección (**Fig. 17-D**). No se detectaron diferencias con los estímulos de ConA y AgTc en ningún tiempo analizado (**Fig. 17 E-F**).

Respecto a la concentración de IL-10 se observó un discreto incremento en la producción espontánea en esplenocitos WT a los 21dpi (**Fig. 17-G**). Sin embargo, observamos una mayor producción espontánea y ante el estímulo con AgTc a los 28 dpi en esplenocitos mMGL^{-/-} en comparación al grupo control (**Fig. 17 H-I**) respectivamente.

Finalmente en cuanto a la concentración de IL-4 se observó una mayor producción espontánea y posterior al estímulo con CoA o AgTc de esta citocina en esplenocitos mMGL^{-/-} a los 21 dpi (**Fig. 17-J-L**). Sin embargo, estas diferencias se pierden a los 28 dpi, donde disminuyó la producción de esta citocina.



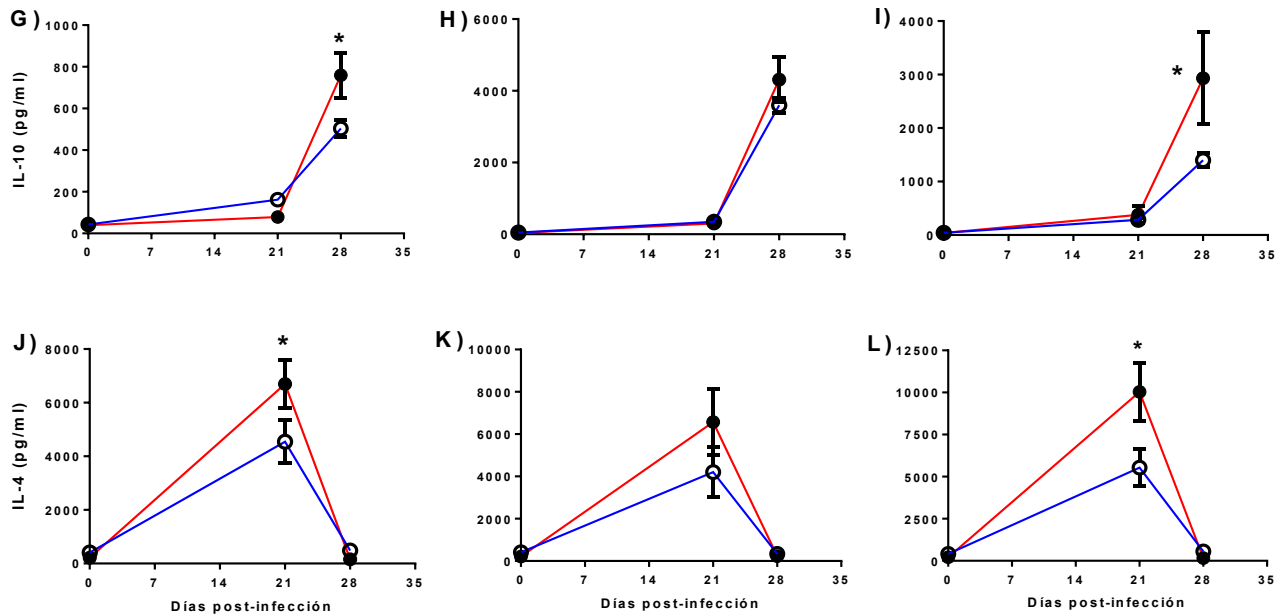


Fig. 17.- Concentración de citocinas en cultivo de esplenocitos de ratones infectados con *T. cruzi* (21 y 28 dpi). IL-12-A (espontánea), IL-12-B (CoA), IL-12-C (AgTc). Producción IFN- γ -D (espontánea), Producción IFN- γ -E (CoA), Producción IFN- γ - F (AgTc). Producción IL-10-G (espontánea), IL-10-H (CoA), IL-10-I (AgTc). Producción IL-4-J (espontánea), IL-4-K (CoA), IL-4-L (AgTc). Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes n= 18; *p< 0.05 prueba "t" student (Graphpad Prism 6).

6.11. Determinación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en co-cultivos de macrófagos-esplenocitos

Dentro de las funciones descritas para mMGL se encuentra su capacidad para capturar e internalizar antígenos glucosilados con influencia directa en la presentación del Ag a células T, y de esta manera mMGL podría influir en el tipo de respuesta efectora [76, 103, 105]. Se realizó un co-cultivo de esplenocitos provenientes de ratones con 20 días post-infección con macrófagos de ratones WT y mMGL^{-/-} sin infección previamente los Mo se estimularon con 25 μ g de AgTc. En la (Fig. 18 A-D) se detectó una disminución en la producción de IFN- γ , IL4, IL-10 e IL-13 de manera espontánea y posterior al estímulo con AgTc en el sobrenadante de cocultivo de ratones deficientes en comparación al grupo control.

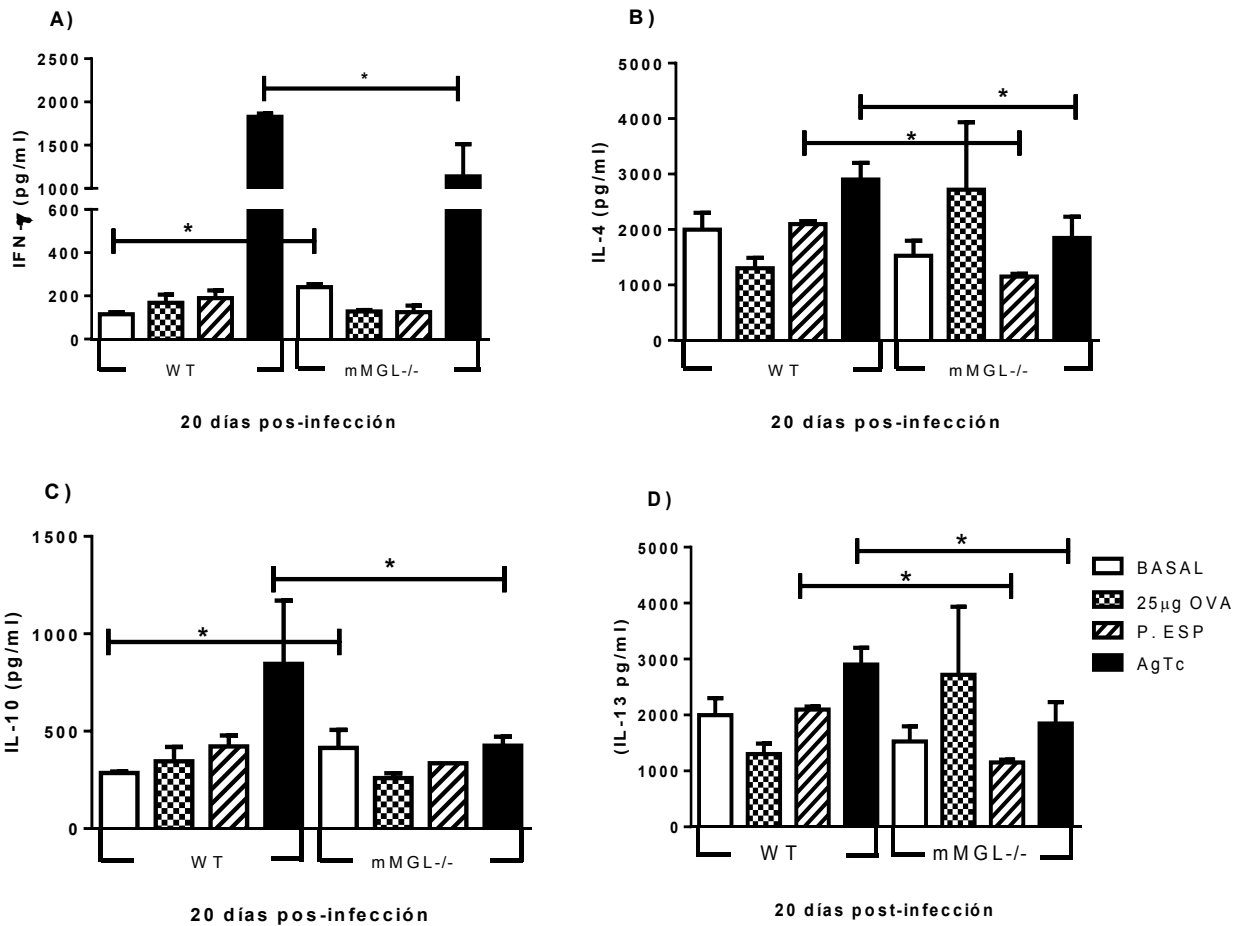


Fig. 18.- Concentración de IFN- γ (A), IL-4 (B) e IL-10 (C) e IL-13 en los sobrenadantes de co-cultivos de macrófagos de ratones WT y mMGL^{-/-}, con esplenocitos de ratones con 20 días de infección. Los resultados representan la media de 3 experimentos independientes n= 18; *p< 0.05 prueba "t" student (Graphpad Prism 6).

7. DISCUSIÓN

Con base en su capacidad para mantener un balance entre tolerancia e inflamación, las células presentadoras de antígeno como las dendríticas y los macrófagos contribuyen al mantenimiento de la homeostásis inmune así como a la activación inmunológica [106]. Estas células actúan como sensores clave de la integridad del tejido e invasión de patógenos y se encuentran equipadas con una amplia variedad de receptores para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), entre los cuales se encuentra la familia de (CLRs). Los CLRs son receptores de unión a glicanos, entre sus funciones destacan la comunicación célula-célula, el reconocimiento y endocitosis de patógenos y la presentación a células T [45, 107].

MGL pertenece a esta familia de receptores, en humanos se ha descrito una sola copia de este receptor (hMGL), mientras que para el ratón se conocen dos (mMGL1) y (mMGL2). Estudios pioneros demostraron el tipo de ligandos a los cuales puede unirse hMGL entre los cuales se han descrito residuos de N-acetylgalactosamina (GalNAc) y antígenos tumorales no sialidados (α GalNAc-Ser/Thr) y el epítopo LacdiAc [87, 108, 109]. Esta especificidad en hMGL, es compartida por mMGL2, la cual además se une a residuos de galactosa (Gal) [73, 75]. En contraste mMGL1 tiene una mayor especificidad por estructuras de Lewis x [(Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)], pero menor para estructuras Lewis A (Gal β 1-4(Fuc α 1-4)GlcNAc), esta diferencia en su especificidad se puede explicar por los sitios de unión secundarios presentes en los sitios de unión al carbohidrato de

mMGL1 y mMGL2 [48, 74], dicha característica se refleja en una función diferente entre ambos receptores.

Por otro lado, recientemente se demostró que hMGL, además de reconocer antígenos tumorales, puede actuar como receptor de reconocimiento de patrones moleculares (PRR), dado que es capaz de unirse a estructuras glucosiladas presentes en patógenos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Clostridium jejuni*, *virus del Ebola*, *S. Mansoni* y *Trichuris suis* [110-114]. De manera similar se ha descrito que mMGL 1 y como mGL2 reconocen antígenos tumorales y antígenos glicosilados presentes en patógenos comensales como: especies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Taenia crassiceps* [88, 115-119].

Aunque es claro que MGL funciona como un PRR, sin embargo, la información que se tiene acerca de su participación en la respuesta inmune en infecciones por parásitos es escasa. En 2005 Raes y col, observaron un incremento en la expresión de mMGL 1 y 2 en diferentes poblaciones de macrófagos alternativamente activados (AAM), entre los que se incluyen macrófagos peritoneales obtenidos durante la infección por *T. brucei* y *T. crassiceps* o en macrófagos alveolares en un modelo de alergia. También estos autores reportaron la regulación de mMGL1 y 2 a través de IL-4 e IL-13. Aunque se observó un incremento en la expresión de mMGL, no se asoció a resistencia o susceptibilidad en ninguno de estos modelos y solamente se le consideró como un nuevo marcador de AAM.

En este trabajo abordamos el estudio de mMGL1/2 a fin de establecer su participación en la respuesta inmune innata durante la infección murina causada

por el parásito *T. cruzi* a través de la caracterización de la actividad de los Mo de ratones silvestres y ratones deficientes en el receptor mMGL.

Dado que MGL reconoce glicoproteínas con presencia de Gal y N-GalNAc y que la membrana plasmática de *T. cruzi* es rica en antígenos glucosilados, se confirmó la presencia de galactosa en el antígeno total de *T. cruzi* cepa Qro por lectin blot **(Fig. 8)**.

Se empleó un modelo murino de infección deficiente para este receptor (mMGL^{-/-}) y ratones WT como control. Se infectaron vía i.p con 10,000 tripomastigotes de la cepa Querétaro de *T. cruzi*. Se dio seguimiento al curso de la infección por 60 días. Durante este tiempo se observó una menor capacidad para controlar la división del parásito en los ratones mMGL^{-/-}, se detectaron entre 2 y 3 veces más parásitos en sangre en comparación al grupo control, además es importante resaltar que también presentaron un mayor porcentaje de mortalidad, el 67% de los ratones sucumbieron a la infección a partir del día 23 post-infección mientras que solo se observó el 20% de mortalidad observada en el grupo control **(Fig. 10 A, B)**. La utilización de diversos modelos deficientes para citocinas o receptores tipo toll ha permitido establecer de manera clara la importancia que tiene una respuesta inflamatoria o (Th1) principalmente mediada por IL-12, TNF- α , e IFN- γ durante la infección por *T. cruzi* dado que la secreción de estas citocinas participa en el control de la replicación y/o eliminación del parásito [7, 120-122].

Tomando en cuenta estos antecedentes y la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* observada en los ratones mMGL^{-/-}, nos preguntamos si la ausencia de este receptor influye en el perfil de citocinas asociadas con la susceptibilidad a la

infección *T. cruzi*. Poco se sabe acerca de la influencia que tiene MGL sobre la respuesta inmune. Van Vliet y col en 2013, reportan que la interacción de MGL con sus ligandos induce la maduración de CD_s y que dicha activación se caracteriza por un incremento en la producción de TNF- α [77].

En este trabajo el análisis en suero de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-10 a los 7, 14, 21, 28 y 35 dpi reveló una menor producción de IL-12 y TNF- α en ratones mMGL^{-/-} con respecto al grupo control. Sin embargo, de manera contrastante estos mismos ratones tuvieron una mayor producción de IFN- γ e IL10 desde el inicio de la infección (**Fig. 11 A-D**). Estos hallazgos resultan interesantes puesto que desde el inicio de la infección los ratones mMGL^{-/-} producen una mayor cantidad de IFN- γ dicha citocina es clave en la activación de los macrófagos y la consecuente producción de mediadores inflamatorios, así como la producción de óxido nítrico, moléculas implicadas en la resistencia a la infección por *T. cruzi* [123, 124]. Por otro lado, se ha descrito que IL-10 es capaz de modular las funciones efectoras de los macrófagos activados por IFN- γ [125, 126]. Estos resultados nos sugieren que la coexistencia de ambas citocinas posiblemente contribuyó al establecimiento del parásito.

Dado que los resultados obtenidos a nivel sistémico no mostraron una clara polarización en el perfil de citocinas, se analizó el perfil de citocinas a nivel local, es decir las producidas por macrófagos, ya que se sabe que estas células expresan MGL y además son blanco de *T. cruzi* [127-129]. La determinación de ON, TNF- α , IL-12 e IL-10, a los 0, 21 y 35 dpi en el sobrenadante de cultivos de Mo peritoneales estimulados con LPS, POLY:IC o AgTc reveló que los Mo de

ratones mMGL^{-/-} producen menor cantidad de ON, IL-12 y TNF- α a los 21 y 35 dpi. **(Fig. 12)**. En respuesta a LPS se observó que los Mo mMGL^{-/-} desarrollaron concentraciones menores de ON, TNF- α e IL-12 pero no de IL-10 a los 21 y 35 dpi **(Fig. 12)** en comparación a los ratones WT. En cuanto a la concentración de estas citocinas en respuesta al estímulo con AgTC encontramos una menor concentración de ON, IL-12 e IL-10 en Mo mMGL^{-/-} en comparación a Mo WT **(Fig. 12)**. Cabe mencionar que no se observaron diferencias ante el estímulo con POLY:IC. Esto demuestra que la activación de los Mo vía TLR-3 (receptor endosómico para POLY:IC) es independiente de mMGL ya que los Mo son funcionales **(Fig. 12)** en conjunto estos resultados correlacionan con la susceptibilidad observada en los ratones mMGL^{-/-}, puesto que está bien establecido que uno de los principales mecanismos microbicidas de los Mo para la eliminación de los microorganismos intracelulares es la producción de ON, así como la producción de IL-12 y TNF- α en etapas tempranas de la infección [130]. Además nuestros resultados son congruentes con el reporte de Lefevre *et al.*, 2013, donde resalta la importancia que tienen los CRLs Dectin-1 y MR en la eliminación de *L. infantum*, mediado por la producción de ROS e IL-1 β [131]. Por otro lado, nuestros resultados contrastan con las observaciones de Saba y col en 2009 quienes reportan que ratones deficientes para MGL1 son más susceptibles a desarrollar colitis inducida por duodecil sulfato de sodio (SDS), dicha susceptibilidad se ha asociado a niveles disminuidos de IL-10 en macrófagos de lámina propia [132].

Sin embargo, es importante resaltar que el fenotipo de macrófagos residentes de lámina propia es de tipo antiinflamatorio mientras que los resultados que nosotros obtuvimos corresponden a macrófagos peritoneales.

Se ha establecido que el microambiente de citocinas influye en el genotipo de macrófagos. Particularmente se sabe que un perfil Th1 básicamente a través de IFN- γ se asocia a un genotipo de macrófagos clásicamente activados CAMo con altos niveles de ON favoreciendo su actividad citotóxica, mientras que un ambiente Th2 principalmente mediado por IL-4 o IL-13 favorece un fenotipo AAMo, que a su vez contribuye al establecimiento de *T. cruzi* [133].

A fin de correlacionar un genotipo de los macrófagos con los niveles disminuidos de ON, IL-12 y TNF- α se realizó un análisis por RT-PCR de RNAm de macrófagos WT y mMGL^{-/-} provenientes de ratones sanos y con 21dpi, no tratados (basal) o estimulados con LPS, POLY: IC y AgTc. En la (**Fig. 13-A**) se observa la electroforesis en gel de los genes analizados. En análisis del patrón transcripcional en Mo mMGL^{-/-} obtenidos de ratones sin infección mostró un incremento en la expresión de Arg-1, Ym-1 y TLR-3 en respuesta al LPS (**Fig. 13-B y C**), este fenómeno se mantuvo solo para Arg-1 y TLR-3 ante el estímulo con (**Fig. 13-A**). En cuanto a la expresión de TNF- α , iNOS, IL-1 β , TLR-4 y TLR-2 se observaron niveles similares posterior al estímulo con LPS en comparación a los Mo WT (**Fig. 13 D-H**).

Respecto a los Mo mMGL^{-/-} obtenidos de ratones con 21 dpi sin estímulo alguno se observaron niveles similares en la expresión de Arg-1, Ym-1, IL-1 β , TLR-2 y

TLR-3 (**Fig. 13**) pero una disminución en la expresión de TNF- α , iNOS y TLR-4 (**Fig. 13 D, E y G**). En respuesta al LPS estas células no mostrarán diferencia en la expresión Arg-1 y Ym-1 (**Fig. 13 B y C**). Sin embargo, si se observó una disminución en la expresión de iNOS, TNF- α , IL-1 β y TLR-4 (**Fig. 13 D-G**). En cuanto al estímulo con POLY:IC estas mismas células presentaron niveles disminuidos de Arg-1, iNOS y TNF- α (**Fig.13 B, E y G**). Finalmente, ante el estímulo con AgTc se observó una mayor expresión de Ym-1 (**Fig. 13 C**), expresión similares de iNOS, TLR-3 y TLR-2 (**Fig. 13 E, H**). y una disminución en la expresión de Arg-1, TNF- α , IL-1 β y TLR-4 en comparación a los Mo WT (**Fig. 13 B, D, F y G**) respectivamente.

Aun cuando los resultados obtenidos en la determinación del genotipo de los Mo mMGL^{-/-} no permitió confirmar un cambio de los CAMo a AAMo, es importante resaltar que estos Mo tuvieron una marcada disminución en la expresión de TLR-4 en respuesta al estímulo por LPS y AgTc. Estudios previos han demostrado que TLR-4 tiene un papel importante en la respuesta inmune a *T. cruzi*. Este receptor reconoce mucinas ancladas a GIPL y dicho reconocimiento induce la activación de la vía de señalización dependiente de MyD88 implicado en la activación de Mo y la consecuente transcripción de genes pro-inflamatorios como IL-12, TNF- α e IFN- γ involucrados en la resistencia a *T. cruzi* [1]. En 2010, Bellio, *et al*, utilizaron un modelo deficiente para TLR-4 reportaron una mayor susceptibilidad a la infección, la cual se asoció a niveles de IFN- γ , TNF- α y ON disminuidos en el bazo de ratones infectados; de esta manera se demostró que la señalización mediada por este receptor es esencial para una óptima producción de estas citocinas [134].

Recientemente se reportó que MGL es capaz de sinergizar y/o modular vías de señalización activadas por TLR particularmente TLR-2, 4, 7 y 8 en CDs [77]. Tomando en cuenta los antecedentes, y nuestros resultados nos sugieren que durante la infección con *T. cruzi* MGL modula la expresión de TLR-4.

Entre las funciones descritas para MGL se ha reportado el papel que juega como receptor endocítico capaz de procesar y favorecer la presentación de antígenos en moléculas MHC-II [87, 103], además de favorecer la expresión de moléculas coestimuladoras como CD-80 y CD-86 [39]. Dado que se observó una marcada disminución en la expresión de TLR-4 en Mo de ratones mMGL^{-/-} con 21 dpi, se decidió analizar la expresión de TLR-4, CD80, CD-86 y MHC-II en Mo infectados *in vitro* con *T. cruzi*. Los resultados obtenidos a las 2, 6, 12 y 24 hpi revelaron una disminución en la expresión tanto de MHC-II como TLR-4 en Mo mMGL^{-/-}, en comparación al grupo control. (**Fig. 14 A-B**). Nuestros resultados son congruentes con observaciones previas donde se ha reportado la importancia que tiene la expresión TLR-4 y MHC-II, dado que junto con mediadores pro-inflamatorios inician e influyen en el curso de la respuesta inmune a *T. cruzi* [25, 135, 136].

De manera paralela al análisis en la expresión de TLR-4 y MHC-II, determinamos el porcentaje de infección en Mo mMGL^{-/-} y WT no estimulados o estimulados con LPS, IFN- γ o LPS más IFN- γ . El análisis reveló un mayor porcentaje de infección en Mo mMGL^{-/-} en comparación a los WT con o sin tratamiento, cabe mencionar que el tratamiento con LPS, IFN- γ o LPS más IFN- γ redujo el porcentaje de células infectadas, sin embargo la susceptibilidad en los mMGL^{-/-} se mantuvo (**Fig. 14-C**). De manera conjunta podemos concluir que la susceptibilidad observada en

ausencia de MGL se correlacionó con deficiencia en la activación de Mo, así como una disminución en la expresión TLR-4.

Por otro lado, se sabe que durante la infección por *T. cruzi*, una consecuencia es la cardiopatía chagásica. Esta patología se caracteriza por miocarditis, infiltrado linfomononuclear acompañado por fibrosis intersticial e hipertrofia de los cardiomiocitos, lo cual trae como consecuencia falla cardíaca y muerte [137, 138]. Tomando en cuenta la susceptibilidad observada en los ratones mMGL^{-/-}, se realizó un análisis histológico de corazón de ratones mMGL^{-/-} y WT a los 21 y 28 dpi. Los resultados revelaron un mayor número de nidos de amastigotes, así como una reacción inflamatoria intensa en tejido cardíaco de ratones mMGL^{-/-} en comparación al grupo control (**Fig. 15 A-C**). Estos resultados sugieren que la mortalidad observada en los ratones mMGL^{-/-} podría correlacionarse con la cardiopatía chagásica de la enfermedad experimental.

Aun cuando no es del todo clara la patogénesis que subyace a la cardiopatía chagásica, se sabe que citocinas inflamatorias y quimiocinas juegan un papel importante en la generación del infiltrado inflamatorio y el daño al tejido cardíaco [122, 139, 140]. A fin de correlacionar el perfil de citocinas con el daño observado en corazones de ratones mMGL^{-/-}, por RT-PCR se realizó un análisis de producción de RNAm de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IFN- γ) y anti-inflamatorias (IL-10), así como la expresión de factores de transcripción (GATA-3 y FOXP3) y el receptor TLR-4 por RT-PCR en corazones de ratones infectados con *T. cruzi*. El análisis de la electroforesis en gel del RNAm de corazones reveló una menor expresión de RNAm para TNF- α , IFN- γ y TLR-4, pero una mayor expresión

de IL-10, GATA-3 y FOXP3 en el corazón de ratones mMGL^{-/-} a los 38 dpi en comparación al grupo control (**Fig. 16 A-G**). Los resultados obtenidos en este trabajo contrastaron con datos publicados por otros investigadores quienes observaron una mayor producción de IFN- γ , TNF- α e IL-6, y niveles disminuídos de IL-4 e IL-10 en individuos con cardiopatía chagásica en comparación a individuos asintomáticos [141-143] . Por otro lado, se han observado niveles similares de RNAm para IFN- γ e IL-10 en diferentes grados de lesiones cardiacas de ratones infectados [139, 144]. Sin embargo otros estudios mencionan que no hay una correlación entre la producción de citocinas pro-inflamatorias y los signos clínicos de la enfermedad de Chagas [145].

Por otro lado, está bien establecido que durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* la activación de componentes del sistema inmune innato como NKs y Mo, así como la síntesis de citocinas como IFN- γ y TNF- α juegan un papel central en la activación policlonal de células T además de estimular a las CPA para una eliminación eficiente del parásito [135, 146].

La participación que tiene la respuesta celular durante la infección por *T. cruzi*. Es clara la necesidad de analizar la producción de citocinas en sobrenadante de cultivos de esplenocitos proveniente de ratones con 21 y 28 dpi. A los 21 dpi, encontramos que los esplenocitos de ratones mMGL^{-/-} tienen niveles disminuidos de IL-12 e IL-10 tanto de forma espontánea como posterior al estímulo con AgTc en comparación con los ratones WT (**Fig. 17-A, C, G e I**), respectivamente. La determinación de los niveles de IFN- γ no mostraron ninguna diferencia entre ambos grupos de ratones (**Fig 17 D-F**). En cuanto a los niveles de IL-4,

observamos una mayor producción en sobrenadante de esplenocitos mMGL^{-/-} de forma espontánea y frente al estímulo CoA o AgTc (**Fig. 17J-L**).

A los 28 dpi, observamos niveles disminuidos de IL-12, de manera espontánea, ante el estímulo CoA y AgTc (**Fig. 17 A-C**). En cuanto a la producción de IFN- γ solo se observaron diferencias estadísticamente significativas de forma espontánea (**Fig. 17-D**), en el caso de IL-10 encontramos una mayor producción tanto de manera espontánea como frente al estímulo con AgTc (**Fig. 17-G, I**). Finalmente no observamos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IL-4 bajo ninguna condición (**Fig. 17 J-L**).

En conjunto nuestros resultados muestran que en ausencia de mMGL hay una marcada disminución en la producción de citocinas pro-inflamatorias, particularmente IL-12; esta citocina es clave en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta tipo Th1, implicada en la resistencia a la infección por *T. cruzi* [147, 148]. Por otro lado, recientemente se ha reportado que el reconocimiento de antígenos tumorales por MGL y su interacción con CD45 presente en células T conduce a un decremento en la actividad de CD45. Esto trae como consecuencia una disminución en la proliferación de las células T, menor producción de citocinas pro-inflamatorias, lo que a su vez conduce a la apoptosis de las células T [104].

Tomando en cuenta nuestros resultados nos sugieren un papel importante del receptor MGL en la producción de citocinas pro-inflamatorias involucradas en la diferenciación a un perfil celular Th1.

Dadas las observaciones obtenidas en los cultivos de esplenocitos, realizamos un cocultivo de macrófagos mMGL^{-/-} y WT sin infección con linfocitos obtenidos de ratones con 20 dpi. La determinación de citocinas en el sobrenadante de Mo mMGL^{-/-} cocultivados con linfocitos WT reveló niveles disminuidos en la producción de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 incluso posterior al estímulo con AgTc **(Fig. 18 A-D)**. Está bien establecido que durante la infección por *T. cruzi*, las Tc MUC presentes en la superficie del parásito son capaces de inhibir la proliferación de células T, así como transcripción y producción de IL-12 en respuesta a mitógenos [149].

Considerando los antecedentes y nuestros resultados es posible que la ausencia de MGL agudice el efecto supresor que tiene *T. cruzi* o impacte en una deficiente activación de los Mo durante la infección.

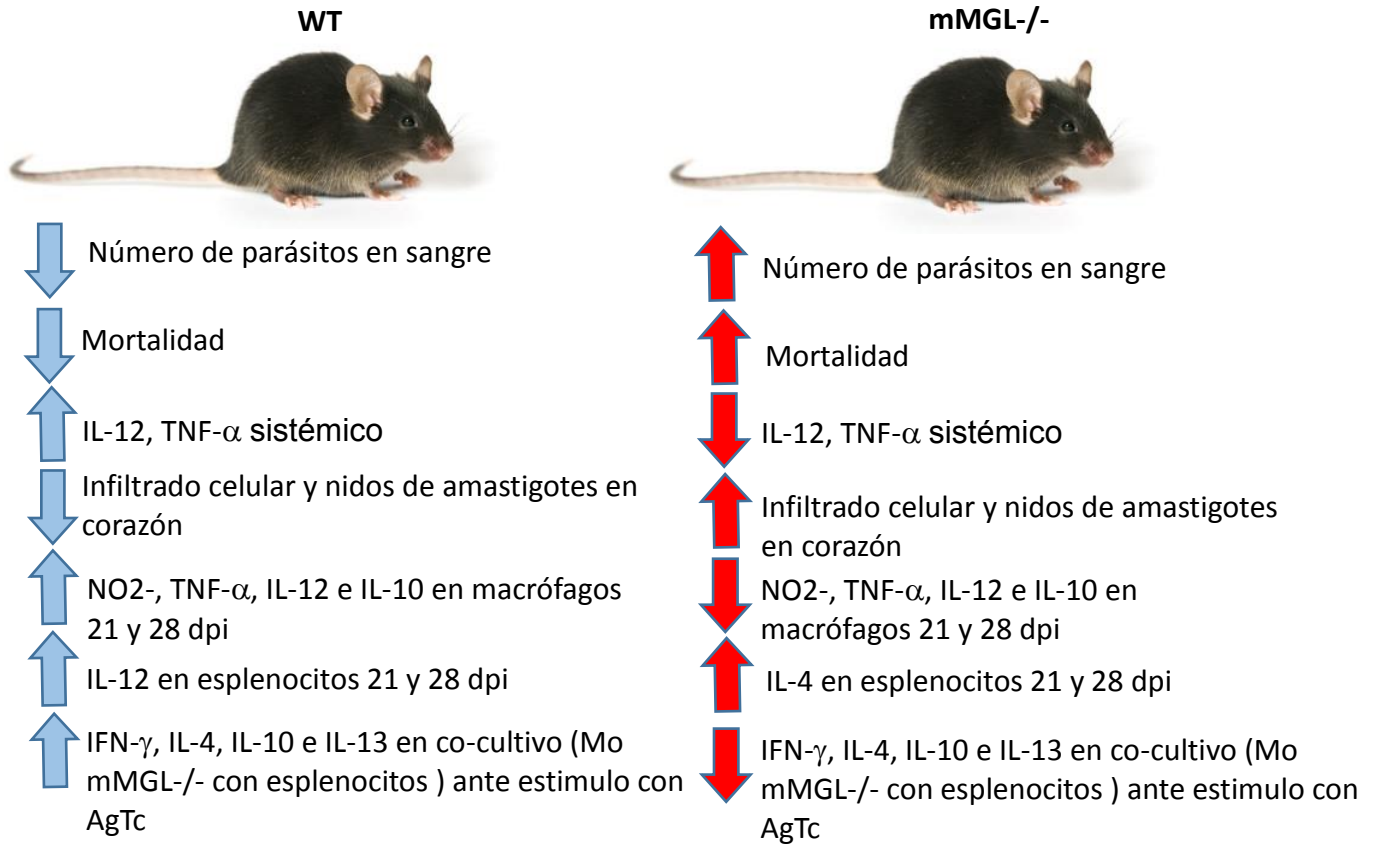
8. RESUMEN DE RESULTADOS

1. El Antígeno total de *Trypanonoma cruzi* cepa Querétaro tiene residuos de galactosa de manera significativa, esto lo hace un potente ligando para el receptor mMGL.
2. El receptor lectina tipo C (mMGL) juega un papel importante en la resistencia a la infección *in vivo* con *Trypanosoma cruzi*, su ausencia resulta en una mayor número de parásitos en circulación y una mayor mortalidad.
3. mMGL contribuye a la producción de ON, IL-12, TNF- α e IL-10 durante la infección *in vivo* con *Trypanosoma cruzi*.
4. Durante la infección *in vivo* con *Trypanosoma cruzi* no detectamos un genotipo claro de los Mo, sin embargo, en su ausencia disminuye la expresión de iNOS, TNF- α , IL-1 β y TLR-4.
5. El receptor lectina tipo C MGL juega un papel esencial en el desarrollo de la cardiopatía chagásica, su ausencia favorece el establecimiento de nidos de amastigotes de *Trypanosoma cruzi* en tejido cardíaco.
6. El receptor mMGL favorece la expresión de TLR-4 en corazón durante la infección *in vivo* con *Trypanosoma cruzi*.
7. El receptor lectina tipo C MGL confiere resistencia a la infección *in vitro* puesto que los macrófagos provenientes de ratones knockout para MGL presentan un mayor porcentaje de células infectadas y una menor expresión de moléculas MHC-II y TLR-4.

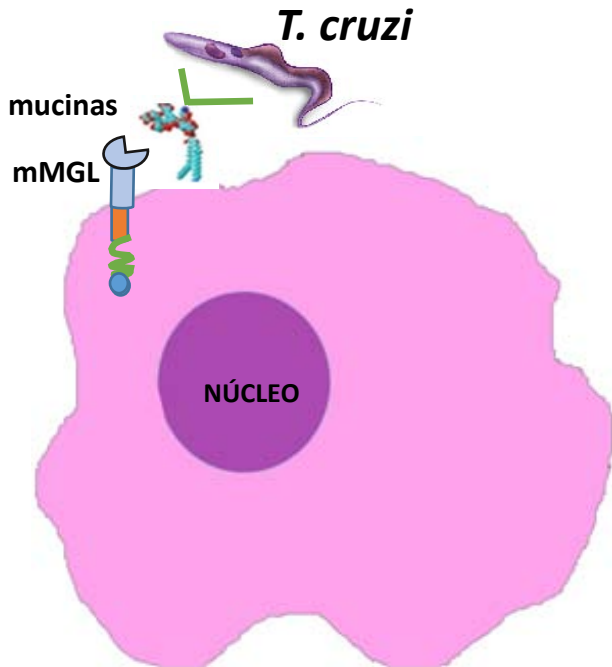
8. El receptor lectina tipo C MGL juega un papel esencial en la producción de IL-12 e IL-10 en esplenocitos a los 21 dpi.
9. Los esplenocitos mMGL^{-/-} producen menos IL-12 y más IL-10 a los 28 dpi, este hallazgo resulta altamente interesante dado que se ha reportado un importante papel de la IL-12 en la resistencia a la infección por *T. cruzi*.
10. Los macrófagos mMGL^{-/-} co-cultivados con esplenocitos de ratones WT con 20 días post-infección produjeron niveles disminuidos de IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-13 ante el estímulo con AgTc que los macrófagos de ratones WT.

Resultados infección *in vivo* con 10×10^3 tripomastigotes *T. cruzi* cepa

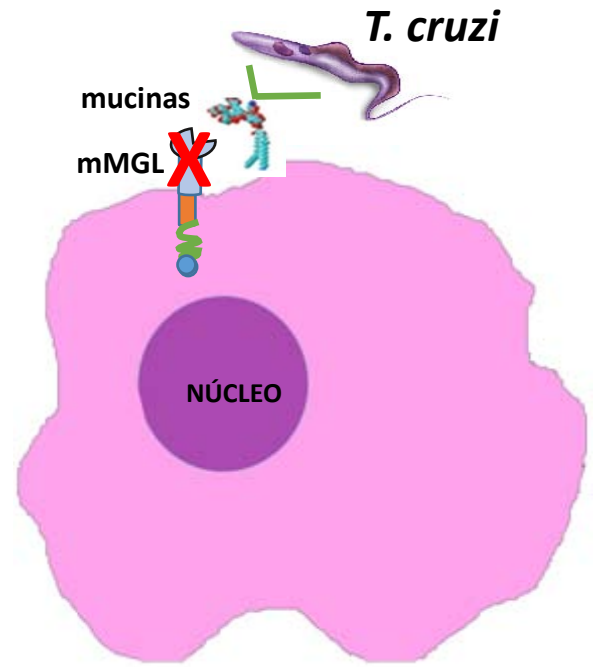
Queretaro



Resultados infección *in vitro* de Mo WT y mMGL-/- con epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro



- ↓ Porcentaje de células infectadas
- ↑ Expresión de TLR-4
- ↑ Expresión de MHC-II



- ↑ Porcentaje de células infectadas
- ↓ Expresión de TLR-4
- ↓ Expresión de MHC-II

9. CONCLUSIÓN

El receptor lectina tipo C mMGL, tiene un papel esencial en la activación los macrófagos, posiblemente sinergize con la vía de señalización de TLR-4, contribuyendo en la producción de mediadores inflamatorios como IL-12, TNF- α e IL-1 β , así como en la inducción de ON. Moléculas importantes en la contención y eliminación de *T. cruzi* en la infección *in vivo*.

10. PERSPECTIVAS

- 1.- Caracterizar el perfil de activación de los macrófagos durante la infección por *T. cruzi*.
- 2.- Investigar si mMGL sinergiza con la vía de señalización activada por TLR-4, en la infección por *T. cruzi*.
- 3.- Determinar si el perfil de activación de los macrófagos mediado por mMGL, impacta en la respuesta inmune adaptativa en la infección por *T. cruzi*.

11. APÉNDICES

APÉNDICE 1

Amortiguador de lisis (Laird W. P. et al. 1991 Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research Vol. 19 Num 15, 4293)

200 mM NaCl (J.T Baker)

5mM de Ácido Etilenediaminatetraacetico (EDTA) (J.T Baker)

0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS) (J.T Baker)

100mM Tris HCl, pH 8.5 (ICN Biomedicals Inc.)

Aforar a 1 Lt con agua destilada

APÉNDICE 2

Amortiguador TBE 10x

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals)

Ácido Bórico (890mM) (J.T Baker)

40 ml de 0.5 M Ácido Etilenediaminatetraacetico (EDTA) dísodico (J.T Baker)

Se ajusta todo a pH 8.0 y se afora a 500 ml con agua destilada

Programa de ciclado

95° 05:00

95° 00:35

65° 00:30

72° 00:35

72° 05:00

4° 10:00

APÉNDICE 3

Solución A. Sulfato de Cu al 1% (1gr de CuSO₄ y llevar a 100 ml de H₂O bidestilada).....1ml

Tartrato de Na y K al 2% (2gr de tartrato de Na y K y llevarlo a 100 ml de H₂O bidestilada).....1ml

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

APÉNDICE 4

Gen	Secuencias	Producto	T alineación	ciclos
mMGL	(F) CTT GGT CCC AGA TCC GTA TC	733 pb	54°C	35
	(R) ATG TCA TGA CTC AGG ATC			
NEO	(F) AAG AAC TCG TCA AGA AGG CGA TAG AAG GCG	592 pb	65°C	35
	(R) AAG AAC TCG CAA GAA GGC GAT AGA AGG CG			
GAPDH	(F) CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC	201 pb	54 ° C	35
	(R) CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC			
IL-10	(F) ACC TGG TAG AAG TGA CCC AGG CA	237 pb	56°C	35

GATA3	(R) CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A (F) GAAGGC ATC CAG ACC CGA AAC (R) ACC CAT GGC GGT GAC CAT GC	255 pb	56°C	35
FOXP3	(F) GGC CCT TCT CCA GGA CAG A (R) GCT GAT CAT GGC TGG GTT GT	112 pb	56°C	35
TLR-4	(F) ACC TGG CTG GTT TAC ACG TC (R) CTG CCA GAG ACA TTG CAG AA	201 pb	56 °C	35

APÉNDICE 5

Solución hemolizante

Tris base 0.17 M (ICN Biomedicals Inc.)

NH₄Cl 0.16 M (J.T Baker)

Se prepara para 300 ml.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rodrigues, M.M., A.C. Oliveira, and M. Bellio, *The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development*. J Parasitol Res, 2012. **2012**: p. 507874.
2. Vega Royero, S.P. and G.J. Sibona, *Can we heal Chagas infection?* J Theor Biol, 2014. **340**: p. 23-9.
3. Gurtler, R.E. and Z.E. Yadon, *Eco-bio-social research on community-based approaches for Chagas disease vector control in Latin America*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2015. **109**(2): p. 91-8.
4. Carabarin-Lima, A., et al., *Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: an update*. Acta Trop, 2013. **127**(2): p. 126-35.
5. Barrias, E.S., T.M. de Carvalho, and W. De Souza, *Trypanosoma cruzi: Entry into Mammalian Host Cells and Parasitophorous Vacuole Formation*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 186.
6. Malik, L.H., G.D. Singh, and E.A. Amsterdam, *The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease*. Clin Cardiol, 2015.
7. Ayo, C.M., et al., *Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 284729.
8. Bern, C. and S.P. Montgomery, *An estimate of the burden of Chagas disease in the United States*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(5): p. e52-4.
9. Andrade, J.P., et al., *[I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]*. Arq Bras Cardiol, 2011. **97**(2 Suppl 3): p. 1-48.
10. Reyes-Novelo, E., et al., *Triatoma dimidiata (Latreille) abundance and infection with Trypanosoma cruzi in a rural community of Yucatan, Mexico*. Neotrop Entomol, 2013. **42**(3): p. 317-24.
11. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J.A. Marin-Neto, *Chagas disease*. Lancet, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
12. Pereira, K.S., et al., *Chagas' disease as a foodborne illness*. J Food Prot, 2009. **72**(2): p. 441-6.
13. Carod-Artal, F.J., *American trypanosomiasis*. Handb Clin Neurol, 2013. **114**: p. 103-23.
14. Pereira, P.C. and E.C. Navarro, *Challenges and perspectives of Chagas disease: a review*. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis, 2013. **19**(1): p. 34.
15. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J. Marcondes de Rezende, *American trypanosomiasis (Chagas disease)*. Infect Dis Clin North Am, 2012. **26**(2): p. 275-91.
16. Zingales, B. and W. Colli, *Trypanosoma cruzi: interaction with host cells*. Curr Top Microbiol Immunol, 1985. **117**: p. 129-52.
17. Andrews, N.W., *Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship*. J Cell Biol, 2002. **158**(3): p. 389-94.
18. Denkers, E.Y. and B.A. Butcher, *Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans*. Trends Parasitol, 2005. **21**(1): p. 35-41.
19. Sacks, D. and A. Sher, *Evasion of innate immunity by parasitic protozoa*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 1041-7.
20. Bogdan, C. and M. Rollinghoff, *How do protozoan parasites survive inside macrophages?* Parasitol Today, 1999. **15**(1): p. 22-8.
21. Campos, M.A., et al., *Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 416-23.

22. Koga, R., et al., *TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7059-66.
23. Kayama, H. and K. Takeda, *The innate immune response to Trypanosoma cruzi infection*. Microbes Infect, 2010. **12**(7): p. 511-7.
24. de Souza, W., T.M. de Carvalho, and E.S. Barrias, *Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction*. Int J Cell Biol, 2010. **2010**.
25. Oliveira, A.C., et al., *Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5688-96.
26. Bafica, A., et al., *Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3515-9.
27. Campos, M.A. and R.T. Gazzinelli, *Trypanosoma cruzi and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors*. Mediators Inflamm, 2004. **13**(3): p. 139-43.
28. Basso, B., *Modulation of immune response in experimental Chagas disease*. World J Exp Med, 2013. **3**(1): p. 1-10.
29. Goncalves, V.M., et al., *NLRP3 controls Trypanosoma cruzi infection through a caspase-1-dependent IL-1R-independent NO production*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(10): p. e2469.
30. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 562-75.
31. Kilpatrick, D.C., *Animal lectins: a historical introduction and overview*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 187-97.
32. McGreal, E.P., J.L. Miller, and S. Gordon, *Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 18-24.
33. Kulkarni, R. and S. Jeyaseelan, *Editorial: Strangers with candy: policing the lungs with C-type lectins*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(3): p. 387-9.
34. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 491-529.
35. Dam, T.K. and C.F. Brewer, *Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity*. Glycobiology, 2010. **20**(3): p. 270-9.
36. van Kooyk, Y., *C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 6): p. 1478-81.
37. Vazquez-Mendoza, A., J.C. Carrero, and M. Rodriguez-Sosa, *Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 456352.
38. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 465-79.
39. Napoletano, C., et al., *Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation*. Eur J Immunol, 2012. **42**(4): p. 936-45.
40. Hespanhol, R.C., et al., *The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in Leishmania (L.) amazonensis invasion*. J Histochem Cytochem, 2005. **53**(1): p. 35-44.
41. Meyer, S., et al., *DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of Schistosoma mansoni cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37349-59.
42. Van Liempt, E., et al., *Molecular basis of the differences in binding properties of the highly related C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN to Lewis X trisaccharide and Schistosoma mansoni egg antigens*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33161-7.

43. Saunders, S.P., et al., *The C-type lectin SIGNR1 binds Schistosoma mansoni antigens in vitro, but SIGNR1-deficient mice have normal responses during schistosome infection.* Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 399-404.
44. McGreal, E.P., L. Martinez-Pomares, and S. Gordon, *Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system.* Mol Immunol, 2004. **41**(11): p. 1109-21.
45. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 33-54.
46. van Vliet, S.J., E. Saeland, and Y. van Kooyk, *Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function.* Trends Immunol, 2008. **29**(2): p. 83-90.
47. Sabatte, J., et al., *Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand.* J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5299-309.
48. Sakakura, M., et al., *Carbohydrate binding mechanism of the macrophage galactose-type C-type lectin 1 revealed by saturation transfer experiments.* J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33665-73.
49. Dahms, N. and M.K. Hancock, *P-type lectins.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 317-40.
50. Song, X., et al., *Glycan microarray analysis of P-type lectins reveals distinct phosphomannose glycan recognition.* J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 35201-14.
51. Castonguay, A.C., L.J. Olson, and N.M. Dahms, *Mannose 6-phosphate receptor homology (MRH) domain-containing lectins in the secretory pathway.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1810**(9): p. 815-26.
52. Chen, J., S. Xiao, and Z. Yu, *F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (Pinctada martensii).* Fish Shellfish Immunol, 2011. **30**(2): p. 750-4.
53. Park, H.J., et al., *Molecular cloning and expression analysis of two distinct F-type lectins from the rock bream, Oplegnathus fasciatus.* Dev Comp Immunol, 2012. **36**(1): p. 230-5.
54. Odom, E.W. and G.R. Vasta, *Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (Morone saxatilis).* J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1698-713.
55. Ogawa, T., et al., *Diversified carbohydrate-binding lectins from marine resources.* J Amino Acids, 2011. **2011**: p. 838914.
56. Bianchet, M.A., et al., *Structure and specificity of a binary tandem domain F-lectin from striped bass (Morone saxatilis).* J Mol Biol, 2010. **401**(2): p. 239-52.
57. O'Reilly, M.K. and J.C. Paulson, *Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease.* Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(5): p. 240-8.
58. Jandus, C., H.U. Simon, and S. von Gunten, *Targeting siglecs--a novel pharmacological strategy for immuno- and glycotherapy.* Biochem Pharmacol, 2011. **82**(4): p. 323-32.
59. West, I. and O. Goldring, *Lectin affinity chromatography.* Methods Mol Biol, 2004. **244**: p. 159-66.
60. Duverger, E., et al., *Carbohydrate-lectin interactions assayed by SPR.* Methods Mol Biol, 2010. **627**: p. 157-78.
61. Pohlmann, S., et al., *Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR.* J Virol, 2003. **77**(7): p. 4070-80.
62. Gijzen, K., et al., *C-type lectins on dendritic cells and their interaction with pathogen-derived and endogenous glycoconjugates.* Curr Protein Pept Sci, 2006. **7**(4): p. 283-94.
63. Kingeter, L.M. and X. Lin, *C-type lectin receptor-induced NF-kappaB activation in innate immune and inflammatory responses.* Cell Mol Immunol, 2012. **9**(2): p. 105-12.
64. Zhao, X.Q., et al., *C-type Lectin Receptor Dectin-3 Mediates Trehalose 6,6'-Dimycolate (TDM)-induced Mincle Expression through CARD9/Bcl10/MALT1-dependent Nuclear Factor (NF)-kappaB Activation.* J Biol Chem, 2014. **289**(43): p. 30052-62.

65. Svajger, U., et al., *C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity*. Cell Signal, 2010. **22**(10): p. 1397-405.
66. Lloyd, D.H., et al., *Role of sugars in surface microbe-host interactions and immune reaction modulation*. Vet Dermatol, 2007. **18**(4): p. 197-204.
67. Park, C.G., *Vaccine strategies utilizing C-type lectin receptors on dendritic cells in vivo*. Clin Exp Vaccine Res, 2014. **3**(2): p. 149-54.
68. Iborra, S. and D. Sancho, *Signalling versatility following self and non-self sensing by myeloid C-type lectin receptors*. Immunobiology, 2014.
69. Zelensky, A.N. and J.E. Gready, *The C-type lectin-like domain superfamily*. FEBS J, 2005. **272**(24): p. 6179-217.
70. Onami, T.M., et al., *Generation of mice deficient for macrophage galactose- and N-acetylgalactosamine-specific lectin: limited role in lymphoid and erythroid homeostasis and evidence for multiple lectins*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): p. 5173-81.
71. Kimura, T., Y. Imai, and T. Irimura, *Calcium-dependent conformation of a mouse macrophage calcium-type lectin. Carbohydrate binding activity is stabilized by an antibody specific for a calcium-dependent epitope*. J Biol Chem, 1995. **270**(27): p. 16056-62.
72. Chun, K.H., et al., *Migration of dermal cells expressing a macrophage C-type lectin during the sensitization phase of delayed-type hypersensitivity*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(4): p. 471-8.
73. Tsuiji, M., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel mouse macrophage C-type lectin, mMGL2, which has a distinct carbohydrate specificity from mMGL1*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28892-901.
74. Oo-Puthinan, S., et al., *The amino acids involved in the distinct carbohydrate specificities between macrophage galactose-type C-type lectins 1 and 2 (CD301a and b) of mice*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1780**(2): p. 89-100.
75. Singh, S.K., et al., *Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties*. Mol Immunol, 2009. **46**(6): p. 1240-9.
76. Higashi, N., et al., *The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20686-93.
77. van Vliet, S.J., et al., *MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF-alpha secretion*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(2): p. 315-23.
78. Basu, N., R. Sett, and P.K. Das, *Down-regulation of mannose receptors on macrophages after infection with Leishmania donovani*. Biochem J, 1991. **277 (Pt 2)**: p. 451-6.
79. Wilson, M.E. and R.D. Pearson, *Evidence that Leishmania donovani utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism*. J Immunol, 1986. **136**(12): p. 4681-8.
80. Akilov, O.E., et al., *The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(5): p. 1188-96.
81. Colmenares, M., et al., *Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes*. J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36766-9.
82. Colmenares, M., et al., *The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of Leishmania*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 1186-90.
83. Garrido, V.V., et al., *The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and Trypanosoma cruzi survival in macrophages*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1257-72.

84. Soeiro Mde, N., et al., *A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in Trypanosoma cruzi invasion and is down-modulated after infection*. Cell Struct Funct, 1999. **24**(3): p. 139-49.
85. Raes, G., et al., *Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(3): p. 321-7.
86. deSchoolmeester, M.L., et al., *The mannose receptor binds Trichuris muris excretory/secretory proteins but is not essential for protective immunity*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 246-55.
87. van Vliet, S.J., et al., *Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells*. Int Immunol, 2005. **17**(5): p. 661-9.
88. van Liempt, E., et al., *Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation*. Mol Immunol, 2007. **44**(10): p. 2605-15.
89. van Die, I., et al., *The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x*. Glycobiology, 2003. **13**(6): p. 471-8.
90. Meyer, S., et al., *The C-type lectin L-SIGN differentially recognizes glycan antigens on egg glycosphingolipids and soluble egg glycoproteins from Schistosoma mansoni*. Glycobiology, 2007. **17**(10): p. 1104-19.
91. Ritter, M., et al., *Schistosoma mansoni triggers Dectin-2, which activates the Nlrp3 inflammasome and alters adaptive immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20459-64.
92. Paveley, R.A., et al., *The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth Schistosoma mansoni and modulates IFN γ production*. Int J Parasitol, 2011. **41**(13-14): p. 1335-45.
93. Terrazas, C.A., et al., *Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1391-400.
94. Almeida, I.C. and R.T. Gazzinelli, *Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from Trypanosoma cruzi: structural and functional analyses*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(4): p. 467-77.
95. Ropert, C. and R.T. Gazzinelli, *Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa*. Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(4): p. 395-403.
96. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4293.
97. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
98. Satoskar, A.R., et al., *Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous Leishmania major infection*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 906-11.
99. Chaudhuri, A., *Regulation of Macrophage Polarization by RON Receptor Tyrosine Kinase Signaling*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 546.
100. Jenkins, K.A. and A. Mansell, *TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*. Cytokine, 2010. **49**(3): p. 237-44.
101. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
102. Cunha-Neto, E. and C. Chevillard, *Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 683230.

103. van Vliet, S.J., et al., *MGL-mediated internalization and antigen presentation by dendritic cells: a role for tyrosine-5*. Eur J Immunol, 2007. **37**(8): p. 2075-81.
104. van Vliet, S.J., et al., *Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1200-8.
105. Singh, S.K., et al., *Tumour-associated glycan modifications of antigen enhance MGL2 dependent uptake and MHC class I restricted CD8 T cell responses*. Int J Cancer, 2011. **128**(6): p. 1371-83.
106. van Kooyk, Y., J.M. Ilarregui, and S.J. van Vliet, *Novel insights into the immunomodulatory role of the dendritic cell and macrophage-expressed C-type lectin MGL*. Immunobiology, 2015. **220**(2): p. 185-92.
107. Sperandio, M., C.A. Gleissner, and K. Ley, *Glycosylation in immune cell trafficking*. Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 97-113.
108. Mortezaei, N., et al., *Tumor-associated Neu5Ac-Tn and Neu5Gc-Tn antigens bind to C-type lectin CLEC10A (CD301, MGL)*. Glycobiology, 2013. **23**(7): p. 844-52.
109. Iida, S., K. Yamamoto, and T. Irimura, *Interaction of human macrophage C-type lectin with O-linked N-acetylgalactosamine residues on mucin glycopeptides*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10697-705.
110. van Sorge, N.M., et al., *N-glycosylated proteins and distinct lipooligosaccharide glycoforms of Campylobacter jejuni target the human C-type lectin receptor MGL*. Cell Microbiol, 2009. **11**(12): p. 1768-81.
111. van Vliet, S.J., et al., *Variation of Neisseria gonorrhoeae lipooligosaccharide directs dendritic cell-induced T helper responses*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000625.
112. Usami, K., et al., *Involvement of viral envelope GP2 in Ebola virus entry into cells expressing the macrophage galactose-type C-type lectin*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **407**(1): p. 74-8.
113. Vukman, K.V., et al., *Mannose receptor and macrophage galactose-type lectin are involved in Bordetella pertussis mast cell interaction*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(3): p. 439-48.
114. Takada, A., et al., *Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 2943-7.
115. Upham, J.P., et al., *Macrophage receptors for influenza A virus: role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry*. J Virol, 2010. **84**(8): p. 3730-7.
116. Watanabe, H., et al., *Monopole-Driven Shell Evolution below the Doubly Magic Nucleus ¹³²Sn Explored with the Long-Lived Isomer in ¹²⁶Pd*. Phys Rev Lett, 2014. **113**(4): p. 042502.
117. Meevissen, M.H., et al., *Specific glycan elements determine differential binding of individual egg glycoproteins of the human parasite Schistosoma mansoni by host C-type lectin receptors*. Int J Parasitol, 2012. **42**(3): p. 269-77.
118. Klaver, E.J., et al., *Trichuris suis-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated*. Int J Parasitol, 2013. **43**(3-4): p. 191-200.
119. Terrazas, C.A., et al., *Helminth-excreted/secreted products are recognized by multiple receptors on DCs to block the TLR response and bias Th2 polarization in a cRAF dependent pathway*. FASEB J, 2013. **27**(11): p. 4547-60.
120. Reis Machado, J., et al., *Immunopathological aspects of experimental Trypanosoma cruzi reinfections*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 648715.
121. Guilmot, A., Y. Carrier, and C. Truyens, *Differential IFN-gamma production by adult and neonatal blood CD56+ natural killer (NK) and NK-like-T cells in response to Trypanosoma cruzi and IL-15*. Parasite Immunol, 2014. **36**(1): p. 43-52.

122. Cunha-Neto, E., et al., *Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 252-8.
123. Malvezi, A.D., et al., *Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental Trypanosoma cruzi infection*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2004. **41**(1): p. 69-77.
124. Martins, G.A., et al., *CD28 is required for T cell activation and IFN-gamma production by CD4+ and CD8+ T cells in response to Trypanosoma cruzi infection*. Microbes Infect, 2004. **6**(13): p. 1133-44.
125. Golgher, D. and R.T. Gazzinelli, *Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease*. Autoimmunity, 2004. **37**(5): p. 399-409.
126. Spellberg, B. and J.E. Edwards, Jr., *Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(1): p. 76-102.
127. Eriksson, M., et al., *Biological evaluation of multivalent lewis X-MGL-1 interactions*. Chembiochem, 2014. **15**(6): p. 844-51.
128. Penas, F., et al., *Treatment in vitro with PPARalpha and PPARgamma ligands drives M1-to-M2 polarization of macrophages from T. cruzi-infected mice*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1852**(5): p. 893-904.
129. Walker, D.M., et al., *Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(7): p. 1245-63.
130. Gutierrez, F.R., et al., *The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104 Suppl 1**: p. 236-45.
131. Lefevre, L., et al., *The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to Leishmania infantum*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 1038-49.
132. Saba, K., K. Denda-Nagai, and T. Irimura, *A C-type lectin MGL1/CD301a plays an anti-inflammatory role in murine experimental colitis*. Am J Pathol, 2009. **174**(1): p. 144-52.
133. de Meis, J., et al., *Differential regional immune response in Chagas disease*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(7): p. e417.
134. Oliveira, A.C., et al., *Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000870.
135. Souza, P.E., et al., *Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease*. Infect Immun, 2007. **75**(4): p. 1886-94.
136. Frosch, S., D. Kuntzlin, and B. Fleischer, *Infection with Trypanosoma cruzi selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity*. Infect Immun, 1997. **65**(3): p. 971-7.
137. Pereira Barretto, A.C., et al., *Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease*. Am Heart J, 1986. **111**(2): p. 307-12.
138. Higuchi Mde, L., *Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1997. **39**(1): p. 53-60.
139. Teixeira, M.M., R.T. Gazzinelli, and J.S. Silva, *Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection*. Trends Parasitol, 2002. **18**(6): p. 262-5.
140. Zhang, L. and R.L. Tarleton, *Characterization of cytokine production in murine Trypanosoma cruzi infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production*. Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p. 102-9.

141. Gomes, J.A., et al., *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response*. Infect Immun, 2003. **71**(3): p. 1185-93.
142. Reis, D.D., et al., *Antibodies to Trypanosoma cruzi express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1611-8.
143. Abel, L.C., et al., *Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to Trypanosoma cruzi infection*. J Autoimmun, 2001. **17**(1): p. 99-107.
144. Powell, M.R., et al., *Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol, 1998. **20**(10): p. 463-71.
145. Dutra, W.O., et al., *Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with Trypanosoma cruzi chronic infection*. Scand J Immunol, 1997. **45**(1): p. 74-80.
146. Camargo, M.M., et al., *Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages*. J Immunol, 1997. **159**(12): p. 6131-9.
147. Une, C., J. Andersson, and A. Orn, *Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with Trypanosoma cruzi*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(2): p. 195-201.
148. Cobb, D. and R.B. Smeltz, *Regulation of proinflammatory Th17 responses during Trypanosoma cruzi infection by IL-12 family cytokines*. J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3766-73.
149. Nunes, M.P., et al., *Inhibitory effects of Trypanosoma cruzi sialoglycoproteins on CD4+ T cells are associated with increased susceptibility to infection*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77568.