

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

INMUNOREGULACIÓN POR ANTÍGENOS

GLICOSILADOS DE *TAENIA CRASSICEPS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LORENA GÓMEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

MÉXICO D.F.

FEBRERO, 2009

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunoparasitología, Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM y en el Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Secretaría de Salud.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Rafael Saavedra Durán (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Ruy Pérez Montfort (Instituto de Fisiología, UNAM)

Beca de estudios de posgrado otorgada por CONACYT.

Trabajo apoyado por proyecto CONACYT 41584-M, DGAPA-PAPIIT-UNAM IN208706 y Fundación Miguel Alemán, A.C.

A mis padres

Agradecimientos

Al Dr. Ignacio Terrazas por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo

Al Dr. Rafael Bojalil por su comprensión, ayuda y amistad

Al Dr. Rafael Saavedra y Edda Tenorio por su asesoría

Al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por las oportunidades otorgadas

A la UNAM, hoy y siempre

A mis amigos Anita, Nacho, Nico, Misha, Vittore y Rashidi, simplemente por su amistad

A Bastiaan por todo el amor

LISTA DE ABREVIATURAS

AAMΦ	Alternative Activated Macrophages (Macrófagos Alternativamente Activados)
APCs	Antigen Presenting Cells (Células Presentadoras de Antígeno)
CAMΦ	Classically Activated Macrophages (Macrófagos Clásicamente Activados)
CD	Cluster Determinants
CFA	Complete Freund Adjuvant (adyuvante completo de Freund)
ConA	Concanavalina A
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DCs	Dendritic Cells (Células Dendríticas)
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FIZZ1	Found in Inflammatory Zone 1
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleucina
Inos	Inducible Nitric Oxide Sintase (Sintasa de Oxido Nitrico Inducible)
LNFP III	Lacto-N-fucopentaosa-III
LNnT	Lacto-N-tetraosa
LPS	Lipopolisacárido
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MHC	Major Histocompatibility Complex
MSC	Myeloid Supresor Cells (Células Mieloides Supresoras)
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaIO ₄	Metaperiodato de Sodio
NES	Nippostrongylus brasiliensis excretory-secretory proteins
NKT	Natural Killer T cell
NO	Nitric Oxide (Oxido Nítrico)
OVA	Ovalbumina
OVA ₃₂₃₋₃₃₉	Péptido de Ovalbumina que comprende de los aminoácidos 323 al 339
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos)
PECs	Peritoneal Exudate Cells (células del exudado peritoneal)
PGE2	Prostaglandin E2
PRRs	Pattern Recognition Receptors (Receptores de Reconocimiento de Patrones)
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEA	Soluble Egg Antigen (antígenos solubles derivados de <i>Schistosoma mansoni</i>)
STAT-6	Signal Transducer and Activator of Transcription-6 (Transductor de Señales y Activador de la Transcripción-6)
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
Th	T-helper
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
TLRs	Toll Like Receptors (Receptores tipo Toll)
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-alfa

ÍNDICE

1. RESUMEN 1
2. INTRODUCCIÓN 2
3. ANTECEDENTES 3
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 20
 - 4.1. Justificación
 - 4.2. Pregunta de Investigación
 - 4.3. Hipótesis
 - 4.4. Objetivos Generales
 - 4.5. Objetivos Particulares
5. MATERIALES Y MÉTODOS 23
6. RESULTADOS 23
 - 6.1. Resumen de hallazgos contenidos en Artículo 1
Gómez-García, L, et al. (2005). *Parasite Immunology*, 27(10-11):395-405
 - 6.2. Resumen de hallazgos contenidos en Artículo 2
Gómez-García, L, et al. (2006). *Parasitology Research*, 99(4):440-8
7. DISCUSIÓN GENERAL 36
8. CONCLUSIONES 50
9. BIBLIOGRAFÍA 52
10. ANEXOS 72
 - 10.1. Artículo 1.
 - 10.2. Artículo 2.
 - 10.3. Otras publicaciones. Gómez-García, L and Terrazas, I. (2007).
Chapter 11: 183-198. ISBN: 81-308-0166-3, *Research Signpost*, India

1. RESUMEN

La regulación de la respuesta inmune por parásitos es un fenómeno global que incluye la supresión, desvío y conversión de la respuesta inmune del huésped. Los helmintos patógenos al igual que otros parásitos, han evolucionado desarrollando diversas estrategias que inducen un microambiente permisivo para su desarrollo. Las infecciones por helmintos son generalmente de tipo crónico y se caracterizan por la inducción en el huésped de una respuesta inmune del tipo Th2 y de un estado hipo-responsivo generalizado. La suma de todos estos cambios resulta en un estado de características anti-inflamatorias, el cual en la mayoría de los casos contribuirá a la sobrevivencia del parásito.

En la inducción de este estado mayormente anti-inflamatorio y polarizado hacia Th2, diversas moléculas pertenecientes a algunos de estos parásitos, en particular sus carbohidratos, parecen tener un papel inmunomodulador.

Taenia crassiceps es un cestodo parásito en cuya infección también se observan las características típicas de las infecciones por helmintos. Sin embargo, las moléculas y mecanismos involucrados en la inducción de dicha respuesta aún se desconocen.

En este proyecto se evaluó si los carbohidratos presentes en los antígenos solubles de *T. crassiceps*, son moléculas involucradas en la modulación de la respuesta inmune. Dentro de los hallazgos más relevantes, observamos que estos antígenos glicosilados pueden influir tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. En el sitio de inóculo y en corto tiempo (18h), estos carbohidratos inducen la expansión de células del sistema inmune innato (F4/80+/Gr-1+) que poseen actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos T previamente activados. En la inmunidad adaptativa, observamos que estas moléculas son indispensables en la inducción de AAMΦ y de la respuesta inmune tipo Th2.

Por tanto, los carbohidratos en los antígenos solubles de *Taenia crassiceps* tienen actividad moduladora sobre elementos del sistema inmune y podrían participar en la inducción de un ambiente que favorece la persistencia del parásito.

2. INTRODUCCIÓN

Los helmintos constituyen uno de los grupos de animales más grandes y ampliamente distribuidos en el planeta, y un gran número de ellos se han adaptado a la vida parasitaria de forma exitosa . Debido a que los helmintos parásitos están continuamente expuestos al ataque por parte del sistema inmune y aún así son capaces de sobrevivir en el huésped por periodos largos, es lógico pensar que estos han desarrollado diversas estrategias que les permiten evadir su destrucción. De hecho, se han descrito mecanismos utilizados por estos parásitos que bloquean o modulan a elementos de la respuesta inmune potencialmente dañinos para ellos . Se piensa que la fuerte respuesta inmune Th2, la respuesta suprimida de los linfocitos y la inducción de ciertos tipos celulares que consistentemente se observan en las infecciones con helmintos, establecen en el huésped un estado "anti-inflamatorio" generalizado que permite que estas infecciones sean típicamente crónicas . Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual se favorece este estado continúa siendo un aspecto inconcluso.

Interesantemente, algunos estudios recientes han mostrado que los carbohidratos expresados por algunos helmintos nematodos y trematodos, poseen diversas actividades inmunomoduladoras, influyendo en la expansión de ciertos fenotipos de células del sistema inmune innato o en la inhibición de la respuesta linfoproliferativa , además de tener un efecto adyuvante en la inducción de la respuesta del tipo Th2 . En cambio para el grupo de los cestodos, se desconocen las moléculas que participan en la modulación de la respuesta inmune y por tanto los mecanismos de dicha actividad.

3. ANTECEDENTES

Los helmintos parásitos son un grupo diverso de organismos que posee diferentes morfologías, hábitos de reproducción y alimenticios, así como estadios variables en sus ciclos de vida. Estos parásitos causan diversas enfermedades y se alojan en varios tejidos en las diferentes especies de mamíferos que utilizan como huéspedes. Las rutas de infección que utilizan también son diversas, desde la ingestión de los huevos o larvas, hasta la penetración de la misma larva a través de la piel del huésped o por la picadura de insectos vectores .

A pesar de la heterogeneidad en el grupo de los parásitos helmintos, en las enfermedades que causan y en los diversos nichos que ocupan, existe una propiedad común a todos ellos, la propensión de permanecer por largos periodos en sus hospederos . Esta cronicidad parece estar relacionada con la modulación que ejerce el parásito sobre el sistema inmune de su huésped, lo que a su vez genera un estado permisivo para su desarrollo . La uniformidad en la cronicidad en el amplio grupo de los parásitos helmintos guarda relación con la respuesta inducida por éstos en sus huéspedes. Como característica distintiva, estas infecciones inducen una respuesta inmune del tipo Th2 con concentraciones altas de las citocinas IL-4, IL-13, IL-5 y de los anticuerpos IgE, IgG1 e IgG4 . Además, consistentemente se puede observar un estado hipo-responsivo generalizado, que se debe principalmente a una baja respuesta linfoproliferativa ya sea hacia los antígenos del parásito o hacia antígenos no relacionados . La inducción de macrófagos alternativamente activados (AAMΦ por sus siglas en inglés) y de células T reguladoras, son características que recientemente también se han asociado a estas infecciones .

El efecto global de estos fenómenos es que las infecciones por helmintos, tanto en modelos experimentales como en pacientes infectados, tienen un fenotipo inmunológico del tipo Th2 con fuertes características anti-inflamatorias, que en la mayoría de los casos es favorable para estos parásitos y permite su sobrevivencia por largos periodos.

Se ha observado que los efectos inmunomoduladores inducidos por el parásito, también pueden afectar la respuesta inmune que se presenta frente a antígenos no relacionados , otros parásitos , virus y vacunas . En diversos modelos, se ha observado cómo la inducción de la respuesta Th2 puede extenderse a la respuesta que se monta hacia otros antígenos, disminuyendo o inhibiendo las respuestas Th1 y sustituyéndolas por respuestas mixtas Th1/Th2 o polarizadas hacia Th2 .

Mientras que la polarización hacia Th2 parece ser parte esencial de la modulación del sistema inmune observada en las infecciones con helmintos, el estado hipo-responsivo generalizado del sistema inmune del huésped es también resultado de esta modulación y se refleja en el decremento de la habilidad de los linfocitos para proliferar en respuesta a los antígenos específicos o a estímulos policlonales o a antígenos no relacionados , situación que por tanto también influirá en la respuesta que el huésped pueda montar hacia otras infecciones .

Moléculas de helmintos con actividad moduladora

El huésped infectado con los helmintos parásitos está continuamente expuesto a una gran variedad de moléculas derivadas de los mismos. Estas moléculas son producidas por diferentes estadios y pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, lípidos o carbohidratos.

Diversas moléculas de helmintos han sido asociadas con efectos reguladores sobre el sistema inmune de sus huéspedes. En algunos trabajos al principio del siglo XXI, se demostró que los antígenos o extractos de los helmintos representan una fuente importante de moléculas que desvían la respuesta inmune hacia Th2, promueven supresión o ambas .

Posteriormente se describió que los antígenos presentes tanto en la superficie de los parásitos como sus productos de excreción-secreción, pueden actuar sobre distintas poblaciones celulares y afectar su función y por tanto la respuesta inmune del huésped . Diversas moléculas provenientes de los helmintos pueden influir en eventos de la respuesta inmune, tales como el procesamiento de antígenos , la maduración de células presentadoras de antígeno (APCs por sus siglas en inglés) y su producción de citocinas y la activación y expansión de tipos celulares que participan en etapas tempranas de la respuesta inmune . Estos cambios a su vez, parecen estar asociados con la inducción de la respuesta tipo 2 y con el estado hipo-responsivo generalizado presente en estas infecciones .

En el caso de *Schistosoma mansoni*, diversas moléculas provenientes de este parásito pueden inducir respuestas tipo Th2 . Por ejemplo, los lípidos presentes en los adultos y huevos pueden activar monocitos e inducir la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-10 . Estas fracciones lipídicas, en particular las que contienen fosfatidilserina, bloquean la producción de IL-12 por parte de las células dendríticas (DCs por sus siglas en inglés), actuando así como factores promotores de la respuesta Th2 .

Otro ejemplo lo es el estudio de Semnani y colaboradores , en el que demuestran que los monocitos que fagocitan antígenos de la microfilaria de *Brugia malayi* durante su diferenciación a DCs, muestran una menor producción de IL-12 p40, IL-12p70 e IL-10 en respuesta al antígeno *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC) o SAC más IFN- γ . Aunque la viabilidad celular o la expresión de moléculas co-estimuladoras MHC-I y MHC-II no se modificó, las DCs expuestas a estos antígenos estimularon en menor grado a los linfocitos que cuando no fueron expuestas a tales antígenos .

El nematodo *Nippostrongylus brasiliensis* secreta *in vitro* diversas glicoproteínas llamadas en conjunto NES. Estos antígenos polarizan la respuesta inmune hacia Th2 y aumentan la expresión de marcadores asociados con tal respuesta como CD86 y OX40L mientras disminuyen la expresión de IL-12p70 .

Además, diversos productos derivados de *Ascaris suum* entre ellos sus glicoesfingolípidos, inhiben la respuesta linfoproliferativa inducida por la estimulación con el mismo antígeno o con mitógenos . Los componentes de *A. suum* también inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos peritoneales , así como la expresión de las moléculas MHC-II, CD80, CD86 y CD40 en

células CD11c⁺ . En particular la molécula PAS-1 derivada de este mismo parásito, puede inducir la secreción de citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- β . Los estudios más extensos se han hecho para la molécula ES-62 secretada por *Achantocheilonema vitae* y se ha demostrado que posee una gran variedad de actividades inmunomoduladoras que se atribuyen a los grupos fosforil-colina que contiene . La ES-62 actúa sobre una gran variedad de tipos celulares que incluyen macrófagos y DCs . Esta molécula inhibe la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-12, IL-6 y TNF- α por macrófagos peritoneales, situación que puede contribuir a la generación de una respuesta Th2 . Además, la ES-62 también inhibe la proliferación de linfocitos B y T , e induce la producción de IL-10 por células B-1 . La exposición de las DCs a la ES-62 promueve el incremento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 e inhibe la expansión clonal de linfocitos transferidos *in vivo* .

Para el caso de los cestodos, recientemente Rigano y colaboradores demostraron cómo los antígenos del cestodo *Echinococcus granulosus* afectan a las APCs en diferentes estados de maduración . Estos antígenos disminuyen el número de monocitos que se diferencian en DCs inmaduras. En presencia de los antígenos, este número reducido de DCs pueden madurar y promover la diferenciación de los linfocitos en células productoras de IL-4, sugiriendo su potencial como antígenos que polarizan la respuesta hacia Th2 .

La respuesta hacia antígenos no relacionados también puede ser modificada por las moléculas de helmintos. Por ejemplo, cuando células CD11c⁺ son expuestas a ciertos extractos de *A. suum* y estas presentan un antígeno no-relacionado como lo es la Ovalbumina (OVA), la respuesta proliferativa observada por parte de las células T es menor que la observada cuando las APCs son células que no fueron expuestas a los antígenos .

Una situación similar sucede para el caso de la molécula ES-62. Cuando las DCs expuestas a esta molécula presentan un antígeno heterólogo a células T CD4⁺, la producción de IL-4 se incrementa en paralelo al decremento en la producción de IFN- γ y de su respuesta linfoproliferativa . Sin embargo, es importante hacer notar que la ES-62 no funciona en todos los sistemas; por ejemplo, no altera el desarrollo de la respuesta inflamatoria generada por una infección con *Toxoplasma gondii* o la respuesta Th1 inducida por algunos antígenos de helmintos , sugiriendo que su actividad moduladora se da través de mecanismos de regulación finos que por tanto no pueden influir sobre cualquier respuesta inflamatoria, volviendo necesario el estudio de otras moléculas reguladoras y de sus respectivos mecanismos de acción.

Carbohidratos como moléculas inmunomoduladoras

Los helmintos parásitos expresan diversos glicoconjugados que a su vez son de los epítopes más relevantes debido a su alta antigenicidad . Los más estudiados son los glicanos presentes en los antígenos de nematodos y trematodos .

Se ha demostrado que estos glicanos pueden modular la respuesta inmune de su huésped en diversas formas; por ejemplo, activando a células del sistema inmune innato , promoviendo una respuesta Th2 o deprimiendo la respuesta proliferativa .

Este es el caso de los glicanos presentes en los helmintos *B. malayi* y *S. mansoni*, que pueden influir en la actividad de macrófagos, células dendríticas y otras células del sistema inmune innato, induciendo su expansión, cambios en su producción de citocinas o modificando la expresión de sus moléculas de co-estimulación . Esto puede asociarse a su vez, con la inducción de la respuesta inmune Th2 y la disminución de la respuesta proliferativa .

En particular, los antígenos solubles de los huevos de *S. mansoni* (SEA por sus siglas en inglés) contienen moléculas que polarizan la respuesta de células CD4+ hacia Th2 .

Cuando los glicoconjugados derivados de SEA son capturados, procesados y presentados a linfocitos T vírgenes por DCs, la respuesta inmune se polariza hacia Th2 . La regulación negativa de moléculas co-estimuladoras y de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 por parte de las células dendríticas parece ser el mecanismo involucrado en dicha polarización .

Este tipo de modulación inducida por SEA, depende de la porción glicosídica presente en estos antígenos ya que el tratamiento con metaperiodato de sodio elimina su capacidad de inducir respuestas Th2 . Algunos de los carbohidratos derivados de los huevos de *S. mansoni* son incluso suficientes para inducir muchos de los efectos moduladores observados; por ejemplo, los glicanos lacto-N-fucopentaosa III (LNFP III) y lacto-N-neotetraosa (LNnT) promueven la producción de IL-10 y la inhibición de la proliferación de células T CD4+ ó CD8+ . De hecho, estudios con LNFP III proveyeron la primera demostración de la capacidad adyuvante de los glicanos de helmintos para promover una respuesta tipo Th2 hacia un antígeno no-relacionado como la albúmina humana, aparentemente a través de la inducción de células dendríticas del tipo 2 (DC2) .

Además, algunos glicoconjugados de *S. mansoni* que contienen los carbohidratos α 1,3-fucosa y B1,2 xilosa, también poseen la capacidad de generar fuertes respuestas celulares del tipo Th2 . Lo mismo sucede para el caso de algunos glicolípidos presentados a células NKT vía CD1, aunque una vez más la actividad inductora de respuestas Th2 depende de los carbohidratos presentes en estas moléculas .

Para el caso de los nematodos, especies parásitas y de vida libre contienen glicanos que poseen propiedades inmunomoduladoras . Las células de los nódulos linfáticos de ratones inmunizados con los extractos solubles de estas especies, producen concentraciones altas de IL-4 y esta actividad depende los glicanos intactos en el extracto antigénico . Esta respuesta Th2 se observa aún en presencia del adyuvante Th1 CFA (adyuvante completo de Freund), lo que indica la fuerte inducción de la respuesta Th2 por parte de estos glicanos .

La posible actividad moduladora de los glicanos derivados de cestodos ha sido pobremente estudiada. Recientemente Alvarez y colaboradores, determinaron que existe una continua liberación de glicoconjugados por parte de *Mesocestoides corti* hacia el tejido infectado y que estas moléculas son a su vez fagocitadas por células de su hospedero . Aunque aún no existe evidencia directa de la actividad inmunomoduladora de estos glicanos, es probable que pudieran influir sobre elementos del sistema inmune y estar involucrados en la evasión del mismo por parte

del parásito, debido a su rápida y persistente liberación y a su estrecho contacto con células y tejidos del hospedero .

AAMØ y Células Mieloides Supresoras en helmintiasis

Dependiendo del microambiente de citocinas, los macrófagos pueden diferenciarse en distintos subtipos y llevar a cabo roles inmunológicos específicos.

Los AAMØ son un tipo distintivo de macrófagos que son activados por las citocinas IL-4 e IL-13, las cuáles son producidas generalmente en respuestas tipo Th2 y que a diferencia de los macrófagos clásicamente activados (CAMØ por sus siglas en inglés), tienen propiedades anti-inflamatorias y de reparación tisular . Estos macrófagos son antagónicamente regulados por citocinas Th1 pero a su vez, pueden modular este tipo de respuesta e inhibir la proliferación de células T . Los AAMØ expresan de manera diferencial diversas moléculas tales como el receptor de manosa, Arginasa I, FIZZ1 (RELM- α) y Ym1 , que actualmente son utilizados como marcadores de la diferenciación de este tipo celular.

Los AAMØ son un tipo celular ampliamente observado en las infecciones con helmintos; de hecho, existen reportes de su inducción en una gran variedad de estas infecciones .

Aunque diferentes mecanismos y poblaciones celulares parecen contribuir en la supresión inmune y en la respuesta Th2 observadas en las infecciones con helmintos , existe evidencia que indica que la inducción del tipo celular de los AAMØ es uno de los mecanismos involucrados.

Por ejemplo, hace algunos años se describió que la implantación del nematodo *B. malayi* en la cavidad peritoneal de ratones sanos induce el desarrollo de una potente respuesta Th2 y la infiltración estable de células de las cuáles el tipo principal son macrófagos F480+ . Estos macrófagos también poseen la habilidad de suprimir la proliferación de células T, en un mecanismo que requiere el contacto entre células y de promover a su vez, la diferenciación de células Th2 productoras de IL-4 mientras que inhiben la de las células Th1 productoras de IFN- γ . Posteriormente, estos macrófagos serían identificados como AAMØ por su expresión de los genes Ym1 y FIZZ1 . Además, la infección con *Litomosoides sigmodontis*, también recluta una población de AAMØ F480+, que inhiben la respuesta linfoproliferativa de células T CD4+ antígeno específicas a través de un mecanismo que no depende de IL-10 o CTLA-4 aunque podría parcialmente depender de TGF- β . Acorde con su activación alternativa, en ambos casos este tipo de macrófagos dependieron totalmente de la presencia de la citocina IL-4 para la adquisición de su característica supresora .

Sólo 4 días después de la infección con *N. brasiliensis*, es posible observar un incremento en la población de AAMØ en ratones SCID (Severe Combined Immunodeficiency) , lo que sugiere que una fuente temprana de IL-4/IL-13 por parte de células innatas puede ser suficiente para la diferenciación de estos macrófagos. Además, *Fasciola hepatica* induce el reclutamiento de AAMØ en la cavidad peritoneal tan solo 24 horas después de la infección y esta respuesta se puede replicar tras la inyección intraperitoneal de la molécula de excreción/secreción tioredoxina peroxidasa de este parásito . Estos ejemplos indican que los AAMØ pueden expandirse

rápida en el sitio de invasión, dentro de los primeros días posteriores a la infección con los helmintos o a la exposición con sus productos.

Alternativamente, una población supresora que expresa F480, CD11b y Gr1 se ha identificado en respuesta inmediata a la inyección en peritoneo de los glicanos LNFP III y LNnT de *S. mansoni*. Estas células deprimen la proliferación de linfocitos CD4+ o CD8+ en respuesta a estímulos policlonales, lo cual es dependiente de la presencia de NO e IFN- γ y del contacto entre ambos tipos celulares. Estas células supresoras producen concentraciones bajas de citocinas pro-inflamatorias; en cambio, la producción de IL-10 y TGF- β se encuentra elevada y en co-cultivo con linfocitos, promueven una respuesta sostenida del tipo Th2.

Se ha descrito la expansión de células con estos mismos marcadores en una gran variedad de condiciones asociadas a la supresión de la respuesta inmune. Estas células se han identificado en diversos tipos de cáncer, tras dosis tolerizantes de superantígenos o tratamiento con ciclofosfamida, así como en algunas infecciones por protozoarios. En todos los casos, estas células suprimen la proliferación de linfocitos a través de diversos mecanismos en los que están involucrados tanto factores solubles como el contacto entre células. Por su actividad supresora y expresión del marcador mielóide Gr1, actualmente este tipo celular es referido como células mieloides supresoras (MSC por sus siglas en inglés) o MDSC (myeloid-derived suppressor cells).

TLRs y las moléculas de helmintos

La unión de ligandos a moléculas que actúan como receptores en la superficie de las células del sistema inmune, desencadena una serie de rutas bioquímicas que transducen señales a su núcleo, las cuales inducen cambios en la expresión de genes, lo que a su vez determina la variedad de respuestas que encontramos en el sistema inmune.

Algunos reportes indican que la actividad inmunomoduladora de los productos de helmintos parece depender, al menos en parte, de su interacción con receptores específicos. Tal y como sucede para los productos derivados de virus, bacterias y protozoarios, los antígenos de helmintos pueden interactuar con los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs por sus siglas en inglés) del huésped tales como lectinas y los receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés).

La inducción de la producción de citocinas, la presentación de antígenos y otras respuestas de las células del sistema inmune, ocurren principalmente y en general, tras la unión de los PRRs a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés). Dentro de los PRRs, los más estudiados han sido los TLRs. Los TLRs son miembros de la superfamilia de moléculas TIR y señalizan a través del reclutamiento de distintas proteínas adaptadoras de las cuales la mejor caracterizada es MyD88. A pesar de que los TLRs han sido ampliamente conocidos como receptores de PAMPs que inducen respuestas tipo Th1, algunas moléculas inductoras de respuestas Th2 provenientes de helmintos también pueden ser reconocidas por éstos, e inclusive su actividad parece depender de los mismos.

Goodridge y colaboradores mostraron que la acción moduladora del antígeno de *A. viteae* ES-62 sobre la secreción de citocinas por macrófagos y DCs es mediada por la molécula TLR-4 .

TLR-4 parece también ser indispensable para la acción moduladora del carbohidrato LNFPIII de *S. mansoni*, ya que la actividad de esta molécula sobre las DCs y los efectos asociados a la misma, dependen de la presencia de TLR-4 . A su vez, algunos estudios con ratones TLR-2^(-/-) mostraron que este receptor es activado por moléculas de lisofosfatidilserina de *S. mansoni* (lyso-PS) y que esta interacción influye en la actividad de las DCs . Además, el RNA de doble cadena de este mismo trematodo interactúa con TLR-3 . La falta de secreción de IL-12 e IL-6 por parte de macrófagos en ratones MyD88^(-/-) en respuesta a moléculas de *S. mansoni* , también sugiere que los TLRs tienen un papel importante en la actividad de los productos de este helminto. Sin embargo, la evidencia a este respecto es contradictoria ya que en un trabajo reciente usando DCs de ratones TLR-4^(-/-), TLR-2^(-/-) o MyD88^(-/-), se demostró que la actividad moduladora sobre la activación de las DCs o la capacidad inductora de respuestas Th2 que posee el SEA, no requiere de ninguna de estas moléculas .

STAT-6 en las helmintiasis

El transductor de señales y activador de la transcripción-6 (STAT-6) es el miembro de la familia de proteínas STAT que es activado por las citocinas IL-4 e IL-13 y que a su vez es un componente esencial en la señalización de estas citocinas al interior de la célula . STAT-6 por tanto es una molécula indispensable en la diferenciación de la respuesta inmune hacia Th2 .

Como ya se mencionó anteriormente, tanto la respuesta inmune tipo Th2 como la inducción de AAMØ , son características que juegan un papel determinante en las helmintiasis y para el desarrollo de ambas, el papel de STAT-6 puede ser esencial como molécula involucrada en la señalización de las citocinas IL-4 e IL-13.

De hecho, la deficiencia de STAT-6 en las infecciones con helmintos inhibe la diferenciación de células T en células secretoras de citocinas tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 y en algunos casos evita la expulsión de helmintos intestinales . Además, en estudios con *H. polygyrus* se demostró que la señalización del receptor de IL-4 a través de la molécula STAT-6, es necesaria para la activación alternativa de los macrófagos .

Taenia crassiceps

Taenia crassiceps es un helminto cestodo cuyo estadio larvario puede establecerse y reproducirse rápidamente por gemación en la cavidad peritoneal de ratones y ratas , causando una infección crónica en los mismos. Este tipo de infección, es un modelo de cisticercosis experimental ampliamente usado para estudiar la relación huésped-parásito en infecciones por cestodos .

En esta infección, *T. crassiceps* al igual que otros helmintos induce en su huésped una respuesta polarizada hacia el tipo Th2 con linfoproliferación suprimida ya sea ante estímulos antígeno-específicos o antígeno-inespecíficos como ConA o anti-CD3 y que es atribuida al menos en parte a la baja producción de IL-2 .

En las etapas tempranas de la infección (< 4 semanas), se observa una respuesta Th1 con concentraciones altas de IL-12, IFN- γ , NO e IgG2a. Esta respuesta es reemplazada por una respuesta inmune Th2 con concentraciones altas de IL-4, IL-13, IgG1, IgE en la etapa crónica de la infección (> 4 semanas) . Este cambio hacia una respuesta Th2, correlaciona con un aumento en la carga parasitaria lo que indica una susceptibilidad asociada a la respuesta Th2 y la resistencia dada por una respuesta temprana tipo Th1 .

La respuesta Th2 que favorece la susceptibilidad en esta infección, es inducida a través de la señalización por la molécula STAT-6. Los ratones STAT-6^(-/-) restringen de manera más eficiente el crecimiento de *T. crassiceps* que los ratones STAT-6^(+/+) y este incremento en la resistencia coincide con el mantenimiento de la respuesta inmune tipo Th1 y la presencia de CAM \emptyset en la fase crónica de la enfermedad . De hecho, la susceptibilidad mediada por STAT-6 está relacionada al menos en parte con la inhibición de la producción de NO por parte de los macrófagos .

Paralelamente al cambio en el ambiente de citocinas de Th1 a Th2, se observa un cambio en el desarrollo de una población celular de CAM \emptyset F480+ a una de AAM \emptyset F480+ . Esta última población produce concentraciones altas de PGE2 e IL-6 y concentraciones bajas de NO e IL-12 en comparación con la población de CAM \emptyset . Los AAM \emptyset pueden inhibir la proliferación de células T de ratones inmunizados con antígenos heterólogos y promueven la producción de IL-4 en respuesta a antígenos del mismo parásito o a los antígenos no-relacionados. La actividad supresora de estos AAM \emptyset , no se debe a su producción de IL-6 o PGE2 aunque IL-6 sí parece estar relacionada con la polarización hacia Th2 . Así mismo, la señalización a través de la molécula STAT-6 es necesaria para la expansión de estos AAM \emptyset .

Al igual que otras infecciones por helmintos, la presencia de *T. crassiceps* puede también modificar la susceptibilidad del huésped hacia otros patógenos. Por ejemplo, esta infección altera la susceptibilidad y la respuesta inmune hacia parásitos no relacionados como los protozoarios *Trypanosoma cruzi* , *Leishmania major* y *Leishmania mexicana* .

Las proteínas presentes en la superficie de *T. crassiceps* son en su mayoría inmunogénicas ya que pueden ser precipitadas con suero proveniente de animales infectados y desde la primera semana de infección, ocurre una respuesta humoral contra diversas moléculas de este parásito . La unión de estas proteínas del parásito a ciertas lectinas, sugirió la presencia de diferentes carbohidratos unidos que incluían D-manosa y D-glucosa y posiblemente en menor cantidad N-acetilglucosamina y ácido siálico . Esto reforzó la teoría de Trimble y Lumsden de la existencia de anticuerpos contra carbohidratos altamente inmunogénicos que eran continuamente liberados por la larva de *T. crassiceps* . Un estudio más reciente con análisis con espectrometría de masas, mostró que los metacestodos de *T. crassiceps* poseen diversos N-glicanos que contienen principalmente fucosa, manosa, galactosa y N-acetilglucosamina organizados en diversos tipos de estructuras . De hecho, se ha demostrado que los antígenos con mayor antigenicidad provenientes de los metacestodos de *T. crassiceps*

y que pueden ser utilizados en el diagnóstico de la neurocisticercosis, son glicoproteínas . Inclusive, los glicanos de este parásito pueden ser reconocidos por el suero proveniente de ratones o humanos infectados con otros cestodos u otras clases de helmintos .

Se ha observado, que los carbohidratos de *T. crassiceps* también juegan un papel en la producción de IL-6 e IL-10 por parte de células de bazo y esto se cree podría estar relacionado con la inducción de la respuesta Th2 típica de la infección .

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1. Justificación

Los helmintos al igual que otros parásitos, han desarrollado complejos mecanismos de evasión y modulación de la respuesta inmune del hospedero.

Actualmente hay poca información acerca de cómo los helmintos pueden regular la respuesta inmune de su huésped, induciendo un estado anti-inflamatorio generalizado en donde la polarización hacia una respuesta tipo Th2, la proliferación de linfocitos disminuida y la expresión de tipos celulares como los AAMΦ son las características principales.

Algunos estudios muestran que moléculas presentes en los antígenos de helmintos, poseen actividades inmunomoduladoras que pueden influir dichas respuestas en el sistema inmune. La evidencia sugiere, que los carbohidratos en estos antígenos pudieran tener uno de los papeles más relevantes en esta modulación. En este tema, el grupo de los cestodos es para el cual contamos con menor información.

Este proyecto se plantea con la idea de obtener conocimiento relacionado con la posible actividad de los antígenos glicosilados derivados del helminto cestodo *Taenia crassiceps*, en la regulación del sistema inmune de su hospedero. Los posibles hallazgos además de responder cuestiones básicas en la inmunoparasitología, podrían en un futuro ser útiles en el desarrollo de vacunas más efectivas así como en el desarrollo de inmunomoduladores que resultarían de gran utilidad en la terapia de patologías que tienen su origen y desarrollo en el descontrol de la respuesta inmune.

4.2. Pregunta de investigación

¿Los antígenos glicosilados del helminto *Taenia crassiceps* poseen efectos moduladores sobre el sistema inmune? ¿A través de cuáles mecanismos?

4.3. Hipótesis

Los antígenos glicosilados presentes en el helminto *T. crassiceps* poseen actividad moduladora sobre el sistema inmune, que se refleja en la inducción de respuestas asociadas a la infección con este parásito, tales como la polarización de la respuesta inmune hacia Th2, la disminución en la respuesta linfoproliferativa y la inducción de AAMΦ.

Moléculas con relevancia en las infecciones con helmintos como STAT-6 y TLR-4 están involucradas en la actividad moduladora de los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

4.4. Objetivos Generales

-Determinar si los carbohidratos en el antígeno total soluble de *T. crassiceps* poseen actividad moduladora sobre el sistema inmune.

-Determinar algunos de los mecanismos a través de los cuáles se lleva a cabo esta actividad moduladora.

4.5. Objetivos Particulares

- Determinar el tipo y actividad de la o las poblaciones celulares que responden tempranamente a la inyección de antígenos solubles de *T. crassiceps*
- Determinar el papel de los carbohidratos presentes en los antígenos en esta respuesta temprana
- Evaluar el papel de la molécula STAT-6 en el reclutamiento y actividad de la o las poblaciones celulares que responden tempranamente a la inyección de antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.
- Determinar el tipo de respuesta inmune tardía que se monta hacia un antígeno heterólogo en presencia de los antígenos solubles de *T. crassiceps*.
- Determinar el papel de los carbohidratos en estos antígenos en esta respuesta tardía.
- Evaluar la inducción de macrófagos alternativamente activados en la respuesta temprana y tardía hacia los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.
- Evaluar indirectamente la participación de TLR-4 en la respuesta temprana y tardía hacia los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

5. MATERIALES y MÉTODOS

Estos pueden consultarse en detalle en los artículos anexos que son la parte central de la tesis.

6. RESULTADOS

6.1. Respuesta temprana a antígenos derivados de metacestodos de *T. crassiceps*.

Resumen de hallazgos descritos en el artículo:

Gómez-García L., López-Marín M.L., Saavedra R., Reyes J.L., Rodríguez-Sosa M. and Terrazas L.I. (2005). Intact Glycans from Cestode Antigens are involved in Innate Activation of Myeloid Suppressor Cells. *Parasite Immunology*, 27:395-405.

Algunos aspectos de la respuesta inmediata hacia los antígenos solubles de *T. crassiceps* y en particular el papel de los carbohidratos en este extracto se evaluaron en esta primera parte del proyecto.

-El extracto soluble de metacestodos de *T. crassiceps* contiene glicanos que pueden ser alterados en su porción glicosídica a través del tratamiento con metaperiodato de sodio.

Hallazgos previos en el estudio de antígenos de trematodos y nematodos, reportaron que el tratamiento con metaperiodato de sodio (NaIO₄) modifica la estructura conformacional de los glicanos en los antígenos de estos parásitos, sin afectar la parte proteica de los mismos. Basados en esas observaciones, nosotros desarrollamos un tratamiento similar para los antígenos solubles de *T. crassiceps*. Fueron analizados por SDS-PAGE, el antígeno total soluble derivado de este parásito, el mismo antígeno total soluble pero tratado con NaIO₄, así como el antígeno control del tratamiento con NaIO₄ (mock). Observamos que los tres distintos extractos antigénicos, presentaron un corrimiento de proteínas en el que se visualizaron 25 bandas que conservaron la misma intensidad, tamaño y forma en todos los antígenos (ver en Artículo 1, Fig 1(b), Art 2, Fig 1(a)). En el análisis de Lectin-Blot (para determinar glicoproteínas) se observaron entre 10 y 11 bandas a las cuáles se unió la lectina Concanavalina-A(Con-A) (Art 1, Fig 1(b), Art 2, Fig 1(b)), demostrando que estas bandas corresponden a glicoproteínas presentes en el antígeno soluble de *T. crassiceps*.

El tratamiento del antígeno con NaIO₄ abolió la unión de ConA a estas glicoproteínas, mientras que esta unión permaneció en el extracto control del tratamiento con metaperiodato y en el extracto de antígenos solubles que no recibieron tratamiento alguno (Art 1, Fig 1(b), Art 2, Fig 1(b)). Estos resultados indicaron que las proteínas en el extracto soluble de los metacestodos de *T. crassiceps*, contienen carbohidratos que pueden ser oxidados y que al suceder esto, pierden la configuración necesaria que les permite su unión a otras moléculas como la ConA.

El método de remoción de los carbohidratos en la proteína a través de tratamiento enzimático también fue evaluado. Se observó que a pesar de ser la enzima glicosidasa F altamente efectiva en la remoción de los carbohidratos, este tratamiento también afectó drásticamente la parte proteica de los antígenos ya que diversas bandas desaparecieron por completo o disminuyeron su intensidad cuando se analizaron por PAGE. Por esto, dicho método no resultó de utilidad para nuestros experimentos.

-Inducción de células mieloides supresoras por el antígeno total soluble con carbohidratos intactos de *T. crassiceps*.

Aunque diversos tipos celulares están involucrados en la respuesta hacia los antígenos de helmintos, los AAMØ y células innatas supresoras se han descrito como importantes en estas infecciones en parte debido a que ambos pueden inhibir la proliferación de linfocitos activados. Los AAMØ y células innatas supresoras, pueden expandirse de forma casi inmediata en algunas infecciones con helmintos o tras el inóculo de algunos antígenos de los mismos parásitos.

En este proyecto estudiamos el reclutamiento celular temprano que se da en el sitio de inóculo (peritoneo) del antígeno total soluble con carbohidratos intactos de *T. crassiceps*, analizando el fenotipo de las células reclutadas a través de citometría de flujo y evaluando la posible actividad supresora de estas células peritoneales sobre la proliferación de linfocitos CD90+. Para alcanzar lo anterior, se inyectaron i.p. 50 µg de antígenos solubles de *T. crassiceps* y se recuperaron las células del exudado peritoneal (PECs por sus siglas en inglés) presentes a las 18 horas post-inóculo. En respuesta a la inyección de los antígenos solubles de *T. crassiceps* se observó el reclutamiento/expansión de distintas poblaciones celulares sin embargo; la más característica fue una población de células con marcada expresión de las moléculas F4/80 y Gr1 en su membrana. Entre un 20-25% de las células de tamaño grande y altamente granulosa presentaron dicho fenotipo (Art 1, Fig 2(a)). En cambio en los animales que recibieron solo solución salina, observamos que las células con este fenotipo representaron solamente entre un 8-9% de la población celular total (Art 1, Fig 2(d)), indicando que la expansión de células F480+/Gr1+ es debida a la presencia de los antígenos de *T. crassiceps* en el peritoneo de estos animales.

Células positivas para F480 y en particular para el marcador de células mieloides Gr1 (Ly-6C), han sido reportadas en diversas condiciones en donde el sistema inmune se encuentra bajo estímulos que pueden promover inmunosupresión, desde diversos tipos de cáncer hasta algunas infecciones por protozoarios. A esta población se le ha denominado células mieloides supresoras (MSC) debido a su capacidad para suprimir en todos los casos, la respuesta proliferativa de linfocitos.

A fin de determinar si las células peritoneales inducidas en respuesta a la inyección de antígenos solubles de *T. crassiceps* y con fenotipo de MSC poseían actividad supresora, se llevaron a cabo co-cultivos en relaciones descendentes de las PECs de ratones inyectados con antígenos y linfocitos CD90+ purificados de bazo de animales sanos y estimulados *in vitro* con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28.

Se observó que con respecto a los controles, la proliferación de los linfocitos en respuesta al estímulo policlonal fue significativamente menor en todas las relaciones PECs:CD90+ probadas, donde una relación de 1 PEC versus 4 linfocitos CD90+ inhibió hasta un 90% la proliferación esperada (Art 1, Fig 3).

Ahora bien, dada la importancia que han adquirido los carbohidratos en la regulación de la respuesta inmune en infecciones por helmintos, quisimos evaluar si éstos

podrían estar involucrados tanto en el reclutamiento celular como en el efecto supresor observado en respuesta a los antígenos solubles de *T. crassiceps*. Cuando los carbohidratos en el antígeno total soluble fueron oxidados con NaIO₄ e inoculados en peritoneo, no se observó la expansión de células F4/80+/Gr1+ en las PECs de estos animales, de hecho el número de células con este fenotipo fue marcadamente similar al de los animales control (inyección con sol. salina), encontrándose en ambos grupos un número de células F480+/Gr1+ que equivale a menos de la mitad del de las células expandidas en el caso de la inyección con antígenos con glicanos intactos (Art 1, Fig 2). Este hallazgo indica, que en la respuesta celular temprana hacia los antígenos solubles de *T. crassiceps*, los carbohidratos en dicho extracto poseen un papel esencial. Además, las PECs inducidas en los ratones que recibieron estos antígenos oxidados, no suprimieron la proliferación de los linfocitos CD90+, observándose que éstos proliferaron de manera similar a los linfocitos de cultivos con PECs extraídas de ratones que sólo recibieron solución salina o de manera similar a los linfocitos cultivados sin PECs (Art 1, Fig 3), resultados que implican nuevamente a los glicanos presentes en los antígenos de *T. crassiceps* como esenciales en la expansión temprana de células que en este caso poseen actividad supresora.

En las helmintiasis, varios mecanismos parecen estar involucrados en la baja respuesta linfoproliferativa comúnmente observada. La secreción de factores solubles como IL-10 u NO son algunos de ellos. Debido a que las células reclutadas en respuesta a los antígenos glicosilados poseían actividad supresora sobre la proliferación policlonal de linfocitos, evaluamos si esta supresión se debía a la acción de un componente soluble que estas células pudiesen estar secretando o el mecanismo dependía de moléculas de superficie en las PECs y linfocitos que pudieran entrar en contacto. Para responder esta pregunta, se realizaron nuevamente co-cultivos en los que se colocó una membrana en la placa de cultivo para evitar el contacto entre las PECs y los linfocitos, pero permitiendo a su vez la difusión de factores solubles.

La inhibición de la proliferación observada por las células inducidas post-inóculo del antígeno soluble con carbohidratos intactos, se abolió al no existir contacto entre los linfocitos y las PECs (Art 1, Fig 5(c)), demostrando que el mecanismo a través del cuál las PECs inhiben la proliferación de linfocitos CD90+ depende del contacto entre estas poblaciones.

-Las PECs expandidas en respuesta a los antígenos con carbohidratos intactos de *T. crassiceps* no son AAMØ.

Ya que las células inducidas en respuesta a los antígenos glicosilados fueron positivas para el marcador F480, un marcador asociado al linaje de los macrófagos y que un tipo de macrófagos, los AAMØ, son un tipo celular importante en la inhibición de la respuesta inmune observada en la infección con *T. crassiceps*, era probable que las células expandidas en respuesta a los antígenos glicosilados de este parásito fueran AAMØ y no MSC.

Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR para evaluar la expresión de los genes de la molécula sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), asociada al fenotipo de los CAMØ y de las moléculas Ym1, FIZZ1, Arginasa 1 e IL-10 como marcadores de AAMØ. En estos experimentos se observó, que las PECs de los animales inoculados con antígeno intacto o con antígeno con carbohidratos oxidados o con solución salina, no expresaron de manera diferencial ninguno de los marcadores ya sea de CAMØ o de AAMØ, descartando que las células inducidas en respuesta a los antígenos solubles y glicosilados de *T. crassiceps* sean macrófagos clásica o alternativamente activados (Art 1, Fig 4).

-La inducción y actividad supresora de las MSC inducidas por los antígenos glicosilados de *T. crassiceps* no dependen de STAT-6.

El transductor de señales y activador de la transcripción-6 (STAT-6) es un componente esencial en la señalización de las citocinas IL-4 e IL-13. En particular en la infección con *T. crassiceps*, esta molécula es esencial en la inducción de la respuesta Th2 y en la expansión de los AAMØ .

Para determinar si STAT-6 participaba en la expansión y actividad de las células peritoneales expandidas por los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*, se llevaron a cabo los experimentos antes mencionados pero esta vez utilizando ratones deficientes en el gen STAT-6 y su respectivo control. En ratones STAT-6^(-/-), observamos que la expansión de las células F480+/Gr1+ y la actividad supresora contacto-dependiente de las PECs no se modificó (Art 1, Fig 6), descartando así la participación de esta molécula en el o los mecanismos involucrados en la inducción y actividad de las células peritoneales supresoras.

-La señalización clásica del TLR-4 no participa en la respuesta temprana inducida por los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

Debido a que algunos trabajos recientes implican al receptor TLR-4 en el reconocimiento y actividad de algunos antígenos de helmintos , se evaluó la participación del mismo en la respuesta inmediata hacia los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*. Utilizando ratones de la cepa C3H/HeJ, los cuáles poseen una mutación espontánea del gen *tlr-4* que da como resultado la expresión de un receptor TLR-4 no funcional en su señalización para LPS , se evaluó si la actividad supresora contacto-dependiente de las PECs y la expansión de las células F480+/Gr1+ en respuesta a los antígenos glicosilados de *T. crassiceps* sufría alguna modificación en estos ratones. Los resultados muestran que la expansión de la población F480+/Gr1+ y la actividad supresora de las PECs, se da en igual magnitud en los ratones C3H/HeJ a la expansión observada que en los ratones con genotipo silvestre (Art 1, Fig 5), indicando que la señalización clásica de este receptor no es necesaria para el reclutamiento de la población F480+/Gr1+ o de la actividad supresora de las células peritoneales.

6.2. Modulación de la respuesta inmune adaptativa hacia antígenos heterólogos por antígenos glicosilados derivados de *T. crassiceps*.

Resumen de hallazgos descritos en el artículo:

Gómez-García L., Rivera-Montoya I., Rodríguez-Sosa M. and Terrazas L.I. (2006). Carbohydrate Components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology Research*. **99**: 440-448.

La inducción de una respuesta inmune Th2 es una característica principal en las infecciones por helmintos. Esta respuesta Th2 puede ser dirigida hacia los antígenos de estos parásitos o hacia antígenos no-relacionados, lo que sugiere un posible papel adyuvante de los antígenos de helmintos en la inducción de la respuesta Th2. Así, la segunda parte de este proyecto se enfocó en determinar si los glicanos presentes en el antígeno de *T. crassiceps*, tienen un papel en la inducción de una respuesta adquirida tipo Th2 hacia un antígeno no relacionado como lo es la Ovalbumina (OVA), utilizando como características distintivas de este tipo de respuesta, a la producción elevada de algunas citocinas tales como IL-4 e IL-5 y de los anticuerpos IgE e IgG1 junto a la producción menor de la citocina Th1 IFN- γ y del anticuerpo IgG2a.

-El antígeno total soluble de *T. crassiceps* actúa como adyuvante en la inducción de una respuesta Th2 y esta actividad depende de los carbohidratos en el extracto.

Ratones transgénicos DO11.10, los cuáles expresan un receptor de T con especificidad por el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉, fueron inyectados en tres ocasiones con intervalos de una semana con 50 μ g de antígeno total soluble de *T. crassiceps* o antígeno total soluble tratado con NaIO₄ o antígeno control del tratamiento con NaIO₄ (mock) o solución salina, junto con 10 μ g del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉. Los ratones fueron sacrificados semanalmente vía la vena caudal y una semana después de la última inyección fueron sacrificados y las células de bazo fueron aisladas.

Los títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para OVA fueron determinados por ELISA. En estos análisis se observó, que tanto en el grupo de animales inyectados con el antígeno total con carbohidratos intactos + OVA₃₂₃₋₃₃₉ como en el grupo tratado con mock + OVA₃₂₃₋₃₃₉, hubo un incremento estadísticamente significativo en los títulos del isotipo IgG1 anti-OVA con respecto a los títulos observados tanto en el grupo de animales que recibió antígenos con glicanos alterados + OVA₃₂₃₋₃₃₉, como en el que recibió solución salina + OVA₃₂₃₋₃₃₉ (grupo control). En cambio, el isotipo IgG2a

en los dos primeros grupos, se encontró en títulos similares a los títulos del grupo control. Con respecto a los títulos de IgE total, isotipo característico de la respuesta inducida por los helmintos, se observó nuevamente un incremento significativo en los grupos con glicanos intactos respecto a los otros grupos (Art 2, Fig 2).

Interesantemente, la situación contraria tanto en lo que respecta a IgG1, IgG2a, como a IgE fue observada en el grupo de animales inoculados con antígeno total soluble con los glicanos oxidados donde el título de IgG2a fue significativamente mayor y los de IgG1 e IgE fueron similares a los del grupo control (Art 2, Fig 2), sugiriendo así que los glicanos presentes en el antígeno soluble de *T. crassiceps* juegan un papel en la inducción de anticuerpos asociados con las respuestas Th2 y por ello, en la polarización de la respuesta inmune característica de la infección con este parásito. Así mismo, se determinó si los carbohidratos presentes en los antígenos de *T. crassiceps* inducen la expresión de las citocinas asociadas con una respuesta polarizada hacia Th2 en las células de bazo *in vivo*. Se analizaron por RT-PCR en tiempo real los transcritos de las citocinas características de las respuestas Th1 y Th2 (IFN- γ e IL-4 respectivamente) en estas células y se observó que cuando los animales recibieron antígenos con glicanos que fueron oxidados, en las células de bazo hubo un incremento en los transcritos de IFN- γ mientras que en los transcritos de IL-4 se dio un incremento mínimo. En cambio, en los grupos de animales inoculados con antígeno con carbohidratos intactos ocurrió lo contrario, observándose un incremento importante en los transcritos de IL-4 y uno mucho menor en los de IFN- γ , sugiriendo nuevamente un papel determinante de los glicanos en el desarrollo de la respuesta tipo Th2 (Art 2, Fig 4).

A fin de investigar el alcance del efecto de los carbohidratos en la generación de respuestas Th2, las células de bazo fueron re-estimuladas *in vitro* con OVA y se determinó su capacidad proliferativa así como la producción de citocinas típicas encontradas en la respuesta Th2 contra helmintos tales como IL-4, IL-5 e IL-10 y la de la citocina Th1 IFN- γ .

Las células provenientes de todos los grupos inmunizados y controles proliferaron eficientemente en respuesta a la estimulación *in vitro* con OVA. Sin embargo, se encontró que la secreción de IL-4, IL-5 e IL-10 fue mayor para las células de bazo provenientes de los ratones inoculados con OVA y antígeno con carbohidratos intactos, respecto a los sobrenadantes de células de bazo de ratones inoculados con OVA más antígenos con carbohidratos alterados. En cambio, la producción de IFN- γ se encontró disminuida cuando los carbohidratos estaban intactos y elevada cuando estas moléculas habían sido alteradas, ratificando el papel de los glicanos en los antígenos de *T. crassiceps* como posibles inductores de la respuesta Th2 (Art 2, Fig 5).

-Los carbohidratos en el antígeno total soluble de *T. crassiceps* inducen la expresión de AAM \emptyset y de citocinas anti-inflamatorias *in vivo*.

Para establecer si existía inducción de AAM \emptyset en respuesta a los antígenos de *T. crassiceps* y si tal inducción estaba ligada a los antígenos glicosilados del parásito, se determinó por RT-PCR en tiempo real la expresión relativa de los genes de las moléculas Arginasa 1, de la lectina Ym1 y del receptor de manosa en las células de

bazo de los animales inyectados con los distintos antígenos. La expresión del gen de iNOS se utilizó como marcador de la inducción CAM \emptyset . Además, también se determinó la expresión de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β en las mismas células. Se observó que los antígenos solubles de *T. crassiceps*, inducen la expresión de los marcadores de los AAM \emptyset en bazo y que los glicanos en los antígenos del parásito, son críticos en la inducción de estos marcadores, ya que la expresión de éstos se incrementó en la células de bazo provenientes de los ratones inyectados con antígenos intactos + OVA₃₂₃₋₃₃₉ con respecto a aquéllos que recibieron antígenos oxidados + OVA₃₂₃₋₃₃₉ o al grupo control (Art 2, Fig 6).

La expresión de los transcritos de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β también se encontró elevada en las células de los animales que recibieron el antígeno con glicanos no oxidados, lo cual también sugiere un papel de estos antígenos en la inducción de estos factores anti-inflamatorios (Art 2, Fig 6).

-La señalización clásica del TLR-4 no participa en la respuesta tardía inducida por los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

Se evaluó la posible participación de la molécula TLR-4 en la respuesta Th2/anti-inflamatoria inducida por los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*. Encontramos que en ratones C3H/HeJ, estos antígenos inducen al igual que en ratones Balb/c, el aumento en los títulos del isotipo asociado a Th2, IgG1, así como de la citocina anti-inflamatoria TGF- β y a su vez la disminución de los transcritos de las moléculas pro-inflamatorias IFN- γ e iNOS (Art 2, Fig 7). Estos resultados sugieren, que la señalización clásica del receptor TLR-4 no tiene un papel en la modulación del sistema inmune, que ocurre tras la inyección repetida de los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

7. DISCUSION GENERAL

En este trabajo se estudió la posible actividad moduladora de los carbohidratos presentes en el antígeno total soluble del cestodo *T. crassiceps* sobre el sistema inmune.

Actualmente es claro que las interacciones tempranas entre los elementos del sistema inmune y los patógenos son cruciales en el desarrollo de la respuesta contra éstos . Debido a lo anterior, han sido probadas diversas sustancias derivadas de los helmintos parásitos como posibles activadores de células asociadas a la respuesta inmune innata .

Primeramente, en este estudio observamos que de forma temprana tras la inyección peritoneal de antígenos solubles con glicanos intactos de *T. crassiceps*, se dio una expansión de células peritoneales que expresan las moléculas F480 y Gr1 y que inhibieron la respuesta proliferativa de linfocitos activados. Estas células peritoneales poseen una fuerte actividad supresora ya que la respuesta linfoproliferativa fue inhibida hasta un 50% en la relación de 1PEC:32 linfocitos y hasta un 90% en la relación 1:4.

Interesantemente, cuando los carbohidratos en el antígeno total soluble de *T. crassiceps* son oxidados, la población de células peritoneales tuvo una reducción casi total en la expresión de F4/80 y Gr1 y además no suprimieron la proliferación de linfocitos, observándose una respuesta similar a la de los controles. Esto demostró que los glicanos intactos en el antígeno total soluble de *T. crassiceps*, pueden modular la respuesta inmune innata contra antígenos del parásito, induciendo la expansión de células peritoneales que expresan las moléculas F4/80 y Gr1 y que poseen actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos.

Diversos estudios han reportado la inhibición de la proliferación de células T, por una población con morfología mieloide identificada fenotípicamente como CD11b+/Gr1+ o F4/80+/Gr1+ , las cuáles fueron referidas como células supresoras naturales (MSC). Estas células son conocidas por su acumulación en órganos linfoides bajo condiciones de intensa activación del sistema inmune y parecen mediar al menos en parte, la inmunosupresión en una gran variedad de condiciones tales como diversos tipos de cáncer , tumores , uso de ciclofosfamida o dosis tolerizantes de super-antígenos y algunas infecciones con protozoarios . Por fenotipo y función, es altamente probable que la población F480+/Gr1+ observada en nuestro estudio, pertenezca a esta misma población de células supresoras naturales o MSC. Ya que esta expansión depende de los carbohidratos intactos en el antígeno; el reclutamiento de estas MSC es un fenómeno que es modulado por los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

La rápida expansión de células F4/80+/Gr1+ ha sido previamente reportada usando dos gliconjugados sintéticos que simulan a carbohidratos expresados de manera natural en *S. mansoni* . Los datos obtenidos en este proyecto, refuerzan el papel relevante de los carbohidratos presentes en los antígenos de los helmintos, como componentes moduladores de la respuesta inmune innata.

Sin embargo, contrario a estos estudios en donde los factores solubles IFN- γ y NO fueron los principales elementos responsables de la actividad supresora de las células Gr1, nosotros demostramos que este efecto funciona a través del contacto directo entre las células y no de la liberación de factores solubles, estableciéndose una clara diferencia entre los mecanismos de supresión inducidos entre los carbohidratos de *S. mansoni* y los de *T. crassiceps*.

Alternativamente, es probable que tanto factores solubles como el contacto entre células sean necesarios para la actividad supresora de estas células, ya que existen reportes en los que se observó que el contacto celular es necesario para que las células supresoras secreten las concentraciones necesarias de factores solubles como NO y especies de oxígeno reactivo que directamente inhibirán la proliferación de los linfocitos. Las integrinas CD11b, CD18 y CD29 podrían ser las involucradas en el incremento de estos factores.

Por tanto, aunque sabemos que las células peritoneales que responden a los antígenos glicosilados de *T. crassiceps* inhiben la proliferación de los linfocitos T a través de un mecanismo que requiere el contacto entre las células supresoras y los linfocitos, se requieren más estudios para determinar el mecanismo exacto a través del cuál se da esta supresión.

Los AAM Φ son un tipo celular que se observa comúnmente en las infecciones con helmintos y que tiene un papel importante en las mismas. En particular, la infección peritoneal con *T. crassiceps* induce su expansión y estos AAM Φ , tienen actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos. Esto nos indicaba, que las células peritoneales que responden a los antígenos con glicanos intactos de *T. crassiceps*, que a su vez expresan la molécula F4/80 (marcador típico de macrófagos) y que poseen actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos, pudieran pertenecer al tipo de los AAM Φ y no MSC. Utilizando la expresión de moléculas asociadas a los AAM Φ como marcadores, evaluamos si las células inducidas en respuesta a los antígenos con glicanos intactos de *T. crassiceps* pertenecían a este tipo celular. Observamos que las células peritoneales que responden tempranamente (18 h) a la inoculación de los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*, no expresaron de manera diferencial las moléculas asociadas con el fenotipo de los AAM Φ , descartando de esta forma que dichas células peritoneales pertenezcan a este tipo celular y reafirmando indirectamente su fenotipo de MSC.

En este contexto, durante la cuarta semana de la infección con *T. crassiceps*, Brys y colaboradores observaron la expansión de células CD11b⁺/Gr1⁺ que poseían actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos y que a su vez, expresaban las mismas moléculas asociadas a la activación alternativa de los macrófagos. Por su expresión de Gr1, estas células se definieron como células mieloides supresoras con fenotipo de “activación alternativa”, indicando que es posible observar la expresión conjunta de los marcadores de MSC y de AAM Φ en un tipo celular.

En el presente estudio, aunque las células peritoneales con actividad supresora fueron positivas para el marcador F4/80 y el marcador Gr1, éstas no expresaron los marcadores típicos de “activación alternativa” como en el caso del estudio de Brys y

colaboradores, donde las células Gr1+ son células mieloides supresoras o inclusive como en el caso del estudio de Rodríguez-Sosa et. al., en el cuál las células F480+ son AAMΦ que también poseen actividad supresora . Es factible, que estas discrepancias se deban a que en los trabajos de Brys et al. y Rodríguez-Sosa et al., la expansión de las células positivas para los marcadores de AAMΦ fue inducida por la infección patente con el parásito y el análisis se hizo después de varias semanas del transcurso de la infección, mientras que en este trabajo las células caracterizadas son células presentes en peritoneo tan sólo 18 horas después del inóculo de solo una fracción antigénica del parásito.

Cabe resaltar, que en este estudio también observamos que en el bazo de ratones inyectados en tres ocasiones con intervalos de una semana con los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*, sí hay sobre-expresión de los marcadores típicos de los AAMΦ en los esplenocitos. Es por tanto también probable, que en el transcurso ya sea de la infección o de la exposición con los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*, la expresión de los marcadores Gr1, F4/80 o de los asociados con los AAMΦ se modifique, y lo que observemos a distintos tiempos o en distintos sitios en una infección con *T. crassiceps* o tras la inyección de sus antígenos, sea simplemente un mismo tipo celular en diferentes momentos de maduración o alternativamente, tipos celulares que no comparten un precursor pero que si comparten la expresión de ciertas moléculas. Independientemente de si los tipos celulares observados en este estudio comparten o no el mismo precursor, nuestros hallazgos sí indican que distintas poblaciones celulares con distintas propiedades, pueden inducirse en respuesta a los antígenos glicosilados de *T. crassiceps* y que ésto dependerá del tiempo de exposición a los mismos. En concordancia con ello, Taylor y colaboradores describieron que la infección con *Litosomoides sigmodontis*, puede inducir la expresión de macrófagos F480+ con distintas actividades dependiendo del tiempo de infección transcurrido .

Aunque no se determinó el papel directo de los AAMΦ inducidos por los antígenos con carbohidratos intactos de *T. crassiceps*, es posible que al igual que en la infección, éstos sean un tipo celular que promueve la polarización de la respuesta inmune hacia Th2 y que tiene también, actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos *in vitro* .

Además, la expresión y secreción de TGF-β e IL-10 por los esplenocitos de los animales que recibieron repetidamente el antígeno con carbohidratos intactos, concuerda con la actividad anti-inflamatoria reportada para los AAMΦ . Es por esto probable, que las células que están expresando estas citocinas sean los AAMΦ inducidos en bazo en respuesta a los antígenos con glicanos intactos.

Independientemente del tipo celular que secreta las citocinas IL-10 y TGF-β en los bazos de estos ratones, es claro que los antígenos con glicanos intactos de *T. crassiceps* inducen la expresión de factores anti-inflamatorios que pudiesen contribuir a la depresión de la respuesta inmune que se observa en la infección con este parásito o en la inducción de la respuesta Th2 al influir negativamente en la respuesta Th1. De hecho, en la infección con *T. crassiceps* se observa una elevada producción de IL-10, de la cual depende la marcada disminución de la respuesta Th1 .

STAT-6 es una molécula importante en las infecciones con helmintos debido a su papel en la inducción de respuestas Th2 y en la expresión de AAMΦ con actividad supresora sobre la proliferación de linfocitos . En la infección peritoneal con *T. crassiceps* esta molécula también participa en la inducción de dichos fenómenos .

En este trabajo se evaluó si STAT-6, es una molécula que esté involucrada en la respuesta temprana hacia los antígenos glicosilados de *T. crassiceps* es decir, con la inducción de la población F480+/Gr1+ y con la actividad supresora contacto dependiente de las células peritoneales previamente descritas en este trabajo.

Observamos que ni la expansión de las células F480+/Gr1+, ni la actividad supresora contacto-dependiente, se modificaron en ratones STAT-6^(-/-) inoculados con el extracto antigénico con carbohidratos intactos de *T. crassiceps*, descartando el papel de esta molécula en la señalización requerida para la expansión de las células mieloides con actividad supresora. A su vez, esta observación concuerda con nuestros resultados previos donde las PECs inducidas en respuesta a los antígenos con glicanos intactos, no expresan los marcadores de AAMØ ya que se sabe, que la molécula STAT-6 es necesaria para la expresión de este tipo de macrófagos .

Aunque en algunos estudios se ha observado que la secreción de IL-4 está involucrada en la inhibición de la proliferación de linfocitos probablemente a través de la inducción de AAMØ , indirectamente nuestros estudios indican que es poco probable que esta citocina juegue un papel en la inducción de las células peritoneales y en su actividad supresora ya que las PECs provenientes de los ratones STAT-6^(-/-) se expanden de igual forma e inhiben la proliferación de los linfocitos al igual que las PECs de ratones silvestres.

En la primera parte de este trabajo, observamos que los carbohidratos intactos en el antígeno total soluble de *T. crassiceps* juegan un papel determinante en la modulación de algunas de las características de la respuesta inmune inicial contra los antígenos de este parásito.

Nuestro segundo enfoque consistió en determinar si el extracto soluble de antígenos de *T. crassiceps* y en particular los carbohidratos presentes en éste, participan en la modulación de la respuesta inmune tardía la cual en esta infección y en general en las infecciones por helmintos, se caracteriza por la polarización de la respuesta inmune hacia un tipo Th2 con producción elevada de citocinas tales como IL-4, IL-5 e IL-10 y de los anticuerpos IgE e IgG1 así como la disminución paralela de la respuesta Th1 . Como se mencionó anteriormente, esta respuesta Th2 puede extenderse a la respuesta que se monta hacia otros antígenos, sugiriendo que estas moléculas poseen la capacidad de modular el sistema inmune del huésped actuando como adyuvantes en la polarización hacia Th2 . En este trabajo evaluamos la actividad adyuvante de los antígenos con glicanos intactos de *T. crassiceps*, en la inducción de una respuesta Th2.

Observamos, que posterior a la inyección con antígenos de *T. crassiceps* que poseen carbohidratos intactos más un antígeno heterólogo, en este caso OVA₃₂₃₋₃₃₉, ocurrió un incremento sistémico en los títulos de los anticuerpos OVA-específicos de la

subclase IgG1 y un aumento en los niveles de IgE total, así como en la expresión de las citocinas IL-4 e IL-5 en esplenocitos, parámetros que nos indican que una respuesta Th2 está presente en estos ratones. Esta respuesta Th2 se dio paralelamente a la inhibición de la respuesta Th1 ya que estos mismos ratones muestran una disminución del isotipo IgG2a y de la citocina IFN- γ .

La inducción de la respuesta Th2, resultó dependiente de los carbohidratos presentes en el antígeno soluble de *T. crassiceps*, ya que el tratamiento con metaperiodato invierte esta respuesta observándose la inducción de una respuesta Th1 y la inhibición de la respuesta Th2 cuando los carbohidratos perdieron su configuración tridimensional.

La capacidad de polarizar la respuesta hacia Th2, mediada por los carbohidratos en el extracto antigénico, estaba “impresa” en los esplenocitos y es antígeno-específica ya que cuando estas células fueron re-estimuladas con OVA, se observaron concentraciones elevadas de IL-4, IL-5 e IL-10 en ratones inoculados con OVA más antígenos con carbohidratos intactos, respecto a los sobrenadantes de células de bazo de ratones inoculados con OVA más antígenos con carbohidratos oxidados. En cambio, la producción de IFN- γ disminuyó cuando los carbohidratos estaban intactos e incrementó cuando estas moléculas fueron oxidadas.

Estos resultados nos indican claramente que una respuesta del tipo Th2, concomitante a la supresión de la respuesta Th1, predomina tras la inyección repetida de los antígenos solubles de *T. crassiceps* y sugieren que esta modulación depende de los carbohidratos presentes en dichos antígenos. Estos glicanos intactos, no solo favorecen una fuerte respuesta Th2 sino que también juegan un papel en la inhibición de la respuesta Th1 que se induce cuando estos carbohidratos han sido alterados. Es muy probable que esta inhibición de la respuesta Th1, se de a través de la inducción de las citocinas IL-4 e IL-10 por los carbohidratos en el extracto antigénico.

Así mismo, se observa que esta modulación puede extenderse aún a la respuesta contra un antígeno no-relacionado a los antígenos del parásito lo que sugiere que es a través de la acción adyuvante de los carbohidratos presentes en el antígeno soluble que se da esta modulación de la respuesta. Ambas observaciones están en concordancia con las hechas con moléculas de *S. mansoni* y *B. malayi*, donde el tratamiento de sus antígenos con metaperiodato de sodio inhibe su actividad como inductores de respuestas Th2, actividad que al menos para el caso de los glicanos de *S. mansoni* parece depender de su papel como adyuvantes. Además, recientemente se describió que los metacestodos de *T. crassiceps* poseen N-glicanos en donde la estructura Fuca1-3GlcNAc se expresa mayormente. Esta estructura también está presente en los antígenos de los helmintos *Haemonchus contortus* y *S. mansoni*. Se ha reportado, que este epítipo es inmunogénico y puede actuar como adyuvante inductor de respuestas Th2. Por tanto, es plausible que esta u otras estructuras sacáridas similares presentes en los antígenos solubles de *T. crassiceps*, pudiesen ser las involucradas en la modulación de la respuesta inmune descrita en este trabajo y en particular en la generación de la respuesta Th2. Aun cuando el mecanismo exacto por el cuál los glicanos de los helmintos inducen este tipo de respuesta no está del todo establecido, existen diversos estudios que indican que el reconocimiento de

estos antígenos por APCs y en particular las DCs puede modificar la actividad de estas influyendo así en su capacidad de inducir respuestas tipo Th2 .

De forma similar a la bien conocida interacción entre los distintos TLRs y componentes bacteriales, parásitos intracelulares y virus , existen algunos estudios que sugieren como posibles receptores de las moléculas de helmintos a TLR-2 , TLR-3 y TLR-4 y se ha propuesto a éstos como componentes importantes en los efectos moduladores de los antígenos de helmintos sobre el sistema inmune . Por ejemplo, TLR-4 pudiera estar involucrado en la polarización de la respuesta hacia Th2 inducida por el glicano de *S. mansoni* LFNPIII .

Para elucidar si el receptor TLR-4 jugaba un papel en la modulación de la respuesta inmune de los glicanos intactos en el antígeno soluble de *T. crassiceps*, ratones C3H/HeJ fueron inoculados con estos antígenos. Interesantemente, en estos ratones al igual que en los de la cepa Balb/c, también se observó el reclutamiento y actividad de la población mieloide con actividad supresora, así como la inducción preferencial de anticuerpos asociados a la respuesta Th2, el aumento en la expresión de la citocina anti-inflamatoria TGF- β y la disminución concomitante de factores pro-inflamatorios IFN- γ e iNOS. Estos resultados nos sugirieron que las moléculas presentes en el antígeno soluble de los cestodos y en particular los glicanos, no son reconocidos a través del receptor TLR-4 y que no es la activación a través de este receptor la responsable de la actividad supresora de las PECs. Acorde con nuestros hallazgos, se ha reportado que la glicoproteína de excreción-secreción ES-62 perteneciente al nematodo *A. viteae* y que posee actividades inmunomoduladoras, mantiene su función sobre células dendríticas y macrófagos provenientes de ratones mutantes C3H/HeJ .

Sin embargo, en ratones TLR-4^(-/-) la función moduladora de esta misma proteína está ausente , lo que sugiere que la ruta de señalización utilizada por la molécula de *A. viteae* es distinta a la ruta de señalización clásica utilizada por LPS, probablemente a través del uso de un co-receptor o moléculas accesorias , situación que pudiese darse también para el caso de los antígenos de *T. crassiceps* utilizados en este estudio.

Más aún, aunque Thomas y colaboradores asociaron la actividad del glicano LNFPIII de *S. mansoni* sobre las DCs y la respuesta Th2 con la molécula TLR-4 , el estudio de Kane y colaboradores indica que la actividad de los antígenos de *S. mansoni* no depende de TLR-4, 2 o inclusive de la molécula MyD88 . Por tanto, aunque diversos trabajos indican que los TLRs pudiesen tener un papel en el reconocimiento y actividad moduladora de los antígenos de helmintos , la evidencia acerca del papel de estos receptores aún es controversial .

Aunque en nuestro estudio los resultados sugieren que TLR-4 no está involucrado en la actividad inmunomoduladora de los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*, el uso de un modelo en el cuál el receptor TLR-4 aún puede ser funcional, no nos permite descartar la posibilidad de que esta molécula tenga un papel en el reconocimiento y actividad de tales antígenos. Este aspecto requiere de mayor exploración.

En cualquier caso, si los TLRs reconocen a las moléculas de helmintos, queda por definir la existencia o no de PAMPs en estos parásitos, y en este sentido; los carbohidratos presentes en sus antígenos son candidatos plausibles. Así mismo, es

necesario dilucidar el mecanismo a través del cuál un receptor del tipo de los Toll, que generalmente cuando se unen a sus ligandos disparan la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α), cuando se unen a moléculas provenientes de helmintos esta señal cambia y se observa una disminución dramática en la producción de estas citocinas pro-inflamatorias y en algunos casos, su inhibición total.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos afirmar que los carbohidratos en los antígenos del cestodo *T. crassiceps*, poseen actividad moduladora sobre el sistema inmune del huésped. Esta modulación es de amplio espectro ya que influye en diversos elementos de la respuesta inmune y puede incluso modificar la respuesta hacia antígenos no-relacionados con el parásito. Es interesante resaltar que los antígenos glicosilados en el antígeno total soluble de *T. crassiceps*, son suficientes para inducir algunas de las características más importantes descritas para la infección con este parásito, como lo es la expresión de AAM Φ y la respuesta polarizada hacia Th2. Además, la inducción de células mieloides con actividad supresora en respuesta a estos mismos antígenos, pudiera ser uno de los mecanismos que *in vivo* contribuye con la baja respuesta linfoproliferativa que se observa consistentemente en la infección. Más aún, siendo estas características anti-inflamatorias permisivas para la sobrevivencia de *T. crassiceps*, nuestros resultados sugieren que los carbohidratos en los antígenos de este parásito juegan un papel importante en su desarrollo y persistencia dentro de su hospedero.

Este trabajo hace relevante el estudio de glicoconjugados específicos de *T. crassiceps* en la modulación de respuestas inflamatorias, así como los posibles receptores de dichas moléculas parasitarias y aún más importante, sus células blanco. También es posible que estas moléculas puedan encontrarse en productos excretados/secretados por el parásito, haciendo así factible la modulación de elementos de la respuesta inmune que no se encuentren necesariamente en contacto con el parásito.

El estudio de los receptores, células blanco y efectos de tales moléculas glicosiladas, será de gran importancia para determinar los mecanismos de colonización de este helminto parásito, así como el potencial uso de sus glicoconjugados en la modulación de la respuesta inmune con aplicaciones terapéuticas.

8. CONCLUSIONES

-El antígeno total soluble del parásito *T. crassiceps*, contiene glicanos que de forma temprana expanden una población de células peritoneales mieloides F480+/Gr1+. Estas células peritoneales, poseen actividad supresora *in vitro* sobre la proliferación de linfocitos previamente activados y esta supresión, requiere del contacto entre los tipos celulares. La molécula STAT-6, no participa en la expansión o actividad de estas células.

-Tras su inyección repetida, este extracto antigénico promueve la polarización de la respuesta inmune contra el antígeno heterólogo OVA hacia Th2 y, en esta actividad los carbohidratos presentes en los antígenos también juegan un papel determinante. -Así, el antígeno total soluble de *T. crassiceps* y en particular los glicanos presentes en éste, actúan como adyuvantes promoviendo la respuesta Th2 OVA específica. -La exposición repetida a estos glicanos intactos induce la expresión en bazo de marcadores de la activación alternativa de macrófagos indicando que esta población celular (AAMΦ), puede expresarse en respuesta a la inyección de estos antígenos y no sólo durante la infección con el parásito. Este mismo extracto antigénico también puede inducir la producción de citocinas anti-inflamatorias.

-Aunque en ratones C3H/HeJ se observó una respuesta muy similar a la observada en los ratones Balb/c, son necesarios más estudios para definir si TLR-4 es una molécula involucrada en el reconocimiento y actividad inmunomoduladora de los antígenos glicosilados de *T. crassiceps*.

-Estos hallazgos en conjunto, revelan que los glicanos que se expresan en los metacestodos de *T. crassiceps*, pueden modular el sistema inmune actuando sobre diversos tipos celulares dependiendo del tiempo de exposición a tales antígenos. Debido a que en general estos glicanos promueven la expresión de elementos con actividad anti-inflamatoria, esto abre la posibilidad de su uso terapéutico en patologías donde exista una exacerbación de respuestas pro-inflamatorias medidas por Th1.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Maizels, R.M., et al., *Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations*. Nature, 1993. **365**(6449): p. 797-805.
2. Plaisier, A.P., et al., *The reproductive lifespan of Onchocerca volvulus in West African savanna*. Acta Trop, 1991. **48**(4): p. 271-84.
3. Graham, S.P., et al., *Down-regulated lymphoproliferation coincides with parasite maturation and with the collapse of both gamma interferon and interleukin-4 responses in a bovine model of onchocerciasis*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4313-9.
4. Paterson, J.C., et al., *Modulation of a heterologous immune response by the products of Ascaris suum*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 6058-67.
5. Maizels, R.M., et al., *Immune evasion genes from filarial nematodes*. Int J Parasitol, 2001. **31**(9): p. 889-98.
6. Molinari, J.L., et al., *Taenia solium: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro*. Exp Parasitol, 2000. **94**(3): p. 133-42.
7. Leid, R.W., et al., *Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, taeniaestatin*. J Immunol, 1986. **137**(8): p. 2700-2.
8. Baig, S., et al., *Characterization of excretory/secretory endopeptidase and metallo-aminopeptidases from Taenia crassiceps metacestodes*. J Parasitol, 2005. **91**(5): p. 983-7.
9. Harnett, W. and M.M. Harnett, *Molecular basis of worm-induced immunomodulation*. Parasite Immunol, 2006. **28**(10): p. 535-43.
10. Babu, S., et al., *Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3248-56.
11. Jenkins, S.J., et al., *Modulation of the host's immune response by schistosome larvae*. Parasite Immunol, 2005. **27**(10-11): p. 385-93.
12. Terrazas, L.I., et al., *The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 5294-303.
13. Atochina, O., et al., *A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 2001. **167**(8): p. 4293-302.
14. Tawill, S., et al., *Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 398-407.
15. Faveeuw, C., et al., *Schistosome N-glycans containing core alpha 3-fucose and core beta 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice*. Eur J Immunol, 2003. **33**(5): p. 1271-81.

16. Okano, M., et al., *Lacto-N-fucopentaose III found on Schistosoma mansoni egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 442-50.
17. Van der Kleij, D., et al., *Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc*. J Infect Dis, 2002. **185**(4): p. 531-9.
18. Kassai, T., *Veterinary helminthology*. 1999, Oxford: Butterworth-Heinemann. xxviii, 260 s.
19. Kennedy, M.J., *Helminths and Protozoa of terrestrial mammals*. 1988. 90 s.
20. Gosálbez, J., et al., *Mamíferos y helmintos : volumen homenaje al prof. Herman Kahmann*. 1987, Barcelona: Ketres. 338 p.
21. Maizels, R.M., et al., *Helminth parasites--masters of regulation*. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 89-116.
22. Mahanty, S., et al., *IL-4- and IL-5-secreting lymphocyte populations are preferentially stimulated by parasite-derived antigens in human tissue invasive nematode infections*. J Immunol, 1993. **151**(7): p. 3704-11.
23. Pearce, E.J. and S.L. Reiner, *Induction of Th2 responses in infectious diseases*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(4): p. 497-504.
24. King, C.L., *Transmission intensity and human immune responses to lymphatic filariasis*. Parasite Immunol, 2001. **23**(7): p. 363-71.
25. King, C.L., et al., *Immunologic tolerance in lymphatic filariasis. Diminished parasite-specific T and B lymphocyte precursor frequency in the microfilaremic state*. J Clin Invest, 1992. **89**(5): p. 1403-10.
26. Harnett, W. and M.M. Harnett, *What causes lymphocyte hyporesponsiveness during filarial nematode infection?* Trends Parasitol, 2006. **22**(3): p. 105-10.
27. Noel, W., et al., *Alternatively activated macrophages during parasite infections*. Trends Parasitol, 2004. **20**(3): p. 126-33.
28. Satoguina, J., et al., *Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis)*. Microbes Infect, 2002. **4**(13): p. 1291-300.
29. Hoerauf, A., et al., *Immunomodulation by filarial nematodes*. Parasite Immunol, 2005. **27**(10-11): p. 417-29.
30. Kullberg, M.C., et al., *Infection with Schistosoma mansoni alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen*. J Immunol, 1992. **148**(10): p. 3264-70.
31. Stewart, G.R., et al., *Onchocerciasis modulates the immune response to mycobacterial antigens*. Clin Exp Immunol, 1999. **117**(3): p. 517-23.
32. Pearlman, E., et al., *Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses*. J Immunol, 1993. **151**(9): p. 4857-64.

33. Actor, J.K., et al., *Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic T-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(3): p. 948-52.
34. Cooper, P.J., et al., *Human onchocerciasis and tetanus vaccination: impact on the postvaccination antitetanus antibody response*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5951-7.
35. Cooper, P.J., et al., *Human infection with Ascaris lumbricoides is associated with a polarized cytokine response*. J Infect Dis, 2000. **182**(4): p. 1207-13.
36. Gause, W.C., J.F. Urban, Jr., and M.J. Stadecker, *The immune response to parasitic helminths: insights from murine models*. Trends Immunol, 2003. **24**(5): p. 269-77.
37. Doetze, A., et al., *Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift*. Int Immunol, 2000. **12**(5): p. 623-30.
38. Faquim-Mauro, E.L. and M.S. Macedo, *The immunosuppressive activity of Ascaris suum is due to high molecular weight components*. Clin Exp Immunol, 1998. **114**(2): p. 245-51.
39. Boitelle, A., et al., *Investigating the impact of helminth products on immune responsiveness using a TCR transgenic adoptive transfer system*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 447-54.
40. Yan, Y., et al., *Down-regulation of murine susceptibility to cerebral malaria by inoculation with third-stage larvae of the filarial nematode Brugia pahangi*. Parasitology, 1997. **114** (Pt 4): p. 333-8.
41. Whelan, M., et al., *A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6453-60.
42. Okano, M., et al., *Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on Schistosoma mansoni egg antigens*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6712-7.
43. Holland, M.J., et al., *Proteins secreted by the parasitic nematode Nippostrongylus brasiliensis act as adjuvants for Th2 responses*. Eur J Immunol, 2000. **30**(7): p. 1977-87.
44. Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh, *Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 733-44.
45. Manoury, B., et al., *Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite Brugia malayi, inhibits class II MHC-restricted antigen processing*. Curr Biol, 2001. **11**(6): p. 447-51.
46. Goodridge, H.S., et al., *Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode Acanthocheilonema viteae*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 940-5.

47. Donnelly, S., et al., *Thioredoxin peroxidase secreted by Fasciola hepatica induces the alternative activation of macrophages*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 166-73.
48. Hartmann, S. and R. Lucius, *Modulation of host immune responses by nematode cystatins*. Int J Parasitol, 2003. **33**(11): p. 1291-302.
49. Semnani, R.T., et al., *Filarial antigens impair the function of human dendritic cells during differentiation*. Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5813-22.
50. Van der Kleij, D., et al., *A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48122-9.
51. Holland, M.J., et al., *Th2 induction by Nippostrongylus secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC Class I-related receptors*. Immunol Lett, 2005. **96**(1): p. 93-101.
52. Balic, A., et al., *Selective maturation of dendritic cells by Nippostrongylus brasiliensis-secreted proteins drives Th2 immune responses*. Eur J Immunol, 2004. **34**(11): p. 3047-59.
53. Ferreira, A.P., et al., *Immunization with Ascaris suum extract impairs T cell functions in mice*. Cell Immunol, 1995. **162**(2): p. 202-10.
54. Deehan, M.R., et al., *Immunomodulatory properties of Ascaris suum glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects*. Parasite Immunol, 2002. **24**(9-10): p. 463-9.
55. Silva, S.R., et al., *Immunosuppressive components of Ascaris suum down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism*. Eur J Immunol, 2006. **36**(12): p. 3227-37.
56. Soares, M.F. and C.A. Araujo, *Helminth products as a potential therapeutic strategy for inflammatory diseases*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2008. **7**(2): p. 113-8.
57. Goodridge, H.S., et al., *Subversion of immunological signalling by a filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product*. Cell Signal, 2005. **17**(1): p. 11-6.
58. Harnett, W., et al., *Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein*. Parasite Immunol, 1999. **21**(12): p. 601-8.
59. Goodridge, H.S., et al., *In vivo exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype*. Immunology, 2004. **113**(4): p. 491-8.
60. Wilson, E.H., et al., *Hyporesponsiveness of murine B lymphocytes exposed to the filarial nematode secreted product ES-62 in vivo*. Immunology, 2003. **109**(2): p. 238-45.
61. Marshall, F.A., et al., *ES-62, an immunomodulator secreted by filarial nematodes, suppresses clonal expansion and modifies effector function of heterologous antigen-specific T cells in vivo*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5817-26.

62. Rigano, R., et al., *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun*, 2007. **75**(4): p. 1667-78.
63. Couper, K.N., et al., *ES-62 is unable to modulate Toxoplasma gondii-driven Th1 responses and pathology*. *Parasite Immunol*, 2005. **27**(4): p. 147-50.
64. Al-Riyami, L., et al., *Failure of ES-62 to inhibit T-helper type 1 responses to other filarial nematode antigens*. *Parasite Immunol*, 2008. **30**(5): p. 304-8.
65. Obregon-Henao, A., et al., *The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of Taenia solium metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD*. *Mol Biochem Parasitol*, 2001. **114**(2): p. 209-15.
66. Dell, A., et al., *Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1455**(2-3): p. 353-62.
67. Hokke, C.H. and A.M. Deelder, *Schistosome glycoconjugates in host-parasite interplay*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(8): p. 573-87.
68. Kariuki, T.M., et al., *Antibodies elicited by the secretions from schistosome cercariae and eggs are predominantly against glycan epitopes*. *Parasite Immunol*, 2008. **30**(10): p. 554-62.
69. Van Die, I., et al., *Interaction of schistosome glycans with the host immune system*. *Adv Exp Med Biol*, 2005. **564**: p. 9-19.
70. 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.
71. Kane, C.M., et al., *Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7454-61.
72. Vella, A.T., M.D. Hulsebosch, and E.J. Pearce, *Schistosoma mansoni eggs induce antigen-responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level*. *J Immunol*, 1992. **149**(5): p. 1714-22.
73. Cook, G.A., et al., *Lymphokine expression in granulomas of Schistosoma mansoni-infected mice*. *Cell Immunol*, 1993. **152**(1): p. 49-58.
74. Faveeuw, C., et al., *Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to Schistosoma mansoni glycoconjugates in mice*. *J Immunol*, 2002. **169**(2): p. 906-12.
75. Alvarez, J.I., J. Rivera, and J.M. Teale, *Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. **2**(4): p. e218.
76. Kodolja, V., et al., *Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages*. *Immunobiology*, 1997. **197**(5): p. 478-93.
77. Song, E., et al., *Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts*. *Cell Immunol*, 2000. **204**(1): p. 19-28.
78. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 23-35.

79. Herbert, D.R., et al., *Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology*. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 623-35.
80. Schebesch, C., et al., *Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro*. *Immunology*, 1997. **92**(4): p. 478-86.
81. Loke, P., et al., *IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype*. *BMC Immunol*, 2002. **3**: p. 7.
82. Raes, G., et al., *FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages*. *Dev Immunol*, 2002. **9**(3): p. 151-9.
83. Raes, G., et al., *Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2002. **71**(4): p. 597-602.
84. Anthony, R.M., et al., *Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites*. *Nat Med*, 2006. **12**(8): p. 955-60.
85. Reece, J.J., M.C. Siracusa, and A.L. Scott, *Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages*. *Infect Immun*, 2006. **74**(9): p. 4970-81.
86. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability*. *Infect Immun*, 2002. **70**(7): p. 3656-64.
87. Dzik, J.M., et al., *A non-classical type of alveolar macrophage response to Trichinella spiralis infection*. *Parasite Immunol*, 2004. **26**(4): p. 197-205.
88. Reyes, J.L. and L.I. Terrazas, *The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections*. *Parasite Immunol*, 2007. **29**(12): p. 609-19.
89. Pearce, E.J., C.M. Kane, and J. Sun, *Regulation of dendritic cell function by pathogen-derived molecules plays a key role in dictating the outcome of the adaptive immune response*. *Chem Immunol Allergy*, 2006. **90**: p. 82-90.
90. Taylor, M.D., et al., *Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4924-33.
91. Loke, P., et al., *Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(9): p. 2669-78.
92. Loke, P., A.S. MacDonald, and J.E. Allen, *Antigen-presenting cells recruited by Brugia malayi induce Th2 differentiation of naive CD4(+) T cells*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(4): p. 1127-35.
93. Taylor, M.D., et al., *F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection*. *J Immunol*, 2006. **176**(11): p. 6918-27.

94. Gabrilovich, D.I., et al., *Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5398-406.
95. Almand, B., et al., *Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 678-89.
96. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
97. Cauley, L.S., et al., *Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6056-66.
98. Pelaez, B., et al., *Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6608-15.
99. Mordue, D.G. and L.D. Sibley, *A novel population of Gr-1+-activated macrophages induced during acute toxoplasmosis*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1015-25.
100. Voisin, M.B., et al., *Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5487-92.
101. Goni, O., P. Alcaide, and M. Fresno, *Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells*. Int Immunol, 2002. **14**(10): p. 1125-34.
102. Dupuis, M., et al., *Gr-1+ myeloid cells lacking T cell protein tyrosine phosphatase inhibit lymphocyte proliferation by an IFN-gamma- and nitric oxide-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 726-32.
103. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 989-99.
104. Jenkins, S.J., et al., *Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways*. Int Immunol, 2005. **17**(11): p. 1409-18.
105. 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.
106. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
107. O'Neill, L.A. and C. Greene, *Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 650-7.
108. Dunne, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense*. Sci STKE, 2003. **2003**(171): p. re3.

109. Anderson, K.V., *Toll signaling pathways in the innate immune response*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(1): p. 13-9.
110. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 253-8.
111. Krug, A., et al., *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3026-37.
112. Sieling, P.A., et al., *Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 194-200.
113. Aksoy, E., et al., *Double-stranded RNAs from the helminth parasite Schistosoma activate TLR3 in dendritic cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 277-83.
114. Thomas, P.G., et al., *Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5837-41.
115. Goodridge, H.S., et al., *Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 284-93.
116. Kane, C.M., E. Jung, and E.J. Pearce, *Schistosoma mansoni Egg Antigen-Mediated Modulation of Toll-Like Receptor (TLR)-Induced Activation Occurs Independently of TLR2, TLR4, and MyD88*. Infect Immun, 2008. **76**(12): p. 5754-9.
117. Kotanides, H. and N.C. Reich, *Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25555-61.
118. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
119. Takeda, K., et al., *Essential role of Stat6 in IL-4 signalling*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 627-30.
120. Finkelman, F.D., et al., *Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2303-10.
121. Zhu, J., et al., *Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7276-81.
122. Kaplan, M.H., et al., *Th2 cells are required for the Schistosoma mansoni egg-induced granulomatous response*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1850-6.
123. Urban, J.F., Jr., et al., *IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 255-64.
124. Dorais, F.J. and G.W. Esch, *Growth rate of two Taenia crassiceps strains*. Exp Parasitol, 1969. **25**(1): p. 395-8.
125. Culbreth, K.L., G.W. Esch, and R.E. Kuhn, *Growth and development of larval Taenia crassiceps (Cestoda). 3. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of 14 C-leucine*. Exp Parasitol, 1972. **32**(2): p. 272-81.

126. Chernin, J., *The growth of the metacestodes of Taenia crassiceps in white mice*. J Helminthol, 1975. **49**(4): p. 297-300.
127. Blair, L.S. and W.C. Campbell, *The rat (Rattus norvegicus) as a laboratory host for the metacestodes of Taenia crassiceps*. J Parasitol, 1976. **62**(1): p. 163-4.
128. Chau, C.Y. and R.S. Freeman, *Intraperitoneal passage of Taenia crassiceps in rats*. J Parasitol, 1976. **62**(5): p. 837-9.
129. Huerta, L., et al., *Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by Taenia crassiceps metacestodes*. J Parasitol, 1992. **78**(3): p. 471-6.
130. Frago, G., et al., *Genetic control of susceptibility to Taenia crassiceps cysticercosis*. Parasitology, 1996. **112 (Pt 1)**: p. 119-24.
131. Padilla, A., et al., *Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with Taenia crassiceps*. J Parasitol, 2001. **87**(3): p. 591-9.
132. Chernin, J., *The growth and antigenicity of the metacestodes of Taenia crassiceps in several different strains of rats*. J Helminthol, 1981. **55**(3): p. 209-22.
133. Terrazas, L.I., et al., *Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by Taenia crassiceps*. Parasitol Res, 1999. **85**(2): p. 135-41.
134. Sciutto, E., et al., *Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental Taenia crassiceps infection*. Infect Immun, 1995. **63**(6): p. 2277-81.
135. Terrazas, L.I., et al., *Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps)*. J Parasitol, 1998. **84**(1): p. 74-81.
136. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite Taenia crassiceps is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3135-9.
137. Rodriguez, M., et al., *Susceptibility to Trypanosoma cruzi is modified by a previous non-related infection*. Parasite Immunol, 1999. **21**(4): p. 177-85.
138. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by Leishmania major and Leishmania mexicana infection, a role for alternatively activated macrophages*. Cell Immunol, 2006. **242**(2): p. 61-71.
139. Lamsam, S. and D.P. McManus, *Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of Taenia crassiceps*. Parasitology, 1990. **101 Pt 1**: p. 115-25.
140. Siebert, A.E., Jr., A.H. Good, and J.E. Simmons, *Kinetics of primary and secondary infections with Taenia crassiceps metacestodes (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda: Cyclophyllidea)*. Int J Parasitol, 1978. **8**(1): p. 39-43.
141. Trimble, J.J., 3rd and R.D. Lumsden, *Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in Taenia crassiceps larvae*. J Parasitol, 1975. **61**(4): p. 665-76.

142. Lee, J.J., et al., *Mass spectrometric characterisation of Taenia crassiceps metacestode N-glycans*. Mol Biochem Parasitol, 2005. **143**(2): p. 245-9.
143. Pardini, A.X., et al., *Use of Taenia crassiceps cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (Taenia solium)*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(1): p. 190-3.
144. Wuhrer, M., et al., *The parasitic trematode Fasciola hepatica exhibits mammalian-type glycolipids as well as Gal(beta1-6)Gal-terminating glycolipids that account for cestode serological cross-reactivity*. Glycobiology, 2004. **14**(2): p. 115-26.
145. Dissanayake, S., et al., *Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by Taenia crassiceps metacestode carbohydrates*. Immunology, 2002. **107**(4): p. 411-9.
146. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
147. Vogel, S.N., et al., *Cutting edge: functional characterization of the effect of the C3H/HeJ defect in mice that lack an Lpsn gene: in vivo evidence for a dominant negative mutation*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5666-70.
148. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
149. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
150. Li, Q., et al., *Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1130-9.
151. Sinha, P., V.K. Clements, and S. Ostrand-Rosenberg, *Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 636-45.
152. Oshiro, T.M., M.S. Macedo, and M.F. Macedo-Soares, *Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of Ascaris suum*. Inflamm Res, 2005. **54**(1): p. 17-21.
153. Terrazas, L.I., et al., *Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis*. Int J Parasitol, 2005. **35**(13): p. 1349-58.
154. Brys, L., et al., *Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6095-104.
155. MacDonald, A.S., et al., *Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferative suppression by filarial parasites*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 4124-32.
156. Van Die, I., et al., *Core alpha1-->3-fucose is a common modification of N-glycans in parasitic helminths and constitutes an important epitope for IgE*

from Haemonchus contortus infected sheep. FEBS Lett, 1999. **463**(1-2): p. 189-93.

157. Schnare, M., et al., *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.

10. ANEXOS

Original Article

Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells

L. GÓMEZ-GARCÍA,^{1,2} L. M. LÓPEZ-MARÍN,³ R. SAAVEDRA,³ J. L. REYES,¹ M. RODRÍGUEZ-SOSA¹
& L. I. TERRAZAS^{1,2}

¹Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),

²Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, and ³ Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico

SUMMARY

During helminthic infections, strong Th2 type-biased responses concomitant with impaired cell-proliferative responses to parasitic and unrelated antigens are major immunological hallmarks. Parasite glycan structures have been proposed to play a role in modulating these responses. To understand early events related to immune modulation during cestode infection, we have examined the role of intact glycans of antigens from Taenia crassiceps in the recruitment of innate cells. Soluble antigens from this cestode contained higher levels of carbohydrates than proteins. Intraperitoneal injection of the antigens rapidly recruited a cell population expressing F4/80⁺/Gr1⁺ surface markers, which adoptively suppressed naïve T-cell proliferation in vitro in response to anti-CD3/CD28 MAb stimulation in a cell-contact dependent manner. Soluble antigens with altered glycans by treatment with sodium periodate significantly reduced the recruitment of F4/80⁺/Gr1⁺ cells, concomitantly their suppressive activity was abrogated, indicating that glycans have a role in the early activation of these suppressor cells. Using C3H/HeJ and STAT6-KO mice, we found that expansion and suppressive activity of F4/80⁺/Gr1⁺ cells induced by T. crassiceps intact antigens was TLR4 and Th2-type cytokine independent. Together with previous studies on nematode and trematode parasites, our data support the hypothesis that glycans can be involved on a similar pathway in the immunoregulation by helminths.

Keywords cysticercosis, glycans, Gr1⁺, helminth, suppressor cells.

Correspondence: Luis I. Terrazas, Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. De los Barrios # 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Edo. de México. Mexico (e-mail: literrazas@campus.iztacala.unam.mx).

Received: 01 March 2005

Accepted for publication: 22 July 2005

INTRODUCTION

Parasitic helminths have developed complex mechanisms to evade or modulate host responses, and their antigens have important immunomodulatory activities (1–4). Early interactions between parasite antigens and innate cells from the host play a major role in the outcome of the immune response and the clearance or parasite installation. Most helminth infections induce strong polarized Th2-type responses that are associated with impaired proliferative cell responses to parasitic antigens or unrelated antigens (5). In helminth infections, this area is under intense research; however, for cestodes, there are few reports regarding early activation of the immune response. We have been examining the immunomodulatory activities of the cestode infection caused by *Taenia crassiceps* (6–8). As in most helminth infections, experimental cysticercosis caused by *T. crassiceps* induces Th2-type biased immune response (9) and inhibits proliferative capacity of spleen cells in response to both antigen-specific and polyclonal stimuli (10–12). Hence, it is perhaps not surprising that increased susceptibility to *Trypanosoma cruzi* (13) and to vaccinia virus (14) was observed in *T. crassiceps*-infected mice. Collectively, these observations suggest that *T. crassiceps* infection not only induces a Th2-type biased response but also regulates other lymphocyte functions *in vivo*. The biased type-2 response observed in helminth infections has been associated to parasite antigens present on the helminthes surface or in their excreted/secreted products (4,15–18). Some of the most relevant epitopes of these antigens have been shown to be glycans, which also participate importantly in sera cross-reactions among different species of helminths (19,20).

Previous studies using antigens from nematodes and trematodes have shown that glycans on those parasites can act as Th2-enhancing adjuvants (21,22), and even in activating innate cells (23,24). These studies led us to hypothesize that

antigens (may be glycoproteins) from the metacestodes of *T. crassiceps* may have the potential to act as ligands for innate cells to induce altered responses associated to experimental cysticercosis. In this study, we evaluated the ability of intact glycosylated antigens from *T. crassiceps* to recruit early innate cells at the peritoneal cavity, the phenotype of cells recruited as well as their capacity to modulate cell proliferative responses of naïve T cells *in vitro*. Based on the expression of the cell surface markers, we found that intact cestode antigen-injected mice have a two- to threefold increase in F4/80⁺/Gr-1⁺ cell population in their peritoneal cavities relative to mice injected with saline or antigens where glycans were altered by periodate treatment. These F4/80⁺/Gr-1⁺-recruited cells adoptively suppressed the proliferative response of naïve T cells *in vitro* involving a cell-to-cell contact mechanism, whereas cells recruited by periodate-treated antigens did not display suppressive activity. In an attempt to define potential mechanisms involved in the recruitment and suppressive activity of these cells, we used C3H/HeJ and STAT6^{-/-} mice, which showed a similar response after short exposure to the cestode antigens. Our findings suggest that intact glycans in antigens from the cestode *T. crassiceps* are essential for the induction of suppressive myeloid cells and this effect is not TLR4 neither Th2-type cytokine dependent.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Six to 8 weeks old female BALB/cAnN and C3H/HeJ mice were obtained from Harlan Laboratories (México City, México), and female STAT6^{-/-} in a BALB/c background originally from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), were maintained in a pathogen-free environment at the FES-Iztacala, UNAM animal facility in accordance with Institutional and National guidelines.

Antigen preparation and quantification

Metacestodes of *T. crassiceps* were harvested in sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2–4 months of infection, and exhaustively washed with cold-sterile phosphate buffer saline (PBS). *T. crassiceps* antigen (TcAg) was prepared by homogenizing whole metacestodes (10 mL) with two rounds of 3 s each by using a homogenizer (Polytron, Kinematica, Newark, NJ, USA). The homogenates were centrifuged at 20 000 *g* for 20 min at 4°C, and the supernatants containing PBS-soluble antigens were collected and frozen at -80°C until further use. Protein concentration was determined by Bradford protein kit assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and carbohydrate contents were measured with the anthrone method.

Periodate treatment

Sodium metaperiodate-mediated modification of glycan molecules in TcAg was performed by using a modification of Tawill *et al.* (22). Briefly, 2 mg/mL of TcAg was incubated for a few seconds (v/v) with 50 mM sodium acetate pH 4.5 (Na acetate buffer) at room temperature. The sample was divided in two to produce a periodate treatment-*T. crassiceps* soluble antigen (pTcAg) and control (mock) periodate treatment-*T. crassiceps* soluble antigen (mTcAg). Twenty millimolars of sodium metaperiodate (v/v) was added to the pTcAg antigen, whereas the mTcAg received acetate buffer without sodium metaperiodate, both tubes were incubated for 30 min in the dark at room temperature with gentle shaking. The reaction was completed by further incubation of the tubes with 100 mM of sodium borohydride in PBS for 30 min at room temperature. Excess salt was removed by using Amicon Ultra Filter Units (Millipore, Billerica, MA, USA), and the protein concentration was determined.

SDS-PAGE and Lectin-Blotting

Sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and lectin blotting were performed by standard techniques. Briefly, antigen extracts in nonreducing sample buffer were boiled for 5 min at 95°C and separated on 7.5% polyacrylamide gel at a concentration of 10 µg/well. Separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Amersham, Piscataway, NJ, USA) by using a Western blotting unit (Bio-Rad). The membrane was blocked overnight at 4°C with 2% (w/v) bovine serum albumin in phosphate buffer (PBS) pH 7.2, washed thoroughly with PBS/Tween 0.1% and incubated with Con A-Peroxidase (SIGMA) for 3 h. After washing, bound peroxidase on the membrane was developed with 1 : 1000 PBS/H₂O₂ and diaminobenzidine at a concentration of 2 mg/mL.

Isolation of peritoneal exudates cells (PECs)

Saline or Ag-*T. crassiceps* (50 µg)-injected BALB/c mice were sacrificed at 18 h after i.p. injection. Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained by peritoneal lavage with 5 mL of ice-cold sterile Hank's balanced salt solution (Microlab, México). PECs were washed twice and red blood cells were lysed by hypotonic shock with ammonium chloride. Following two washes, viable cells (by trypan blue exclusion, routinely over 95%) were counted and adjusted to 2 × 10⁵ cells/mL in RPMI supplemented.

Flow cytometric analysis

Peritoneal macrophages were blocked with antimouse CD16/CD32 (Biolegend, San Diego, CA, USA) and stained

with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated monoclonal antibodies against F4/80 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), MHC-II (Biolegend), CD11b (Biolegend) or phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies against Gr-1 (Biolegend). Stained cells were analysed on a FACScalibur using CELL QUEST software (Becton Dickinson). Live cells were electronically gated using forward- and side-scatter parameters.

Coculture of PECs-CD90⁺ cells

Coculture of PECs with naive CD90⁺ (Thy 1.2) cells was performed as follows: PECs were obtained as described and adjusted to 5×10^5 cells/mL. Splenocytes were prepared from naive mice, and enriched for CD90⁺ cells (> 95% by FACS analysis) using CD90 magnetic cell sorter beads (MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). CD90⁺ cells 6×10^5 were plated (100 μ L) in 96-well flat-bottom plates (Costar, Cambridge, MA, USA) that were pre-coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Biolegend) at 1 μ g/mL. Three hours later, PECs were added to CD90⁺ T cells at ratios of 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 and 1 : 32 (PECs : CD90⁺). Cocultures were maintained at 37°C and 5% CO₂ for 72 h, and then ³H-Thymidine (185 GBq/mmol activity, Amersham, UK) 0.5 μ Ci/well was added and incubated for a further 18 h. Cells were harvested on a 96-well harvester (Tomtec, Toku, Finland) then counted using a micro β -plate counter (Trilux, Toku, Finland). Values are represented as CPM from triplicate wells.

Co-cultures using transwells

In some cocultures, 96-well cell culture plates (Costar) were inserted with 8-well strip transwells (0.2 μ m pore) in order to separate PECs from naive CD90⁺ (Thy 1.2) cells. PECs were plated on the superior chamber at a ratio 1 : 4 to CD90⁺ cells, the inferior chamber was coated with anti-CD3/CD28 antibodies (1 μ g/mL) and naive CD90⁺ cells were added. Cultures were maintained for 72 h and then 0.5 μ Ci/well ³H-Thymidine was added (Amersham) and incubated for an additional 18 h. Transwells were removed and CD90⁺ cells harvested as described.

Reverse transcriptase-PCR

Total RNA was extracted from PECs obtained from saline or *T. crassiceps*-intact antigen-injected mice (18 h after injection), using RNA STAT-60 (Tel-test, TX, USA). cDNA was prepared using first strand synthesis superscript II kit (Invitrogen) from 5 μ g of total RNA. cDNA samples were standardized based on the content of β -actin cDNA. Primers for β -actin were F-GTGGCCGCTCAGGCACCAA

and R-CTCTTTGATTGCACGCACGATTTC. Primers for inducible nitric oxide synthase were F-CTGGAGGAGCT-CCTGCCTCATG and R-GCAGCATCCCCTCTGATGGTG. Primers for interleukin 10 were F-ACCTGGTAGAAGT-GATGCCCCAGGCA and R-CTATGCAGTTGATGAA-GATGTCAAA. Primers for CCL5 were F-GTG CCCACGTCAAGGAGTAT and R-GGGAACCGTATA-CAGGGTCA.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total volume of 50 μ L in PCR buffer in presence of 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M of each primer, and 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), using a palmcycler (Corbett Research, Australia). After 30 cycles of amplification, the PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Sequences and conditions for PCR found in inflammatory zone 1 (Fizz1), chitinase Ym1 and Arginase-1 were used as previously reported (25).

Statistical analysis

Data were analysed using unpaired Student's *t* test, significant values were considered when $P < 0.05$.

RESULTS

Antigens from *T. crassiceps* metacestodes are rich in carbohydrates and glycoproteins

Different helminth parasites have been reported to have many glycoproteins (20,21,26,27). In order to know the proportion of carbohydrates in the soluble fraction obtained from *T. crassiceps* metacestodes, we performed an analysis for these molecules by the anthrone method parallel with protein determination. We found that antigens from *T. crassiceps* are richer in carbohydrates than proteins, as shown in Figure 1a, there are near to four times more amount of carbohydrates. Intact soluble antigens (iTcAg) were also tested for the presence of glycoproteins through their reactivity to Con-A (data not shown). As previously reported for trematode and nematode antigens, mild sodium periodate treatment was used to modify the conformational structure of glycans on parasite antigens (21,22). In the Figure 1b, a typical lectin-blot analysis of soluble antigens from *T. crassiceps* metacestodes after periodate or mock treatment is shown. It is evident that after periodate treatment of TcAg (pTcAg), the binding to the lectin Con-A was abolished, whereas in mock-treated antigens (mTcAg) remain the ability to bind to Con-A. According to the SDS-PAGE analysis (Figure 1b) can be appreciated that periodate treatment did not denaturalize the protein backbone of parasite glycoproteins.

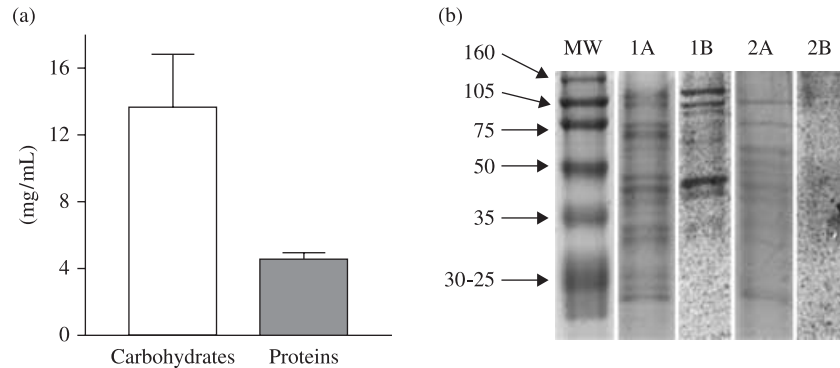


Figure 1 *Taenia crassiceps* antigens are rich in carbohydrates and glycoproteins. (a) Soluble antigens were obtained as described and analysed for the presence of carbohydrates by anthrone method and for proteins using Bradford method. (b) Lectin blot analysis and SDS-PAGE of sodium periodate-treated (pTcAg) soluble extracts of *T. crassiceps* (lane 1A, SDS-PAGE; lane 1B, Lectin blot) and mTcAg (lane 2A, SDS-PAGE; lane 2B, Lectin blot) prepared as detailed in Materials and methods were separated by SDS-PAGE and transferred to NC sheets that were used to detect N-linked glycans with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Con-A. Source of antigens were from different infected mice, and periodate treatment was repeated three times more. MW indicates molecular weight markers.

Injection of *T. crassiceps* antigens rapidly recruits F4/80⁺ Gr1⁺ PECs

Previous studies using different pathogens or their molecules (28,29) or in mice-harboured tumours have reported the increased presence of a myeloid cell population with the marker Gr1⁺ (30) that have suppressive activities. Here, we examined the peritoneal influx of cells following injection with iTcAg 18 h later. The composition of the peritoneal exudate cells (PECs) from mice receiving iTcAg or saline were analysed according to their FSC and SSC characteristics by flow cytometry as well as for their expression of CD11b, Gr1, F4/80 and MHC-II. Cells that clustered as FCS^{high}/SSC^{high} were gated as regions R1 and R2. R1 was found to be mainly F4/80⁺/Gr1⁺, whereas cells gated as R2 were F4/80⁻/Gr1⁻. Interestingly, mice exposed to iTcAg rapidly expanded PECs expressing F4/80⁺/Gr1⁺ (25% up to 30% of total cells, Figure 2a) and Gr1⁺/CD11b⁺ (15–20% of total cells, data not shown) compared with F4/80⁺/Gr1⁺ (8–10%) in mice receiving saline (Figure 2d). The F4/80⁺/Gr1⁺ population recruited in response to iTcAg can be divided in two sub-populations according to F4/80 expression, F4/80^{low} and F4/80^{high}, where the F4/80^{low} population increased significantly with respect to mice receiving saline (Figure 2a–d, $P < 0.05$). Interestingly, these cells also had increased expression of MHC-II (Table 1). In contrast, F4/80^{high} population reduced by a half their MHC-II expression when compared with PECs from saline-injected mice (Table 1). These data suggest that PECs recruited by iTcAg could function as APC.

PECs recruited by iTcAg exhibit suppressive activity

We first tested for suppressive activity of PECs recruited in response to iTcAg by initially stimulating naïve T cells with

Table 1 MHC-II expression on F4/80⁺ cells in response to intact and periodate-treated *Taenia crassiceps* antigens

	Antigens injected			
	iTcAg	pTcAg	mTcAg	Saline
F4/80 ^{low}	25 ± 1.6%	24 ± 1.7%	18 ± 1.7%	13 ± 1.5%
F4/80 ^{high}	7 ± 3%	4 ± 1.7%	8 ± 3.5%	15 ± 2.7%

^aThe percentage of PECs gated within the R1 and R2 cell population was determined by FACs.

anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and 3 h later, adding PECs obtained from iTcAg-injected or saline-injected mice at several ratios. T cells stimulated *in vitro* with anti-CD3/CD28 in the absence or presence of PECs from saline injected mice displayed high levels of proliferation (Figure 3). In contrast, addition of PECs from iTcAg-injected mice, markedly suppressed proliferation of CD90⁺ cells (T cells), especially when higher ratios of PECs were added into the cultures (Figure 3). There was a significant inhibition in the proliferative response (67% reduction relative to controls) even when the PECs : CD90⁺ ratio was 1 : 32 (Figure 3, $P < 0.05$). However, the strongest inhibition was detected using a PECs : CD90⁺ ratio of 1 : 4, where greater than 90% suppression was observed.

Glycans on *T. crassiceps* antigens play a major role in the induction of suppressor PECs

To investigate whether intact glycans on cestode glycoproteins play a role in the induction of suppressive PECs, experimental groups of BALB/c mice were i.p. injected with equal amounts of proteins of intact *T. crassiceps* antigens (iTcAg),

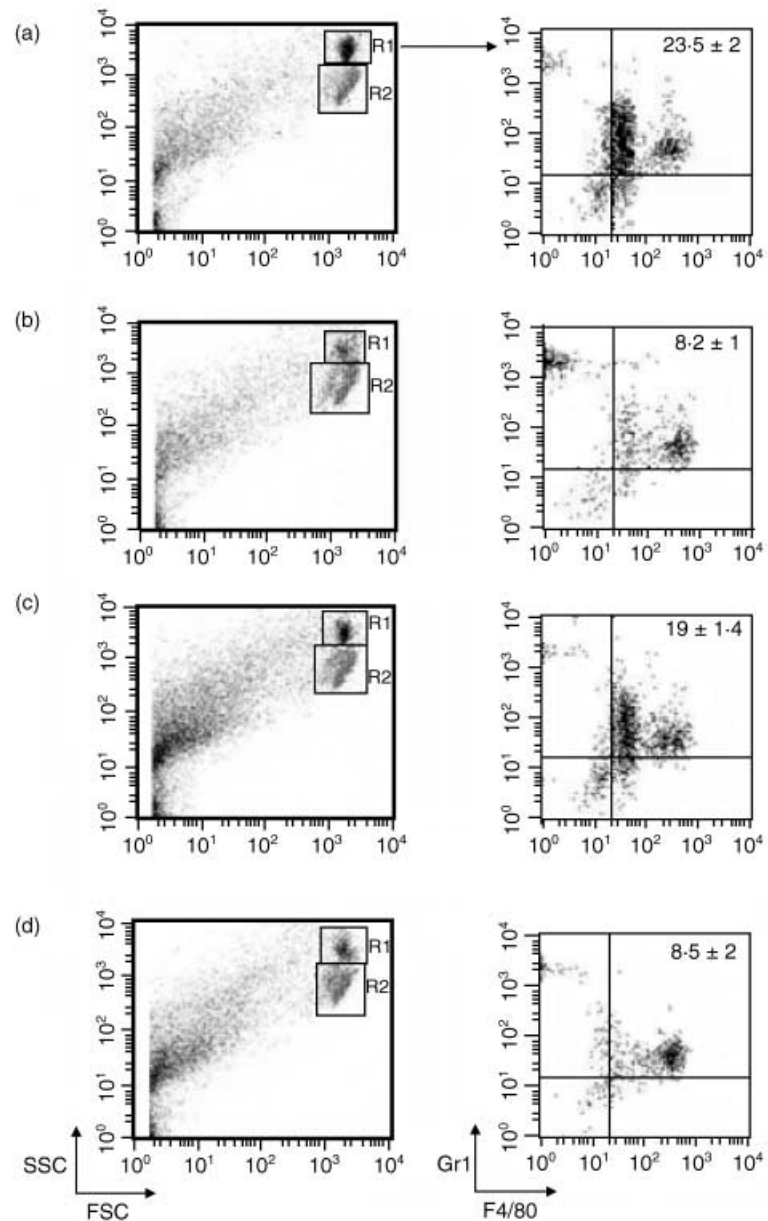


Figure 2 Injection of *T. crassiceps*-antigens recruits greater numbers of peritoneal cells expressing F4/80⁺/Gr1⁺ surface markers that depend of the presence of intact glycans. (a) FACS analysis of PECs recruited by intact *T. crassiceps*-antigens, (b) periodate-treated *T. crassiceps*-antigens, (c) mock-treated antigens or (d) saline. PECs were obtained at 18 h following antigen injection. Percentages marked in the dot plots were obtained from R1 and R2. Analysis was performed in individual mice, four mice per group. Data are representative of three experiments.

periodate-treated *T. crassiceps*-antigens (pTcAg), mock-treated *T. crassiceps*-antigens (mTcAg), or saline (control group), and the PECs recruited were analysed by two-colour flow cytometry and assayed for *in vitro* adoptive suppression of naïve T-cell proliferation in response to anti-CD3/CD28 antibody stimulation. Interestingly, mice receiving pTcAg had a reduced recruitment of the population F4/80⁺/Gr1⁺ (9%, Figure 2b) compared with PECs exposed to iTcAg. Additionally, PECs recruited by pTcAg displayed a low antiproliferative activity on naïve T cells (Figure 3). In contrast, upon *in vivo* exposure to the respective iTcAg or mTcAg, mice showed a good antigen recruitment of the

F4/80⁺/Gr1⁺ population paralleled with a significant suppression in the proliferative response of T cells (Figures 2a,c and 3), indicating that the chemical treatment did not interfere with the ability of the antigens to prime PECs *in vivo*.

PECs recruited by iTcAg are not alternate-activated myeloid cells

A recent publication has found a population of alternatively activated myeloid cells with suppressive activity after 2 weeks of *T. crassiceps* infection (31). In order to test whether the PECs recruited as early as 18 h following iTcAg injection

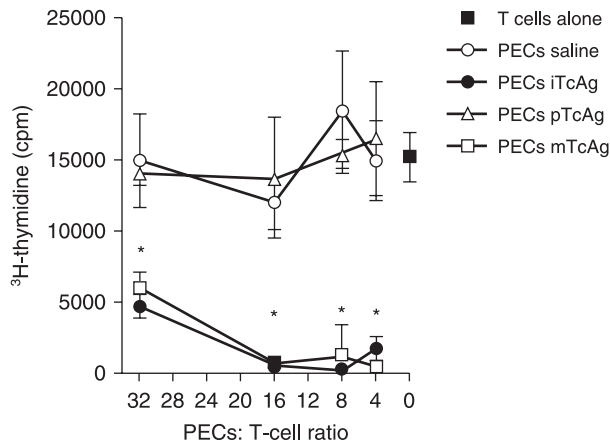


Figure 3 PECs recruited by *T. crassiceps* antigens inhibit the proliferative response of naive CD90⁺ cells stimulated with plate-bound anti-CD3/CD28 antibodies and intact glycans are involved. PECs from BALB/c mice recruited by intact or mock-treated, as well as pTcAg and saline 18 h post-injection were cocultured at different ratios with 6 × 10⁴ previously stimulated naive CD90⁺ cells in a ratio 1 : 4 to 1 : 32. Cells were cocultured for 72 h and incorporation of ³H-thymidine was measured. Individual mice (4) were assayed and data are shown as mean ± SD and are representative of three experiments. *P < 0.05 by comparing saline and pTcAg vs. iTcAg or mTcAg.

presented some of these characteristics, we evaluated by RT-PCR a series of genes associated to a state of alternate activation on these PECs. As shown in Figure 4, PECs recruited after iTcAg, pTcAg or mTcAg injection did not display any increase in three of the more remarkable signature genes for alternate activation such as arginase 1, Ym1 and Fizz1 when compared with saline-injected mice. Furthermore, these PECs showed similar transcripts for iNOS and RANTES. Additionally, IL-10 transcripts were not detected on the same population of cells.

Suppressive activity of F4/80⁺Gr1⁺ cells is contact-dependent and their recruitment is TLR4- and STAT6-independent

Next we tested for mechanisms involved in the expansion and suppressive activity of PECs expressing F4/80⁺/Gr1⁺. Initially, we asked if cell-to-cell interactions were involved in the inhibition of the cell proliferation observed, for these experiments culture plates with inserted transwells were used to eliminate cell-to-cell contact in PECs : CD90⁺ cocultures. PECs were plated in the upper chamber at a ratio 1 : 4 with respect to naive CD90⁺ cells, which were plated and stimulated in the lower chamber with anti-CD3/CD28 plate bound antibodies. The transwell cocultures showed that in the absence of cell-to-cell contact, there was significant reduction in the ability of PECs recruited by *T. crassiceps*

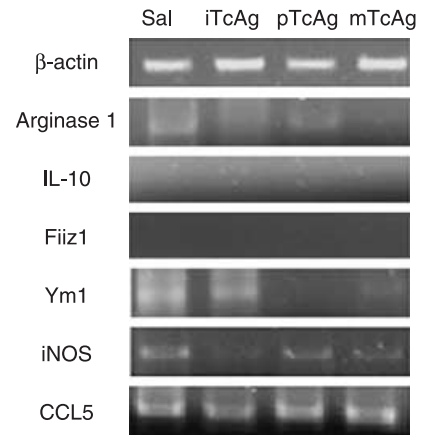


Figure 4 PECs from BALB/c iTcAg, mTcAg and pTcAg-injected mice did not display an alternate state of activation. Transcript levels of β-actin, Fizz1, Ym1, IL-10, arginase 1, CCL5 and iNOS were analysed by RT-PCR in PECs isolated from saline- or antigen-injected mice (18 h after i.p. injection). The data shown are from a single mouse per group and are representative of the findings from three mice examined for each treatment.

antigens to suppress the proliferation of anti-CD3/CD28 stimulated CD90⁺ cells (approximately 10% inhibition, Figure 5c, P < 0.05), ruling out a major role for soluble factors in the F4/80⁺/Gr1⁺ PECs mediated suppression on T-cell proliferation. In fact, we did not detect spontaneous IL-10 production by PECs expanded in response to iTcAg (data not shown, and Figure 4), a cytokine with the ability to inhibit T-cell proliferative responses.

Recently, it has been proposed that some synthetic or natural glycoconjugates can activate innate cells through a classical pro-inflammatory signalling molecule such as TLR4 (32,33). We decided to explore whether or not this molecule participates in both cell recruitment and suppressive activity mediated by iTcAg injection. To test this, we used TLR4-defective C3H/HeJ mice, which were exposed to iTcAg in parallel with other group of BALB/c mice. Interestingly, C3H/HeJ mice exposed to iTcAg displayed a similar recruitment of F4/80⁺/Gr1⁺ cells as seen in BALB/c mice (Figures 2a and 5a). Likewise, suppressive activity of this population was maintained (Figure 5b), and apparently also the major suppressive mechanism may be involved is cell contact-dependent, as is shown in the transwell cocultures (Figure 5c).

To explore whether the recruitment and suppressive activity of F4/80⁺/Gr1⁺ cells was dependent upon the early signalling of Th2-type cytokines, we performed a series of similar experiments using STAT6^{-/-} mice. Following i.p. exposure to iTcAg, STAT6^{-/-} mice were able to expand high levels of the F4/80⁺/Gr1⁺ cell population compared with saline-injected mice (Figure 6a). In addition, suppressive activity of this population was found to be intact and also

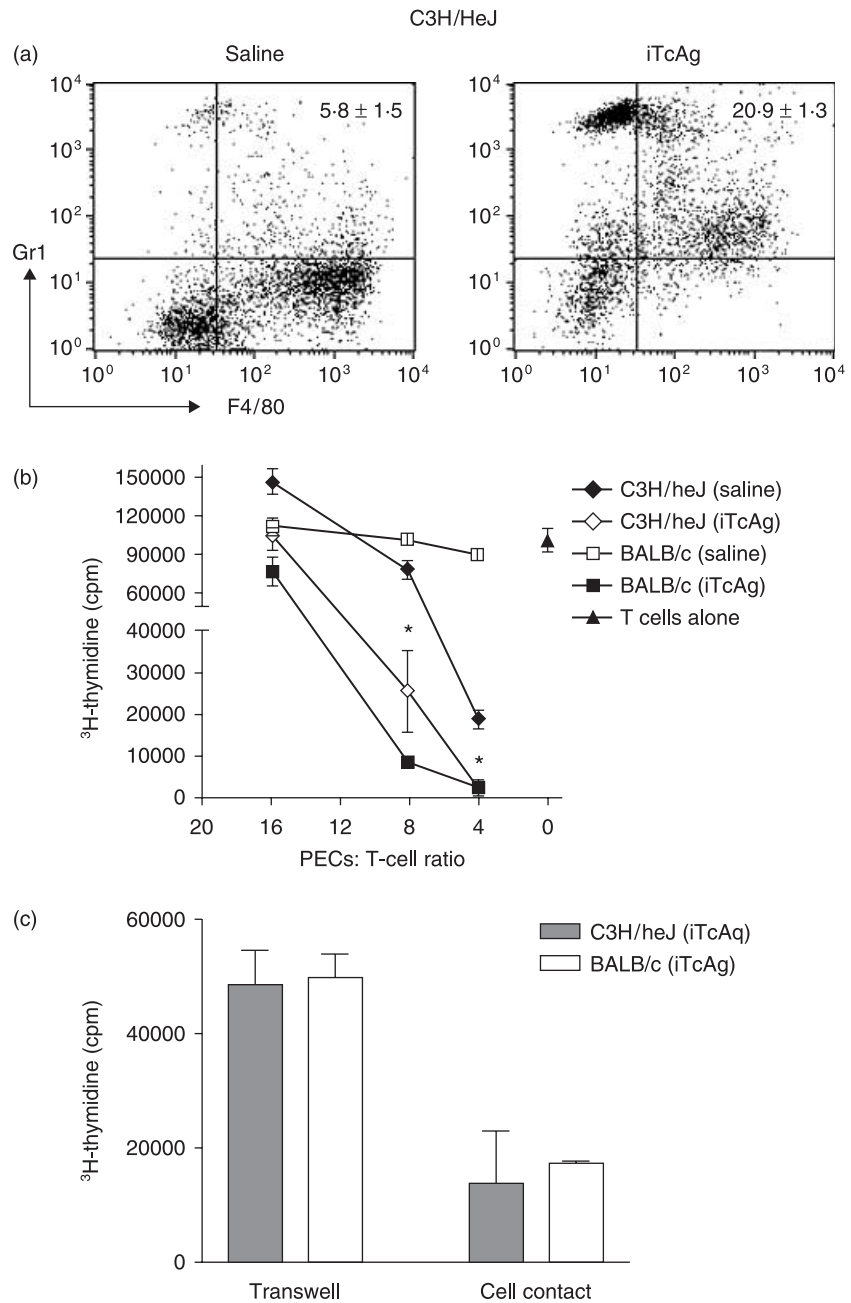


Figure 5 Expansion and suppressive activity of F4/80⁺/Gr1⁺ cells is contact-dependent but TLR4-independent. PECs were harvested at 18 h post-antigen injection in BALB/c or C3H/HeJ mice and (a) were analysed for the presence of F4/80⁺/Gr1⁺ peritoneal cells; (b) were directly cocultured with CD90⁺ naive cells at different ratios; or (c) placed in a transwell plate separated by a 0.2 µm membrane. PECs were obtained from individual mice and triplicate wells set up. Proliferation was measured by ³H-thymidine uptake (cpm). Data are shown as mean ± SE from four animals per group and are representative of two independent experiments. *P < 0.05.

was contact-dependent (Figure 6b). Collectively, these observations suggest that recruitment of F4/80⁺/Gr1⁺-suppressive PECs in response to iTcAg is TLR4 and STAT-6 independent.

DISCUSSION

Several studies have reported inhibition of T-cell responses by a cell population with a myeloid morphology identified phenotypically as Gr1⁺/CD11b⁺ and/or F4/80⁺/Gr1⁺ (29,34,35), which were previously referred as natural suppressors cells

and constituted a cell population of undefined phenotype. These cells are known to accumulate in lymphoid organs under conditions of intense immune activation and appear to mediate immunosuppressive effects in a wide variety of pathological conditions (30,34,35).

In chronic helminthic infections such as schistosomiasis, these myeloid cells do not appear to play a major role in the T-cell anergy observed (36). However, it is known that early interactions are crucial for the outcome of the final immune response against these pathogens (2). Thus, diverse parasitic

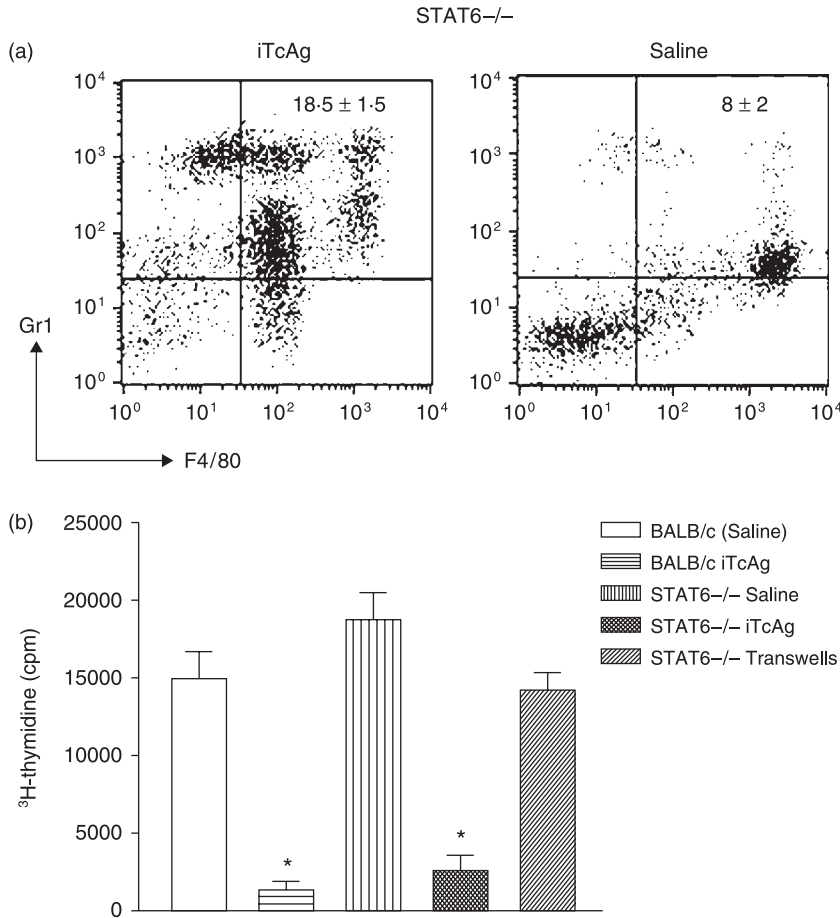


Figure 6 Expansion and suppressive activity of F4/80⁺/Gr1⁺ cells is STAT6-independent. PECs were harvested following 18 h post-antigen injection in BALB/c or STAT6^{-/-} mice and (a) were analysed for the presence of F4/80⁺/Gr1⁺ cells; (b) were directly cocultured with previously anti-CD3/CD28 stimulated CD90⁺ naive cells at 1 : 4 ratio and, in some cocultures transwells were used. PECs were obtained from individual mice and triplicate wells set up. Proliferation was measured by ³H-thymidine uptake (cpm). Data are shown as mean ± SD from 4 animals per group and are representative of two experiments. **P* < 0.05 by comparing iTcAg injection vs. saline injection.

helminth-derived substances have been tested for the early activation of DCs or macrophages, but still the molecular mechanism inducing potent Th2 responses and anergy in helminthic diseases remains to be elucidated.

In this study, we have characterized peritoneal myeloid cell populations based on their expression of F4/80, a marker attributed to macrophage lineage and, Gr1 a marker associated to granulocyte lineage. Following a single and short exposure to iTcAg, naïve mice rapidly expanded a cell population with suppressive activity and expressing the surface markers F4/80 and Gr1, which was defined as myeloid cells (24). Interestingly, in the absence of conformational structure of glycans on *T. crassiceps* antigens, the pattern of the myeloid population recruited after i.p. injection was different. Whereas cells bearing Gr1⁺/CD11b⁺ were almost unchanged (data not shown), the greatest difference relative to mice receiving iTcAg or mTcAg was on the F4/80⁺/Gr1⁺ cell population, which was barely recruited by pTcAg and was closely similar to mice receiving saline. Moreover, the suppressive activity was not observed, indicating that expansion of these suppressor cells depends on intact glycans. This

rapid expansion of F4/80⁺/Gr1⁺ suppressor cells has previously been reported using two different synthetic glycoconjugates that mimic sugars naturally expressed on *Schistosoma* (23,24), together with our findings, it is tempting to suggest that glycan structures on other helminthes (such as *T. crassiceps*) may share components that may trigger similar innate responses. However, in contrast to the studies using synthetic glycans where soluble factors (IFN- γ and NO) were found mainly responsible for the suppressive activity of Gr1 cells, here we mechanistically demonstrated that F4/80⁺/Gr1⁺ suppressor cells functioned via cell-to-cell contact and do not act through the release of suppressive soluble factors, such as IL-10. Notwithstanding that our results differed in both the time required to expand suppressor cells as well as the ratio of PECs : CD90⁺ cells used in cocultures, our results on mechanism of suppression are in accordance with the findings of Allen's group (37) who, using the whole nematode *Brugia malayi*, expanded peritoneal suppressor macrophages which actively suppressed T-cell responses in a contact-dependent pathway. Similarly, in a recent report, myeloid cells raised in *T. crassiceps*-infected mice had a

suppressive activity on naïve T cells (31). Interestingly, in both cases the suppressive cells were found to be in an alternate state of activation that was IL-4-dependent (38). In our study, PECs recruited by iTcAgs did not display any increase in gene transcripts for any of the alternate markers tested (Arginase 1, Fizz1 and Ym1), indicating the distinct nature of these cell populations as well as a possible differential via of activation. Our findings that STAT6-KO mice still strongly recruit this suppressive population support this conclusion. Moreover, taken in account the data obtained using STAT6^{-/-} mice is unlikely that NKT cells (early IL-4 producers) have a possible role as the earlier cell responding to glycan structures of *T. crassiceps* antigens. Regarding whether or not apoptosis or cell cycle arrest is operating as the main mechanisms involved on the inhibition of T-cell proliferation, more experiments are necessary; however, in experimental cysticercosis an increase in apoptotic CD4⁺ cells has been reported (39). On the other hand, the suppressive effect of macrophages recruited by *Brugia* was not associated to apoptosis because T cells in cocultures were still producing cytokines, indicating they were alive (40). Both situations will be explored in future experiments with *T. crassiceps* antigens.

Glycans structures of pathogens are important in the first encounter with host innate systems, glycoconjugates on helminth antigens have been reported to act on both innate cells and biasing acquired immune response to Th2-type (2), thus periodate treatment of antigens from *Schistosoma* (trematode) and *Brugia* (nematode) potently inhibits the induction of the skewed type-2 immune response (21,22); to our knowledge, this is the first demonstration that antigens and specifically conformational structure of glycans from a cestode parasite are involved in the innate recruitment and activation of suppressor myeloid cells. Whether this early response to cestode antigens can participate in biasing Th2-type responses need further research. However, according to the MHC-II expression on these cells is likely that PECs recruited by *T. crassiceps* antigens may have APC ability and likely have a role on biasing Th2 responses.

In contrast to the well-known interaction among TLRs and bacterial or intracellular parasites components (41), there are no definitive reports involving TLRs as the major receptors for helminth antigens. However, several reports have suggested some possible receptors for helminth products on immune cells, mostly those related with dendritic cell activation. Thus, DC-sign, TLR2 and TLR4 have been proposed to participate in Th2 driving by helminthes (1,2). In an attempt to know whether TLR4 was playing a role in the expansion and suppressive activity of the F4/80⁺/Gr1⁺ cells, we exposed C3H/HeJ mice to iTcAg. Interestingly, these TLR4-defective mice were completely able to maintain the recruitment and the suppressive contact-dependent activity of F4/80⁺/Gr1⁺ cells,

suggesting that glycans present in cestode antigens do not signal via TLR4. These data contrast with those recently reported for LNFP-III, a synthetic glycan related to *Schistosoma mansoni*, which was reported to trigger DC activation via TLR4 (32), a possible explanation for this disparity is that Thomas *et al.* used an *in vitro* system, and DC cytokines in response to the synthetic glycan were not reported, here we used *in vivo* exposure to natural cestode antigens and cytokines (IL-12 and IL-10) were not detected (data not shown). Besides, DC responses in our work were not analysed. In contrast, more recently and according with our data, it was reported that the immunomodulatory properties of ES-62, an excreted/secreted glycoprotein from a filarial nematode, were functional in macrophages and DCs from TLR4 mutant C3H/HeJ mice (33). Thus, it is plausible that helminth antigens can modulate the immune response by triggering different signalling molecules.

In conclusion, we found that the cestode parasite, *T. crassiceps* possesses soluble antigens, which when injected in naïve mice, expands a myeloid cell population that suppress polyclonal T-cell activation through a cell contact mechanism. These activities are dependent of intact glycan structures and are neither TLR4 nor STAT6 mediated. Molecules involved in both, cell contact suppression and direct binding of ligands of cestode antigens to target some TLRs or either glycan receptors are under research in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank biologist Erika Segura for her technical assistance, MVZ Leticia Flores for her excellent help in animal care. This work was supported by grant 41584-M from CONACYT, IN223003 and IN245004 from DGAPA-UNAM, and it is part of the requirements to obtain the doctorate degree in the postgraduate program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine; U.N.A.M. for Lorena Gómez-García who is supported by a fellowship from CONACYT-Mexico.

REFERENCES

- 1 Maizels RM & Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 733–744.
- 2 Maizels RM *et al.* Helminth parasites – masters of regulation. *Immunol Rev* 2004; **201**: 89–116.
- 3 Harnett W, McInnes IB & Harnett MM. ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential. *Immunol Lett* 2004; **94**: 27–33.
- 4 Goodridge HS *et al.* Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. *J Immunol* 2001; **167**: 940–945.
- 5 Gause WC, Urban JF Jr & Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol* 2003; **24**: 269–277.
- 6 Terrazas LI *et al.* *Taenia crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitol Res* 1999; **85**: 1025–1031.

- 7 Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R *et al.* Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin 12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun* 2002; **70**: 3656–3664.
- 8 Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, David JR & Terrazas LI. Altered T-helper responses in CD40 and interleukin 12-deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol* 2003; **33**: 703–711.
- 9 Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T & Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1998; **84**: 74–81.
- 10 Villa OF & Kuhn RE. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down-regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 1996; **112**: 561–570.
- 11 Rodríguez-Sosa M, David JR, Bojalil R *et al.* Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 2002; **168**: 3135–3139.
- 12 Sciutto E, Fragoso G, Vaca M *et al.* Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 1995; **63**: 2277–2281.
- 13 Rodríguez M, Terrazas LI, Marquez R & Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous nonrelated infection. *Parasite Immunol* 1999; **21**: 177–185.
- 14 Spolski RJ, Alexander-Miller MA & Kuhn RE. Suppressed cytotoxic T-lymphocyte responses in experimental cysticercosis. *Vet Parasitol* 2002; **106**: 325–330.
- 15 Whelan M, Harnett MM, Houston KM *et al.* A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 2000; **164**: 6453–6460.
- 16 Gregory WF, Atmadja AK, Allen JE *et al.* The abundant larval transcript-1 and -2 genes of *Brugia malayi* encode stage-specific candidate vaccine antigens for filariasis. *Infect Immun* 2000; **68**: 4174–4179.
- 17 Holland MJ *et al.* Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 1977–1987.
- 18 Holland MJ, Harcus YM, Balic A *et al.* Th2 induction by *Nippostrongylus*-secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC class I-related receptors. *Immunol Lett* 2005; **96**: 93–101.
- 19 Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira S *et al.* Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop* 2003; **89**: 73–84.
- 20 Obregón-Henao A, Londono DP, Gomez DI *et al.* The role of N-linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacystode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. *Mol Biochem Parasitol* 2001; **114**: 209–215.
- 21 Okano M, Satoskar AR, Nishizaki M *et al.* Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 1999; **163**: 6712–6717.
- 22 Tawill S, Le Goff L, Ali F, Blaxter M, & Allen JE. Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infect Immun* 2004; **72**: 398–407.
- 23 Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D *et al.* The schistosome oligosaccharide lacto-n-neotetraose expands gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive cd4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol* 2001; **167**: 5294–5303.
- 24 Atochina O, Daly-Engel T, Piskorska D *et al.* A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T-cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 2001; **167**: 4293–4302.
- 25 Nair MG, Gallagher IJ, Taylor MD *et al.* Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective up-regulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect Immun* 2005; **73**: 385–394.
- 26 Deehan MR, Harnett W & Harnett MM. A filarial nematode-secreted phosphorylcholine-containing glycoprotein uncouples the B-cell antigen receptor from extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase by promoting the surface Ig-mediated recruitment of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1 and Pac-1 mitogen-activated kinase-phosphatase. *J Immunol* 2001; **166**: 7462–7468.
- 27 Gruden-Movsesijan A, Ilic N & Sofronic-Milosavljevic L. Lectin-blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Parasitol Res* 2002; **88**: 1004–1007.
- 28 Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E & Harn DA Jr. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1+ cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4+ cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol* 2001; **167**: 5294–5303.
- 29 Voisin MB, Buzoni-Gatel D, Bout D *et al.* Both expansion of regulatory GR1+ CD11b+ myeloid cells and anergy of T lymphocytes participate in hyporesponsiveness of the lung-associated immune system during acute toxoplasmosis. *Infect Immun* 2004; **72**: 5487–5492.
- 30 Sinha P, Clements VK & Ostrand-Rosenberg S. Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* 2005; **174**: 636–645.
- 31 Brys L, Beschin A, Raes G *et al.* Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *J Immunol* 2005; **174**: 6095–6104.
- 32 Thomas PG, Carter MR, Atochina O *et al.* Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; **171**: 5837–5841.
- 33 Goodridge HS, Marshal FA, Else KJ *et al.* Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol* 2005; **174**: 284–293.
- 34 Goni O, Alcaide P & Fresno M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection. involvement of Ly6G (Gr1(+)) CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol* 2002; **14**: 1125–1134.
- 35 Salvadori S, Martinelli G & Zier K. Resection of solid tumors reverses T-cell defects and restores protective immunity. *J Immunol* 2000; **164**: 2214–2220.
- 36 Smith P, Wals CM, Mangan NE *et al.* *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of

- programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol* 2004; **173**: 1240–1248.
- 37 Allen JE & Loke P. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol* 2001; **23**: 345–352.
- 38 MacDonald AS *et al.* Requirement for *in vivo* production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferative suppression by filarial parasites. *J Immunol* 1998; **160**: 1304–1312.
- 39 Lopez-Briones S, Sciotto E, Ventura JL *et al.* CD4⁺ and CD19⁺ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 2003; **90**: 157–163.
- 40 Allen JE, Lawrence RA & Maizels RM. APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. *Int Immunol* 1996; **8**: 143–151.
- 41 Akira S, Takeda K & Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2**: 675–680.

Lorena Gómez-García · Irma Rivera-Montoya ·
Miriam Rodríguez-Sosa · Luis I. Terrazas

Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen

Received: 2 December 2005 / Accepted: 8 February 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Common helminth infections promote Th2-skewed immune responses in their hosts. We have studied the role of intact carbohydrate structures on *Taenia crassiceps* compounds in the induction of biased type 2 and anti-inflammatory immune responses on peptide-stimulated T cells by using DO11.10 transgenic (OVA Tg) mice. While OVA Tg mice co-injected with OVA peptide 323–339 (OVA_{323–339}) plus intact *Taenia* soluble antigens (iTSA) displayed significantly higher titers of OVA-specific IgG1 and total IgE, low amounts of these antibodies were detectable in sera from OVA Tg mice co-injected with OVA_{323–339} plus periodate-carbohydrate altered TSA (paTSA). Spleen cells from OVA Tg mice failed to efficiently produce OVA-specific IFN- γ but displayed higher IL-4, IL-5 and IL-10 production when they received OVA_{323–339} plus iTSA, compared with OVA Tg mice similarly co-injected with OVA_{323–339} plus paTSA. Moreover, after in vivo stimulation with OVA_{323–339} plus iTSA, spleen cells did show elevated mRNA transcripts for Arginase 1, Ym1, IL-4, IL-10, TGF- β , and Mannose Receptor (MR) genes, all them associated with Th2-type and anti-inflammatory responses. Similar results were obtained using TLR4 mutant mice. Together these findings suggest that carbohydrate components in TSA are involved in modulating immune responses to bystander antigens and that do not signal via TLR4.

Introduction

The prominent induction of Th2-biased immune responses by parasitic helminths has been firmly established (Gause et al. 2003; Maizels et al. 2004; Holland et al. 2005). Helminth infections can alter the immunity and susceptibility to other pathogens (Reimold et al. 2001) or reduce the effectiveness of vaccines, such as tetanus vaccination during lymphatic filariasis (Nookala et al. 2004). Moreover, using different models of helminth-infected animals has shown that the phenotype of the response to bystander or heterologous antigens was indeed driven in the Th2 direction (Brady et al. 1999; Whelan et al. 2000). However, the precise mechanisms by which helminth infections affect concomitant immune responses remain to be determined. *Taenia crassiceps* is a cestode parasite used as a model for investigating factors modulating neurocysticercosis caused by *Taenia solium*. Experimental cysticercosis caused by *T. crassiceps* induces strong Th2-type biased immune responses and inhibits proliferative capacity of spleen cells in response to both polyclonal and antigen-specific stimuli (Sciutto et al. 1995; Terrazas et al. 1998).

While events that participate on Th1-biased responses observed in most bacterial and protozoan infections have been clearly deduced (Flavell et al. 1998; Guernonprez et al. 2002; Kaisho and Akira 2003), the mechanisms involved in how helminth infections drive Th2-type immune responses remain unclear. The main receptors of Antigen Presenting Cells (APCs) engaged in the recognition of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) on antigens are the toll-like receptors (TLRs) (Janeway and Medzhitov 2002). TLRs are pathogen recognition receptors (PRRs) that bind PAMPs present in microbial lipids, lipoproteins, lipopolysaccharides (LPS), nucleic acids, or bacterial DNA, as well as structures present in intracellular parasites such as *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* (Campos et al. 2001; Ropert and Gazzinelli 2004). The recognition by TLRs triggers intracellular signaling cascades that result in APC maturation and mainly the induction of inflammatory cytokines, ultimately leading to

L. Gómez-García · I. Rivera-Montoya ·
M. Rodríguez-Sosa · L. I. Terrazas
Laboratory of Immunoparasitology, Unidad de Biomedicina,
Facultad de Estudios Superiores Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Mexico, Mexico

L. I. Terrazas (✉)
Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. De los Barrios # 1, Los Reyes Iztacala,
54090 Tlalnepantla, Edo. de México, Mexico
e-mail: litterrazas@campus.iztacala.unam.mx
Tel.: +52-55-56231291
Fax: +52-55-56231138

Th1 cell activation (Schnare et al. 2001). How helminth infections drive polarized Th2 and anti-inflammatory responses is largely unknown, but is likely in part due to the nature and quantity of possible parasite “PAMPs” present on their surfaces or in excreted/secreted products (Maizels et al. 2004). Many of the immuno-dominant epitopes of several parasitic nematodes, trematodes, and cestodes are known to be shared (Ishida et al. 2003); indeed, most of the cross-reactivities found in patients and parasitized mice with different helminthiasis is due to the presence of glycans on the antigenic components (Ishida et al. 2003). Specifically, in schistosome infections, dominant Th2 responses are initiated by parasite eggs (Grzych et al. 1991), and among the varied milieus that make up soluble egg antigens (SEA), carbohydrates appear to be major inducers of Th2 type responses (Okano et al. 1999). Recently, studies using antigens from nematodes also have shown that glycans on those parasites can act as Th2-enhancing adjuvants (Tawill et al. 2004). Nevertheless, non-common helminth PAMPs has yet been identified.

Recently, it has been found that glycans of *T. crassiceps* metacestodes share some of their *N*-glycan structure with those observed in *Schistosoma* antigens (Lee et al. 2005). These studies led us to hypothesize that carbohydrate structures on *T. crassiceps* antigens may also share the feature to favor Th2 responses when co-administered with other proteins. In this paper, we studied the ability of intact glycosylated soluble antigens from *T. crassiceps* metacestodes to modify the immune response to a bystander antigen. To approach this question, DO11.10 (TCR transgenic OVA) mice were immunized with the OVA-peptide_{323–339} plus intact carbohydrate antigens from *T. crassiceps* (TSA), as well as with OVA_{323–339} plus periodate-altered antigens (paTSA) and with OVA_{323–339} plus saline. Based on the production of antigen-specific cytokines by spleen cells, on titers of OVA-specific IgG1 and IgG2a, on total IgE levels and, on mRNA transcripts for IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , Ym1, Mannose Receptor, iNOS and arginase-1 genes, our findings suggest that intact carbohydrate components in *T. crassiceps* are essential for their ability to induce Th2-biased and anti-inflammatory responses.

Materials and methods

Mice Eight to 10 weeks old female DO11.10 TCR-transgenic mice on BALB/c background originally obtained from The Jackson Lab were maintained in a pathogen-free environment at FES-Iztacala, UNAM animal facility, in accordance with Institutional and National guidelines. C3H/HeJ mice were obtained from Harlan Laboratories (México City, México).

Antigen preparation and quantification Metacestodes of *Taenia crassiceps* were harvested in sterile conditions from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2–4 months of infection and exhaustively washed with cold-sterile PBS. *T. crassiceps* soluble antigen (TSA) was prepared by homogenizing whole metacestodes (10 ml

volume) with two rounds of 3 s each by using a homogenizer (Polytron, Kinematica). The homogenates were centrifuged at 20,000 \times g for 20 min at 4°C, and the supernatants containing PBS-soluble antigens were collected and frozen at –80°C until further use. Protein concentration was determined by Bradford protein kit assay (BioRad).

Periodate treatment Sodium metaperiodate-mediated modification of glycan molecules in TSA was performed by using a modification of Tawill et al. (Tawill et al. 2004). Briefly, 2 mg/ml of TSA was incubated for a few seconds (vol/vol) with 50 mM sodium acetate pH 4.5 (Na acetate buffer) at room temperature. The sample was divided into two to produce a periodate treatment *T. crassiceps*-soluble antigen (paTSA) and control (mock treatment) *T. crassiceps*-soluble antigen (mTSA or iTSA). Twenty millimole of sodium metaperiodate (vol/vol) was added to the paTSA, while the mTSA received acetate buffer without sodium metaperiodate; both tubes were incubated for 30 min in the dark at room temperature, with gentle shaking. The reaction was completed by further incubation of the tubes with 100 mM of sodium borohydride in PBS for 30 min at room temperature. Excess of salt was removed by using Amicon Ultra Filter Units (Millipore), and the protein concentration was determined.

Treatments Groups of naïve mice were given three i.p. injections at weekly intervals with 50 μ g of mTSA or paTSA plus OVA_{323–339} 10 μ g (Invitro, USA). Control mice were injected with an identical amount of OVA_{323–339} plus saline. Mice were bled from the tail vein weekly to obtain serum. One week after the last injection, mice were killed in a CO₂ chamber.

Cell preparations, culture conditions, and cytokine assays Spleen cells were obtained and cultured as previously described (Terrazas et al. 1998). Briefly, single cell suspensions were prepared in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units of penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, 25 mM HEPES buffer, and 1% non-essential amino acids (all from GIBCO, BRL Grand Island, NY, USA). Erythrocytes were lysed and viable cells were adjusted (3 \times 10⁶ cells/ml), 100 μ l/well were placed into 96-well flat bottom culture plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and stimulated with OVA_{323–339} (10 μ g/ml) at 37°C for 72 h. Cells were harvested and processed for flow cytometry.

Supernatants from these cultures were analyzed for IFN- γ , IL-4, IL-5, and IL-10 (Biolgend, San Diego, CA, USA) production by ELISA.

Evaluation of cell proliferation using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) staining In some cultures, spleen cells were stained with 0.5 μ M of CFSE (5,6 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester). When the cultures were done (72 h), the cells were processed for flow cytometric analysis.

Relative gene expression by real-time quantitative PCR IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , Ym1, Mannose Receptor, toll-like receptor 4 and iNOS mRNA expression in spleen cells from mTSA or paTSA or saline plus OVA₃₂₃₋₃₃₉-injected Tg mice was determined by reverse transcription (RT), followed by analysis of relative gene expression using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen 2001). Briefly, total RNA was extracted from spleen cells using RNA STAT-60 (Tel-test, TX, USA). cDNA was prepared using First Strand Synthesis Superscript II kit (Invitrogen) from 5 μ g of total RNA. RT-PCR was performed using the Access RT-PCR System kit according to the manufacturer's protocol (Promega). The IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , Ym1, Mannose Receptor, and iNOS primers, were labeled with SYBR Green I (1X) (Amresco) and processed as described elsewhere (Ponchel et al. 2003). Real-time PCR was performed on the Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research, Australia). Housekeeping *GAPDH* gene was evaluated using the same PCR protocol. The specificity of PCR was verified by no signal in no-template control spleen cells samples. CT was used to reflect the relative mRNA expression levels to demonstrate the fold change of IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , Ym1, Mannose Receptor, and iNOS gene expression in mTSA or paTSA or saline plus OVA₃₂₃₋₃₃₉-injected Tg mice, compared with the expression of *GAPDH* gene. Data evaluation and processing was performed according to Ponchel et al. (Ponchel et al. 2003). The sequences of the primers used were for inducible Nitric Oxide Synthase were F-CTGGAG GAGCTCCTGCCTCATG and R-GCAGCATCCCCTCT GATGGTG. Primers for Interleukin-10 were F-ACCTGG TAGAAGTGATGCCCCAGGCA and R-TATGCAGTTG ATGAAGATGTCAAA. Primers for IFN- γ ? F-TGG ACC TGT GGG TTG TTG ACC TCA AAC TTGGC; R-TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC ATG GC; sequences and conditions for PCR of chitinase Ym1 and Arginase-1, IL-4, and TGF- β were used as reported (Nair et al. 2005).

Antibody ELISAs Peripheral blood was collected from tail snips 7 days after each immunization. Blood was centrifuged and store at -20°C until use. OVA-specific IgG1 and IgG2a titers were determined by ELISA as previously described (Rodriguez-Sosa et al. 2002a) and results are expressed as optical density \pm SE. Total IgE production was detected by Opt-EIA ELISA-set (Pharmingen).

Statistical analysis Comparisons among treatment groups considered in this work were made using Student's unpaired *t* test. $P < 0.05$ was considered significant. The statistical significance of the sera titers were determined by non-parametric tests using Mann-Whitney *U*-Wilcoxon Rank.

Results and discussion

Intact carbohydrates on soluble antigens of *T. crassiceps* metacestodes favor Th2-type Ab production Experimental infection with the cestode *T. crassiceps*, as observed with other helminth parasites, led to the high production of parasite-specific IgG1 and total IgE in mice, whereas, induced low levels of IgG2a (Terrazas et al. 1998). To examine the influence of soluble extract antigens of *T. crassiceps* metacestodes in the development of this (antibody) Ab response and their potential function as adjuvant for peptides, the systemic immune response to OVA₃₂₃₋₃₃₉ co-injected with *Taenia* soluble antigens (TSA) was evaluated in OVA TCR transgenic DO11.10 mice. Given that carbohydrate structures on some helminth parasites have been proposed to play an important role in modifying immune responses (Goodridge et al. 2004; Hokke and Yazdanbakhsh 2005), and because we and others have recently observed that *T. crassiceps* antigens are rich in carbohydrates (Gomez-Garcia et al. 2005; Lee et al. 2005), therefore, we used native, mock- or periodate-treated TSA to determine the role of intact carbohydrate components on TSA in the induction of Th2-type Ab response and cytokine production after repeated sensitization with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus TSA.

First, we developed PAGE and lectin-blot analysis to demonstrate that treatment of TSA with 20 mM of sodium metaperiodate leads to structural alteration in carbohydrates without any significant effect on proteins in TSA (Fig. 1). Periodate treatment of TSA altered their carbohydrate structure as it is shown by the lectin blot analysis (Fig. 1b), where Con-A was unable to bind periodate-treated TSA. In contrast, mock-treated TSA still did bind to Con-A. We used these mock TSA (mTSA) and periodate altered TSA (paTSA) to co-inject OVA Tg mice, mixing these antigens with OVA₃₂₃₋₃₃₉ once a week for 3 weeks.

To determine whether injection of mTSA or paTSA had an effect on the levels of total IgE and specific IgGs, we monitored the levels of IgE, IgG1, and IgG2a weekly. OVA-specific titers of IgG1 were significantly increased after the second injection of mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉, compared to OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus paTSA co-injected mice and control animals receiving OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus saline (data not shown). After the last injection, OVA-specific IgG1 titers from mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉-treated mice were significantly higher than mice receiving OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus saline than mice receiving OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus paTSA (Fig. 2a). On the other hand, mice sensitized with paTSA /OVA₃₂₃₋₃₃₉ displayed marked decreases in total IgE production (50%), compared with DO11.10 TCR Tg mice receiving mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉, which displayed significantly higher amounts of total IgE since the first injection of mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Fig. 2b).

These data indicate that mTSA induces important changes in such Th2-associated antibodies. In contrast to IgG1 and IgE, we found that DO11.10 Tg mice co-injected with mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ displayed lower titers of the Th1-associated OVA-specific IgG2a, compared with those mice

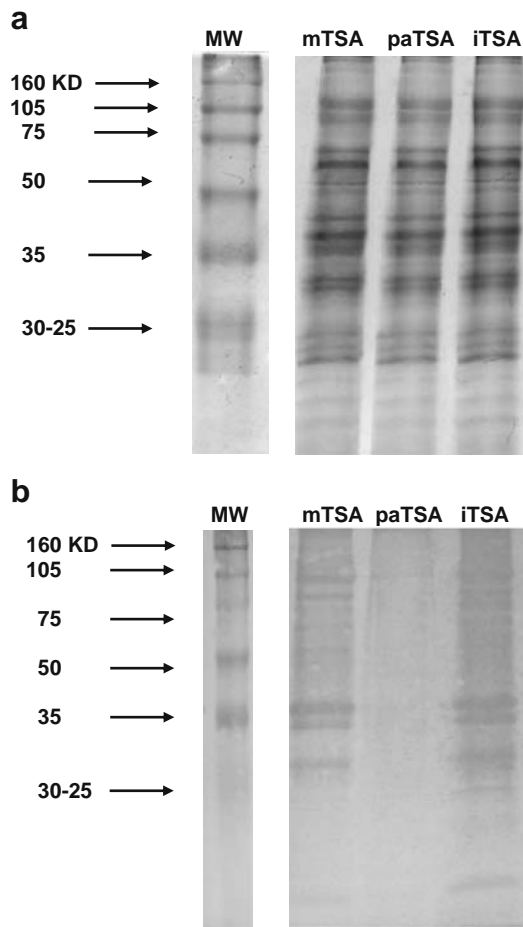


Fig. 1 *Taenia crassiceps*-antigens contain glycoproteins. SDS-PAGE (a) and Lectin blot analysis (b) of mock-treated soluble extracts of *T. crassiceps* (mTSA); sodium periodate-treated (paTSA) and intact TSA (iTSA) prepared as detailed in [Materials and methods](#). TSAs were separated by SDS-PAGE and transferred to NC sheets that were used to detect N-linked glycans with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated Con-A. Sources of antigens were different infected mice, and periodate-treatment was repeated three times more. MW indicates molecular weight markers

co-injected with paTSA, OVA-specific IgG2a titers remained significantly reduced through the third injection of mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Fig. 2c).

Inhibition of Th2 cytokine production in mice co-injected with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus periodate-treated TSA Given that experimental cysticercosis caused by *T. crassiceps* induces strong Th2-type-biased immune responses characterized by the production of high levels of IL-4, IL-5, and IL-13 from spleen cells but with little IFN- γ production (Rodriguez-Sosa et al. 2002a), we examined the ability of carbohydrate components on TSA to induce Th2 responses in vivo. Spleen cells from DO11.10 OVA Tg mice immunized with either mTSA or paTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ were assayed for cytokine transcripts of both of the signature cytokines for Th1 and Th2 responses (IFN- γ and IL-4, respectively) before recalling these cells in vitro with OVA peptide. While no important IL-4 up-regulation was detected in mice receiving periodate-altered carbohydrate TSA plus

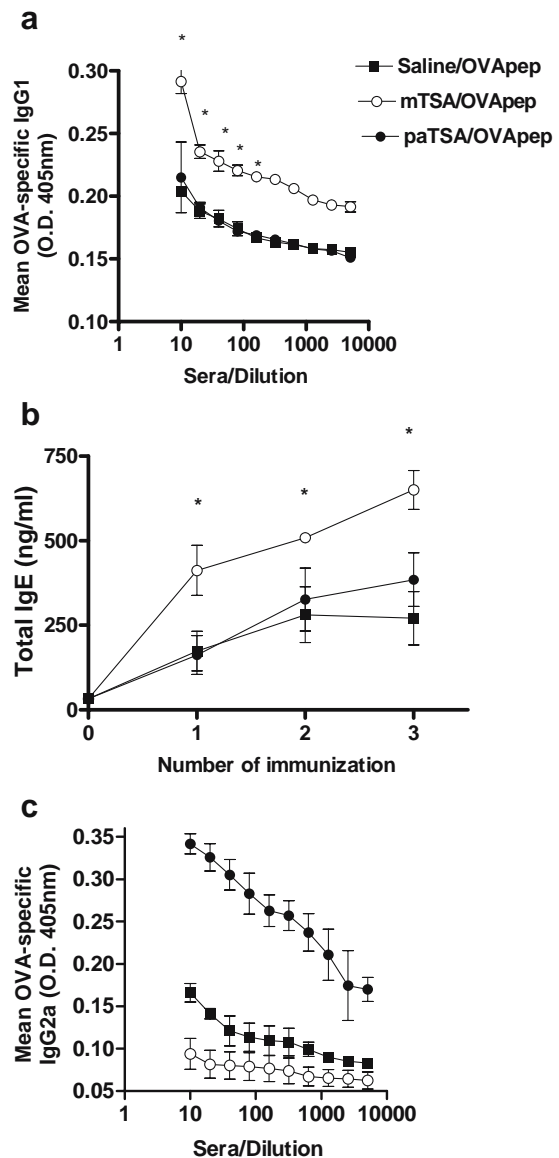


Fig. 2 Specific IgG isotypes and polyclonal IgE responses to TSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ immunization. a OVA-specific IgG1 response, b total IgE levels, and c OVA-specific IgG2a response in DO11.10 mice injected with mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉, paTSA plus OVA₂₃₋₃₅ or saline plus OVA₃₂₃₋₃₃₉. Sera were obtained 7 days after each injection. Data represent mean \pm SD of five individual mice per group, and are representative of two different experiments. * $P < 0.05$ (for mTSA, compared to treatment with paTSA)

OVA₃₂₃₋₃₃₉, intact TSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉-injected mice induced significantly more IL-4 transcripts after three weekly injections (Fig. 3a). In contrast, the absence of intact carbohydrate structures favored the transcripts for IFN- γ in DO11.10 OVA Tg mice, whereas, the mice receiving mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ showed four times lower transcripts for this gene, according to our real time-RT-PCR analysis (Fig. 3b).

To further investigate a possible role for the carbohydrate structures on driving Th2 responses, we performed recall in vitro stimulation with OVA peptide in spleen cells from mice sensitized with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus TSA. In these cultures, we

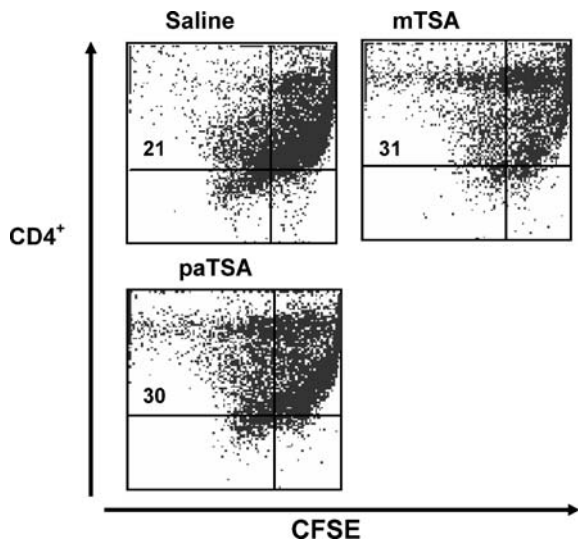


Fig. 3 TSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ immunization favors the proliferation of peptide-stimulated DO11.10 T CD4⁺ cell population. Lymphocytes from DO11.10 Tg OVA mice treated with TSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ were labeled with CFSE and stimulated with 10 g OVA₃₂₃₋₃₃₉ alone. After 72 h, spleen cells were processed for flow cytometric analysis. Representative CFSE profiles of CD4⁺ DO11.10 TCR⁺ cells isolated from the spleens of mice treated with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus saline or in combination with *mTSA* or *paTSA* are shown. Similar results were seen in two independent experiments

measured both OVA-specific proliferation by CFSE and OVA-specific production of Th2-associated IL-4, IL-5, and IL-10, as well as Th1-associated IFN- γ . We found that spleen cells from OVA TCR Tg mice co-injected with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus mock- or periodate-treated cestode antigens were able to efficiently proliferate, in response to OVA stimulation in vitro (Fig. 4). We also detected in the supernatants of spleen cell cultures from OVA TCR Tg mice co-injected with *mTSA* plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ significantly higher amounts of IL-4, IL-5, and IL-10 after OVA stimulation in vitro than those mice co-injected with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus saline (Fig. 5a-c). In contrast to native or mock-treated TSA, spleen cells from OVA Tg mice co-injected with OVA₃₂₃₋₃₃₉ plus antigens with altered glycans by periodate treatment produced significantly less of these Th2-type cytokines. Conversely, as show in Fig. 5d, the OVA-specific IFN- γ production was depressed in splenocyte culture from mice injected with *mTSA*/OVA₃₂₃₋₃₃₉, while it was significantly increased in mice receiving *paTSA*/OVA₃₂₃₋₃₃₉.

Our data showed that TSA drives Th2-biased responses to heterologous antigens without requiring live infection of mice, and also that this activity is abolished by mild-periodate treatment of the soluble antigens. According to these data, TSA may act as a Th2-promoting adjuvant on bystander antigens, as co-administration of TSA plus OVA peptide provokes a Th2 response specific to the coincident OVA antigen. In fact, our data fit with the induction of IL-4 and IL-5 by glycosylated antigens and the classical induction of switching to IgG1 and IgE by these cytokines. In contrast, IFN- γ that is associated with switching to IgG2a was poorly induced in mice receiving glycosylated antigens. Thus, when glycans were altered by periodate treatment, the Th2 -

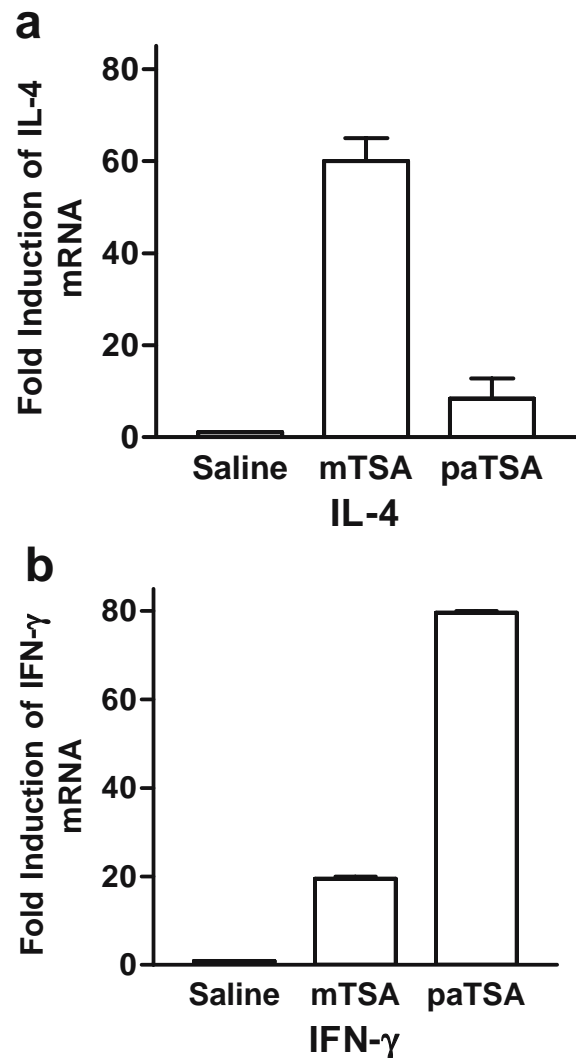
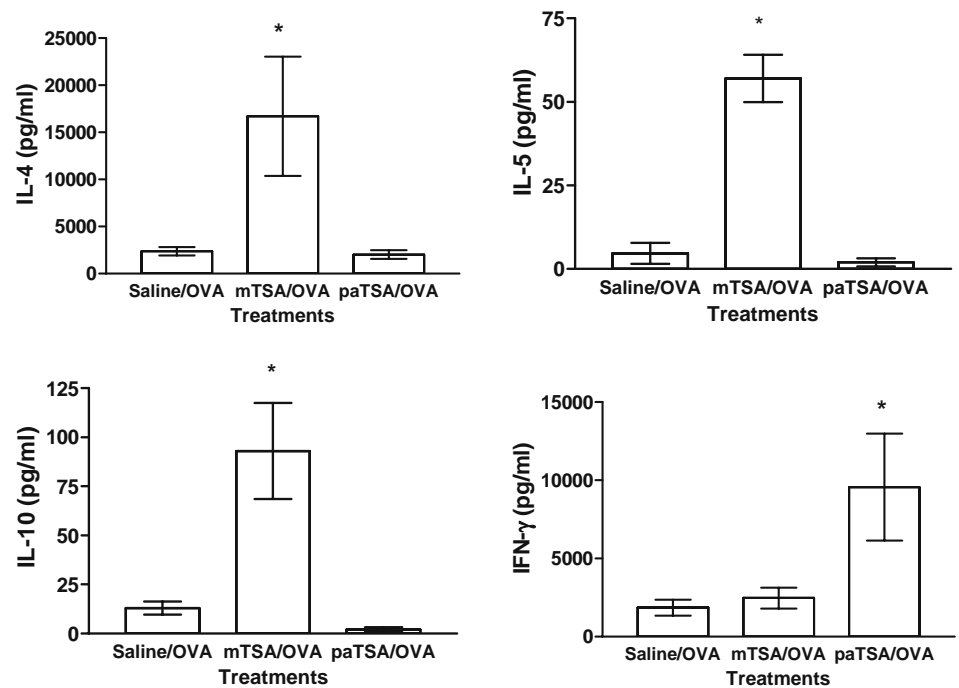


Fig. 4 Real-time RT-PCR analysis of the signature cytokines IL-4 (Th2) and IFN- γ (Th1) in spleen cells from DO11.10 OVA Tg mice. RNA was isolated from splenocytes at the indicated times after injections with mock-treated antigens of *T. crassiceps* or *paTSA* or saline plus OVA₃₂₃₋₃₃₉, RNA samples were individually processed (three mice per group) and subjected to real-time RT-PCR analysis, results were analyzed as described in M&M and compared to the level of gene expression of GAPDH, arbitrarily assigned the value 1. **a** IL-4 and **b** IFN- γ . Bars represent the fold increase in gene expression over the expression level in the control gene. Data are representative of two independent experiments

inducing activity of TSA was lost. The ability of TSA to generate a strong Th2 response when co-administered with OVA peptide is a clear evidence that the generation of Th2 immune responses by this cestode parasite is not simply due to a 'default' pathway in the absence of Th1-oriented stimulation, but to undefined carbohydrate components present in these antigens. Thus, together with previous reports with glycoproteins from *Brugia malayi* (nematode) (Tawill et al. 2004) and SEA (Okano et al. 1999) from *Schistosoma mansoni* (trematode), our data with cestode antigens support the idea that natural glycans on helminth parasites are essential to imprint Th2-type responses. Moreover, they also suggest that a similar mechanism

Fig. 5 Cytokine profile of spleen cells from DO11.10 OVA Tg mice, after treatment of TSA. Spleen cells were obtained after the third injection with mock carbohydrate antigens of *T. crassiceps* or *paTSA* or saline plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ and re-stimulated in vitro with 20 µg/ml of OVA₃₂₃₋₃₃₉ for 72 h. Supernatants were analyzed for IL-4 (a), IL-5 (b), IL-10 (c), and IFN-γ (d) production by ELISA. Results show the mean±SD of two different experiments. **P*<0.05 (for mTSA, compared to treatment with paTSA)



should be turned on through these glycoconjugates; however, it is not yet clear which receptors are used by the extracts from all these parasites to induce Th2 responses.

Intact glycans are critical for the induction of macrophage alternative activation genes Recent advances in the understanding of the immuno-regulatory abilities of helminthic infections give the macrophages a central role as they can become alternatively activated (AAM) and/or suppressive (Allen and Loke 2001; Rodriguez-Sosa et al. 2002b; Donnelly et al. 2005). Several gene markers for alternative activation are now well-identified (Raes et al. 2002; Mosser 2003), such as arginase 1 (Arg1), a liver enzyme that is inducible in non-liver cells, which metabolizes arginine to ornithine and urea by using Arg 1, instead of producing NO and citrulline by using iNOS. As we and others have previously reported that AAM arises during *T. crassiceps* infection (Rodriguez-Sosa et al. 2002b; Raes et al. 2005), we hypothesized that induction of alternative activation markers might occur also during the repetitive injection of TSA with intact glycans plus OVA in DO10.11 OVA Tg mice. We used real time RT-PCR analysis of spleen RNA expression for three alternative activation markers, Arg1, Yml1, and Mannose Receptor (MR) (Fig. 6). We detected major increases in the expression for all these genes in samples from mice co-injected with mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉, compared with samples from mice receiving paTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ or saline/OVA₃₂₃₋₃₃₉. Remarkably, MR transcripts were up-regulated up to ten times by treatment with mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ when compared with mice injected with paTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉. Moreover, iNOS transcript, a marker for classical activated macrophages (inflammatory marker), were significantly increased in mice treated with paTSA, whereas, a limited expression for this gene was detected in mTSA-treated OVA TCR Tg

mice (Fig. 6). Other genes analyzed, such as TLR4, Lipox5, and RANTES were unchanged (data not shown).

Because Th1 differentiation in response to mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ appeared defective in Tg mice, we asked for a possible induction of anti-inflammatory gene expression. IL-10 production has been previously found elevated in *T. crassiceps* cysticercosis, as a means to down-regulate the type 1 response that can otherwise eliminate this parasite (Terrazas et al. 1999; Rodriguez-Sosa et al. 2004). When we look for the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-β by real time RT-PCR analysis, we found both of them highly up-regulated in spleen cells from mice receiving mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉ (Fig. 6).

Although the phenotype of AAM may be clearly established, their function and range of activities in vivo has not been fully characterized. It has been proposed that AAM has the ability to induce the differentiation of naive T cells to Th2 phenotype directly (Allen and Loke 2001) or by the inhibition of type 1 responses (Allen et al. 1996; Goodridge et al. 2001) by releasing soluble mediators such as IL-10 and transforming growth factor β (TGF-β). As we have shown in this paper, these consistently reported properties of AAM are dependent on the presence of intact glycans on *Taenia* antigens. Thus, IL-10 and TGF-β expressed at relatively high levels may inhibit NO production, while increasing arginase activity (Allen and Loke, 2001). Such observations are important in the context of the present study, as TGF-β apparently may favor the production of Th2 responses by inhibiting Th1-induced macrophage activation.

Modulation of cytokine and Ab responses by glycans on TSA is maintained in TLR4 mutant mice Contrasting reports regarding the potential receptors in innate cells for helminth glycans have recently been suggested, among

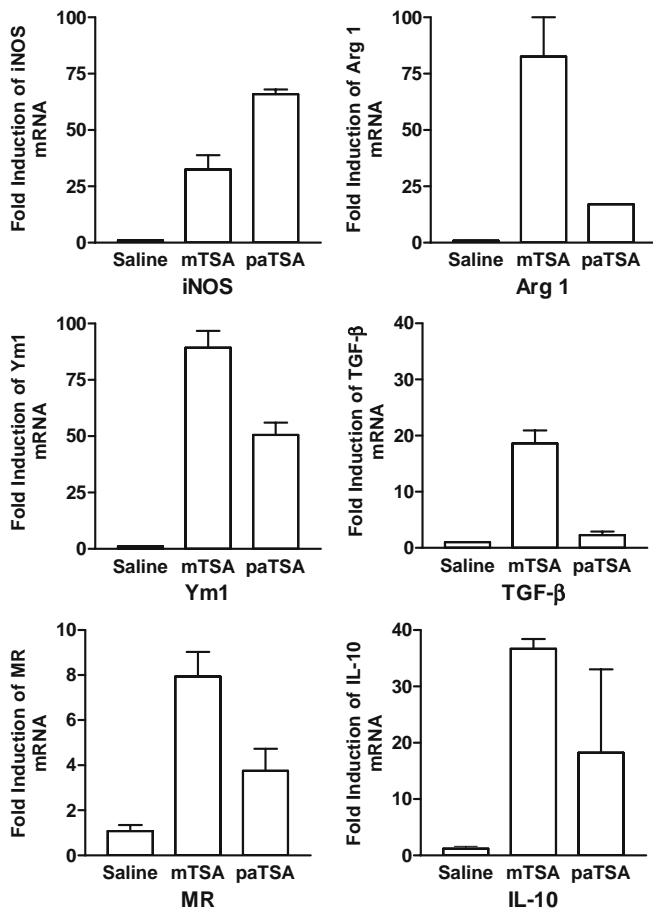


Fig. 6 Injection of mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ induces the expression of gene markers of alternatively activated macrophages into the spleen cells of DO11.10 Tg mice. Spleen cells recovered from DO11.10 Tg mice after repeated i.p. delivery of mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ exhibit increased expression of Arg1, Ym1, and MMR; these cells did express low transcripts for iNOS, a marker of classically activated macrophages. In contrast, injection of paTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉, induced higher transcripts for iNOS. No differences were observed in TLR4, CCL5, and 5-Lox genes among groups (data not shown). mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ also induced higher transcripts of Th2-associated and anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-β. Values for mRNA are expressed in relative absorbance units and were standardized per unit of GAPDH per sample. **P*<0.05 (for mTSA, compared to treatment with paTSA)

them C-type lectins and TLRs (Goodridge et al. 2005; McGreal et al. 2005; Nadesalingam et al. 2005). One of the putative receptors most studied has been TLR4 (Thomas et al. 2003; Dissanayake et al. 2004; Taylor et al. 2005c); however, TLR4 is mainly known to induce strong pro-inflammatory cytokines after triggering it with different bacterial and/or intracellular parasites (Schnare et al. 2001). To explore the possibility that mTSA may act via TLR4-signaling in the Th2 biasing, we used C3H/HeJ mice that had defective activity of TLR4. C3H/HeJ mice were similarly injected with mTSA/OVA, paTSA/OVA or saline/OVA. IgE and IgG were measured to determine if the B-cell responses in the TLR4-mutant mice were functional. Total serum IgE levels were comparable in mTSA/OVA-immunized TLR4-mutant mice with those levels found in paTSA/OVA or saline/OVA-treated mice

(Fig. 7). In contrast, OVA-specific IgG1 responses were more elevated in the mTSA/OVA-immunized TLR4-mutant mice (Fig. 7a). Furthermore, these TLR4 defective mice developed the anti-inflammatory-biasing activity induced by intact glycans in TSA plus OVA-peptide, given that high levels of mRNA for TGF-β were also detected in the spleen cells of these mice, whereas, mRNA for IFN-γ was barely induced with mTSA/OVA treatment. In contrast, C3H/HeJ mice receiving paTSA/OVA displayed increased transcripts of mRNA for IFN-γ and iNOS, but lower transcripts for TGF-β (Fig. 7b). Taken together, our data in Fig. 7 appear that glycans present in *Taenia* antigens do not signal via TLR4.

Helminth infections stimulate strong immune responses biased towards Th2-type and induce high levels of anti-inflammatory cytokines (Rodriguez-Sosa et al. 2002a; Gause et al. 2003). In this paper, we demonstrated, using a very sensitive model (DO11.10 TCR-Tg mice), the effect of *Taenia* soluble antigens containing intact glycoconjugates on the Th1/Th2 and anti-inflammatory profile of the immune response to a well-defined bystander antigen as well as the amplitude of the OVA-specific T-cell response induced in vivo. We also showed in this paper that glycosylated soluble antigens from *Taenia* essentially reproduce both the Th2-biasing and elevated IgE levels seen during *Taenia* infections. Further similarities between responses in mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉-injected mice and helminth-infected mice are the suppressed levels of pro-inflammatory markers (Taylor et al. 2005a) detected after repeated injection of mTSA/OVA₃₂₃₋₃₃₉. Taken together, our results indicate that intact carbohydrate components from TSA are involved in skewing Th2 type responses to OVA peptide antigen in OVA Tg mice.

In addition, a recent study found that *N*-glycans on *T. crassiceps* metacestodes (Lee et al. 2005) show a rare terminal structure consisting of Fucose (Fuc)α1-3 *N*-acetylglucosamine (GlcNAc), which are similar to core Fucα1-3GlcNAc found in schistosomes (Hokke and Yazdanbakhsh 2005). These structures in schistosomes have been reported to act as adjuvant and induce Th2-type responses (Okano et al. 2001), and the same structures are susceptible to periodate alteration (Okano et al. 1999). Thus, it is plausible that *N*-glycans on *T. crassiceps* metacestodes may actively participate as Th2 inducers. The mechanism of action as well as putative receptors for these glycans has yet to be defined. However, an attractive proposition is that TSA glycans can activate or modulate some population of accessory cells, as APC (macrophages, dendritic cells or granulocytes) through triggering a specific receptor, and induce these populations to drive naive T cells towards type 2 responses.

Interestingly, we observed an increased expression of the Mannose Receptor (MR) in spleen cells obtained from DO11.10 mice receiving mTSA/OVA (Fig. 6). MR is considered as a PRR and belongs to the family of C-type lectin receptors (Taylor et al. 2005b). MR recognizes glycosylated molecules with terminal mannose, fucose, or *N*-acetylglucosamine moieties and internalizes soluble and particulate ligands through the endocytic and phagocytic

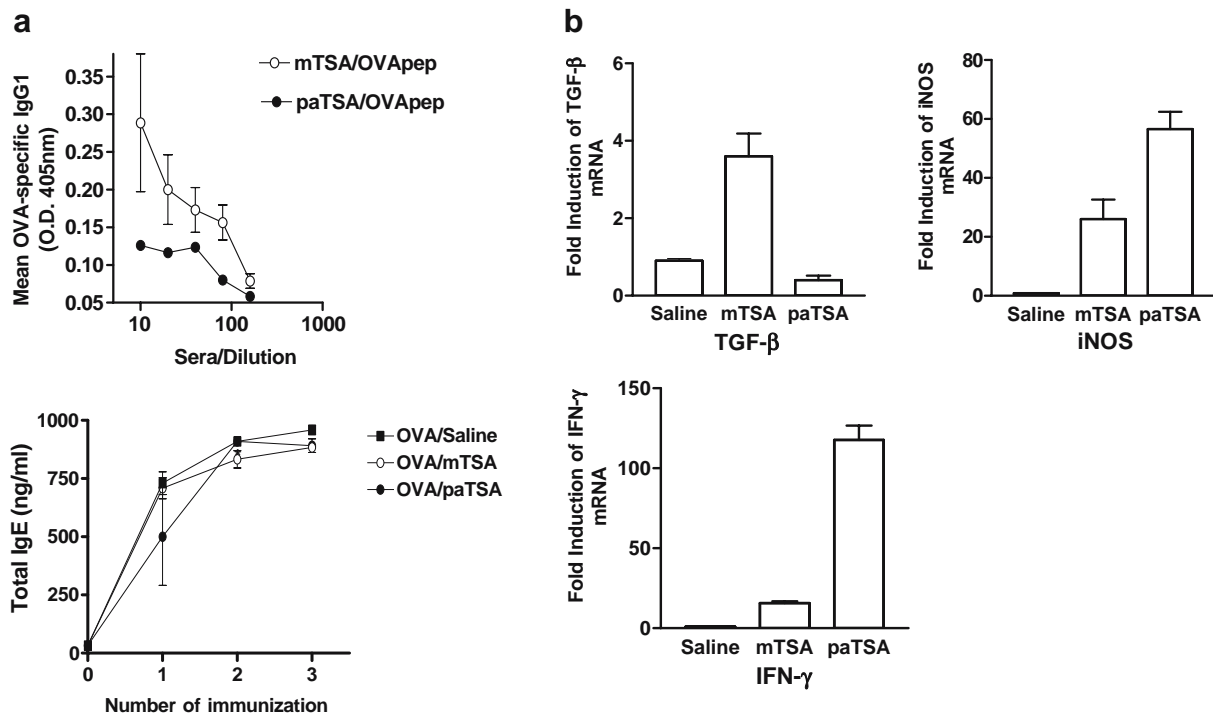


Fig. 7 TLR4-independent anti-inflammatory-biasing of mTSA. C3H/HeJ mice were weekly injected with mTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉; paTSA plus OVA₃₂₃₋₃₃₉ or saline plus OVA₃₂₃₋₃₃₉. In sera were evaluated OVA-specific titers of IgG1 and IgG2a (not detected) as

well as total IgE (a). After the last injection, spleen cells were obtained and processed for real-time RT-PCR analysis of mRNA transcripts for IFN- γ , TGF- β and iNOS (b). * $P < 0.05$ (for mTSA, compared to treatment with paTSA)

pathways (Taylor et al. 2005b). MR is mainly expressed in macrophages, can be induced in DCs, and seems to play a role in the early immune response against invading pathogens (McGreal et al. 2005). Thus, given its higher expression in mice receiving mTSA/OVA, MR could be a candidate receptor for intact glycans on TSA and participate in favoring Th2 responses, instead a possible role for TLR4, because in the current study the Th2 immune response was significantly increased in immunized C3H/HeJ mice. Therefore, TLR4 is not required for the development of the Th2 response against bystander OVA-peptide co-injected with glycosylated *Taenia* antigens. However, the knowledge regarding helminth structures that enhance both Th2 type and anti-inflammatory responses and their putative receptors involved in recognizing them are still in a rudimentary state.

Acknowledgements This work was supported by grant 41584-M from CONACYT and IN223003 from DGAPA-UNAM, and it is part of the requirements to obtain the doctorate degree in the Postgraduate Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine; U.N.A.M. for L. G. G., who is supported by a fellowship from CONACYT-Mexico. L. G. G. and I. R. M. contributed equally to this work.

References

Allen JE, Lawrence RA, Maizels RM (1996) APC from mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. *Int Immunol* 8:143-151

- Allen JE, Loke P (2001) Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol* 23:345-352
- Brady MT, O'Neill SM, Dalton JP, Mills KHG (1999) *Fasciola hepatica* suppresses a protective Th1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 67:5372-5378
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167:416-423
- Dissanayake S, Amith RS, Shahin A (2004) *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL-6 expression in naive murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs). *Mol Immunol* 41:391-398
- Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP (2005) Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun* 73:166-173
- Flavell RA, Rincon M, Zheng WP, Li B, Enslin H, Raingeaud J, Davis RJ (1998) The regulation of CD4 T cell differentiation. *Eur Cytokine Netw* 9:26-32
- Gause WC, Urban JF Jr, Stadelcker MJ (2003) The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol* 24:269-277
- Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI (2005) Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol* 27:395-405
- Goodridge HS, Wilson EH, Harnett W, Campbell CC, Harnett MM, Liew FY (2001) Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilum vitae*. *J Immunol* 167:940-945
- Goodridge HS, Marshall FA, Wilson EH, Houston KM, Liew FY, Harnett MM, Harnett W (2004) In vivo exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology* 113:491-498

- Goodridge HS, Marshall FA, Else KJ, Houston KM, Egan C, Al-Riyami L, Liew FY, Harnett W, Harnett MM (2005) Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol* 174:284–293
- Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine *Schistosomiasis mansoni*. *J Immunol* 146:1322–1327
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621–667
- Hokke CH, Yazdanbakhsh M (2005) Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol* 27:257–264
- Holland MJ, Harcus YM, Balic A, Maizels RM (2005) Th2 induction by Nippostrongylus secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC Class I-related receptors. *Immunol Lett* 96:93–101
- Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S, Vaz AJ (2003) Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop* 89:73–84
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216
- Kaisho T, Akira S (2003) Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Curr Mol Med* 3:759–771
- Lee JJ, Dissanayake S, Panico M, Morris HR, Dell A, Haslam SM (2005) Mass spectrometric characterisation of *Taenia crassiceps* metacystode N-glycans. *Mol Biochem Parasitol* 143:245–249
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-[Delta]Delta}CT method. *Methods* 25:402–408
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE (2004) Helminth parasites—masters of regulation. *Immunol Rev* 201:89–116
- McGreal EP, Miller JL, Gordon S (2005) Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol* 17:18–24
- Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73:209–212
- Nadesalingam J, Dodds AW, Reid KB, Palaniyar N (2005) Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via the N-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *J Immunol* 175:1785–1794
- Nair MG, Gallagher IJ, Taylor MD, Loke P, Coulson PS, Wilson RA, Maizels RM, Allen JE (2005) Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect Immun* 73:385–394
- Nookala S, Srinivasan S, Kaliraj P, Narayanan RB, Nutman TB (2004) Impairment of tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human lymphatic filariasis. *Infect Immun* 72:2598–2604
- Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA Jr (1999) Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163:6712–6717
- Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA Jr (2001) Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 167:442–450
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 3:18
- Raes G, De Baetselier P, Noel W, Beschin A, Brombacher F, Hassanzadeh Gh G (2002) Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* 71:597–602
- Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, Vanham G, Noel W, Bogaert P, Boonefaes T, Kindt A, Van den Bergh R, Leenen PJM, De Baetselier P, Ghassabeh GH (2005) Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 77:321–327
- Reimold AM, Kim J, Finberg R, Glimcher LH (2001) Decreased immediate inflammatory gene induction in activating transcription factor-2 mutant mice. *Int Immunol* 13:241–248
- Rodriguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI (2002a) Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the Helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 168:3135–3139
- Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI (2002b) Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun* 70:3656–3664
- Rodriguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI (2004) A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 72:4552–4560
- Roport C, Gazzinelli RT (2004) Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Endotoxin Res* 10:425–430
- Sciutto E, Fragoso G, Baca M, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E (1995) Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 63:2277–2281
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2:947–950
- Tawill S, Le Goff L, Ali F, Blaxter M, Allen JE (2004) Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infect Immun* 72:398–407
- Taylor MD, LeGoff L, Harris A, Malone E, Allen JE, Maizels RM (2005a) Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* 174:4924–4933
- Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L (2005b) The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 26:104–110
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S (2005c) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23:901–944
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84:74–81
- Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 85:135–141
- Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'Dara AA, Piskorska D, McGuire E, Harn DA (2003) Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 171:5837–5841
- Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP (2000) A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 164:6453–6460

Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases, 2007: 183-198
ISBN: 81-308-0166-3 Editor: Luis I. Terrazas

Modulation of antigen-presenting cells' activities by helminth-derived molecules

Lorena Gómez-García¹ and Luis I. Terrazas²

¹Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

²Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

Abstract

Helminth parasites are a major cause of global infectious diseases which are normally both chronic and long-lasting. Much like other parasites, helminthes have developed complicated strategies in order to infect and successfully colonize their hosts. The critical factor in the interaction with the host is the immune system; through a series of intricate mechanisms, these parasites are able to impair or alter key early immune response elements such as the function of dendritic cells and macrophages. It has been proven that several molecules of helminth parasites can affect

Correspondence/Reprint request: Dr. Lorena Gómez-García, Juan Badiano No. 1 Col. Sección XVI C.P. 14080, México D.F., Mexico Ciudad Universitaria, Mexico City, 04510 Mexico
E-mail: lorego@starmedia.com

the host's immune response in different ways, thereby leading to changes that presumably help the parasite survive. In this chapter, we review recent advances in the interaction between helminth-derived molecules and antigen-presenting cells' function.

Introduction

Helminthes constitute one of largest and most widely distributed groups of animals on the planet and, a great number of them have adapted to the parasitic life in highly successful ways (1, 2). Their success as parasites depends on a series of intricate and highly evolved adaptations that enable them to evade destruction by the host's immune system. Because helminth parasites are constantly exposed to attack by the host's immune cells, and even though they are able to survive in their hosts for long periods of time, it has been thought that they must have developed complex strategies to avoid or even resist immune system attack (1-3). In fact, in recent years complex mechanisms to avoid, block and modulate elements of the immune responses that are potentially dangerous for the parasite have been described (4-6).

One of the steps in adaptation occurs when parasitic invaders confront elements that provide a crucial link between the innate response and the adaptive immune response: the antigen-presenting cells (APCs). Thus, innate immune recognition of pathogens triggers both immediate defenses against them and the initiation of adaptive immune responses. Dendritic Cells (DCs) and macrophages play a key role in sensing and processing microbial information; they also direct the subsequent differentiation of lymphocytes into effector cells suitable to battle particular types of infections, via both interaction with co-stimulatory molecules expressed on the APC surface and the secretion of cytokines.

Among APCs there are two cell types of particular importance due their capacity to initiate and regulate the immune response: macrophages and dendritic cells. Macrophages have several pleiotropic capacities among the immune system; their roles span diverse biological functions from phagocytosis (direct killing of pathogens), pro-inflammatory activity to stimulation of adaptive immune responses through cytokine release, co-stimulatory molecules and antigen processing and presentation (7). On the other hand, the cells that clearly initiate primary immune response are the DCs, due to their exclusive ability to present antigens to naive T-cells (8) and due to their being the main and early source of cytokines such as IL-12 and IL-10, which can greatly influence the next step of the immune response. In this way, one of the main obstacles for pathogens to defeat is the macrophage and DC action against the invaders. It has been shown that some molecules derived from helminth parasites can alter the activity of these cells, presumably leading to immune system changes that favor the parasite's presence (9, 10).

Parasite helminth diversity

Parasitic helminthes are a highly diverse group of organisms displaying very different morphologies, accessory structures, sexual and feeding behaviours as well as life cycle stages. At the same time, they also generate a variety of diseases and fill a variety of niches in their hosts, since they may spend their entire life in a specific organ or tissue, such as the gastrointestinal tract, or travel into different organs and systems in the host (skin, bladder, muscle, liver, lung, brain) to finally reach the specific organ where they cause disease. Helminth parasites also appear to follow varied and complicated infection routes in the host tissues. Infections mainly originate with the ingestion of eggs/larvae (oral route) or in active penetration of the skin by parasite larvae or by the bite of their vectors.

Based on the diversity of helminth parasites and in the diseases they cause, one could expect a wide range of different helminth-induced immune responses. Surprisingly, despite all these differences, the organisms share a unique immunological feature by inducing very similar immune responses in their hosts. This reaction is collectively termed as the characteristic immune response to a “helminth infection”, although this immune response is not necessarily the only reaction of the host immune system to a specific infection. Immune response to a helminth infection is typified by: the profile of cytokines induced to high levels, including IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (11); the high levels of characteristic antibodies such as IgG1 and IgE; the increased numbers of particular cell populations such as eosinophils, goblet cells and mast cells; and low T-cell proliferative responses to polyclonal stimuli and to specific parasite antigens and “bystander” decreased T-cell proliferation (12). Two more shared features of helminth infections have recently been identified: regulatory cell subpopulations, such as T regulatory cells (13, 14), and alternatively activated macrophages (Horsnell & Brombacher, in this book & 7, 15). Furthermore, this kind of immune response can be found in experimental hosts infected not only with parasites but also with free-living helminths (i.e. *Caenorhabditis elegans*); this may be indicative of an evolutionarily conserved ability and a likely conserved pattern of molecules with similar immunomodulatory activities (16). Of note, aside from experimental infections these responses are features of human parasitosis caused by helminths. Notwithstanding, these infections can become chronic and persist over many years, presumably because of helminthes' ability to modulate the host immune system to tolerate the parasites for a long time. Different authors have catalogued that helminth infections were causative agents of immuno-suppression; however, such a concept has greatly changed now that the response generated by helminthic infections is more acceptably identified as helminth-induced immuno-modulation rather than suppression, since high levels of antibodies and high numbers of parasite-specific immune cells are detected in hosts parasitized with helminthes (12). Thus, immunomodulation by helminthes

is not just contained to antigen-specific responses to these parasites, but has been shown to spread to bystander antigens including parasites, viruses and vaccines (12). How do helminthes and their byproducts drastically modify and shape the immune response of their hosts? This is a question driving researchers around the world who have worked in recent years both to understand how to attack to these parasites through development of effective vaccines (as-yet undeveloped) or treatments, and to understand and take advantage of these properties in order to apply them strategically, as in cases of autoimmunity or perhaps as adjuvants.

One of the myriad of possible mechanisms involved in driving remarkable similar immune responses to helminth infections, may be the products they release or display on their structures, which in turn can target similar cell populations, in special those participating in early events of the immune response such as APCs, where these helminth-derived products may interfere with the antigen processing; may impair the maturation and cytokine release of APCs, (Table 1) even inducing a different state of activation of these cells or altering their function may be taking advantage by acting through widely expressed receptors.

Table 1. Main immunomodulatory effects of helminth-derived molecules on antigen-presenting cells.

Helminth-derived molecules	MACROPHAGES	DENDRITIC CELLS
Cystatins	<p>↑ NO, IL-10</p> <p>↓ MHC-II, Antigen Presentation</p> <p>↓ Lymphoproliferation</p>	<p>↓ MHC-II, Antigen Presentation, Lymphoproliferation</p>
Filarial Antigens	ND	<p>↓ IL-12p40 & p70, IL-10, Lymphoproliferation</p> <p>MHC-I & MHC-II unaffected</p>
NES	ND	<p>↑ CD86, OX40L</p> <p>↓ IL-12p70, Induction of Th2 responses</p>
SEA	<p>↑ IL-10,</p> <p>↓ Lymphoproliferation</p>	<p>↓ IL-12, MHC-II, CD80, CD86 & pro-inflammatory genes in general</p> <p>Induction of Th2 responses</p>
<i>S. mansoni</i> -lipids	<p>↑ IL-10, IL-6, TGF-β</p>	<p>↓ IL-12, Induction of Th2 responses</p>
ES-62	<p>↓ IL-12, IL-6, TNF-α</p>	<p>↑ CD40, CD80, CD86, Induction of Th2 responses</p>
<i>A. suum</i> -glycolipids	<p>In response to LPS:</p> <p>↓ IL-12p40</p>	<p>↓ CD80, CD86, CD40</p> <p>Lymphoproliferation when they are used as APC</p>
<i>E. granulosus</i> hydatid cyst antigens	ND	<p>Exposed to LPS: ↓ CD80, CD86, HLA-DR, IL-12p70, TNF-α</p> <p>Immature: ↑ CD80, CD86, CD40, HLA-DR, TNF-α, IL-10, IL-6</p> <p>Exposed to LPS: ↓ CD80, CD86, TNF-α, IL-12p70</p> <p>Mature: Induction of Th2 responses</p>

Interference with antigen processing and presentation

Studies of *Brugia malayi* provided the first evidence that a helminth molecule can directly interfere with the host's antigen-processing and presentation pathway. The product responsible for this interference was shown to be a cystatin (17). The cystatin superfamily consists of evolutionarily related, reversible, tight-binding inhibitors of cysteine proteases (18, 19), which in turn are found throughout the animal kingdom and are involved in different biological processes such as antigen presentation and inflammation (19).

Cysteine protease inhibitors, or cystatins, are well described pathogenic factors and have been described for different helminth parasites such as *Acanthocheilonema vitae* (20), *Onchocerca volvulus* (21), *Nippostrongylus brasiliensis* (22), *Litomosoides sigmodontis* (23), *Haemonchus contortus* (22), *Taenia crassiceps* and *T. solium* (24, 25) Of all the immunomodulatory activities attributed to these helminthes, some are clearly due to cystatin –action.

One of the main steps in the specific T-cell responses is the formation of peptide-major histocompatibility complex (MHC-II) molecule complexes on APCs such as macrophages and DCs. In this process, cysteine proteases from the host play a major role in “breaking” the antigenic proteins into small peptides; here, the cystatins play a role in inhibiting the host's protease activity. It has been demonstrated that nematode cystatins inhibit cysteine proteases, leading to a dramatic change in the antigen processing and in the efficient generation of MHC II molecules loaded with helminth peptides. The result is a drastic reduction in antigen presentation by APCs (26). In fact, the presence of *O. volvulus* cystatin resulted in a 72% decrease in HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-DR) and a 37% decrease in co-stimulation molecules of human monocytes exposed to this molecule (21). *Nippostrongylus brasiliensis* cystatin (nippocystatin) has also been reported to suppress expression of MHC-II molecules and, *in vitro*, inhibits ovalbumin (OVA)-antigen processing by the host's APCs (22).

The cystatin secreted by the filarial nematode *Brugia malayi*, named Bm-CPI-2, interferes with the action of different cysteine proteases involved in the MHC-II pathway, the papain-like cathepsins B, L and S and the legumain-type asparagines endopeptidase. In an experimental model, CPI-2 blocks the processing presentation of tetanus toxoid antigen in human antigen-presenting cells (17).

Cystatins possess other immunomodulatory properties besides their interference with the antigen-processing pathway, such as their contribution to down-regulation of T-cell proliferation and induction of anti-inflammatory cytokine responses. For example, a cystatin from *Litomosoides sigmodontis* down-regulate spleen cell proliferation (23); a nippocystatin from *N. brasiliensis* does the same and also suppresses cytokine and IgE production

(22); and cystatins from *O. volvulus* and *A. vitae* suppress the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and murine spleen cells, meanwhile increasing the production of IL-10 by PBMCs and the up-regulation of nitric oxide by macrophages (27).

Other molecules that probably affect the antigen-processing pathway are the schistosome soluble egg antigens (SEA), given that DCs exposed to SEA showed a difference in antigen processing by segregating SEA to a different compartment than the *Propriosebacterium acnes* antigen. Since these two antigens are handled very differently, this could provide a potential link in the contrasting responses they induce in these cells (9).

Impaired differentiation and cytokine production in APCs by helminth-derived products

During development and differentiation, APCs can be exposed to different antigens which significantly influence their function and maturation. Semnani and co-workers (28) demonstrated that when monocytes engulfed *B. malayi* microfilariae antigens while differentiating to DCs, they displayed inhibited production of IL-12p1+6, IL-12p70 and IL-10 in response to *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC) and SAC plus IFN- γ . Cell viability or expression of co-stimulatory molecules, including MHC-I and MHC-II, were not altered; however, DCs exposed to filarial antigens induced lymphocyte reactions to a lesser degree than DCs that were not exposed to the filarial antigen.

Nippostrongylus brasiliensis secretes *in vitro* diverse glycoproteins named excretory-secretory products (NES). These antigens polarize the immune response to a Th2-type response without requiring live infection of the mice. Murine bone marrow-derived DCs pulsed with *N. brasiliensis* excretory/secretory antigen (NES) can, upon transfer to naive recipients, prime mice for Th2 responsiveness (29). NES upregulates DC markers associated with Th2 promotion, including CD86 and OX40L, while suppressing the IL-12p70 response. Interestingly, the high LPS-induced IL-12p70 levels are also suppressed in DCs that had been pre-incubated with NES (30).

Schistosomes produce a great variety of glycosylated proteins and lipids to which mainly humoral immune responses are directed. In the case of *Schistosoma mansoni*, proteins, glycans and lipoconjugates all can induce Th2-type responses. Several groups have shown that schistosome soluble egg antigens (SEA) contain molecules that drive the polarized CD4⁺ Th2 response (3, 31). Possible involved mechanisms have emerged since immature DCs pulsed with SEA do not show an increase in expression of co-stimulatory molecules or cytokines (32-34). Interestingly, SEA also suppresses LPS-induced activation of immature murine DCs, including expression of MHC class II and co-stimulatory molecules as well as IL-12 production. Moreover,

SEA inhibits the ability of CpG, poly (I:C) and hyaluronic acid (HA) to induce production of IL-12 and upregulation of MHC class II, CD80, and CD86 by DC. Even though IL-10 production is augmented in the presence of SEA, not all the SEA effects on DCs depend on this cytokine (35). In these cells, SEA also suppresses the LPS-induced expression of 46 genes, many of which are pro-inflammatory and prevent the LPS-induced down-regulation of 37 genes (35). Thus, SEA appears to have a profound effect on TLR ligand-induced DC maturation/activation, suppressing inflammatory events associated with the development of Th1-type responses.

This type of immune modulation by SEA from *S. mansoni* has been shown to depend on the glycans present in these antigens, since treatment with sodium metaperiodate abrogates their ability to induce Th2-type responses (36). Carbohydrates on schistosome eggs are not just necessary, but also sufficient, for much of the schistosome's immunomodulatory function. For example, some glycans found in SEA, such as core α -3-fucose, β 2-xylose and Lewis X, have been shown to play an important role in the changes observed in DCs (33). DCs pulsed with fractions containing a motif of α 3-fucosylation of a GlcNac or of β -xylosylated core sugar drive strong Th2-cell responses in mice (37); two of the main glycans found on schistosome eggs, lacto-N-fucopentose III and lacto-N-neotetraose, are also highly active in macrophages promoting IL-10 production and inducing a suppressive phenotype that actively blocks T-cell proliferation (38, 39). LNFPIII and LNnT conjugates have also been shown to activate macrophages *in vivo*. Injection of either conjugate in mice leads to a rapid expansion of a population of CD11b+, Gr1+, F480+ peritoneal cells (38, 39). These cells have potent suppressive activity on naïve CD4+ T and/or CD8+ T cells, and they have been called natural suppressor macrophages. Even though their role in *Schistosoma* infections has not been clarified, similar populations of suppressive macrophages expressing the same markers have been found in a variety of stimuli and pathological situations, such as in response to the cestode *T. crassiceps* (40), in tumor-bearing mice (41), or in virus infections and drug treatments (7). Thus, it is possible that these macrophages can be induced *in vivo* by natural antigens from *Schistosoma* and may have similar activities.

When egg-derived glycoconjugates are captured, processed, and presented to naïve T lymphocytes by DCs, the immune response is skewed to a Th2-type response. Periodate treatment reverses this effect and CD1d is apparently crucial to this phenomenon, indicating that SEA glycolipids may be involved in the Th2 skew by DCs (37). Lipids from *S. mansoni* (adults and eggs) have been shown to activate monocytes to produce anti-inflammatory IL-10 and pro-inflammatory IL-6 and TNF- α (32). These lipid fractions, particularly the ones containing phosphatidylserine, act as Th2-promoting factors through the

blockade of IL-12 production by DCs. At the same time, they promote the development of IL-10-producing T_{reg} cells.

ES-62 is a phosphoryl-choline-bearing secreted product of *Achantocheilonema vitae* that has been shown to display a variety of immunomodulatory activities, many of which have been attributed to the presence of phosphoryl-choline groups (42). ES-62 exerts its immunomodulatory effects on an array of cells of the murine immune system, including macrophages and DCs (43-45). ES-62 can desensitize mouse peritoneal macrophages to subsequent IFN- γ /LPS-induced production of IL-12. This suppression extends to the production of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α . In this way, exposure to ES-62 seems to render macrophages unable to produce Th1/proinflammatory cytokines, a situation that could likely contribute to the generation of immune responses biased to a Th2 phenotype (45).

Exposure of immature DCs to ES-62 leads to an increase in the expression of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80 and CD86. Also, ES-62 is capable of shifting bone marrow-derived DCs into the "DC2" activation state (42). When these DC2 cells present an ovalbumin peptide to naïve CD4⁺ T cells from OVA TCR transgenic mice, an increase in lymphocyte production of IL-4 is observed while IFN- γ production decreases. In addition, the switch to either a Th1 or a Th2 response is not affected by differential regulation through CD80 or CD86; a Th2 response is achieved even in the presence of IL-12 (44).

Glycosphingolipids of *Ascaris suum* have been shown to inhibit LPS/IFN- γ -induced pro-inflammatory cytokine production by peritoneal macrophages (46). High-molecular-weight components of *A. suum* inhibit the expression of MHC-II, CD80, CD86 and CD40 in CD11c⁺ cells. When these CD11c⁺ cells were used as APCs for OVA-Tg T cells, the proliferative response observed was lower than that of CD11c⁺ cells that were not exposed to the high-molecular-weight components. The inhibitory effect on both the expression of co-stimulatory molecules and the induction of T-cell proliferation was abolished in IL-10 deficient mice (47), suggesting that the immunosuppressive effect of *A. suum* extract components is related to their property of down-regulating the antigen-presenting ability of APCs via an IL-10-mediated mechanism.

Recently, Rigano et. al. (48) demonstrated how *Echinococcus granulosus* hydatid cyst antigens affect APCs in different stages of maturation. Purified Antigen B (AgB) and sheep hydatid fluid (SHF) can affect host DC differentiation from monocyte precursors by reducing the number of cells that differentiate into immature DCs (iDCs) and inhibiting the up-regulation of CD1a expression while increasing CD86 expression. When these cells were stimulated with LPS, there was a significantly lower expression of CD80, CD86 and HLA-DR and lower quantities of TNF- α and IL-12p70. Once those monocytes differentiate into iDCs, *E. granulosus* antigens interfere in the

maturation process of these cells. iDCs exposed to AgB clearly matured since they up-regulated CD80, CD86, CD40 and HLA-DR, and they produced significantly higher amounts of TNF- α , IL-10, and IL-6, however, they did not induce IL-12p70. In response to LPS, these iDCs expressed fewer CD80 and CD86 molecules and showed reduced TNF- α and IL-12p70 production (48). When DCs matured in the presence of *E. granulosus* antigens and later were used as APCs to naïve T cells, most of these lymphocytes differentiated into IL-4-producing cells, suggesting the potential of *E. granulosus* antigens to skew the response to a Th2 type, which would be mediated by DCs.

Possible consequences of altering APCs' function: Diminished lymphoproliferation and Th2 polarization

What happens when APCs previously exposed to helminth-derived molecules come into contact with T-cells? In most cases, the helminth molecules, through their modulatory effect on the maturation and function of macrophages and DCs, can influence antigen-specific and antigen non-specific lymphocyte proliferation (39, 47), as well as polarization of T-cell responses (14, 37, 45).

A clear example of this is illustrated by the filarial molecule ES-62. In this model, IFN- γ production of re-stimulated T-cells is suppressed by the previous exposure to ES-62. Meanwhile, typical cytokines from a Th2 response, such as IL-13 and IL-4, were also suppressed, but remain and enhance Ag-specific IL-5 production. These T-cells produced lower levels of IL-2 and their proliferation response was diminished after recalling with OVA (49). Moreover, pre-exposure to ES-62 inhibited the clonal expansion of the transferred T-cells *in vivo* (49). Given that ES-62 affects the DCs' maturation, turning them into DC2 type (44), and given the importance of DCs in T-cell responses, is very likely that this Th2-type response is promoted by the changes in DCs induced by this helminth-molecule (Figure 1).

Different helminthes have independently developed a variety of pathways for Th2 stimulation, and this propensity is likely to have been positively selected to confer a biological advantage to each parasite species. The most obvious distinction is the heat liability and protease sensitivity of NES (30), as compared to the glycan moieties associated with Th2 stimulation from filarial nematodes (16), schistosomes (36) and cestodes (50).

Glycan moieties from *B. malayi* and the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* induce antigen-specific IL-4 production by lymph node cells (16), indicating that the induction of Th2 responses could be a generic response against common structures shared between helminth species and not necessarily an evolutionary strategy evolved in those that are parasitic.

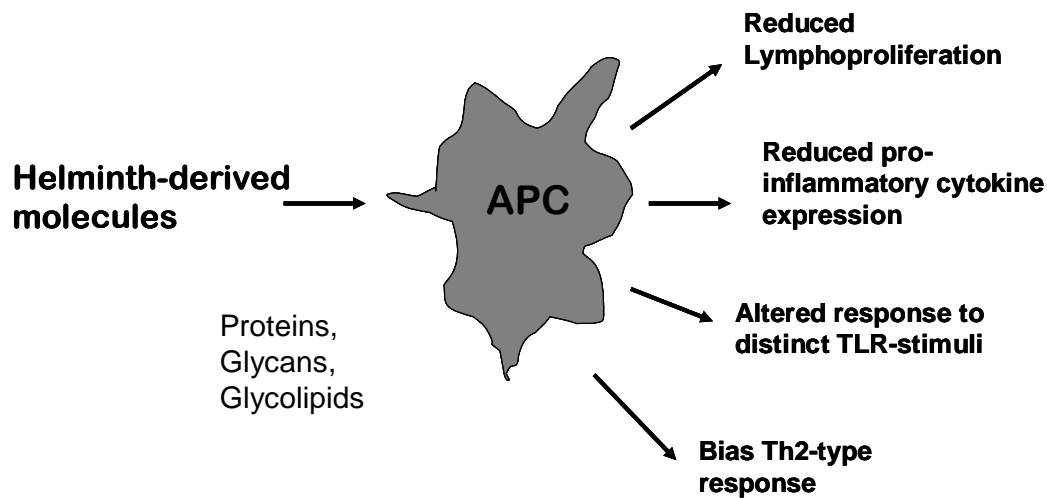


Figure 1. Exposure of antigen presenting cells to helminth-derived molecules lead to important changes in APC's which in turn importantly modulate the immune response.

Alternative activation of APCs

Alternatively Activated Macrophages (AAM Φ) represents a distinct population of macrophages which are generated in the presence of the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 (51). These macrophages possess specific features and functions distinct from Classically Activated Macrophages, which are activated for the Th1 cytokine IFN- γ and bacterial products such as LPS (51). In an environment in which the cytokines IL-4 and IL-13 predominate, as happens in helminth infections, is obvious to think that AAM Φ s would be a characteristic type of cell in these types of infections. Indeed, different studies have shown that these macrophages are preferentially induced during helminth infections (52-54).

In some studies, molecules derived from helminthes reproduced the recruitment of the AAM Φ s and these macrophages seemed to be involved in a diminished T-cell proliferation. AAM Φ s are induced by *B. malayi*, as well as *T. crassiceps* infection; in both cases they can indeed drive Th2 differentiation of naive T-cells and inhibit polyclonal proliferation of T-cells (15, 55). Interestingly, these AAM Φ s can also be generated by daily injection of excretory/secretory products (ES) from *B. malayi* adults (56), suggesting a scenario in which ES products are secreted by adult parasites into the lymphatic system and, through this, induce Th2 responses and the recruitment of AAM Φ s.

After intraperitoneal injection of parasite excretory-secretory (ES) products of *Fasciola hepatica*, AAM Φ s were recruited to the peritoneum of mice based on the expression of genetic markers of alternative activation such as Fizz1, Ym1, and Arginase 1. Administration of a recombinant antioxidant

thioredoxin peroxidase (TPx), which is contained within the ES products, also induced the recruitment of AAMΦs to the peritoneum. TPx directly converts a RAW 264.7 macrophage to an alternatively activated phenotype characterized by the production of high levels of IL-10 and prostaglandin E(2), concomitantly with low levels of IL-12 (57). Similar observations have been done in experimental cysticercosis, where intraperitoneal infection with the cestode *T. crassiceps* recruits AAMΦs which are able, in a cell contact-dependent manner, to suppress T-cell proliferation to a polyclonal stimulus such as anti-CD3/CD28 (15). Similarly, following repeated injections with intact glycans from *T. crassiceps* antigens in naïve mice, these animals displayed up-regulation of the expression of different AAMΦ markers (Fizz 1, Arginase 1 and Ym1) in parallel with Th2 adjuvant activity (50). However, when glycans were chemically altered, the AAMΦ induction and Th2 biasing activity to OVA-peptide was lost, indicating that glycosylated-derived antigens from *T. crassiceps* are also able to modulate the immune response to unrelated antigens (50).

Altogether, these data suggest that the characteristic population of AAMΦs observed during helminth infections may be directly mediated through the secretion of molecules (glycosylated or not) derived from these parasites.

Modulation through receptors

Induction of cytokine production by macrophages and DCs in response to many pathogen products occurs following ligation of a pathogen recognition receptor (PRR), such as toll-like receptors and lectins (58). Goodridge and co-workers (45) showed that ES-62 achieves modulation of its macrophage and DC activation in a TLR-4-dependent manner (49). Cytokine suppression, which was seen in macrophages and in DCs in response to both the TLR ligands BLP and CpG and exposure to ES-62, was dependent on the presence of TLR-4. The modulation of MHC-II, CD40, CD80 and CD86 observed in response to ES-62 was also suppressed in DCs from TLR-4 knockout mice (49).

Another system in which toll-like receptors appear to be involved in helminth molecule signaling is the case of *Schistosoma* lipids. *Schistosoma*-specific phosphatidylserine (PS) both activated TLR2 and affected DCs such that mature dendritic cells gained the ability to induce the development of IL-10-producing regulatory T-cells (32).

The helminth carbohydrate, lacto-N-fucopentaose III (LNFPIII), functions as an innate Th2 promoter of murine DCs. The alpha1-3-linked fucose required for this activity and the ability of LNFP-III to drive DC2 maturation both depend on TLR-4 signaling (59), suggesting that APCs use TLR-dependent signaling pathways to produce a Th1- or Th2-promoting phenotype. It remains unknown how TLR-4 uses LPS to induce a strong pro-inflammatory cytokine release but uses a helminth-derived molecule to induce IL-10 instead of IL-12 or TNF- α .

On the other hand, a series of recent studies showed that SEA antigens are internalized by immature DCs through other PRRs such as the C-type lectins DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-grabbing non-integrin), MGL (macrophage-galactose type C-type lectin) and the MR (mannose receptor). In turn, these antigens are targeted to MHC-II positive lysosomal compartments (34). DC-SIGN also mediates adhesion of DCs to glycolipids derived from *S. mansoni* (60). Together, these studies suggest that helminth-derived molecules can be detected by diverse types of receptors; interestingly, such diversity in recognition converges in a similar response in APCs: low IL-12 production and a slight increase in IL-10 release, which undoubtedly affects the development of the immune response.

Concluding remarks

The diminished T-cell proliferation and the lack of IFN- γ production are some of the immunological features found in helminth-infected patients and animals. Among the array of possible mechanisms that induce these changes, the alteration in APC function seems plausible. As we have discussed in this review, there are diverse mechanisms behind the changes in APC activities but, independent of their nature, this interference with normal APC function alters different steps in the immune response.

Helminth derived molecules have been shown to be an important mechanism of immunomodulation used by the parasites to provide a safe environment in the host and achieve a long-lasting life. An array of molecules with distinct biochemical properties share common effects, suggesting a successful evolutionary strategy that different helminthes have achieved using different molecules.

Acknowledgment

This work was supported by DGAPA-UNAM grant # IN208706, and by grant # 59561-CONACYT, and is a portion of the requirements for obtaining the doctoral degree in the postgraduate program in biomedical sciences, Faculty of Medicine, UNAM for Lorena Gómez-García, who is supported by a fellowship from CONACYT-Mexico. Authors thanks to Peprotech-México by partially support the print of this chapter.

References

1. Maizels, R. M., D. A. Bundy, M. E. Selkirk, D. F. Smith, and R. M. Anderson. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365:797-805.
2. Plaisier, A. P., G. J. van Oortmarssen, J. Remme, and J. D. Habbema. 1991. The reproductive lifespan of *Onchocerca volvulus* in West African savanna. *Acta Trop* 48:271-284.

3. Cook, G. A., A. Metwali, A. Blum, R. Mathew, and J. V. Weinstock. 1993. Lymphokine expression in granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Cell Immunol* 152:49-58.
4. Graham, S. P., A. J. Trees, R. A. Collins, D. M. Moore, F. M. Guy, M. J. Taylor, and A. E. Bianco. 2001. Down-regulated lymphoproliferation coincides with parasite maturation and with the collapse of both gamma interferon and interleukin-4 responses in a bovine model of onchocerciasis. *Infect Immun* 69:4313-4319.
5. Paterson, J. C., P. Garside, M. W. Kennedy, and C. E. Lawrence. 2002. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris suum*. *Infect Immun* 70:6058-6067.
6. Maizels, R. M., N. Gomez-Escobar, W. F. Gregory, J. Murray, and X. Zang. 2001. Immune evasion genes from filarial nematodes. *Int J Parasitol* 31:889-898.
7. Noel, W., G. Raes, G. Hassanzadeh Ghassabeh, P. De Baetselier, and A. Beschin. 2004. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol* 20:126-133.
8. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9:10-16.
9. Cervi, L., A. S. MacDonald, C. Kane, F. Dzierszinski, and E. J. Pearce. 2004. Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J Immunol* 172:2016-2020.
10. Chaussabel, D., R. T. Semnani, M. A. McDowell, D. Sacks, A. Sher, and T. B. Nutman. 2003. Unique gene expression profiles of human macrophages and dendritic cells to phylogenetically distinct parasites. *Blood* 102:672-681.
11. Mahanty, S., C. L. King, V. Kumaraswami, J. Regunathan, A. Maya, K. Jayaraman, J. S. Abrams, E. A. Ottesen, and T. B. Nutman. 1993. IL-4- and IL-5-secreting lymphocyte populations are preferentially stimulated by parasite-derived antigens in human tissue invasive nematode infections. *J Immunol* 151:3704-3711.
12. Maizels, R. M., A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M. D. Taylor, and J. E. Allen. 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201:89-116.
13. Maizels, R. M., and M. Yazdanbakhsh. 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* 3:733-744.
14. Wilson, M. S., M. D. Taylor, A. Balic, C. A. Finney, J. R. Lamb, and R. M. Maizels. 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* 202:1199-1212.
15. Terrazas, L. I., D. Montero, C. A. Terrazas, J. L. Reyes, and M. Rodriguez-Sosa. 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol* 35:1349-1358.
16. Tawill, S., L. Le Goff, F. Ali, M. Blaxter, and J. E. Allen. 2004. Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infect Immun* 72:398-407.
17. Manoury, B., W. F. Gregory, R. M. Maizels, and C. Watts. 2001. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Curr Biol* 11:447-451.

18. Nicklin, M. J., and A. J. Barrett. 1984. Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cystatin. *Biochem J* 223:245-253.
19. Henskens, Y. M., E. C. Veerman, and A. V. Nieuw Amerongen. 1996. Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377:71-86.
20. Hartmann, S., B. Kyewski, B. Sonnenburg, and R. Lucius. 1997. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. *Eur J Immunol* 27:2253-2260.
21. Schonemeyer, A., R. Lucius, B. Sonnenburg, N. Brattig, R. Sabat, K. Schilling, J. Bradley, and S. Hartmann. 2001. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol* 167:3207-3215.
22. Dainichi, T., Y. Maekawa, K. Ishii, T. Zhang, B. F. Nashed, T. Sakai, M. Takashima, and K. Himeno. 2001. Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infect Immun* 69:7380-7386.
23. Pfaff, A. W., H. Schulz-Key, P. T. Soboslay, D. W. Taylor, K. MacLennan, and W. H. Hoffmann. 2002. *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis. *Int J Parasitol* 32:171-178.
24. Baig, S., R. T. Damian, J. L. Molinari, P. Tato, J. Morales-Montor, M. Welch, J. Talhouk, R. Hashmeys, and A. C. White, Jr. 2005. Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG. *Parasitology* 131:411-416.
25. Baig, S., R. T. Damian, J. Morales-Montor, A. Ghaleb, A. Baghdadi, and A. C. White, Jr. 2006. Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease. *Microbes Infect* 8:2733-2735.
26. Hartmann, S., and R. Lucius. 2003. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 33:1291-1302.
27. Schierack, P., R. Lucius, B. Sonnenburg, K. Schilling, and S. Hartmann. 2003. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun* 71:2422-2429.
28. Semnani, R. T., H. Sabzevari, R. Iyer, and T. B. Nutman. 2001. Filarial antigens impair the function of human dendritic cells during differentiation. *Infect Immun* 69:5813-5822.
29. Holland, M. J., Y. M. Harcus, A. Balic, and R. M. Maizels. 2005. Th2 induction by *Nippostrongylus* secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC Class I-related receptors. *Immunol Lett* 96:93-101.
30. Balic, A., Y. Harcus, M. J. Holland, and R. M. Maizels. 2004. Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses. *Eur J Immunol* 34:3047-3059.
31. Vella, A. T., M. D. Hulsebosch, and E. J. Pearce. 1992. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen-responsive CD44-hi T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44-lo cells. Potential for T helper 2 subset differentiation is evident at the precursor level. *J Immunol* 149:1714-1722.
32. Van der Kleij, D., A. Van Remoortere, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, A. M. Deelder, A. G. Tielens, C. H. Hokke, and M. Yazdanbakhsh. 2002. Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc. *J Infect Dis* 185:531-539.

33. van Die, I., E. van Liempt, C. M. Bank, and W. E. Schiphorst. 2005. Interaction of schistosome glycans with the host immune system. *Adv Exp Med Biol* 564:9-19.
34. van Liempt, E., S. J. van Vliet, A. Engering, J. J. Garcia Vallejo, C. M. Bank, M. Sanchez-Hernandez, Y. van Kooyk, and I. van Die. 2007. 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* 44:2605-2615.
35. Kane, C. M., L. Cervi, J. Sun, A. S. McKee, K. S. Masek, S. Shapira, C. A. Hunter, and E. J. Pearce. 2004. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol* 173:7454-7461.
36. Okano, M., A. R. Satoskar, K. Nishizaki, M. Abe, and D. A. Harn, Jr. 1999. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on Schistosoma mansoni egg antigens. *J Immunol* 163:6712-6717.
37. Faveeuw, C., T. Mallevaey, K. Paschinger, I. B. Wilson, J. Fontaine, R. Mollicone, R. Oriol, F. Altmann, P. Lerouge, M. Capron, and F. Trottein. 2003. Schistosome N-glycans containing core alpha 3-fucose and core beta 2-xylose epitopes are strong inducers of Th2 responses in mice. *Eur J Immunol* 33:1271-1281.
38. Atochina, O., T. Daly-Engel, D. Piskorska, E. McGuire, and D. A. Harn. 2001. A schistosome-expressed immunomodulatory glycoconjugate expands peritoneal Gr1(+) macrophages that suppress naive CD4(+) T cell proliferation via an IFN-gamma and nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* 167:4293-4302.
39. Terrazas, L. I., K. L. Walsh, D. Piskorska, E. McGuire, and D. A. Harn, Jr. 2001. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol* 167:5294-5303.
40. Gomez-Garcia, L., L. M. Lopez-Marin, R. Saavedra, J. L. Reyes, M. Rodriguez-Sosa, and L. I. Terrazas. 2005. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol* 27:395-405.
41. Huang, B., P. Y. Pan, Q. Li, A. I. Sato, D. E. Levy, J. Bromberg, C. M. Divino, and S. H. Chen. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66:1123-1131.
42. Goodridge, H. S., M. R. Deehan, W. Harnett, and M. M. Harnett. 2005. Subversion of immunological signalling by a filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product. *Cell Signal* 17:11-16.
43. Harnett, W., M. R. Deehan, K. M. Houston, and M. M. Harnett. 1999. Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein. *Parasite Immunol* 21:601-608.
44. Whelan, M., M. M. Harnett, K. M. Houston, V. Patel, W. Harnett, and K. P. Rigley. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 164:6453-6460.
45. Goodridge, H. S., E. H. Wilson, W. Harnett, C. C. Campbell, M. M. Harnett, and F. Y. Liew. 2001. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode Acanthocheilonema viteae. *J Immunol* 167:940-945.
46. Deehan, M. R., H. S. Goodridge, D. Blair, G. Lochnit, R. D. Dennis, R. Geyer, M. M. Harnett, and W. Harnett. 2002. Immunomodulatory properties of Ascaris suum

- glycosphingolipids - phosphorylcholine and non-phosphorylcholine-dependent effects. *Parasite Immunol* 24:463-469.
47. Silva, S. R., J. F. Jacysyn, M. S. Macedo, and E. L. Faquim-Mauro. 2006. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *Eur J Immunol* 36:3227-3237.
 48. Rigano, R., B. Buttari, E. Profumo, E. Ortona, F. Delunardo, P. Margutti, V. Mattei, A. Teggi, M. Sorice, and A. Siracusano. 2007. *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75:1667-1678.
 49. Marshall, F. A., A. M. Grierson, P. Garside, W. Harnett, and M. M. Harnett. 2005. ES-62, an immunomodulator secreted by filarial nematodes, suppresses clonal expansion and modifies effector function of heterologous antigen-specific T cells in vivo. *J Immunol* 175:5817-5826.
 50. Gomez-Garcia, L., I. Rivera-Montoya, M. Rodriguez-Sosa, and L. I. Terrazas. 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res* 99:440-448.
 51. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3:23-35.
 52. Rodriguez-Sosa, M., A. R. Satoskar, R. Calderon, L. Gomez-Garcia, R. Saavedra, R. Bojalil, and L. I. Terrazas. 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun* 70:3656-3664.
 53. Taylor, M. D., A. Harris, M. G. Nair, R. M. Maizels, and J. E. Allen. 2006. F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J Immunol* 176:6918-6927.
 54. Persaud, R., A. Wang, C. Reardon, and D. M. McKay. 2007. Characterization of the immuno-regulatory response to the tapeworm *Hymenolepis diminuta* in the non-permissive mouse host. *Int J Parasitol* 37:393-403.
 55. Loke, P., A. S. MacDonald, and J. E. Allen. 2000. Antigen-presenting cells recruited by *Brugia malayi* induce Th2 differentiation of naive CD4(+) T cells. *Eur J Immunol* 30:1127-1135.
 56. Allen, J. E., and A. S. MacDonald. 1998. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunol* 20:241-247.
 57. Donnelly, S., S. M. O'Neill, M. Sekiya, G. Mulcahy, and J. P. Dalton. 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun* 73:166-173.
 58. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
 59. Thomas, P. G., M. R. Carter, O. Atochina, A. A. Da'Dara, D. Piskorska, E. McGuire, and D. A. Harn. 2003. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 171:5837-5841.
 60. Meyer, S., E. van Liempt, A. Imberty, Y. van Kooyk, H. Geyer, R. Geyer, and I. van Die. 2005. 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* 280:37349-37359.