



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la Tiorredoxina-1 recombinante de *Taenia solium* (TsTRX-1r)  
sobre macrófagos peritoneales de ratón Balb/c

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB. Xinastle Castillo Luis Omar

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Landa Piedra Abraham

Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ibarra Rubio María Elena

Facultad de Química, UNAM

Dr. Zenteno Galindo Edgar

Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Comité tutor:**

Dra. Ibarra Rubio María Elena

Dr. Zenteno Galindo Edgar

Dr. Landa Piedra Abraham

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Biología molecular de *Taenia solium* del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección del Dr. Landa Piedra Abraham.

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, bajo la convocatoria de investigación básica SEP-CONACyT 2012. (CONACyT-176925. "Estudio de la transcripción de los genes de ratones susceptibles y resistentes, así como del parásito durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*") y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT IN219711. "Estudio de la transcripción de genes de linfocitos y macrófagos de cepas de ratones susceptibles y resistentes, vacunados o no durante la infección causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*").

## Glosario

Arg1	Gen murino para la Arginasa 1
ARG1	Enzima Arginasa 1
B7-H4	Dominio V-set que contiene el inhibidor 1 de la activación de células T
CCL1	Quimiocina (motivo C-C) ligando 1
CCL17	Quimiocina (motivo C-C) ligando 17
CCL22	Quimiocina (motivo C-C) ligando 22
CCL24	Quimiocina (motivo C-C) ligando 24
CCR3	Receptor 3 de quimiocinas (motivo C-C)
CCR4	Receptor 4 de quimiocinas (motivo C-C)
CD4	Cúmulo de diferenciación 4
CD8	Cúmulo de diferenciación 8
CD23	Polipéptido gamma de alta afinidad para el Fc de las IgE's
CD80	Cúmulo de diferenciación 80
CD86	Cúmulo de diferenciación 86
CD115	Cúmulo de diferenciación 115
CD123	Antígeno 123 o receptor de Interleucina 3
CCL17	Quimiocina (motivo C-C) ligando 17
CXCL9	Quimiocinas (motivo C-X-C) ligando 9
CXCL10	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 10
CXCR3	Receptor 3 de quimiocinas (motivo C-X-C)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FcγR	Receptor 1a de alta afinidad para el Fc de IgG's
FR	Receptor de folato
FIZZ1	Proteína parecida a la resistina alfa
Gapdh	Gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GR	Receptor de galactosa
IFN-γ	Interferón gamma
IFN-γR	Receptor del Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IgE	Inmunoglobulina E
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Subunidad beta de Interleucina 1
IL1RL1	Receptor 1 parecido al receptor de interleucina 1
IL-1 decoy R	Receptor antagonista de Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-2	Interleucina 2
IL-4Rα	Receptor alfa de la Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de la Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-23	Interleucina 23
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LIGHT	Miembro 14 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral
LPS	Lipopolisacáridos
MHC-II	Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad II
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos

MR	Receptor de manosa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas
Nos2	Gen para la óxido nítrico sintetasa inducible
PGE2	Prostaglandina E2
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT-PCR	Reacción de transcripción inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
SR	Receptor scavenger
ST2	Receptor ST2 o IL1RL1
STAT-4	Factor 4 activador de transcripción y transductor de señales
STAT-6	Factor 6 activador de transcripción y transductor de señales
TLR-4	Receptor tipo Toll 4
TAC	Tomografía axial computarizada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
Tnf-α	Gen murino para el factor de necrosis tumoral alfa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRX-1	Tiorredoxina-1
TsTRX-1	Tiorredoxina-1 de <i>Taenia solium</i>
TsTRX-1r	Tiorredoxina-1 recombinante de <i>Taenia solium</i>
TNFSF14	Miembro 14 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial A
Ym1	Gen murino para la proteína 3 parecida a la quitinasa
YM1	Proteína 3 parecida a la quitinasa

## Índice

1. Resumen.....	1
2. Introducción.	
2.1. Cisticercosis en México.....	2
2.2. Respuesta inmunológica ante la cisticercosis.....	4
2.3. Activación de macrófagos.....	6
2.4. Proteínas del parásito como factores de activación de macrófagos.....	9
2.5. Tiorredoxina 1 (TRX-1).....	11
3. Hipótesis.....	14
4. Objetivos.....	14
5. Materiales y métodos.	
5.1. Materiales biológicos.....	15
5.2. Expresión de proteína Tiorredoxina-1 recombinante de <i>T. solium</i> (TsTRX-1r).....	15
5.3. Purificación de la TsTRX-1r.....	16
5.4. Cuantificación de la TsTRX-1r y de LPS.....	16
5.5. Obtención de las células de exudado peritoneal.....	17
5.6. Cultivos de macrófagos.....	17
5.7. Curva dosis/respuesta, estimulación de macrófagos con la TsTRX-1r.....	17
6. Estimulación de cultivos de macrófagos con 5 µgTsTRX-1r/mL (392 nM).....	18
6.1. Extracción de RNA total.....	18
6.2. Reacción de transcripción inversa acoplada a la polimerasa de reacción en cadena (RT-PCR).....	19
7. Resultados y análisis de resultados.	
7.1. Purificación de la TsTRX-1r.....	20
7.2. Eliminación de la endotoxina bacteriana (LPS) en la muestra de TsTRX-1r.....	21
7.3. Cuantificación de la TsTRX-1r por el método de Bradford.....	22
7.4. Cuantificación de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por ELISA en cultivos de macrófagos murinos naïve estimulados con diferentes cantidades de TsTRX-1r.....	22
7.5. Análisis por RT-PCR de los genes Gapdh, Nos2, Arg1 y Ym1 en macrófagos murinos naïve estimulados con diferentes cantidades de TsTRX-1r.....	24
7.6. Cuantificación de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por ELISA en cultivos de macrófagos murinos naïve, M1 y M2a estimulados con 392 nM deTsTRX-1r.....	26
7.7. Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes Gapdh, Nos2, Arg1 y Ym1 en macrófagos murinos naïve, M1 y M2a estimulados con 392 nM de TsTRX-1r.....	29
8. Discusión.....	32
9. Conclusión.....	34
10. Referencias.....	36

## I. Resumen.

La neurocisticercosis es la forma más severa de cisticercosis humana, afecta el sistema nervioso central y es ocasionada por el establecimiento de la forma larvaria (cisticerco) de *Taenia solium*. El estudio de las interacciones hospedero-parásito resulta importante, así como determinar si algunos de los componentes secretados por el cisticerco son capaces de modificar la función de las células del sistema inmunológico. Concretamente, el establecer si el estado de activación de macrófagos residentes se ve modificado por dichos factores excretados y que estos contribuyan a la permisividad o a la restricción de la enfermedad.

Como parte de las proteínas secretadas por el cisticerco y que tienen el potencial de modificar el estado de activación de macrófagos se encuentra la Tiorredoxina-1 de *Taenia solium*. Los resultados obtenidos con la enzima recombinante (TsTRX-1r) muestran que la estimulación de macrófagos naïve, M1 y M2 *in vitro* ocasiona importantes cambios en la expresión de marcadores relacionados a los estados de activación.

En macrófagos naïve la estimulación con la TsTRX-1r ocasiona cambios en la producción de TNF- $\alpha$  e IL-10. En el caso de TNF- $\alpha$ , la producción máxima alcanzada por el estímulo de la TsTRX-1r representa aproximadamente dos tercios de lo producido en los cultivos de macrófagos M1. La IL-10 incrementa su producción a lo largo del experimento y registra un máximo que representa cerca del doble de lo producido por los cultivos de macrófagos M2. Además, se observó que las mayores concentraciones de estímulo (392 y 784 nM de TsTRX-1r) ocasionan el incremento de los RNA mensajeros de los genes Nos2 y Ym1, siendo más marcado el aumento del primero.

Cuando los macrófagos M1 son estimulados con 392 nM de TsTRX-1r se observó un mínimo efecto. La mayoría de los marcadores estudiados igualan sus niveles de producción y expresión con los mostrados por los macrófagos naïve. La única excepción es el gen Nos2, cuya expresión es mantenida a niveles de expresión similares a los observados en macrófagos M1.

La estimulación de macrófagos M2 con 392 nM de TsTRX-1r ocasiona el incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , alcanzando concentraciones que representan dos tercios de la producción observada en cultivos de macrófagos M1. La producción de IL-12 (que se había reducido durante la diferenciación al fenotipo M2) se incrementa hasta el punto de permitir que se retomen los valores observados en el estado naïve. Finalmente, el estímulo también repercute en la expresión del gen Nos2, observándose un aumento en la cantidad del RNA mensajero correspondiente y alcanzando una expresión que representa poco más del 85% de la expresión mostrada por los macrófagos M1.

Los resultados finales muestran que la TsTRX-1r ocasiona cambios en el estado de activación de cultivos de macrófagos murinos Balb/c. Además se observa que dichos cambios son dependientes del estado de activación inicial que presentan los macrófagos al momento de ser estimulados.

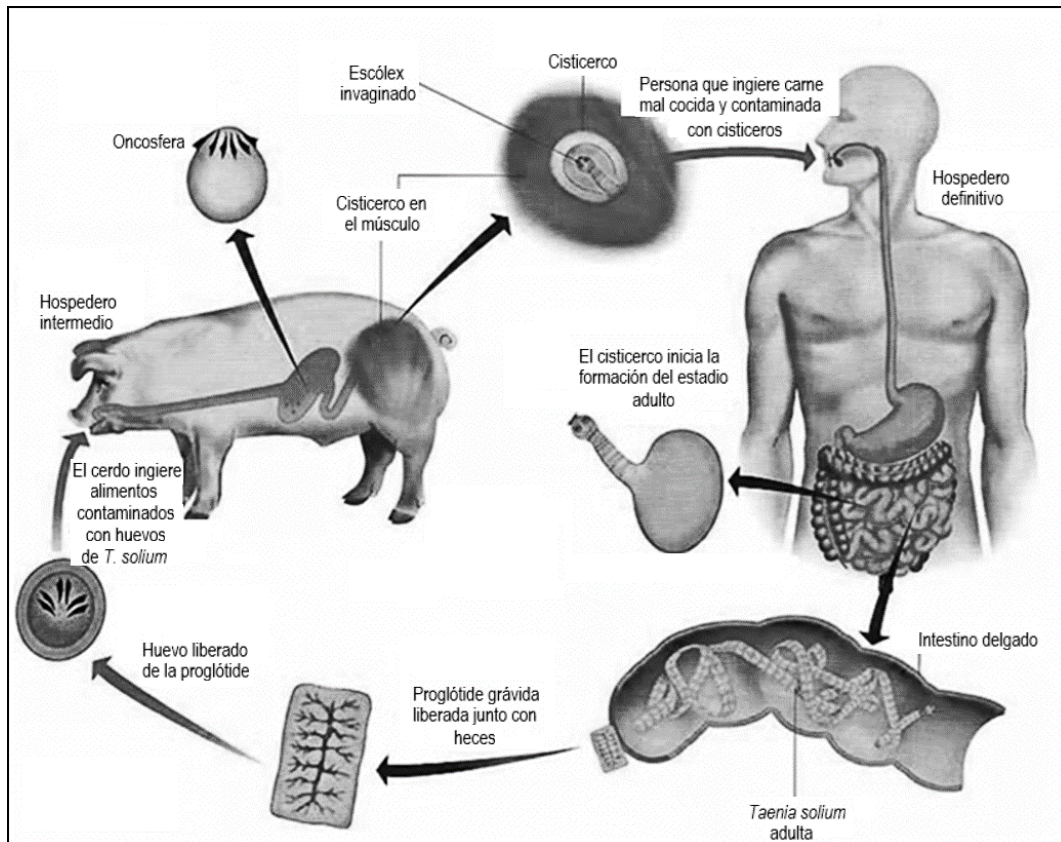
## II. Introducción.

### Cisticercosis en México.

El ciclo de vida de *Taenia solium* depende de dos hospederos: del cerdo (hospedero intermedio) el cual ingiere los huevos del parásito y en donde, por la acción de enzimas digestivas y sales biliares, se liberan los embriones hexacantos u oncosferas las cuales migran desde el intestino a otros sitios anatómicos en donde prosiguen su desarrollo al estadio de cisticerco.

El segundo hospedero es el humano (hospedero definitivo), en el cual el cisticerco se desarrolla intestinalmente al estadio adulto originando en él la teniasis. La tenia adulta es capaz de crecer y auto fecundarse, produciendo así un gran número de huevos que posteriormente serán expulsados vía fecal y permitiendo que sean ingeridos por un hospedero intermedio cerrando el ciclo de vida. (1, 2)

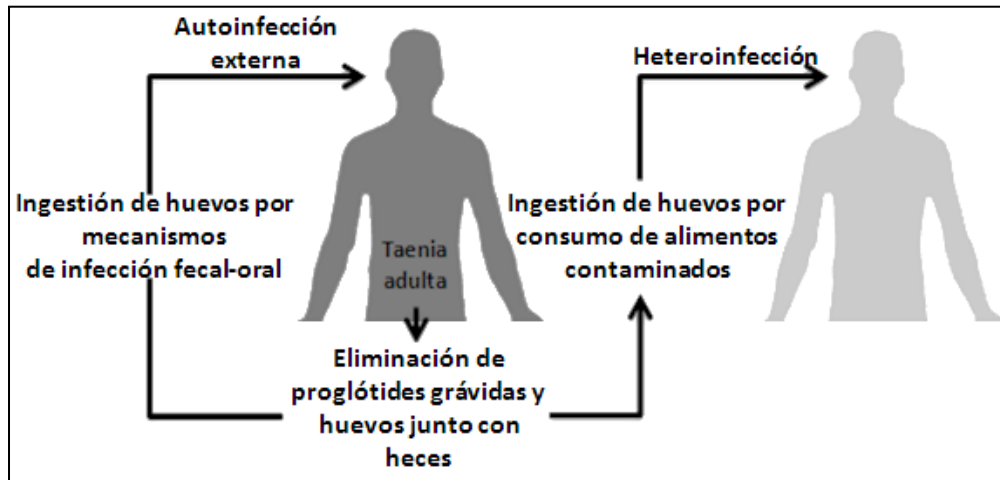
No obstante el papel que juega el humano dentro del ciclo de vida de *T. solium*, existe la posibilidad de que también, en forma accidental, actúe como un hospedero intermedio contrayendo la cisticercosis. Esto sucede cuando el humano ingiere huevos de *T. solium*, ya sea porque dichos huevos hayan sido expulsados por él mismo o porque provengan de un segundo individuo que padece teniasis.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Taenia solium*, el humano actúa como hospedero definitivo adquiriendo teniasis, el cerdo actúa como hospedero intermedio adquiriendo cisticercosis.



Debido a las condiciones requeridas para que suceda la cisticercosis humana, la enfermedad suele estar ligada a grupos sociales menos favorecidos, con una pobre o nula infraestructura sanitaria y en donde sucede fecalismo al aire libre, pobre regulación en los mercados de carne de cerdo, deficiencia en los hábitos de higiene en alimentos y hábitos de higiene personal, etc. En conjunto, todos estos factores permiten la prevalencia de la cisticercosis, ya sea en forma directa mediante la contaminación de alimentos con huevos provenientes de un teniásico o debido al riesgo que implica el exponer a la población a condiciones que le permitan contraer teniasis, y así posteriormente ser una fuente potencial de infección para causar la cisticercosis.



**Figura 2.** Mecanismos más comunes de infección para cisticercosis humana por *Taenia solium*.

Al igual que con la cisticercosis en cerdos, la cisticercosis humana puede suceder en diferentes zonas anatómicas entre las que se encuentran músculos, tejido cutáneo, pulmones, ojos, etc. No obstante, la forma más severa de cisticercosis humana es la neurocisticercosis, en la que el cisticerco se establece en el sistema nervioso central ocasionando que se desarrollen diversos síntomas. Dicha sintomatología no es específica de la enfermedad, lo que ocasiona que el diagnóstico por este medio resulte complicado. La alternativa de diagnóstico en laboratorio hasta la fecha tampoco resulta ser una forma de diagnóstico definitiva (pruebas serológicas) ocasionando que la enfermedad se mantenga sin ser identificada o que sea confundida con otras enfermedades.

Ante la problemática que plantea la identificación de la enfermedad por los métodos convencionales, actualmente el diagnóstico definitivo de la enfermedad se realiza sólo mediante técnicas de imagen (RMN y TAC), así como por la demostración histológica del parásito mediante biopsia. (1, 3, 4)

En México, la neurocisticercosis es una enfermedad de importancia (5), tanto por sus repercusiones en el estado de salud de las personas que la padecen, el costo que deriva de su diagnóstico definitivo, así como por el costo del tratamiento el cual puede incluir, en un porcentaje importante de los casos, una intervención quirúrgica.

Desde el punto de vista de salud pública, la prevalencia de la enfermedad resulta en un gasto importante que el servicio de salud nacional termina amortiguando, ya que como se señala previamente, la enfermedad suele asociarse en forma importante a personas de bajos recursos y que recurren a ser atendidas en instituciones gubernamentales.

Así pues el entendimiento de interacciones entre el parásito y la respuesta inmune del hospedero podría auxiliar en el combate de la cisticercosis, permitiéndonos identificar posibles mecanismos mediante los cuales la respuesta inmune se modifique. Ya sea que dichas modificaciones sean para ventaja del hospedero o que sean mecanismos de adaptación que *T. solium* desarrolló a lo largo de miles de años de co-evolución con sus hospederos y que estén favoreciendo su establecimiento en el humano.

### **Respuesta inmune ante la cisticercosis.**

Para el estudio en el laboratorio de la cisticercosis se utiliza el modelo de cisticercosis murina causado por *T. crassiceps*. En éste modelo se ha establecido que el fenómeno de susceptibilidad a la enfermedad depende de factores tales como el sexo y el fondo genético de la cepa murina utilizada. (6, 7, 8, 9, 10)

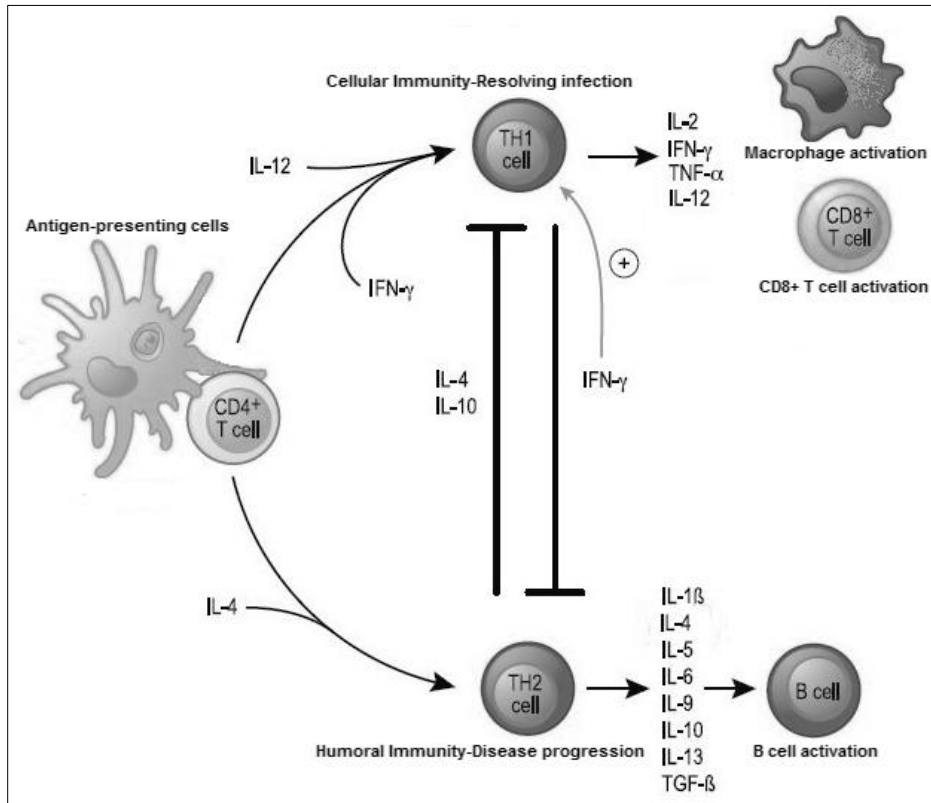
En los 90's se realizó el estudio de algunos componentes de la respuesta inmunológica durante la cisticercosis, en dichos estudios se analizó la forma en que las células T cooperadoras modificaban su estado de activación durante la infección. Como consecuencia, se identificó que en el inicio de la cisticercosis el perfil inmunológico de la respuesta es predominantemente del tipo inflamatorio o Th1, además de asociar ésta etapa con el estado restrictivo ante la infección. Los linfocitos CD4+ activados al fenotipo Th1 se caracterizan por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-12, y su participación en la modulación de la respuesta inmunológica principalmente enfocada en contra de patógenos intracelulares (11, 12).

Por otra parte, se descubrió que con el establecimiento progresivo de la cisticercosis existe un cambio en la respuesta inmunológica, tornándose del tipo antiinflamatoria o Th2, y asociando a esta fase con la permisividad a la infección. En el estado de activación Th2 los linfocitos se caracterizan por la producción de IL-4 e IL-13 (11, 12), con las cuales modula la respuesta inmunológica enfocándola en contra de patógenos extracelulares.

Las diferencias en la producción de citocinas que existen en los linfocitos CD4+ durante los cambios en su estado de activación, afectan al resto de células que se encuentran en el sitio de infección. Uno de estos grupos celulares son los macrófagos, los cuales son activados hacia el fenotipo M1 (o clásicamente activado) como consecuencia del establecimiento de la respuesta inmune tipo Th1. Por otra parte, con el establecimiento de la respuesta tipo Th2 los macrófagos adquieren el fenotipo M2 (o alternativamente activado).

El estudio de los macrófagos durante la cisticercosis murina permitió establecer que el cambio que sufren en su estado de activación, es un factor importante en el proceso de permisividad ante la cisticercosis. Un ejemplo de dichos experimentos es el que impidió la diferenciación de los macrófagos hacia el estado de activación M2, observando que esto

ocasionaba la eliminación exitosa de la cisticercosis murina, señalando el importante papel que juegan los macrófagos M2 en los procesos de permisividad ante la cisticercosis y también la importancia de su estudio con el fin de poder obtener potenciales estrategias de ataque a la infección. (13)



**Figura 3.** Perfiles de activación Th1/Th2 de linfocitos CD4+, los estímulos que ocasionan dicha diferenciación, sus principales productos de secreción y las principales líneas celulares sobre las que ejercen su acción efectora.

Otro ejemplo, que nos señala la importancia de los macrófagos como grupo celular de estudio durante la cisticercosis, es el de reportes que describen una reducción en la población de linfocitos CD4+ y CD8+, acompañada por un enriquecimiento de poblaciones de macrófagos y eosinófilos. Éste fenómeno nos sugiere un importante mecanismo de inmunorregulación teniendo como uno de sus principales efectores a los macrófagos. (14)

Un último ejemplo es el obtenido por el análisis de la neurocisticercosis en pacientes humanos, en donde se ha relacionado un alto grado de inmunorregulación con individuos que muestran condiciones de infección más diseminadas. En éstos casos la respuesta inmunológica se caracteriza por una alta producción de IL-10, bajas cantidades de citocinas características de los estados inmunológicos Th1 y Th2 y además un incremento en el número de linfocitos T reguladores. (15)

## **Activación de macrófagos.**

Los macrófagos se encuentran entre los principales grupos celulares que interactúan con los patógenos en el sitio de infección (además de neutrófilos, monocitos y células dendríticas). Su función es la de iniciar el ataque celular en contra del agente patógeno, además de funcionar como un enlace entre la respuesta inmunológica innata y la respuesta inmune adaptativa.

Los principales mecanismos de ataque con los que cuentan los macrófagos son su capacidad de fagocitar, procesar y presentar antígenos; por otra parte también tienen la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) las cuales reaccionan con estructuras del patógeno causándoles daño químico.

Como consecuencia de las citocinas producidas durante una infección (producidas por los diferentes grupos celulares presentes), se produce un microambiente de señales en el que los macrófagos modifican su estado de activación y sus funciones inmunológicas. Dichos estados de activación en macrófagos son identificados por una serie de citocinas y receptores que son expresados en forma diferencial (16, 17, 18, 19).

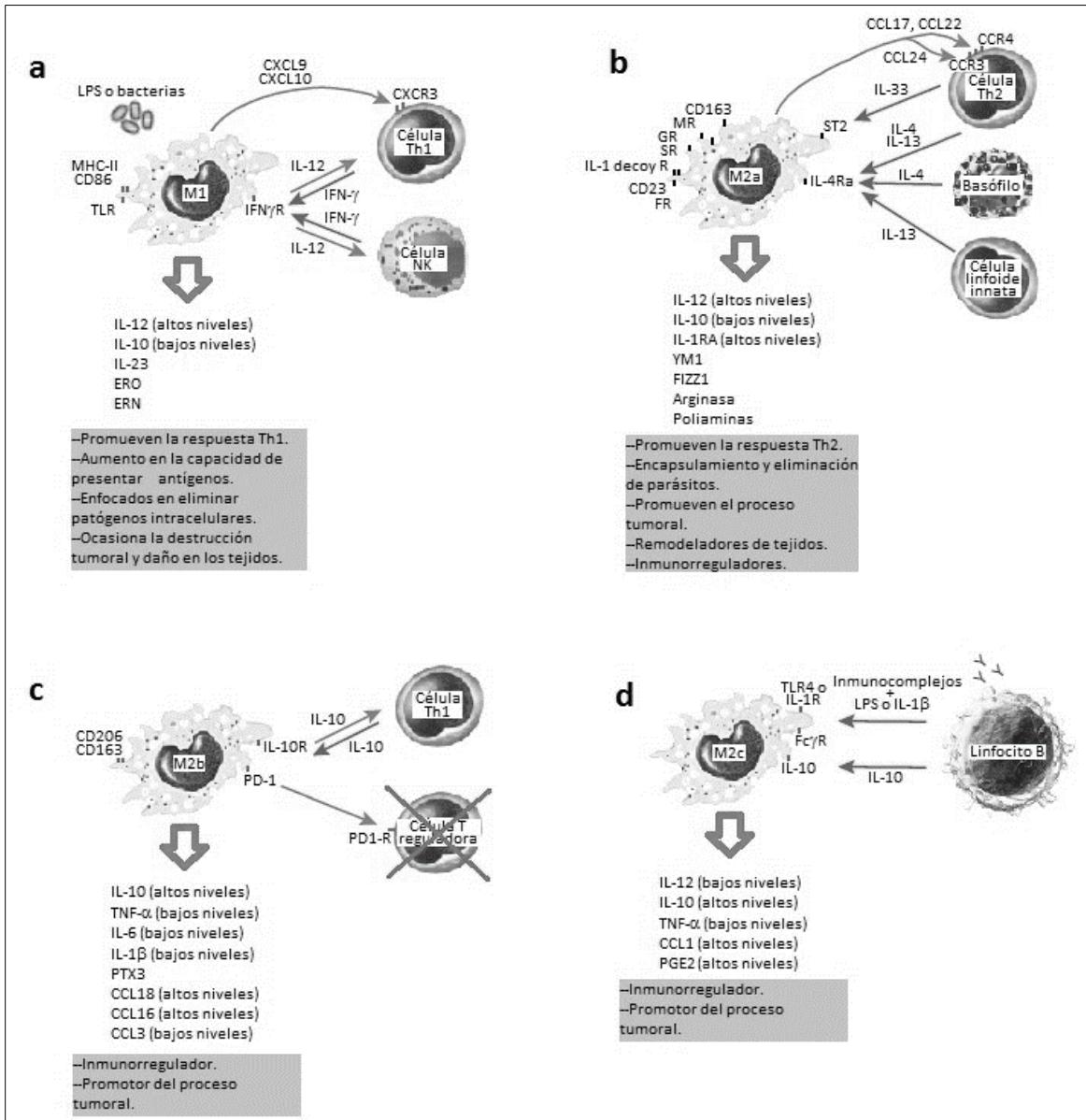
La capacidad que tienen los macrófagos de modificar su estado de activación les permite funcionar en forma responsiva regulando sus funciones inmunológicas. Actualmente los diversos estados de activación en macrófagos son denominados como M1, M2a, M2b, M2c y M2d.

Los macrófagos M1 (también denominados como “clásicamente activados”) son inducidos por el IFN- $\gamma$  (factor principalmente producido por linfocitos CD4+ en activación Th1) y por ligandos del TLR-4. Se caracterizan por la producción: IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  y la enzima iNOS (enzima involucrada directamente en la síntesis de ERO).

Sus principales funciones inmunológicas son: incrementar la fagocitación de antígenos y su posterior presentación a linfocitos (consecuencia directa del aumento de MHC-II en su superficie); la producción de especies tóxicas que atacan directamente a los patógenos (mediante la producción de óxido nítrico, por ejemplo). Y finalmente también contribuyen al establecimiento y mantenimiento del estado Th1 mediante la secreción de citocinas que favorecen el reclutamiento de células (principalmente linfocitos CD4+ y células NK).

Los macrófagos del fenotipo M2a (o también denominados como “alternativamente activados”) tienen como inductores a las interleucinas IL-4 y/o IL-13 (principalmente producidas por linfocitos T CD4+ en activación Th2). Estas interleucinas señalizan a través de varias proteínas entre las que destaca STAT-6, establecido como un factor indispensable para el paso de la respuesta inmune de tipo Th1 a Th2 (20, 21).

La IL-4 e IL-13 tienen la particularidad de poseer similitudes en su conformación tridimensional, lo que se ve reflejado en el hecho de que sus correspondientes receptores comparten una subunidad (la subunidad IL-4R $\alpha$ ).



**Figura 4.** Estados de activación de los macrófagos bajo los estados inmunológicos tipo Th1 y Th2, principales inductores, productos de secreción característicos e interacciones con otros grupos celulares. (a) Macrófagos M1, (b) Macrófagos M2a, (c) Macrófagos M2b y (d) macrófagos M2c. Modificado de Mantovani A. y cols 2004.

El estado de activación M2a se caracteriza por expresar algunos factores antagonistas a los producidos por los macrófagos M1 y como consecuencia tienen la capacidad de contrarrestar el proceso inflamatorio. Entre ellos se encuentran: IL-10, la enzima arginasa 1, el receptor 1 de manosa; y particularmente en macrófagos murinos las moléculas YM1 (una proteína similar a las quitinasas) y FIZZ1 (una molécula tipo resistina). (16)

Entre los factores producidos por los macrófagos M2a destaca la arginasa 1, la que compite por su sustrato con la enzima iNOS, inhibiendo así la síntesis de óxido nítrico en un sistema de regulación por competición. Como consecuencia de la actividad de la

arginasa 1 se producen precursores de colágeno y poliaminas, las cuales son necesarias para procesos de remodelación de la matriz extracelular.

Dentro de las funciones inmunológicas de los macrófagos M2a están las de regular el proceso de inflamación (función antiinflamatoria), participar en la reparación de tejidos mediante su capacidad de remodelar la matriz extracelular, favorecer la angiogénesis y participar en la respuesta ante algunos parásitos nematodos y helmintos (función asociada en un principio con la capacidad de los macrófagos de producir proteínas parecidas a quitinasas, en la actualidad se ha determinado que la mayoría no posee dicha actividad debido a mutaciones en sus sitios catalíticos).

Otro estado de activación es el M2b, al cual los macrófagos son inducidos por la exposición a dos estímulos: en primera instancia el derivado de complejos inmunes (antígenos opsonizados por inmunoglobulinas) y en segundo lugar por el que ocasionan los ligandos de TLR's.

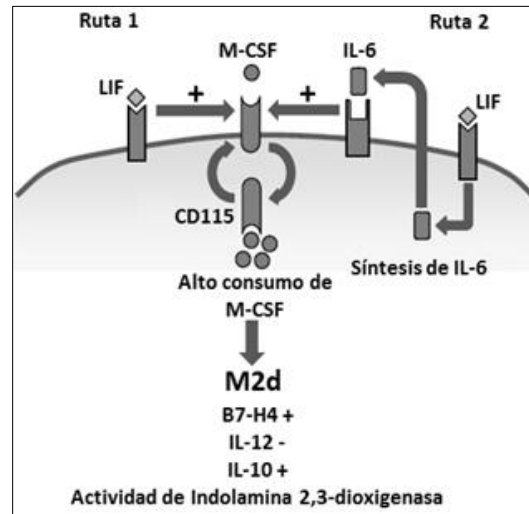
Los macrófagos M2b tienen la particularidad de producir algunas citocinas características de los macrófagos M1 entre las que se encuentran: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, la capacidad de expresar iNOS (como consecuencia no existe expresión de arginasa) y la ausencia de FIZZ1. A pesar de este número de similitudes con los macrófagos M1, los macrófagos M2b producen grandes cantidades de IL-10 que finalmente lleva al macrófago a funcionar más como una célula del tipo antiinflamatorio. Su principal función inmunológica es la de funcionar como un factor inmunorregulador y una célula anti inflamatoria.

Los macrófagos son activados al estado M2c por la exposición a tres estímulos: IL-10, TGF- $\beta$  y glucocorticoides (producidos por células adrenales del eje hipotalámico-pituitario-adrenal como respuesta al estrés). Se caracterizan por: producir grandes cantidades de IL-10, CCL1 y PGE2; presentan una disminución en la cantidad de moléculas del MHC-II (por lo que poseen una baja capacidad de presentar antígenos), expresan arginasa 1 y en su superficie poseen una gran cantidad de receptores no opsónicos (mediante los cuales incrementan su capacidad endocítica y fagocítica). Las principales funciones inmunológicas de éstos macrófagos son las de funcionar como células reguladoras antiinflamatorias y formar parte importante del proceso de formación tumoral.

Por último están los macrófagos M2d, un grupo recientemente descrito y que fue descubierto durante el estudio de células asociadas a tumores y los factores que ocasionaban la tolerancia inmunológica ante el mismo (22). Sus inductores no han sido identificados plenamente, pero en recientes estudios se ha establecido que la coestimulación de TLR's y del receptor antagonista de adenosina forma uno de los mecanismos para su diferenciación. (23, 24)

Entre los factores característicos de los macrófagos M2d se ha identificado la pérdida de regulación en los mecanismos de expresión de IL-6, un aumento en la expresión de receptor de M-CSF, la expresión constitutiva de la molécula B7-H4, una disminución de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (necesarias para la activación de los linfocitos T durante el proceso de presentación de antígenos), la falta de expresión tanto

arginasa 1 como de iNOS, una alta producción de IL-10, una baja producción de TNF- $\alpha$  y altos niveles de VEGF. Estos macrófagos tienen la función inmunológica de ser células inmunosupresoras, lo cual es resultado de su capacidad de suprimir la proliferación de linfocitos T y ocasionar su apoptosis (efecto que tiene su origen en la capacidad de formar metabolitos de triptófano por acción de la enzima indolamina 2,3-deoxigenasa). (22)



**Figura 5.** Modelos de diferenciación de macrófagos M2d propuesto por Duluc y cols (22). El estímulo ocasionado por LIF puede ocasionar la alta expresión del receptor de M-CSF, ya sea en forma directa (Ruta 1) o como consecuencia de inducir la producción y consumo autocrino de IL-6 (ruta 2).

Todos los diferentes estados de activación de macrófagos señalan la versatilidad de la célula, además de lo dinámica que puede ser su respuesta. De tal forma que cada estado de activación no excluye su posterior diferenciación hacia otro, así como tampoco excluye la existencia de poblaciones mixtas de macrófagos con diferentes estados de activación coexistiendo en un determinado momento inmunológico y en donde la respuesta general está dictada por una mayoría poblacional presente.

### **Proteínas del parásito como factores de activación de macrófagos.**

Durante el proceso de establecimiento del cisticerco existe una serie de interacciones hospedero-parásito que, en condiciones ideales, permiten la identificación del cisticerco por parte del sistema inmunológico del hospedero y el establecimiento de una respuesta en su contra.

No obstante, en algunos individuos el proceso de reconocimiento y ataque no se lleva a cabo en forma eficiente, debido a la presencia de factores en el hospedero que determinan la susceptibilidad a la enfermedad y/o por el desarrollo de mecanismos en el parásito que le permiten evadir la respuesta inmunológica del hospedero. La adquisición de dichos factores que otorgan a *T. solium* una ventaja en el proceso de infección sobre ciertos individuos, podría ser el resultado de la presión selectiva que ha sufrido el parásito a lo largo de miles de años de co-evolución con el humano y el cerdo.

Las proteínas producidas por *T. solium* podrían ser algunos de los factores que facilitan el establecimiento del cisticerco, estas proteínas además de llevar a cabo su función principal podrían funcionar como reguladores de la respuesta inmunológica. Estudios con *T. solium* sugieren a este mecanismo como la forma de explicar las modificaciones que la cisticercosis ocasiona en la población de linfocitos e incluso ha sido señalado como el responsable de ocasionar fenómenos de apoptosis en ciertos tipos celulares. (24, 25, 26, 27)

Por estas razones, resulta importante conocer si alguno de los productos de excreción y secreción del cisticerco de *T. solium* posee la capacidad de generar un cambio en la función de los macrófagos. Ya sea que estas proteínas ocasionen la activación y la presencia de fenotipos ligados al estado inmunológicamente protector (M1 para el caso de la cisticercosis), o que por el contrario favorezcan la diferenciación de macrófagos hacia fenotipos asociados al estado inmunológicamente permisivo para el parásito (M2).

En el caso de la diferenciación de macrófagos al estado M1, como consecuencia de la interacción con proteínas del cisticerco, la proteína nos permitiría establecer posibles mecanismos involucrados en la respuesta restrictiva para la cisticercosis. Además de estrategias que permitan favorecer este tipo de interacciones hospedero-parásito.

En el caso de identificar proteínas que auxilien al cisticerco a propiciar un estado inmunológicamente permisivo, se podrían plantear estrategias que impidan dichas interacciones evitando así la diferenciación prematura de macrófagos hacia el estado M2.

Por otra parte el identificar un factor capaz de regular el estado de activación de macrófagos podría resultar de interés para su aplicación en afecciones en donde el problema radica en el establecimiento de un estado inmunológico característico (Th1 o Th2).

Ante la posibilidad de que las proteínas de los parásitos funcionen como factores reguladores de la respuesta inmune, se han realizado una serie de estudios con diferentes parasitosis, al estudiar la respuesta inmunológica en infecciones causadas por helmintos se identificó su capacidad de influir en forma negativa sobre los TLR's de células. De tal forma que suceden alteraciones en la cascada de señales encargadas de ocasionar la internalización nuclear del factor NF- $\kappa$ B (factor importante en la activación de una serie de genes relacionados con la síntesis de citocinas inflamatorias). (28)

Ensayos que resultan de particular interés son los casos del estudio de las peroxirredoxinas de *Toxoplasma gondii* (25, 27), de *Schistosoma mansoni* y de *Fasciola hepatica* (26). Éstos trabajos han demostrado que la peroxirredoxina tiene la capacidad influenciar en la activación de macrófagos y ocasionar su polarización hacia alguno de los diferentes estados de activación. Otros ejemplos son: *Fasciola hepatica* la cual libera un catepsina con la capacidad de unir a las inmunoglobulinas IgG e IgE (involucradas en la citotoxicidad mediada por anticuerpos) y *Schistosoma spp* capaz de producir un factor que mediante el receptor Fas ocasiona la apoptosis de linfocitos T CD4+. (28)



Un último antecedente se presenta en el estudio de arterioesclerosis humana, en donde se detectó (por métodos de microscopía óptica de fluorescencia) que los macrófagos son capaces de captar y saturar su superficie con la TRX humana, sugiriendo así la presencia de receptores o sitios de unión específicos en la superficie de macrófagos. Lo cual ha llevado a plantear la posibilidad de que la TRX posea la capacidad de actuar como una citocina (29).

Estos antecedentes y trabajos de laboratorio realizados por el Dr. Landa y colaboradores en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM, nos llevan a plantear la posibilidad de que la proteína Tiorredoxina-1 de *T. solium* tenga el potencial de funcionar como un modificador del estado de activación de macrófagos murinos.

### **Tiorredoxina-1 (TRX-1).**

Debido a que los parásitos dependen de uno o varios hospederos para llevar a cabo su ciclo de vida, resulta de vital importancia que cuenten con medios de defensa para contrarrestar el ataque que se produce en su contra.

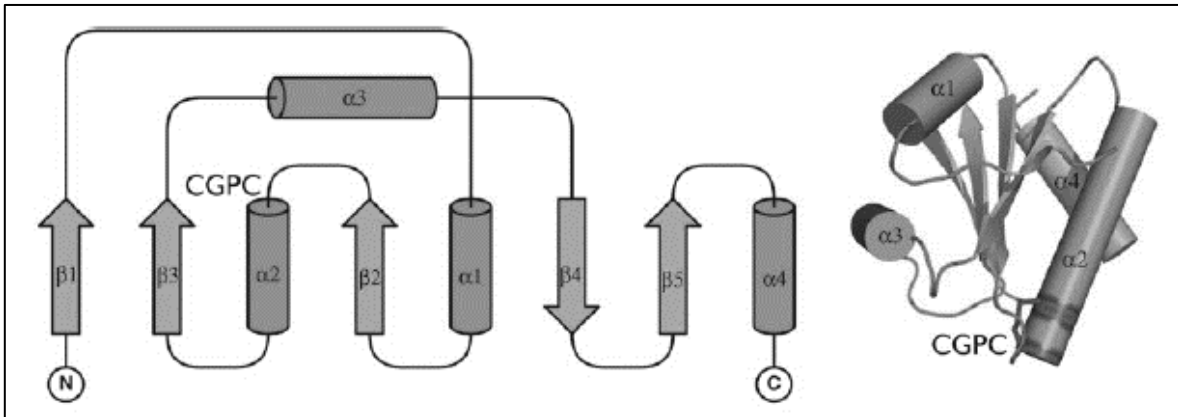
De entre los mecanismos con los que cuenta *T. solium* está el desarrollo de un sistema antioxidante, el cual contrarresta el estrés oxidativo derivado de su propio metabolismo y por otra parte lo protege de las ERO y ERN producidas por la respuesta inmunológica del hospedero.

Las interacciones de ERO y ERN con la superficie del parásito producen peróxidos lipídicos, los cuales ocasionan la presencia de grupos carbonilos citotóxicos responsables del daño directo a estructuras del parásito. Así mismo, al interior de la célula, las ERO y ERN originan cambios del estado redox lo cual deriva en la alteración de la función de un gran número de proteínas y enzimas.

Con el estudio experimental del estado redox en diferentes parasitosis se determinó que cada uno posee un estado antioxidante particular, caracterizado por diferentes niveles de expresión de las enzimas antioxidantes y privilegiando la prevalencia de ciertas enzimas por encima de otras (30, 31, 32). Entre las diversas enzimas involucradas en el mantenimiento del estado redox de las células se encuentra la tiorredoxina-1 (TRX-1), ésta se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de muchas especies y es capaz de actuar en una forma sumamente versátil.

La TRX-1 es una proteína pequeña de aproximadamente 12kDa perteneciente a la familia de las tiorredoxinas, posee un motivo catalítico canónico CGPC, en donde los residuos de cisteína son el componente clave que permite hacer la ruptura de puentes disulfuro en sustratos oxidados. Los demás aminoácidos conservados al interior del sitio catalítico no participan directamente en la reacción de catálisis pero si determinan la termodinámica de la reacción y el poder reductor de la enzima.

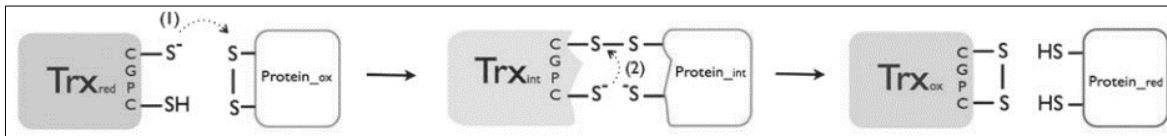
La estructura cristalina de la proteína presenta un arreglo distintivo caracterizado por la presencia de 5 hojas plegadas  $\beta$  rodeadas por 4 hélices  $\alpha$ .



**Figura 6.** Estructura secundaria y terciaria de la TRX-1 ( $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\alpha_3\beta_4\beta_5\alpha_4$ ) y localización del sitio catalítico. (PDB code: 2O7K).

Como resultado del proceso de reducción llevado a cabo por la TRX-1 se forma un puente disulfuro en la misma, el cual es reintegrado a su forma reducida por acción de la enzima denominada tiorredoxina reductasa a costa del gasto de NADPH.

La reacción que lleva a cabo la TRX-1 sobre el sustrato es una sustitución nucleofílica bimolecular ( $SN_2$ ); en ésta el paso de electrones entre enzima y sustrato ocasiona la oxidación de la TRX-1 y la reducción del sustrato. Dicha dirección en la reacción está dictada termodinámicamente por las diferencias de estabilidad que la TRX-1 presenta, dado que su forma oxidada resulta más estable que su forma reducida, lo que permite que la reacción suceda.



**Figura 7.** Mecanismo de reacción de Tiorredoxina-1, la reacción total puede ser visualizada como la transferencia de un puente disulfuro desde una proteína oxidada a la Tiorredoxina.

A nivel celular la proteína se encuentra ampliamente distribuida e incluso es sabido que es secretada por las células, aún y cuando la proteína carece de péptido señal. Su importancia reside en las muchas funciones que lleva a cabo o en las que toma parte (30, 31):

- Es un componente importante para mantener la sobrevivencia de las células en condiciones en donde existen altas concentraciones de ERO, ERN y arsenatos.
- Dentro de la célula es el principal mecanismo encargado de mantener un ambiente reductor, necesario para que las cisteínas de otras proteínas se mantengan reducidas.

- Debido a su acción de reductasa disminuye la formación de agregados de proteínas que resultan de los procesos oxidativos, evitando así la inactivación de esas proteínas.
- Al impedir el aumento de ERO en el núcleo durante procesos de estrés oxidante, indirectamente se ve involucrada en la expresión de genes, ya que éstas especies modifican la actividad de los factores de transcripción involucrados.
- En algunos casos se ha detectado su capacidad para funcionar como un factor de crecimiento y un promotor del plegamiento de proteínas.
- Participa en la regulación de la apoptosis vía denitrosilación.
- Participa como cofactor para enzimas entre las que destacan: la nucleósido difosfato reductasa, la DNA polimerasa T7 y la fosfoadenilsulfato reductasa. Esto señala la importancia que tiene la TRX en procesos de replicación de DNA y proliferación celular.
- En mamíferos se ha identificado a la TRX como un regulador de proteínas activadoras de la transcripción que son sensibles a los cambios redox, tales como: proteína activadora 1 (AP-1) y el factor nuclear de activación beta (NF- $\kappa$ B).
- Tanto la TRX como una forma incompleta de la misma (denominada como TRX80) tienen la capacidad de funcionar en forma similar a una interleucina o a quimiocinas.

### **III. Hipótesis.**

La Tiorredoxina-1 de *T. solium* ocasiona cambios en la expresión de los marcadores característicos de macrófagos peritoneales murinos Balb/c naïve, M1 y M2a.

### **IV. Objetivos.**

#### **Objetivo general.**

Determinar si el estímulo derivado de la Tiorredoxina 1 recombinante de *Taenia solium* (TsTRX-1r) ocasiona que los macrófagos naïve, M1 y M2 modifiquen su perfil de expresión de genes marcadores relacionados a los estados de activación.

#### **Objetivos particulares.**

1. Expresión y purificación de la TsTRX-1r por columnas de afinidad a Níquel.
2. Eliminación de la endotoxina bacteriana (LPS) presente en la muestra de TsTRX-1r, mediante el uso de columnas de intercambio iónico para eliminar LPS.
3. Determinar la concentración adecuada de trabajo para los cultivos con la TsTRX-1r mediante una curva dosis-respuesta y realizando perfiles de expresión de marcadores utilizando RT-PCR y ELISA.
4. Mediante RT-PCR y ELISA identificar los cambios en la expresión de marcadores relacionados con los estados de activación M1 y M2a en diferentes cultivos estimulados con la TsTRX-1r (cultivos naïve, M1 y M2a)

## V. Materiales y métodos.

### Materiales biológicos.

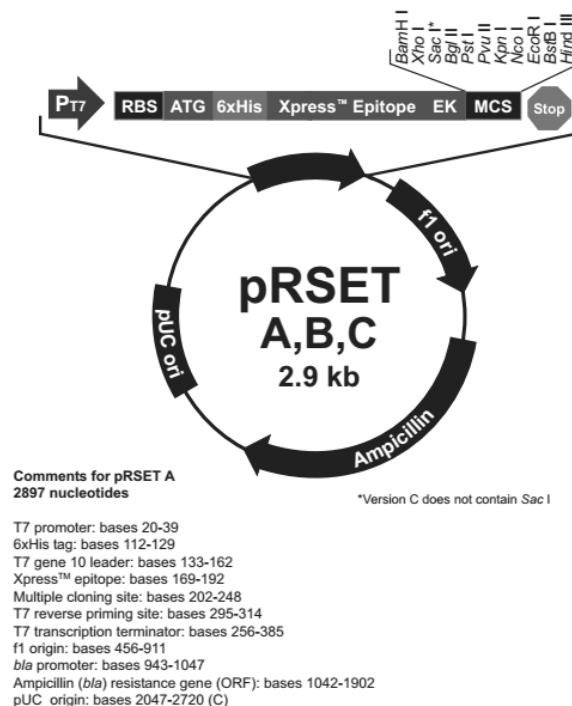
Los macrófagos utilizados en los experimentos fueron obtenidos del exudado peritoneal de ratones hembras de la cepa Balb/c con 8 semanas de edad, dichos animales fueron obtenidos del CINVESTAV y mantenidos durante el experimento dentro de las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular de *T. solium* con alimentación (Rodent Laboratory Chow 5001), agua *ad libitum* y ciclos de luz-oscuridad.

Las citocinas utilizadas para la activación en cultivo de macrófagos peritoneales son IL-4 (14kDa) e IFN- $\gamma$  (15.6kDa) de la marca R&D Systems. Ambas son proteínas recombinantes de ratón obtenidas mediante sistemas de expresión derivados de *Escherichia coli*.

La proteína experimental utilizada, la TsTRX-1r pura (12kDa) fue obtenida por un sistema de expresión en *E. coli*, previamente reportado en el laboratorio (33).

### Expresión de la proteína TSTRX-1r.

La TsTRX-1r fue expresada en *E. coli* que contienen el plásmido de expresión (pRSET-cDNA TsTRX-1) construido en el laboratorio de Biología Molecular de *T. solium* de la Facultad de Medicina de la UNAM. Este plásmido tiene la ventaja de permitir la fusión de una cola de 6 histidinas al amino terminal de la TsTRX1r, lo que permite purificarla por columnas de afinidad con metales (Níquel) (33)



**Diagrama 1.** Mapa del plásmido pRSET utilizado como vector para la expresión de la proteína TsTRX-1r en bacterias *E. coli*.

La clona de *E. coli* conteniendo el plásmido de expresión para la TsTRX-1r fue inoculada en 50 mL de medio de cultivo Luria Bertani (LB) y ampicilina a una concentración final de 50 µg/mL. Posteriormente el medio inoculado fue incubado a 37°C por toda la noche, pasado éste tiempo el cultivo fue colocado en un nuevo matraz que contenía 500 mL de medio LB complementado con ampicilina. Se continuó incubando a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.6 determinada a 600nm, en ese momento se adicionó el IPTG (a una concentración final de 1mM) con el fin de inducir la expresión de la TsTRX-1r. El cultivo con IPTG fue incubado por 4 horas más a 37°C, al término de la incubación el cultivo fue centrifugado a 700 g por 15 minutos y a 4°C (Allegra 64R Centrifuge, Beckman Coulter). El sobrenadante fue desechado y la pastilla bacteriana se resuspendió y lavó en 50mL de amortiguador Tris-ED (Tris 50mM pH=7.4, EDTA1mM, DTT 1mM, previamente filtrado por una membrana de 0.45 µm y desgasificado). La suspensión fue centrifugada una vez más a 700 g por 15 minutos y a 4°C, el sobrenadante fue desechado y la pastilla de bacterias se congeló a -72°C, hasta el momento de ser utilizada.

### **Purificación de la TsTRX-1r.**

La purificación se basa en el aprovechamiento de la cola de histidinas que la proteína tiene fusionadas y la afinidad que estas presentan a columnas de sefarosa-Níquel (GE Halthcare HisTrap HP). La pastilla bacteriana fue lisada con ayuda de un sonicador (Sonic Vibra Cell Ultrasonic processor) utilizando 3 pulsos de 17 watts por 3 min en 30 mL de amortiguador Tris-ED + urea (Tris 50 mM, EDTA 1mm, DTT 1mM, urea 4M). Posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 17,000 g por 10 minutos a 10°C (Allegra 64R Centrifuge, Beckman Coulter) y el sobrenadante resultante recuperado y pasado por la columna de afinidad a Níquel, siguiendo el procedimiento marcado en el manual de las columnas. La proteína unida a la columna fue lavada con Tris-ED y finalmente eluida con un gradiente de Tris-ED + imidazol (50mM, 100mM, 200mM y 500mM). Las fracciones eluidas con imidazol fueron recolectadas en volúmenes de 5 ml. Al término del proceso aquellos volúmenes que contienen la TsTRX-1r se juntaron y se pasaron una vez más por la columna de Níquel, la presencia y pureza de la TsTRX-1r en las fracciones fue observada mediante geles de acrilamida al 15%. (33)

### **Cuantificación de la TsTRX-1r y de LPS.**

La cantidad de TsTRX-1r fue determinada por el método de Bradford, el cual se basa en la cuantificación colorimétrica derivada de la reacción de las proteínas con un colorante hidrofóbico (Azul brillante de Coomassie). El colorante cambia del color rojo en su forma libre, a un color azul cuando forma complejos con las proteínas, permitiendo cuantificar absorbancias a una longitud de onda de 595 nm.

Una vez cuantificada la TsTRX-1r se eliminó el LPS bacteriano mediante el uso de columnas de afinidad a proteínas (ProteoSpin Endotoxin Removal micro-Kit, Norgen), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El principio del funcionamiento de las columnas se basa en la unión de proteínas a una matriz sólida y el posterior paso de una serie de solventes que retiraran gran parte de los LPS.

La determinación de la cantidad final de endotoxinas remanentes en la muestra se realizó mediante un método de reacción con lisado de amebocitos de *Limulus* modificados (Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation, Thermo Scientific). El método se basa en una reacción colorimétrica realizada por una pro enzima que es activada por la presencia de LPS, ocasionándose la síntesis de un cromóforo que es cuantificado mediante espectroscopia a 405-410 nm.

### **Obtención de células de exudado peritoneal.**

Los animales experimentales fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub>. El procedimiento descrito a continuación se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (*Nuair Biological Safety Cabinets Class-II Type AB/3*) y en condiciones de esterilidad. Una vez sacrificados, los animales fueron desinfectados en la zona abdominal con etanol al 70%, posteriormente se retiró la capa de piel de la zona sin que el proceso ocasione la perforación de la membrana peritoneal. Se inyectó en el peritoneo un volumen aproximado de 8 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril y fría (4°C) con ayuda de jeringas de calibre 21G, seguido de un ligero masaje de la zona abdominal del ratón. Posteriormente, con ayuda de la misma jeringa, se extrajo el líquido junto con las células de exudado peritoneal y se depositaron en tubos estériles, repitiendo el lavado una vez más. Los volúmenes de lavados peritoneales obtenidos se centrifugaron por 10 minutos a 1000 g (*Heracus Instruments Labofuge 400*), al finalizar se decantó el sobrenadante y el paquete celular obtenido se suspendió en medio de cultivo RPMI (*RPMI médium Sigma Aldrich*) adicionado con L-glutamina y NaHCO<sub>3</sub>; y complementado con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomina. (35)

### **Cultivos de macrófagos.**

Una vez obtenida la suspensión de células del exudado peritoneal en medio de cultivo RPMI, se procedió a realizar la cuantificación de células con ayuda de un hemocitómetro de Neubauer; además, se determinó la viabilidad mediante la tinción con azul de tripán. Aproximadamente,  $3 \times 10^6$  células/pozo en una placa de 24 pozos (marca FALCON) fueron incubaron por 2 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> para propiciar la adherencia de los macrófagos a la placa. Finalmente, se realizaron lavados con SSI estéril a 37°C para eliminar las células no adherentes, del total de células adheridas más del 90% de las células son macrófagos (36).

### **Curva dosis/respuesta, estimulación de macrófagos con la TsTRX-1r.**

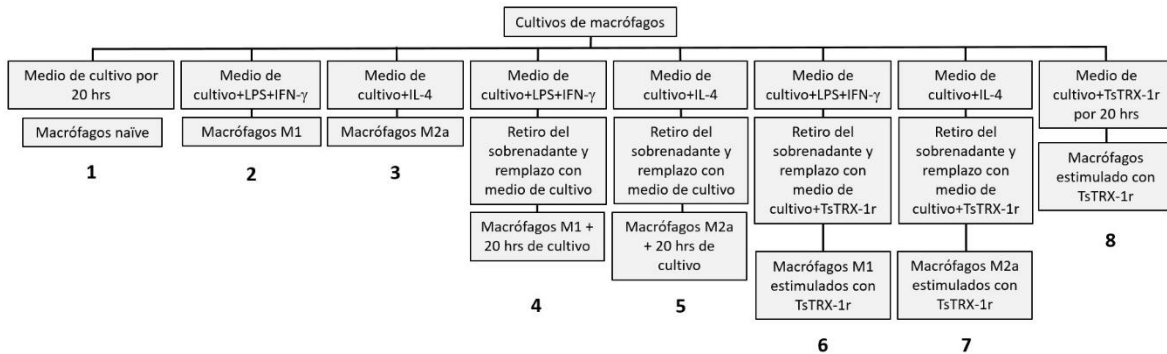
Para determinar la dosis adecuada de estímulo con la TsTRX-1r en los macrófagos, se realizó una curva dosis/respuesta en donde se probaron las siguientes concentraciones de la TsTRX-1r: 0.1 µg/mL (7.8 nM), 0.5 µg/mL (39.2 nM), 1.0 µg/mL (78.4 nM), 5.0 µg/mL (392 nM) y 10.0 µg/mL (784 nM) por un tiempo de 20 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Al término de la incubación los sobrenadantes de cultivo fueron recuperados para las determinaciones de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por método de ELISA (Peprotech Murine TNF- $\alpha$ , IL-12 and IL-10 Mini ABTS ELISA development) y las mono capas celulares fueron

utilizadas para el análisis de la expresión de los genes Gapdh, Nos2, Arg1 y Ym1 por el método de RT-PCR.

### Estimulación de cultivos de macrófagos con 5 µgTsTRX-1r/mL (392 nM).

Una vez establecida la concentración adecuada de la TsTRX-1r a utilizar (392nM), se realizó la estimulación en macrófagos cultivados por 20 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> de acuerdo al siguiente diseño:



**Diagrama 2.** Grupos experimentales utilizados, condiciones de cultivo y estímulos adicionales a las muestras de macrófagos peritoneales murinos Balb/c.

En éste diseño los grupos 2 y 3 sirven como referencias de comparación de los estados de activación M1 y M2 en macrófagos. Los grupos 6 y 7 sirven para determinar si la TsTRX-1r es capaz de ocasionar un fenómeno de amplificación o si es capaz de revertir un estado de activación establecido en los macrófagos en forma previa.

Los grupos 4 y 5 sirven como controles para validar que el efecto observado en los cultivos 6 y 7 es ocasionado por la proteína recombinante y no por el tiempo adicional de cultivo en ausencia de los estímulos diferenciadores (LPS, IFN-γ o IL-4 según sea el caso). El grupo 8 permitirá determinar el efecto que la proteína tiene sobre los macrófagos y por último el grupo 1 sirve como referencia del estado naïve.

Al término de la incubación se procedió a recolectar los sobrenadantes de cultivo y se congelaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados; de las mono capas de macrófagos en cultivo se extrajo RNA total.

### Extracción de RNA total.

La extracción de RNA total de macrófagos estimulados y sin estimular en cultivo se llevó a cabo mediante la lisis de células con TRIZOL (Invitrogen) y la posterior extracción de RNA total mediante columnas (Direct-zol RNA miniPrep, Zymo Research). Una vez removido el sobrenadante de los cultivos se adicionó 1 mL de TRIZOL realizando continuos pipeteos en los pozos para disgregar y lisar las células, los volúmenes de muestras obtenidos fueron recolectados y congelados a -72°C, hasta el momento de ser usadas



La extracción de RNA total se realizó con columnas de extracción (Direct-zol RNA miniPrep, Zymo Research) siguiendo el protocolo que marca el fabricante. La muestra de RNA total obtenida fue cuantificada usando un factor de dilución de 1:100 por espectrofotometría a 260 nm y la pureza se determinó mediante la relación de absorbancias 260 nm/280 nm. Finalmente, la integridad del RNA fue observada en una electroforesis en gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio.

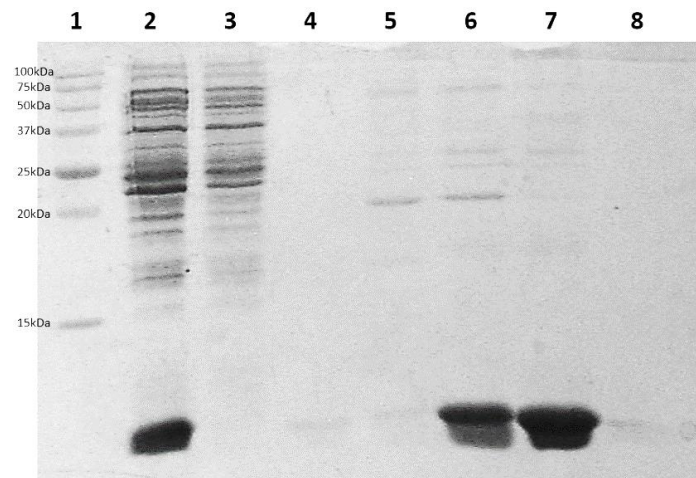
### **Reacciones de Transcripción inversa acopladas a la polimerasa de reacción en cadena (RT-PCR).**

A partir de las muestras de RNA total de macrófagos, se realizaron reacciones de RT-PCR para determinar la expresión de marcadores de los fenotipos M1 y M2a (Nos2, Arg1 y Ym1) utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen. Se utilizó el gen para la Gapdh como gen de mantenimiento. Para las reacciones de la RT-PCR se utilizó un programa con las siguientes condiciones: 1 ciclo de alineamiento y amplificación, 1 ciclo de desnaturalización e inicio (94°C-2 min, 56°C-30 seg, 72°C- 30 seg), 35 ciclos amplificación (94°C-2 min, 56°C-30 seg, 72°C- 30 seg), 1 ciclo extensión (94°C-2 min-72°C-10 min). Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio.

## VI. Resultados.

### Purificación de la TsTRX-1r.

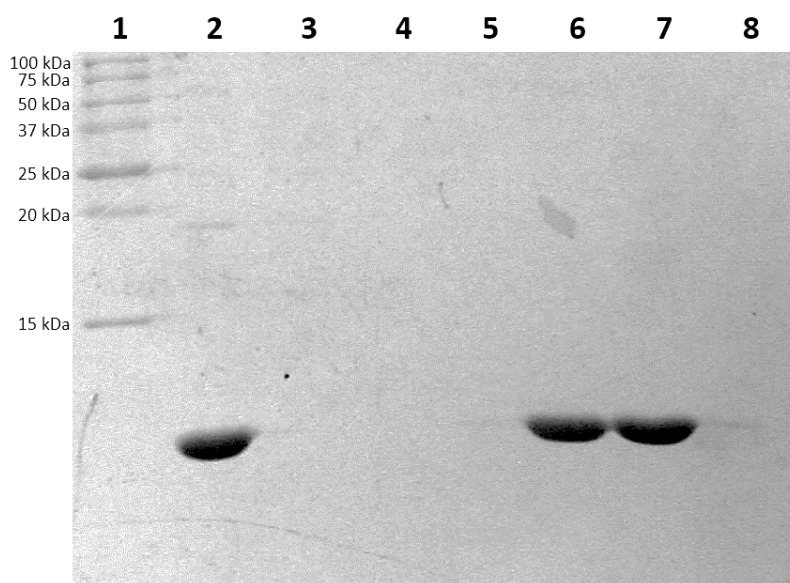
La figura 8 muestra el análisis de la purificación de la TsTRX-1r por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% al utilizar la columna de afinidad a níquel. En el carril 1 podemos observar los marcadores de peso molecular, el carril 2 muestra el total de proteínas expresadas por las bacterias y en donde se observa un enriquecimiento de una proteína de 12 kDa. En el carril 3 se observan las proteínas no retenidas en la columna de afinidad a níquel, notándose la ausencia de la proteína de 12kDa. En el carril 4 se observa que el volumen de lavado de la columna no muestra señal de proteínas que se estén desprendiendo de la columna de purificación. Los carriles 5, 6, 7, y 8 muestran los volúmenes recuperados al realizar las eluciones de la columna de afinidad con diferentes concentraciones de imidazol (50, 100, 200 y 500 nM). Podemos observar que las fracciones de los carriles 6 y 7 muestran un enriquecimiento de la proteína de 12kDa. Sin embargo, también es visible que las muestras están acompañadas de proteínas contaminantes con pesos moleculares de entre 20 y 75 kDa. Estas fracciones fueron colectadas, dializadas y pasadas una segunda vez por la columna de afinidad a níquel.



**Figura 8.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de la primera purificación de la TsTRX-1r. 1) Marcadores de peso molecular, 2) Extracto proteico inicial de *E. coli* expresando a la TsTRX-1r, 3) Fracción no retenida en la columna de Ni, 4) Fracción de lavado de la columna; y fracciones eluidas con imidazol: 5) 50mM, 6) 100mM, 7) 200mM, 8) 500mM. Se cargaron 20  $\mu$ L/carril.

Al término de la segunda cromatografía todas las fracciones obtenidas fueron analizadas por una electroforesis similar a la primera (Fig. 9). El carril 1 muestra los estándares de peso molecular, el carril 2 contiene la muestra obtenida al unir las fracciones 6 y 7 de la primera electroforesis (muestras enriquecidas con la proteína de 12 kDa). El carril 3 muestra la fracción no retenida en la columna de afinidad a níquel, el carril 4 contiene la muestra del lavado de la columna, en estas dos últimas podemos observar que no existe desprendimiento de la proteína de 12 kDa.

Los carriles 5-8 muestran las fracciones eluidas con el gradiente de imidazol (50, 100, 200 y 500 nM). En forma similar a la primera cromatografía se observa que las fracciones 6 y 7 se encuentran enriquecidas con la proteína de 12 kDa (Putativamente la TsTRX-1r), sin contaminación de otras proteínas y con una pureza del 97%. Las fracciones 6 y 7 se colectaron obteniéndose un volumen final de 10mL. Una inmunoelectrotransferencia con anticuerpos específicos anti-TsTRX-1r fue realizada para confirmar que la esta banda de 12 kDa es la TsTRX-1r (Dato no mostrado).



**Figura 9.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al15% de la segunda purificación de la TRX-1. 1) Marcador de peso molecular, 2) Mezcla de las fracciones eluidas con 100 y 200 mM de imidazol de la primera columna, 3) Fracción no retenida en la columna de Ni, 4) Fracción de lavado de la columna de Ni; y fracciones eluidas con imidazol: 5) 50 mM, 6) 100 mM, 7) 200 mM, 8) 500 mM.

### **Eliminación de la endotoxina bacteriana (LPS) en la muestra de TsTRX-1r.**

A la TsTRX-1r obtenida se le eliminó el LPS por medio de columnas de intercambio iónico y se procedió a realizar la cuantificación de LPS en la muestra final resultando en un valor de 1.365 EU/mL.

Muestra	Std 1 (1EU/mL)	Std 2 (0.5EU/mL)	Std 3 (0.25EU/mL)	Std 4 (0.1EU/mL)	Blanco	TRX-1(a)	TRX-1(b)
Abs	2.239	1.616	0.857	0.252	-----	3.160	3.176
Conc (EU/mL)	1	0.5	0.25	0.1	-----	1.36	1.37

Dado que los cultivos de macrófagos se realizarán con un estímulo máximo de 10µg/mL de TsTRX-1r y teniendo en cuenta la concentración final de proteína, podemos ver que los volúmenes utilizados del stock de TsTRX-1r representarán un máximo de 0.0054 EU. Este último valor se encuentra incluso por debajo del límite de 0.5 EU/mL que la FDA marca como el límite para instrumentos médicos que estarán en contacto directo con el sistema cardiovascular y linfático en humanos.

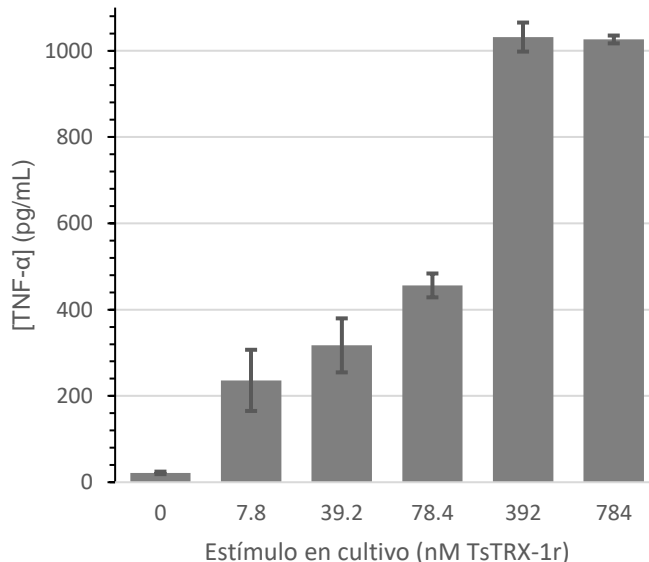
### Cuantificación de la TsTRX-1r por método de Bradford.

Al realizar la cuantificación de proteína en la muestra final por el método de Bradford se obtuvo una concentración de TsTRX-1r de 2.49  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $R^2$  de la regresión lineal=0.9952). Teniendo en cuenta un volumen final de proteína de 10 mL se obtuvo un rendimiento de 24.9 mg de TsTRX-1r a partir de un cultivo bacteriano de 500 mL.

Muestra	$\mu\text{g}$ de albúmina	Abs promedio 595nm (n=3)	$\mu\text{g}$ de TRX	Concentración TRX ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Conc promedio TRX ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Blanco	----	-----	----	-----	-----
Std1	10	0.015	----	-----	-----
Std2	30	0.048	----	-----	-----
Std3	50	0.076	----	-----	-----
Std4	60	0.098	----	-----	-----
TRX1 (10 $\mu\text{L}$ )	-----	0.034	22.06	2.20	2.495
TRX2 (30 $\mu\text{L}$ )	-----	0.133	83.93	2.79	

### Cuantificación de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por ELISA en cultivos de macrófagos murinos naïve estimulados con diferentes cantidades de TsTRX-1r.

En la figura 10 se muestra el efecto que la TsTRX-1r tiene sobre la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos murinos naïve, se observa una relación directa entre el aumento de la producción de TNF- $\alpha$  y el incremento en la cantidad de TsTRX-1r adicionada al cultivo.

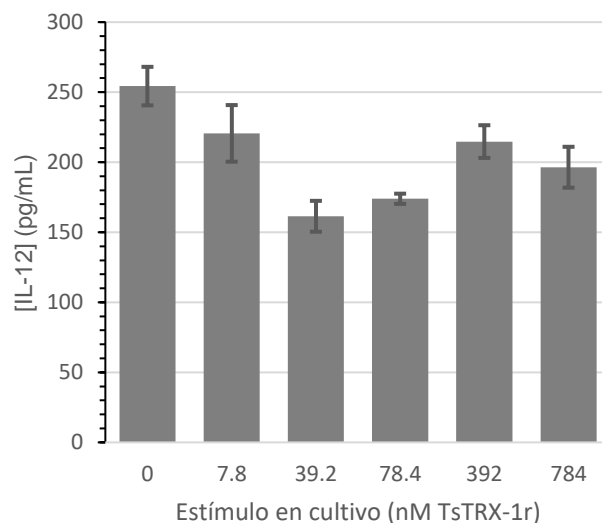


**Figura 10.** Cuantificación de TNF- $\alpha$  por el método de ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos naïve estimulados con diferentes concentraciones de la TsTRX-1r a 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub>. Los datos mostrados representan los valores  $\pm$  el Error estándar de determinaciones experimentales por triplicado, el análisis de significancia se realizó con un valor de  $p > 0.01$ .

También observamos que los estímulos con 7.8 nM, 39.2 nM y 78.4 nM de TsTRX-1r ocasionan un aumento de la producción de TNF- $\alpha$  con respecto a lo observado en los cultivos de macrófagos naïve, no obstante dichos valores representan menos de la mitad de la producción máxima observada durante el experimento. El valor máximo de producción de TNF- $\alpha$  se alcanza con los estímulos de 392 nM y 784 nM de TsTRX-1r, en donde los valores de concentraciones no muestran diferencias significativas y se aproximan a 1000 pg TNF- $\alpha$ /mL.

En el caso de las determinaciones de la IL-12 por ELISA (Fig. 11) observamos que los diferentes estímulos con la TsTRX-1r no ejercen un efecto tan marcado sobre la producción de IL-12 como sucedió en la producción de TNF- $\alpha$ . Los cultivos estimulados con 7.8 nM, 392 nM y 784 nM de TsTRX-1r no muestran diferencias significativas en la producción de IL-12 con respecto a las condiciones sin estímulo.

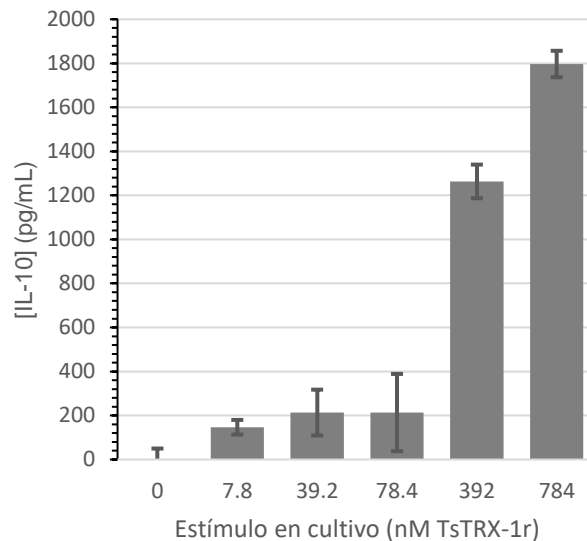
Con respecto a los cultivos estimulados con 39.2 nM y 78.4 nM de TsTRX-1r notamos que la producción de IL-12 se encuentran (~65% por debajo de la observada en los cultivos naïve sin estimular). Sin embargo, debido a la magnitud de las concentraciones registradas a lo largo del experimento, las diferencias ocasionadas por los diferentes estímulos con TsTRX-1r no señalan un efecto tan importante en la producción de esta interleucina.



**Figura 11.** Cuantificación de IL-12 por método de ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos naïve estimulados con diferentes concentraciones de la TsTRX-1r (20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub>). Los datos mostrados representan los valores  $\pm$  el Error estándar de determinaciones experimentales por triplicado, el análisis de significancia se realizó con un valor de  $p > 0.01$ .

La figura 12 muestra el efecto que la TsTRX-1r tiene sobre la producción de IL-10 en cultivos de macrófagos, notamos una relación entre aumento en la producción de la IL-10 y la cantidad de estímulo adicionado al cultivo. Los cultivos con 7.8 nM, 39.2 nM y 78.4 nM de TsTRX-1r muestran un incremento significativo en la producción de IL-10 con respecto al grupo sin estimular, registrando valores aproximados de 200 pg IL-10/mL.

Los cultivos estimulados con 784 nM de TsTRX-1r (Fig. 12), registran el máximo experimental con valores cercanos a los 1800 pg IL-10/mL. A pesar de ser ésta última condición de cultivo la que representa el máximo en la producción de IL-10, el estímulo con 392 nM de TsTRX-1r también ocasiona un incremento importante en la producción de la interleucina (~70% del efecto máximo observado).



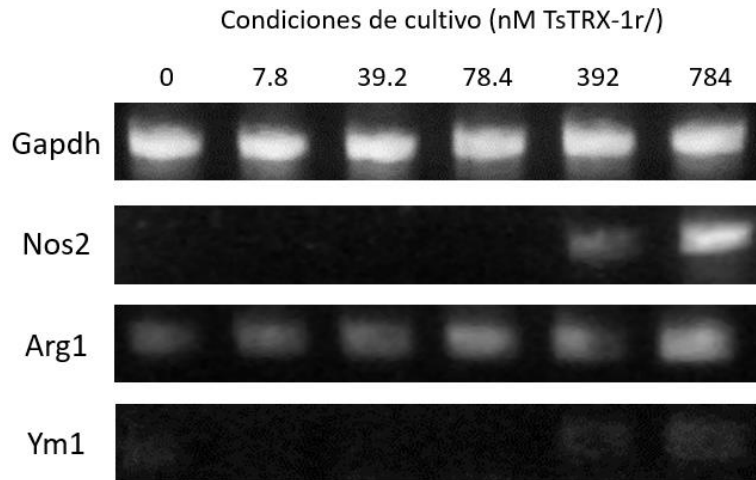
**Figura 12.** Cuantificación de IL-10 por el ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos naïve estimulados con diferentes concentraciones de la TsTRX-1r (20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub>). Los datos mostrados representan los valores  $\pm$  el Error estándar de determinaciones experimentales por triplicado, el análisis de significancia se realizó con un valor de  $p > 0.01$ .

### **Análisis por RT-PCR de los genes Gapdh, Nos2, Arg1 y Ym1 en macrófagos murinos naïve estimulados con diferentes cantidades de TsTRX-1r.**

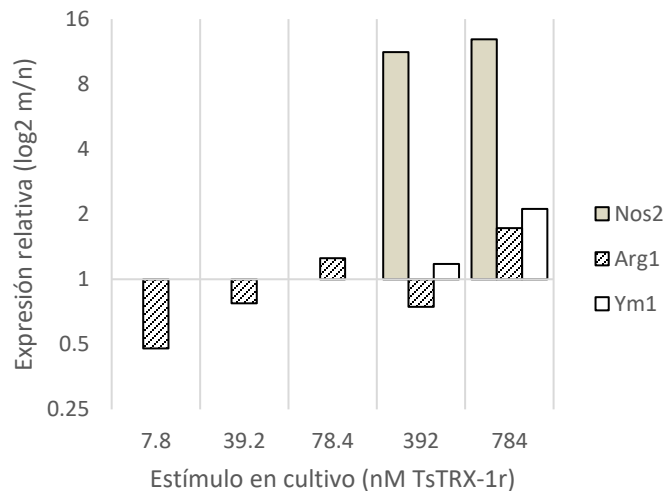
En la figura 13 se observan los productos de la reacción de la RT-PCR para genes marcadores de los estados de activación de macrófagos M1 y M2a. En la primera fila se puede observar que la expresión del RNA mensajero para el gen de la Gapdh se mantiene sin cambios a lo largo del experimento de estimulación con diferentes dosis de la TsTRX-1r.

En el mismo gráfico (Fig. 13) observamos que el incremento en la cantidad de estímulo con la TsTRX-1r ocasiona el aumento en la cantidad de RNA mensajero de los genes Nos2 y Ym1, observándose el mayor efecto en los cultivos estimulados con 392 nM y 784 nM de la TsTRX-1r. Como lo muestra la figura 14 el aumento en la expresión del RNA mensajero para los genes Nos2 y Ym1 alcanza su máximo experimental en las condiciones de estímulo de 784 nM de la TsTRX-1r. Por otra parte el estímulo de cultivos con 392 nM TsTRX-1r también muestra una expresión importante de los genes Nos2 y Ym1 con valores que representan ~30% y 50%, respectivamente, del efecto observado con los cultivos estimulados con 784 nM de la TsTRX-1r.

Finalmente la figura 13 también nos muestra que la cantidad del RNA mensajero para el gen de la Arg1 presenta un aumento gradual y que dicho aumento guarda relación con la cantidad de estímulo adicionado en cultivo. Resulta importante destacar que los macrófagos naïve poseen una producción basal significativa del RNA mensajero para el gen Arg1, a diferencia de los genes Nos2 y Ym1 en donde la producción del RNA mensajero resulta casi nula en el estado naïve. En la figura 14 notamos la tendencia de aumento en la cantidad de RNA mensajero del gen en función del aumento de la cantidad de estímulo adicionado en cultivo y cómo se alcanza un máximo en las condiciones de 784 nM de TsTRX-1r.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los perfiles de expresión de marcadores de los fenotipos M1 y M2a en macrófagos naïve murinos estimulados *in vitro* por 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> con diferentes concentraciones de la TsTRX-1r (curva dosis respuesta).



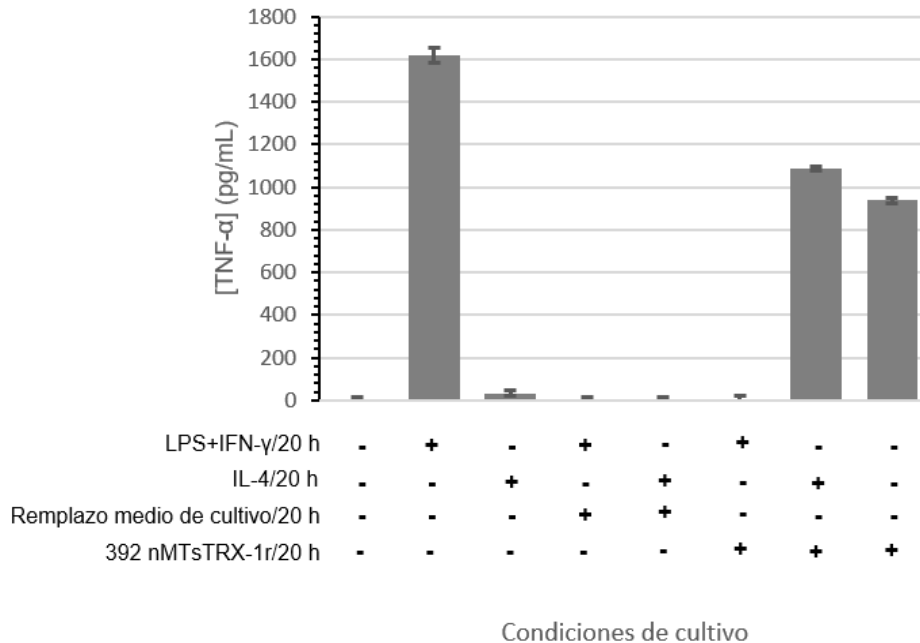
**Figura 14.** Análisis en los cambios de expresión del RNA mensajero de los genes Nos2, Arg1 y Ym1 de macrófagos naïve murinos estimulados *in vitro* (20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub>) con diferentes concentraciones de la TsTRX-1r (curva dosis respuesta). Los valores de expresión relativa están expresados en una escala logarítmica base 2.

Con los resultados obtenidos tanto en las determinaciones de citocinas por el ELISA y los resultados de reacciones de la RT-PCR se establecieron las condiciones de estímulo con 392nM y 784 nM de TsTRX-1r como las condiciones experimentales más importantes de estudio y en donde los estímulos son capaces de generar los mayores cambios en los cultivos de macrófagos.

Para los subsecuentes experimentos se eligió a la condición de estímulo de 392 nM TsTRX-1r como la dosis de trabajo, esta elección responde a que es una de las concentraciones en donde la TsTRX-1r ocasiona mayores cambios en las expresiones de genes de macrófagos murinos (TNF- $\alpha$ , IL-10, Nos2 y Ym1). Por otra parte también es la concentración más baja, permitiéndonos mantener condiciones que resulten similares a las existentes durante el proceso de infección *in vivo* (cisticercosis).

### Quantificación de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 por el ELISA en cultivos de macrófagos murinos naïve, M1 y M2a estimulados con 392 nM deTsTRX-1r.

Al realizar la cuantificación de TNF- $\alpha$  (Fig. 15) se observa que los macrófagos naïve presentan una muy baja producción de la citocina (~20 pg/mL), que los macrófagos polarizados al fenotipo M1 que producen una alta concentración de la citocina alcanzando valores aproximados de 1600 pg/mL, en contraste los macrófagos M2a producen dicha interleucina en cantidades similares a las observadas en los cultivos naïve (~30 pg/mL).



**Figura 15.** Cuantificación de TNF- $\alpha$  por método de ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales naïve (primera columna), M1 (segunda columna), M2a (tercera columna), M1 y M2a cultivados por un periodo extra de 20 h sin sus correspondientes factores activadores (cuarta y quinta columnas correspondientemente); M1, M2a y naïve estimulados con 392 nM de TsTRX-1r por 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> (sexta, séptima y octava columnas correspondientemente) Los datos mostrados representan los valores  $\pm$  el Error estándar de determinaciones experimentales por triplicado, el análisis de significancia se realizó con un valor de  $p > 0.01$ .



Para los macrófagos polarizados a los fenotipos M1 y M2a cultivados por un periodo extra de tiempo sin la presencia de sus factores activadores correspondientes (20 h sin IFN- $\gamma$ +LPS o IL-4 según sea el caso) registramos que la producción de la citocina en ambos casos se mantienen con valores bajos y similares a los observados en los cultivos naïve. En el caso de los macrófagos M1, el periodo extra de incubación ha ocasionado que los macrófagos pierdan la capacidad de producir TNF- $\alpha$  (uno de los principales marcadores de su fenotipo).

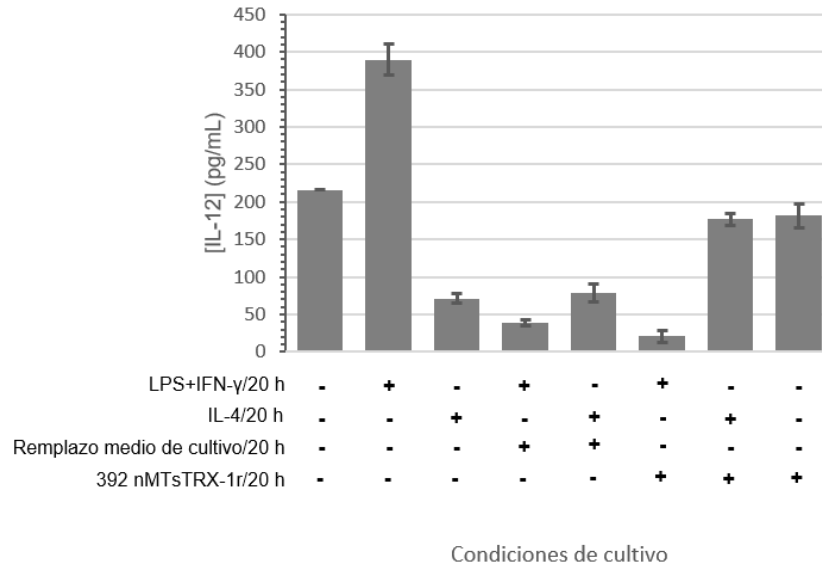
Observando el efecto que la TsTRX-1r tiene sobre la producción de TNF- $\alpha$  en cultivos previamente polarizados a los fenotipos M1 y M2a (Fig. 15), notamos que la estimulación sólo tiene efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$  de los macrófagos M2a, mientras que los macrófagos M1 no son capaces de mantener la expresión de ésta interleucina. Los cultivos M2a al ser estimulados con 392 nM de TsTRX-1r incrementan la producción de TNF- $\alpha$  alcanzando concentraciones de cerca de 1100 pg/mL (~67% de la concentración alcanzada en los cultivos de macrófagos polarizados M1), lo cual resulta un cambio importante pues se aumenta la expresión de un marcador característico de los macrófagos M1.

Finalmente, en la figura 15 podemos verificar que los macrófagos naïve estimulados con 392 nM TsTRX-1r se comportan de forma similar a como se había registrado en los experimentos de curva dosis-respuesta; y en donde el estímulo ocasiona un incremento significativo de la producción de TNF- $\alpha$ . Al comparar este último valor con lo obtenido en los cultivos de macrófagos M1, notamos que la concentración de TNF- $\alpha$  obtenida representa ~58% de lo observado en macrófagos M1.

Respecto a la producción de IL-12 en cultivos (Fig.16) observamos que los macrófagos naïve producen la citocina en concentraciones aproximadas de 210 pg/mL, en comparación los macrófagos M1 incrementada significativamente su producción de la interleucina hasta un valor aproximado de 400 pg/mL (incremento casi del 100%).

En la misma figura (Fig. 16) notamos que los macrófagos polarizados al fenotipo M2a tienen una producción de la interleucina con valores de 75 pg/mL (~33% de lo producido por los macrófagos naïve).

Para los macrófagos polarizados a los fenotipos M1 y M2a, y que posteriormente son cultivados por un periodo extra de tiempo sin la presencia de sus correspondientes factores activadores, en la figura 16 observamos que los macrófagos M1 registran valores de concentración de ~40 pg/mL lo que señala una reducción significativa de su capacidad de producir la interleucina (~9% de lo observado en los cultivos M1). Por otra parte los macrófagos M2a que fueron incubados por un periodo extra de tiempo en ausencia del estímulo diferenciador (IL-4) muestran una concentración de IL-12 en cultivo de 80 pg/mL (Fig.16) lo cual no representa una diferencia significativa a lo obtenido en los cultivos de macrófagos polarizados M2a (75 pg/mL).



**Figura 16.** Cuantificación de IL-12 por método de ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales naïve (primera columna), M1 (segunda columna), M2a (tercera columna), M1 y M2a cultivados por un periodo extra de 20 h sin sus correspondientes factores activadores (cuarta y quinta columnas correspondientemente); M1, M2a y naïve estimulados con 392 nM de TsTRX-1r por 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> (sexta, séptima y octava columnas correspondientemente). Los datos mostrados representan los valores  $\pm$  el Error estándar de determinaciones experimentales por triplicado, el análisis de significancia se realizó con un valor de  $p > 0.01$ .

Al estudiar la producción de la IL-12 en los cultivos de macrófagos M1 estimulados con la 392 nM TsTRX-1r (Fig. 16) observamos que la concentración de interleucina es de 20 pg/mL, un valor que resulta significativamente más bajo que lo observado en los cultivos de macrófagos M2a e incluso que los observados en los cultivos de macrófagos M1 que fueron incubados por un periodo extra de tiempo sin los estímulos diferenciadores (IFN- $\gamma$ +LPS). Este resultado nos señala que la TsTRX-1r no afecta en la producción de la IL-12 de los macrófagos M1, comportándose de forma similar a los cultivos en donde los macrófagos M1 ya no poseen los estímulos diferenciadores.

Al observar los resultados de la determinación de IL-12 en los cultivos M2a estimulados con 392 nM de TsTRX-1r (Fig. 16) encontramos una concentración de la interleucina de ~180 pg/mL. Este valor resulta similar al obtenido en los cultivos naïve y permite observar que el estímulo con la TsTRX-1r ocasiona que la producción de la IL-12 retome valores similares a los encontrados en las células naïve.

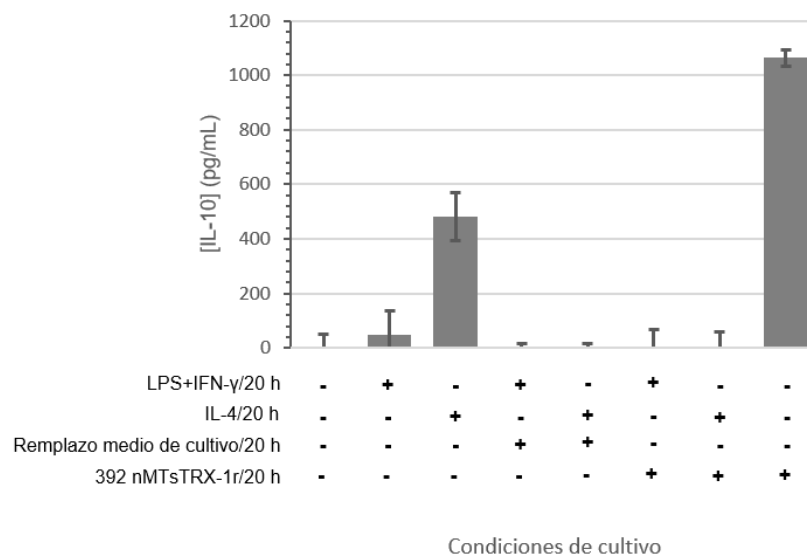
En la figura 17 se muestran los resultados de la cuantificación de la IL-10 en los cultivos, en primer lugar podemos observar que los valores de concentración de la interleucina en los cultivos de macrófagos naïve son bajos y cercanos a cero, los cultivos de macrófagos polarizados el fenotipo M1 también registra una concentración baja de la interleucina y que no es significativamente diferente a lo obtenido en los macrófagos naïve (~45 pg/mL).

En la misma figura 17 se observa que los cultivos de macrófagos polarizados M2a tienen una producción de ~480 pg/mL, lo que resulta un incremento significativo en la producción de la interleucina (10 veces más comparándolo con los macrófagos M1).

Los cultivos de macrófagos polarizados M1 y M2a que son incubados por un periodo extra de tiempo sin los correspondientes factores diferenciadores (Fig. 17), muestran concentraciones de IL-10 muy bajas y sin diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en los cultivos naïve, señalándonos la pérdida de las características de producción de interleucina que habían obtenido durante la polarización.

Observando la producción de IL-10 en los cultivos M1 y M2a estimulados con 392 nM TsTRX-1r (Fig. 17), notamos que el estímulo no ocasiona cambios en la producción de la interleucina. En ambos cultivos la producción de la interleucina se reduce a valores similares a los encontrados en los cultivos de macrófagos naïve, señalando un comportamiento similar al existente en los cultivos polarizados e incubados por un periodo extra de tiempo sin sus correspondientes factores diferenciadores.

Finalmente, los cultivos de macrófagos estimulados con 392 nM de TsTRX-1r (Fig. 17), muestran una concentración de la interleucina de ~1000 pg/mL, lo que resulta un valor significativamente mayor que el valor obtenido en los cultivos M2a (~2 veces la producción obtenida en macrófagos M2a).



**Figura 17.** Cuantificación de IL-10 por método de ELISA en sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales naïve (primera columna), M1 (segunda columna), M2a (tercera columna), M1 y M2a cultivados por un periodo extra de 20 h sin sus correspondientes factores activadores (cuarta y quinta columnas correspondientemente); M1, M2a y naïve estimulados con 392 nM de TsTRX-1r por 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> (sexta, séptima y octava columnas correspondientemente). Los datos mostrados representan los valores ± el Error estándar de determinaciones experimentales por triplicado, el análisis de significancia se realizó con un valor de p>0.01.

### **Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes Gapdh, Nos2, Arg1 y Ym1 en macrófagos murinos naïve, M1 y M2a estimulados con 392 nM de TsTRX-1r.**

La figura 18 muestra la expresión del RNA mensajero para diferentes genes marcadores, en la primera fila observamos que la cantidad de RNA mensajero para el gen Gapdh de

macrófagos en diferentes condiciones de cultivo no muestra cambio en su expresión a lo largo del experimento.

En la segunda fila (Fig. 18) se observa la expresión del RNA mensajero del gen *Nos2* en las diferentes condiciones de cultivo. En la imagen podemos observar que los niveles de expresión de las muestras de cultivo: M1 y M2a incubados por un periodo extra de tiempo y naïve tienen una expresión del RNA mensajero de *Nos2* similar y con valores cercanos a cero (análisis de señales en Fig. 19).

También notamos que la expresión del RNA mensajero del gen *Nos2* (Fig. 18 y 19) tiene su máximo experimental en los cultivos de macrófagos polarizados M1, que las muestras de cultivos M1 estimulados con TsTRX-1r y macrófagos naïve estimulados con TsTRX-1r presentan una expresión importante del gen con valores similares y que se encuentran por debajo de lo registrado en los macrófagos M1 ( $\approx 75\%$ ). Por último, observamos que los cultivos de macrófagos M2a estimulados con TsTRX-1r presentan valor alto en la expresión del gen *Nos2*, representando  $\sim 46\%$  de lo observado en los macrófagos M1 y señalando un importante cambio en un marcador que está relacionado al fenotipo M1.

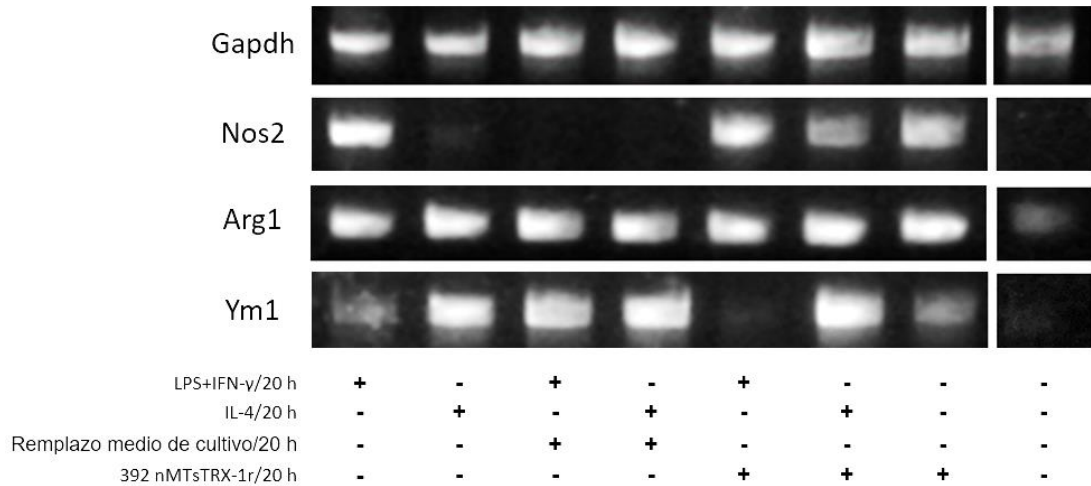
Al observar la expresión de RNA mensajero del gen *Arg1* en la figura 18, notamos que los macrófagos naïve presentan una expresión basal del gen y que las diferentes condiciones de cultivo ensayadas ocasionan un pequeño incremento de la cantidad del RNA mensajero del gen (Fig. 19). Sin embargo, el aumento observado no muestra que el efecto se deba a la TsTRX-1r o que exista alguna diferencia importante entre las condiciones de cultivo experimentales.

Al estudiar la cantidad de RNA mensajero del gen *Ym1* (Fig. 18 y 19) observamos que los macrófagos naïve muestran una ligera expresión basal del gen, en comparación los macrófagos M1 muestran un pequeño aumento en la expresión y los macrófagos M2a incrementan en gran medida la expresión del gen ( $\sim 3$  veces que en los macrófagos M1).

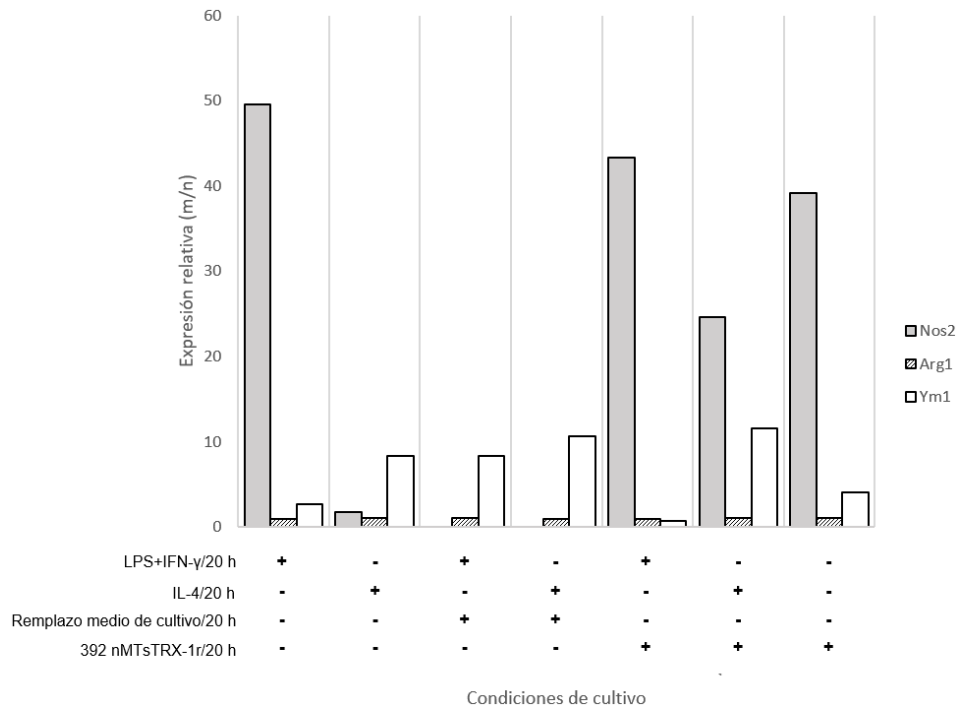
Los macrófagos M1 y M2a con un periodo extra de incubación sin sus factores diferenciadores (Fig. 18 y 19) muestran una alta expresión del gen con valores similares a los obtenidos en los cultivos de macrófagos M2a.

Observando el efecto que la TsTRX-1r tiene sobre la cantidad de RNA mensajero del gen *Ym1* en cultivos polarizados (Fig. 18 y 19) observamos que como consecuencia del estímulo los macrófagos M1 muestran una expresión muy baja y con valores cercanos a los observados en los cultivos de macrófagos naïve señalando un efecto represivo. Por su parte los macrófagos M2a no sufren modificaciones en la expresión del gen *Ym1*, ya que los valores obtenidos resultan similares a los obtenidos en macrófagos M2a y los M2a incubados por un periodo extra de tiempo.

Finalmente observamos que la expresión de *Ym1* en los cultivos de macrófagos naïve estimulados con TsTRX-1r muestra un aumento en la cantidad del RNA mensajero con respecto a lo observado en el estado naïve ( $\sim 2$  veces lo registrado en los macrófagos naïve).



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del perfil de expresión de marcadores de los fenotipos M1 (Nos2) y M2a (Arg1 y Ym1) en cultivos de macrófagos murinos peritoneales naïve (octava columna), M1 (primera columna), M2a (segunda columna), M1 y M2a cultivados por un periodo extra de 20 h sin sus correspondientes factores activadores (tercera y cuarta columnas correspondientemente); M1, M2a y naïve estimulados con 392 nM de TsTRX-1r por 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> (quinta, sexta y séptima columnas correspondientemente).



**Figura 19.** Análisis en los cambios de expresión del RNA mensajero de los genes Nos2, Arg1 y Ym1 en cultivos de macrófagos murinos peritoneales M1 (primera columna), M2a (segunda columna), M1 y M2a cultivados por un periodo extra de 20 h sin sus correspondientes factores activadores (tercera y cuarta columnas correspondientemente); M1, M2a y naïve estimulados con 392 nM de TsTRX-1r por 20 h a 37°C con 5%CO<sub>2</sub> (quinta, sexta y séptima columnas correspondientemente) Los valores de expresión relativa están expresados en valores de radio (señal de muestra/señal de control).

## VII. Discusión.

Las moléculas producidas por diferentes patógenos han demostrado que además de llevar a cabo su función primaria son capaces de llevar a cabo otras funciones, dentro de las se encuentra la de modificar la respuesta inmunológica del hospedero (15, 25, 26, 27, 29, 39). Dichos cambios pueden alterar los mecanismos de defensa del hospedero ocasionando un ambiente inmunológico menos agresivo en contra del patógeno o por el contrario, resultar en interacciones que favorecen el reconocimiento del patógeno y el desarrollo de una respuesta adecuada para su eliminación.

Bajo este marco se estudió el efecto que tiene sobre los macrófagos murinos una proteína de secreción-excreción perteneciente al complejo de enzimas del sistema NADPH-Tiorredoxina-Tiorredoxina glutatión reductasa-2 Cys-peroxirredoxina, y cuya función principal es la regulación del estado redox y desintoxicación de hidroperóxidos para el parásito *Taenia solium*.

Así pues se establece a la TsTRX-1 como una proteína con la capacidad de modificar marcadores importantes relacionados con la activación de los macrófagos peritoneales murinos Balb/c. Sin embargo se encontró que el estímulo modifica a dichos marcadores en forma diferencial, es decir, las modificaciones ocasionadas dependen del estado inicial de los macrófagos.

Por una parte la estimulación de macrófagos naïve con la TsTRX-1r ocasiona el establecimiento de una población con marcadores de activación mixtos: una producción alta de TNF- $\alpha$ , una alta expresión de RNA mensajero del gen Nos2, el aumento de la producción de IL-10, el ligero aumento en el RNA mensajero del gen Ym1 y por último el incremento en la cantidad de RNA mensajero del gen Arg1.

Las modificaciones registradas de los marcadores durante el experimento de estimulación de macrófagos naïve con la TsTRX-1r nos lleva a pensar en el posible establecimiento de una población mixta de macrófagos M1 y M2a. La coexistencia de los fenotipos M1 y M2a parece en principio contradictoria, sin embargo se ha establecido previamente en la bibliografía que la diferenciación de macrófagos en el estado de activación M1 conlleva a la aparición del fenotipo M2a como una forma de auto-regulación inmunológica. Esto evita que los procesos asociados a la existencia de macrófagos M1 (como por ejemplo la síntesis de ERO y ERN) se lleven a cabo en forma descontrolada o exacerbada ocasionando daños al tejido circundante. (36, 37)

Por otra parte la posibilidad de que la TsTRX-1r estuviese ocasionando en cultivos de macrófagos naïve la diferenciación al fenotipo M2b no parece viable debido a que dicho fenotipo se caracteriza, entre otras cosas, por la ausencia de Ym1 y el aumento en la expresión de Arg1.

A pesar de que el resultado de la estimulación de macrófagos naïve con la TsTRX-1r ocasiona una mezcla de marcadores tanto del fenotipo M1 como M2a resulta importante destacar lo que en términos del proceso de neurocisticercosis podría estar sucediendo.

En primer lugar, y debido a la temprana diferenciación de macrófagos hacia uno de los fenotipos M2, se está ocasionando que la etapa de restricción de la infección (ambiente tipo Th1), se vea acortada dando paso a un ambiente inmunológico permisible (ambiente tipo Th2).

En forma adicional al análisis fenotípico de los macrófagos podemos destacar un muy importante punto: los macrófagos naïve estimulados con la TsTRX-1r producen muy altas concentraciones de IL-10. Estas cantidades de IL-10 parecen señalar un mecanismo importante de regulación inmunológica por parte de *T. solium* (*helminthos*), debido a la importancia que la IL-10 tiene, no solo en el desarrollo de la respuesta Th2 en linfocitos T CD4+, sino también en el desarrollo de la respuesta mediada por linfocitos T reguladores. (38, 39, 40)

La hipótesis anterior se apoya también en el hecho de que se han descrito una serie de enfermedades causadas por helmintos en las que los agentes causantes ocasionan que los macrófagos se vuelvan fuentes importantes de producción de la IL-10, entre ellas, la misma cisticercosis causada por *T. solium* o la infección por el nematodo *Onchocerca volvulus* (39, 41, 42).

La alta producción de IL-10 ocasiona que muchas células se vean afectadas en forma importante. En macrófagos y células dendríticas se origina una disminución en sus capacidades de presentar antígenos, además de una disminución en la presencia de moléculas co-estimuladoras en su superficie. En forma adicional estas células influyen sobre otras, como por ejemplo, inhibiendo el desarrollo de la respuesta Th1 e incluso suprimiendo la respuesta Th2 (38, 39, 40, 41, 42).

A nivel de células T reguladoras la presencia de IL-10 fomenta la diferenciación de dichas células debido un fenómeno de inducción ocasionado por un ciclo de auto estimulación con IL-10. Es decir, la IL-10 ocasiona que las células T reguladoras productoras de IL-10 sean estimuladas produciendo aún más IL-10 y desencadenando un ciclo de auto estimulación que finalmente lleva al incremento de poblacional de éste tipo de células originando modificaciones en las funciones del resto de células presentes.

A futuro, el aumento de la producción de IL-10 por parte de macrófagos naïve estimulados con la TsTRX-1r resulta un punto importante de estudio. En este sentido la TsTRX-1r podría ser una pieza clave o el provocador directo del fenómeno de incremento de producción de IL-10 en procesos parasitarios ocasionados por helmintos, arrojando un poco de luz sobre los mecanismos aún no descritos con precisión.

Cuando se estudia el efecto que 392 nM de TsTRX-1r tiene sobre macrófagos M1 observamos que la proteína sólo repercute en la expresión del RNA mensajero para el gen Nos2, los resultados nos podrían sugerir un posible mecanismo que permite privilegiar la producción de la enzima iNOS en los macrófagos. Si pensamos en un ambiente de infección *in vivo*, en donde los factores desencadenantes de la respuesta tipo Th1 siguen siendo producidos por el resto de células presentes en la zona, la presencia de la TsTRX-1r podría ocasionar que la cantidad de especies reactivas de oxígeno y

nitrógeno se incrementen o que se mantengan por un periodo de tiempo mayor; lo cual podría resultar en un ataque mucho más eficiente en contra del tegumento del cisticerco.

Otra posibilidad que se plantea es que el aumento en la expresión del RNA mensajero del gen *Nos2* sea el resultado de un mecanismo de compensación que se desencadena en la célula como consecuencia de la actividad enzimática de la TsTRX-1. Debido a la influencia que la TsTRX-1 tiene sobre el estado redox de la células, el aumento en la cantidad de éste tipo de enzima podría estar ocasionando una disminución de ERO y ERN, las cuales resultan ser factores importantes en el desarrollo del estado inflamatorio. De esta manera el impacto observado en la expresión de *Nos2* durante los cultivos con la TsTRX-1r tal vez sea sólo el intento de los macrófagos M1 por mantener los niveles de especies reactivas necesarias para llevar a cabo su acción de ataque a patógenos y no un efecto de estimulación directa en la expresión del gen.

En cuanto a los cambios producidos en macrófagos M2a por la estimulación con 392 nM de TsTRX-1r, observamos que la proteína ocasiona la producción y expresión de marcadores muy importantes del estado inmunológico tipo Th1 ( $\text{TNF-}\alpha$ , *Nos2* y recuperación de la producción de IL-12 a niveles similares a los observados en macrófagos naïve). Estos cambios nos sugieren el posible cambio de población de macrófagos hacia un fenotipo mucho más inflamatorio, ya sea que estos macrófagos estén siendo revertidos hacia el estado de activación M1 o que, como consecuencia del conjunto de citocinas en el microambiente, se mantuvieran dentro de la categorización de macrófagos M2 con la particularidad de producir citocinas características del fenotipo M1, es decir un fenotipo M2b.

Podemos mencionar que la TsTRX-1 tiene la capacidad de funcionar como un factor inmunorregulador a nivel de macrófagos, con la peculiaridad de poder actuar en forma dependiente del estado inicial de activación de presentes los macrófagos. No obstante resulta importante el profundizar en los posibles mecanismos mediante los cuales la TsTRX-1 actúa, así como poder establecer con más precisión si los efectos observados son dependientes del sitio catalítico o de alguna otra zona de la proteína.

Finalmente, el disponer de moléculas como la TsTRX-1r permitirá entender las vías de señalización involucradas en la regulación de genes de la respuesta inmunológica y que los parásitos han desarrollado como una forma de establecerse en sus hospederos.

## **VIII. Conclusiones.**

La estimulación con la TsTRX-1r de cultivos de macrófagos peritoneales murinos Balb/c ocasiona cambios en las células que son dependientes del estado de activación inicial que presentan los macrófagos.

La estimulación de macrófagos naïve con la TsTRX-1r ocasiona la diferenciación de cultivos con una mezcla de marcadores de macrófagos M1 y M2a. Además de ocasionar la producción de grandes cantidades de IL-10, lo que podría ser un mecanismo de



regulación de la respuesta inmunológica mediada por la participación de células T reguladoras productoras de IL-10.

El estímulo en macrófagos M2a con la TsTRX-1r ocasiona la expresión de marcadores que dotan a los macrófagos de un carácter inflamatorio. Ya sea que los macrófagos M2a se tornen del fenotipo M2b, o que una fracción de la población M2a se torne en una población del fenotipo M1.

Por último, la estimulación de los macrófagos M1 estimulados con la TsTRX-1r sólo ocasiona un efecto sobre la expresión del RNA mensajero del gen Nos2, en éste caso la estimulación contribuye en mantener la expresión del gen en los cultivos de macrófagos.

Los datos presentados y el contar con la proteína pura abren la puerta para su posible uso como reguladora de la respuesta inmunológica.

## Referencias.

- 1) García H y cols. 2003. *Taenia solium* cysticercosis. The Lancet. 361:547-556.
- 2) Tay Zavala J.; Sánchez Vega J. T. & Ruiz Sánchez D. 2002. Rev Fac Med UNAM. 45(3):118-125.
- 3) Del Brutto O. H. y cols. 2012. Diagnostic criteria for human cysticercosis, revisited. Pathogens and global health. 106:299-304.
- 4) Rodríguez S.; Wilkins P. & Dorny P. 2012. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. Pathogens and global health. 106:286-298.
- 5) Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2007. Aspectos relevantes del binomio Teniasis/Cisticercosis. Vigilancia Epidemiológica. 41(24):1-5.
- 6) Sciutto E. y cols. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. Parasitology Research. 77:243-246.
- 7) Fragoso G.; Meneses G.; Sciutto E. & Larralde C. 2008. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. Journal of Parasitology. 94(2):551-553.
- 8) Meneses G. y cols. 2009. *Taenia crassiceps* cysticercosis: Variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in Balb/c substrains. Experimental Parasitology. 123:362-368.
- 9) Toledo A. y cols. 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. Infection and Immunity. 69(3):1766-1773.
- 10) García E.; Ordoñez G. & Sotelo J. 1995. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay and Western Blot (Immunoblot) for diagnosis in neurocysticercosis. Journal of Clinical Microbiology. 33(12):3324-3325.
- 11) Toenjes S. A.; Spolski R. J.; Mooney K. A. & Kuhn R. E. 1999. The systemic immune response of Balb/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. Parasitology. 118:623-633.
- 12) Terrazas L. I.; Bojalil R.; Govezensky T. & Larralde C. 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). Journal of Parasitology. 84(1):74-81.
- 13) Terrazas L.I. y cols. 2010. Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance in vivo. International Journal of Parasitology. 40:731-742.
- 14) Zepeda N. y cols. 2010. Decrease of peritoneal inflammatory CD4+, CD8+, CD19+ lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. Parasitology Res. 107:1129-1135.
- 15) Maizels R. M. & McSorley H. J. 2016. Regulation of the host immune system by helminth parasites. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 138(3):666-671.
- 16) Mantovani A. y cols. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. TRENDS I Immunology. 25(12):677-686.

- 17) Mooser D. 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 73:209-212.
- 18) Mooser D. & Edwards J. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 8:958-969.
- 19) Duque Correa M. & Rojas López M. 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. 26(2):73-86.
- 20) Wurster A. L.; Tanaka T. & Grusby M.J. 2000. The biology of STAT-4 and STAT-6. *Oncogene*. 19:2577-2584.
- 21) Lang R. y cols. 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *The Journal of Immunology*. 169:2253-2263.
- 22) Duluc D. y cols. 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood Journal*. 110(13):4319-4330.
- 23) Ginberg S.; Hasko G.; Wu D. & Leibovich S. J. 2009. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A (2A) receptor-mediated switch of macrophages from and inflammatory to an angiogenic phenotype. *The American Journal of Pathology*. 175:2439-2453.
- 24) Ferrante C. J. et al. 2013. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation*. 36:921-931.
- 25) Marshall E. S.; Elshekha H. M.; Hakimi M. & Flynn R. J. 2011. *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin promotes altered macrophage function; caspase-1-dependent IL1 $\beta$  secretion enhances parasite replication. *Veterinary research*. 42(80).
- 26) Donnelly S. y cols. 2008. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB Journal*. 22:4022-4032.
- 27) Donnelly S. y cols. 2005. Thioredoxin Peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*. 73(1):166-173.
- 28) Zdravkovic y cols. 2002. Immune response in infections caused by Helminths. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 30(3): 117-122.
- 29) El Hadri, Mahmood y cols. 2012. Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 32:1145-1452.
- 30) Chiumiento & Bruschi. 2009. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. *Parasitology Research*. 105:593-603.
- 31) Collet & Messens. 2010. Structure, function and mechanism of Thioredoxin proteins. *Antioxidant and redox signaling*. 13(8):1205-1216.
- 32) Sherratt & Hayes. 2002. Enzymes systems that metabolise drugs and others xenobiotics. Cap 9, 319-352.

- 33) Jiménez L.; Rodríguez-Lima O.; Ochoa-Sánchez A & Landa A. 2014. Characterization of a Thioredoxin-1 gene from *Taenia solium* and its encoding product. *BioMed Research International*. 2015:1-10.
- 34) Billiet L. y cols. 2005. Extracellular human Thioredoxin-1 inhibits lipopolysaccharide induced interleukin-1 $\beta$  expression in human monocyte derived macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 280(48):40310-40318.
- 35) Davies J. Q. & Gordon S. 2005. "Isolation and culture of murine macrophages" in *Methods in Molecular Biology*, vol. 290: Basic Cell Culture Protocols. Third edition, Humana Press (Totowa NJ), 91-103.
- 36) Satoskar A.R. y cols. 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and Immunity*. 70(7):3656-3664.
- 37) Reece J. y cols. 2006. Innate Immune Response to Lung-Stage Helminth Infection Induce Alternatively Activated Alveolar Macrophages. *Infection And Immunity*. 74(9):4970-4981.
- 38) Couper K. N.; Blount D.G. & Riley E. M. 2008. IL-10: The master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 180:5771-5777.
- 39) Maizels R. M. & McSorley H. J. 2016. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 138(3):666-675.
- 40) Saraiva M. & O'Garra A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 10:170-181.
- 41) Doetze A. y cols. 2000. Antigen specific cellular hyporesponsiveness in chronic human helminth infection is mediated by Th3 Tr1 type cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  but not by a Th1 to Th2 shift. *International Immunology*. 12(5): 623-630.
- 42) Arce-Sillas A. y cols. 2015. Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. *Clinical and experimental immunology*. 183:271-279.