



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la 2-Cys Peroxirredoxina típica recombinante de *Taenia solium* (Ts2-CysPrx) sobre macrófagos murinos J7741.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Daniel Morales Palacios

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Abraham Landa Piedra
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Ortega Soto
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis hermanos.

Deseo que mis esfuerzos los inspire a cumplir sus sueños.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Quiero agradecer al Dr. Abraham Landa Piedra, gracias por darme un espacio en su laboratorio, por brindarme su confianza y por creer en mi trabajo; a la Dra. Lucía Jiménez por siempre estar dispuesta a ayudarme, gracias por su paciencia y buena voluntad; a la M.C Alicia Ochoa, por estar siempre al pendiente de mí; y a la Dra. Vega Vera, gracias por darme perspectiva, tus consejos hicieron la diferencia en mucho de mis experimentos, espero la vida te devuelva todas las cosas buenas que hiciste por mí.

Gracias a mi Universidad, la UNAM, por ampliar mi panorama y brindarme las herramientas para salir adelante. Por regalarme tan bellas amistades y compañeros increíbles. Eres el proyecto educativo más grande de México y siempre te estaré agradecido.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradecer es el reflejo instintivo de alguien que se ha dado cuenta de lo que tiene.

Agradezco a mi madre, Claudia Palacios Valerio, por la paciencia y el apoyo que mostros estos últimos meses; por escuchar mis frustraciones y hacer hasta lo imposible por entenderme. Sin este último empujón esta tesis no existiría.

A mi padre, Sergio Mondragón Fabián, por seguir creyendo en mí y darme siempre un voto de confianza. Sin tu guía y apoyo este logro hubiera sido imposible.

A mi hermano, Brandon Antonio Morales Palacios, que a pesar de librar batallas que nadie más conoce siempre trata de escuchar mis consejos y mostrarme confianza.

A mi hermano, Sergio Alexis Mondragón Palacios, por tratarme sin prejuicios e inspirar en mi la curiosidad que solo un niño tiene.

A mi abuelita, Victoria Valerio Rosas, por ser mi ejemplo inmediato de amor y por convertirse en un pilar fundamental de esta familia. Que dios le da muchos años más de vida.

A mis Amigas Paulina y Celeste. Gracias por ser mi alivio en muchas situaciones complicadas, por crecer a mi lado y compartir conmigo esta experiencia de ser adulto joven. Que la vida nos regale más tiempo juntos.

A mis amigos Lalo y Arturo .Gracias por quedarse conmigo tanto tiempo, por mostrarme la vida a través de sus ojos y por siempre tratarme como su hermano pequeño. Que la vida los llene de oportunidades, se las merecen.

A Patricia Pantoja, gracias por confiar en mí, por tenerme en tan buen concepto y siempre considerarme como uno de tus amigos más cercanos; por aprender junto conmigo a sacar lo mejor de los tiempos difíciles.

A mis compañeros de carrera Adrián, Xavier, Alejandra, Anabel, Dulce y Yareli, por convertirse en parte de mi formación como Biólogo, con ustedes aprendí la camarería y el trabajo en equipo, mis mejores deseos.

A todos mis alumnos, gracias por permitirme compartirles algo de mi amor a la ciencia, espero puedan, al igual que yo, encontrar en ella una motivación para salir adelante.

A mi psicóloga Mitzi Sánchez, por todo el apoyo que me brindo y por la empatía que me mostró en todo este proceso.

Una mención especial para José Juan Basurto Godoy, gracias por estar pendiente de mi proceso creativo, por escucharme y por haber llegado a mi vida.

A todos mis profesores, gracias por inculcarme la pasión por estudiar, sus enseñanzas las llevaré siempre conmigo.

Gracias al universo y a la causalidad, por ponerme en el momento y en el lugar adecuado para conocer a todas estas personas maravillosas.

Gracias a la vida, mi mayor fuente de inspiración, por darme un motivo de ser y una fuente de trabajo que amo y disfruto.

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología molecular de *Taenia solium*, departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina-UNAM, bajo la tutela del Dr. Abraham Landa Piedra.

Este proyecto fue financiado por el donativo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (Proyecto CONACYTPN-594. Producción de inhibidores enzimáticos contra tres enzimas esenciales de *Taenia solium*) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-PAPIIT IN217419."Producción de inhibidores enzimáticos contra cuatro enzimas esenciales de *Taenia solium*").

ABREVIATURAS

AAM	Macrófagos Alternativamente Activados
ARG 1	Arginasa 1
<i>Arg1</i>	Gen murino que codifica a ARG 1
BCR	Receptor de linfocito B
BSA	Albumina de Suero Bovino
CAM	Macrófagos Clásicamente Activados
CCL5	Receptor de Quimiocina C-C del tipo 5
CD	Cúmulo de Diferenciación
CD23	Receptor de Inmunoglobulina E
<i>Chil3</i>	Gen murino que codifica a YM1
Cox 2	Ciclooxigenasa 2
CP	Cisteína Peroxidática
CR	Cisteína de Resolución
Cys	Cisteína
DAB	3,3-Diaminobencidina
DAMP	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DC	Célula Dendrítica
EFG	Factor de Crecimiento Endotelial
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas
FIZZ 1	Proteína similar a resistina alfa
Gapdh	Gen que codifica a la Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

HO·	Radicales Hidroxilo
HRP	Peroxidasa de Rábano
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IL-4R α	Receptor de IL-4
iNOS	Óxido Nítrico Sintetasa Inducible
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
IRF	Factor Regulatorio de Interferón
LB	Medio Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MBDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MPO	Mieloperoxidasas eosinófilo peroxidasa
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida
NF- κ B	Factor nuclear κ B
MAPKs	Protein-cinasas activadas por mitógenos
NK	Células Asesinas Naturales
NKT	Células T Asesinas Naturales
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetasa
Nos 2	Gen murino que codifica a iNOS
NOX	Oxidasa de NADPH
ONOO ⁻	Peroxinitrito

PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDL-1	Ligando de Muerte Programada 1
PDL-2	Ligando de Muerte Programada 1
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patrones
Prx	Peroxirredoxina
PTEN	Gen supresor de tumor fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
<i>Retnla</i>	Gen murino que codifica a FIZZ 1
RM	Receptor de Manosa
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-PCR	Transcriptasa reversa acoplada a la PCR
SFB	Suero Fetal Bovino
SH	Grupo tiol
SO ₂ H	Ácido Sulfónico
SOD	Superóxido Dismutasa
SRX	Sulfiredoxina
STAT	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción
TCR	Receptor de linfocito T
TH	Célula T cooperadora
TIR	Receptor de Interleucina 1
TLR	Receptor Tipo <i>Toll</i>

TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Tpx	Tiorredoxina Peroxidasa
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Reductasa
Ts2-CysPrx	2-Cys Peroxirredoxina típica recombinante de <i>Taenia solium</i>
Tyr	Tirosina
YM1	Proteína similar a quitinasa-3

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	12
I. INTRODUCCIÓN	13
2.1 TAENIA CRASSICEPS COMO MODELO EXPERIMENTAL DE CISTICERCOSIS.....	13
2.2 RESPUESTA INMUNE EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON TAENIA CRASSICEPS.	13
2.3 ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS.....	15
2.4.1 Macrófagos M1	15
2.4.2 Macrófagos M2	16
2.4 CARACTERIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN ETAPAS TARDÍAS DE INFECCIÓN POR TAENIA CRASSICEPS.....	18
2.5 ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS POR ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE TAENIA CRASSICEPS.....	18
2.6 ENZIMAS DESINTOXICANTES Y DEFENSA DEL PARÁSITO	19
2.7 PEROXIRREDOXINAS	19
2.8 2-CysPRX.....	20
2.9 2-CYS PEROXIRREDOXINA DE TAENIA SOLIUM.....	21
III. ANTECEDENTES	23
IV. HIPOTESIS	25
V. OBJETIVOS	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VII. RESULTADOS	33
VIII. DISCUSIÓN	45
IX. CONCLUSIONES	50
LITERATURA CITADA	51

I. RESUMEN

En la literatura se han descrito diversos tipos de macrófagos activados, basados en la expresión de marcadores de superficie, producción de factores específicos y actividad biológica. Las dos principales subpoblaciones incluyen a los macrófagos clásicamente activados (M1) y alternativamente activados (M2). Los primeros llevan a cabo funciones de eliminación-ataque y promueven el desarrollo de una respuesta TH1; mientras que los segundos inducen la reparación del tejido y estimulan una respuesta TH2.

Existe evidencia que sugiere que los productos de secreción-excreción de helmintos modulan la respuesta inmune del hospedero a través de la diferenciación de macrófagos. No obstante, se desconoce que moléculas participan en este fenómeno.

En el presente estudio se estimularon macrófagos de la línea celular J774.1 con diferentes concentraciones de la 2-CysPrx recombinante de *Taenia solium* (Ts2-CysPrx), y mediante RT-PCR y ELISA se determinó la expresión y producción de marcadores de activación M1/M2.

Nuestros resultados demuestran que la estimulación con la Ts2-CysPrx tiene un efecto, dosis dependiente, en la expresión de los genes M1:Nos2, Ptgs2 y Cd274 y en la producción de la citocina proinflamatoria IL-12. Características que podrían dirigir a un establecimiento de una respuesta TH1-protectora.

I. INTRODUCCIÓN

2.1 *Taenia crassiceps* como modelo experimental de cisticercosis

Taenia crassiceps es un cestodo cuyo ciclo de vida se desarrolla en 2 hospederos; cánidos, como hospederos definitivos, y roedores, como hospederos intermediarios (Willms et al., 2009).

Su ciclo de vida guarda similitudes con el de *Taenia solium*, con la remarcable diferencia que el cisticerco de *Taenia crassiceps* puede reproducirse asexualmente por gemación. Esta característica ha sido ventajosa para su propagación en el laboratorio; permitiendo mantener la cepa a través de infectar continuamente, vía intraperitoneal, ratones susceptibles BALB/c (Willms et al., 2009).

Adicionalmente, se ha observado que ambos cestodos comparten semejanzas antigénicas. En la literatura se reporta que el suero de pacientes con neurocisticercosis es capaz de reconocer antígenos de *Taenia crassiceps* y viceversa (Willms et al., 2009).

Estas características han convertido a *Taenia crassiceps* en un modelo experimental útil para el estudio de la cisticercosis.

2.2 Respuesta inmune en ratones BALB/c infectados con *Taenia crassiceps*

Terrazas y col. describieron la respuesta inmune de ratones BALB/c infectados por cisticercos de *Taenia crassiceps*. Reportaron que en etapas tempranas de la infección (1 y 2 semanas post infección) se desarrolla una respuesta tipo TH1; caracterizada por la aparición de macrófagos M1, el aumento en los niveles de la citocina proinflamatoria interferón gamma (IFN- γ), la producción dominante de anticuerpos IgG2a, el aumento en la proliferación de esplenocitos y la disminución en la carga parasitaria (Fig.1) (Terrazas et al., 1998; Terrazas et al., 1999).

En contraste, en etapas tardías de la infección (a partir de la cuarta semana post infección), se reportó un cambio hacia un perfil TH2; caracterizado por la presencia de macrófagos M2, una disminución en las citocinas proinflamatorias IL-2 e IFN- γ ,

el decaimiento de la respuesta proliferativa antígeno específica de esplenocitos, un incremento de las citocinas antiinflamatorias IL-4, IL-6 e IL-10; así como el aumento de las cargas parasitarias (Fig.1) (Terrazas et al., 1998; Terrazas et al., 1999).

Aunado a esto, en un estudio posterior, se encontró que la administración temprana de anticuerpos anti-IL10, así como la suministración de IFN- γ e IL-2 recombinantes, promueve una respuesta TH1 que resulta en una disminución drástica de las cargas parasitarias (Terrazas et al., 1999).

Con todas estas evidencias, se propuso que la respuesta tipo TH1 es efectiva inhibiendo la reproducción del parásito, mientras que la respuesta tipo TH2 facilita el establecimiento y reproducción del cisticerco (Terrazas et al. 1998; Terrazas et al. 1999; Rodriguez-Sosa et al. 2002b).

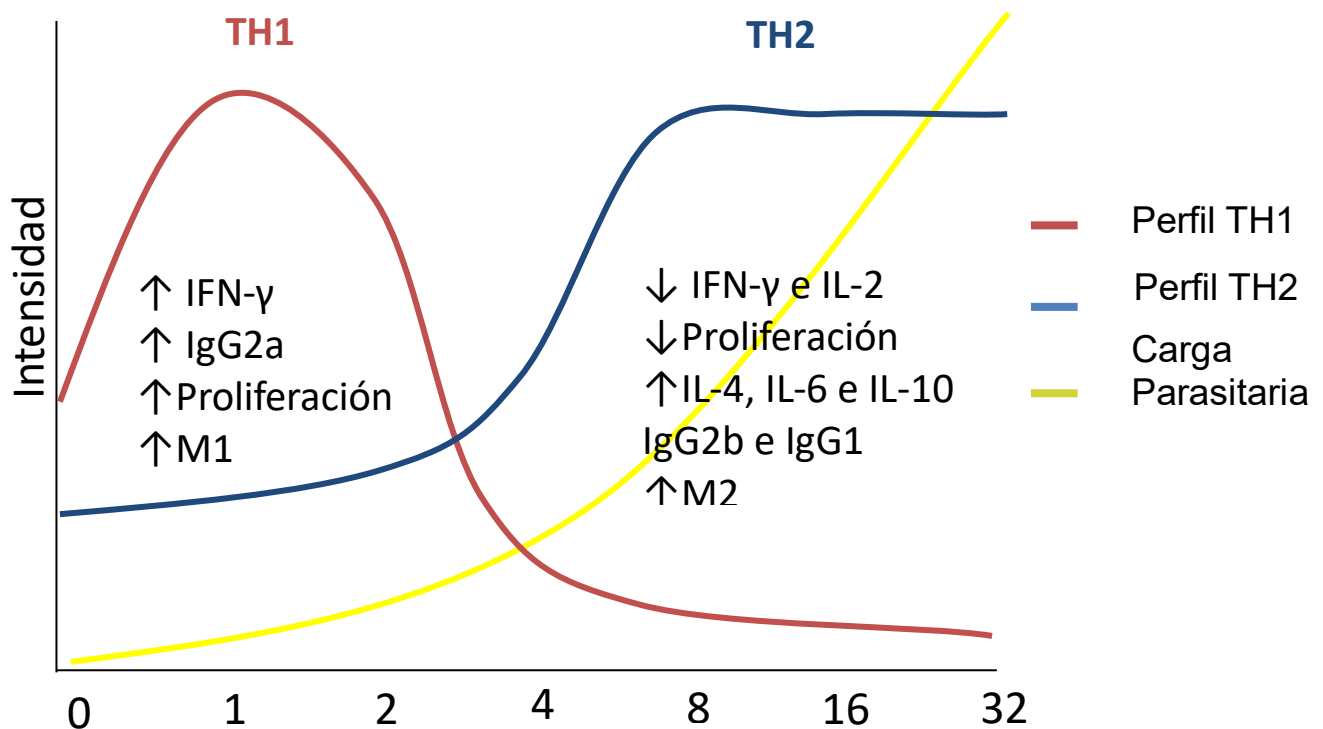


Figura 1. Respuesta inmune en ratones BALB/c infectados con *Taenia crassiceps*. En las primeras semanas de infección se presenta un tipo de respuesta predominantemente TH1 que correlaciona con bajas cargas parasitarias. Conforme avanza la infección (a partir de la cuarta semana) se presenta un cambio de respuesta hacia un perfil TH2 que resulta en un aumento en las cargas parasitarias. (Modificado de Reyes et al. 2009).

2.3 Activación de Macrófagos

Los macrófagos son células fagocíticas del sistema inmune que cumplen funciones antimicrobiales, inmunoregulatorias y de remodelamiento de tejido (Donnelly et al., 2005; Gordon et al., 2010; Rath et al., 2014). Presentan una remarcable plasticidad que les permite modificar su fenotipo cuando reconocen estímulos del microambiente; como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), citocinas o quimiocinas. A este fenómeno se le denomina activación o polarización (Murray et al., 2014).

La activación de un macrófago promueve la fagocitosis e induce su migración hacia los órganos linfoides secundarios; es ahí donde los macrófagos presentarán, a través de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) II, los péptidos antigénicos a los linfocitos T CD4+ naives. Además, de secretar un perfil de citocinas que orquestará la diferenciación de los linfocitos T en linfocitos T cooperadores TH1, TH2, TH17, TH23 o Treg. De tal manera que, la activación de un macrófago juega un rol central en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa posterior.

En la literatura se han descrito diversos tipos de macrófagos activados, tanto en humanos como en ratones; basados en la expresión de marcadores de superficie, producción de factores específicos y actividad biológica. Las dos principales subpoblaciones incluyen a los macrófagos clásicamente activados (M1) y alternativamente activados (M2). Los primeros llevan a cabo funciones de eliminación-ataque y promueven el desarrollo de una respuesta TH1; mientras que los segundos inducen la reparación del tejido y estimulan una respuesta TH2 (Rath et al., 2014).

2.3.1 Macrófagos M1

Los macrófagos M1, también conocidos como clásicamente activados (CAM), metabolizan al aminoácido arginina vía óxido nítrico sintetasa (NOS) para producir

óxido nítrico (NO) y citrulina. Este fenotipo de activación está relacionado con enfermedades autoinmunes y procesos antitumorales (Gordon et al., 2014).

El NO es el compuesto efector inflamatorio y antimicrobiano más importante conocido en macrófagos, reacciona en presencia de radicales libres nitrosilando proteínas y alterando su estructura y función (Gordon et al., 2014; Rath et al. 2014).

Una amplia variedad de citocinas proinflamatorias; como Interleucina 1 β (IL-1 β), Interferón γ (INF- γ) o Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y productos bacterianos como el Lipopolisacárido (LPS), promueven la transcripción de la NOS Inducible (iNOS), mientras que citocinas antiinflamatorias (como IL-4, IL-10 o TGF- β) suprimen su transcripción (Gordon et al., 2014; Rath et al., 2014) (Fig.2).

2.3.2 Macrófagos M2

Los macrófagos M2, o alternativamente activados (AAM), expresan la enzima Arginasa I (ARG-1) encargada de dirigir la ruta alternativa del metabolismo de la Arginina. Este cambio metabólico se ha descrito en macrófagos murinos estimulados *in vitro* con IL-4 e IL-13 (Stein et al., 1992, Doley et al., 1994) e *in vivo* con parásitos como *Trypanosoma brucei* y *Brugia malayi* (Loke et al., 2002; Mantovani et al., 2004; Raes et al., 2002).

La ruta de activación M2 está asociada con la angiogénesis, reacciones de hipersensibilidad, alergia y con la expulsión de nematodos intestinales (Gordon et al., 2010).

Para su estudio, el fenotipo M2 se ha clasificado en tres subdivisiones: los macrófagos M2a, inducidos por IL-4 e IL-13; los macrófagos M2b, inducidos por la exposición a inmunocomplejos agonistas de receptores Tipo Toll (TLR); y los macrófagos M2c, inducidos por IL-10 y glucocorticoides hormonales. Los macrófagos M2a y M2b dirigen el desarrollo de la respuesta TH2; en tanto, los macrófagos M2c contrarrestan los mecanismos efectores celulares de la respuesta inmune inflamatoria, desplegando funciones inhibitorias y regulatorias (Mantovani et al., 2004; Rath et al., 2014; Gordon et al., 2010) (Fig.2).

En la literatura se han descrito marcadores de activación M2. El mejor caracterizado es *Arg1* (Jenkins et al., 2010; Loke et. al., 2002; Donnelly et al., 2008; Gordon et al., 2010).

De igual manera se han descrito otros marcadores M2 como *Retnla* y *Chil3*. *Chil3* es el gen que codifica a la proteína similar a quitinasa-3 (YM1), enzima perteneciente a la familia de las quilectinas quitinasas; mientras que *Retnla* es el gen que codifica para la proteína similar a resistina alfa (FIZZ1), una proteína secretada por macrófagos en alergia y asma (Loke et. al., 2002; Raes et al., 2002, Gordon et al., 2010).

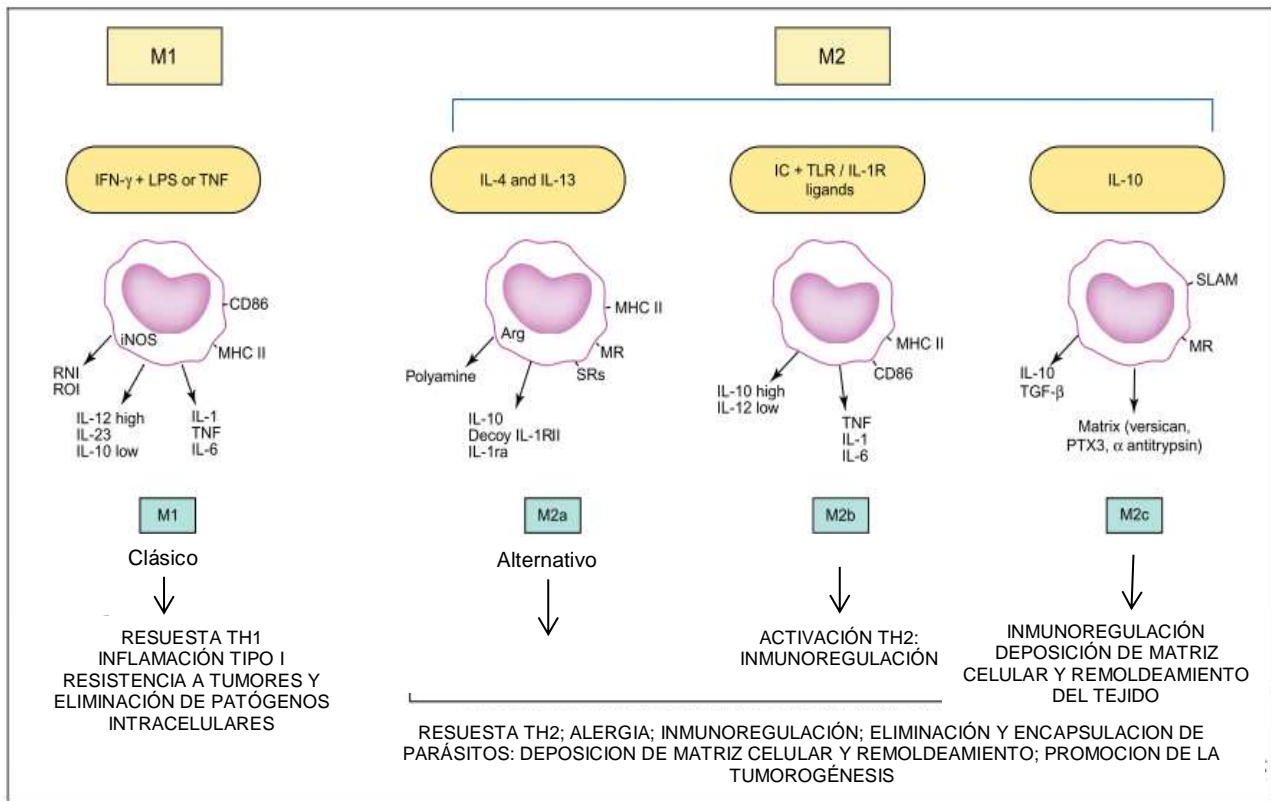


Figura 2. Modelo de activación M1/M2. Los macrófagos desarrollan un fenotipo de activación en respuesta a estímulos del ambiente. Los macrófagos expuestos a IFN-γ y LPS o TNF desarrollan un fenotipo M1 con características citotóxicas y antitumorales. El fenotipo M2 presenta características regulatorias y protumorales, se subdivide en M2a (inducido por estimulación con IL-4/IL-13), M2b (generado de la interacción con inmunocomplejos y antagonistas de TLRs), y M2c (inducidos por IL-10 y glucocorticoides) (Modificado de Mantovani et al., 2004).

2.4 Caracterización de Macrófagos en etapas tardías de infección por *Taenia crassiceps*

Se ha descrito ampliamente, el fenotipo de activación de macrófagos peritoneales provenientes de etapas crónicas de infección por cisticercos de *Taenia crassiceps*. Estos macrófagos presentan un fenotipo M2 caracterizado por un aumento en la expresión de los marcadores Arg-1, Chil-3, Relm- α , CD23, receptor de quimiocina C-C del tipo 5 (CCR5), prostaglandina E₂ (PGE₂), IL-10, receptor de IL-4 (IL-4R α), receptor de Manosa (MR), PD-L1 y PD-L2. Aunado a esto, su capacidad para inducir la proliferación de linfocitos T CD4+ se ve severamente comprometida (Reyes et al., 2009; Reyes et al., 2011; Rodríguez-Sosa et al., 2002a; Rodríguez-Sosa et al., 2002b; Terrazas et al., 2005).

Actualmente, se propone que estos macrófagos M2 están involucrados en el establecimiento de la respuesta TH2 permisiva. Un estudio llevado a cabo por Reyes y su equipo demostró que la remoción temprana o total de estos macrófagos M2 aumentaba significativamente la respuesta proliferativa antígeno-específica de los esplenocitos, además de reducir, en un 90%, las cargas parasitarias (Reyes et al., 2009).

2.5 Activación de macrófagos por antígenos de excreción-secreción de *Taenia crassiceps*

En la literatura hay evidencias que señalan que los productos de excreción-secreción de *Taenia crassiceps* pueden inducir el desarrollo de macrófagos M2. Espinoza-Jiménez reportó que ratones tratados continuamente con productos de excreción-secreción de *Taenia crassiceps*, presentan un incremento en el número de macrófagos que expresan marcadores de activación alternativa como el MR, IL-4R α , IL-4, PDL-1, y PDL-2, (Espinoza-Jiménez et al., 2017).

Aunque actualmente se desconoce las moléculas involucradas que promueven la inducción de este fenotipo en macrófagos, se propone que tiene que ver con el bloqueo de la fosforilación del factor transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1), el cual transcribe genes relacionados con la respuesta TH1 (Becerra-Díaz et al., 2014).

2.6 Enzimas desintoxicantes y defensa del parásito

Uno de los mayores retos que enfrentan los parásitos dentro del hospedero es el daño oxidante. Células del sistema inmune, como macrófagos M1, generan especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS); estas moléculas atacan los componentes celulares produciendo hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos, moléculas altamente nocivas para el parásito (Callahan et al., 1988; Sies, 1993).

Varios reportes han mostrado que el establecimiento exitoso de parásitos helmintos está relacionado con su habilidad para evadir la respuesta inmune y defensa antioxidante (Sies, 1993; Vaca-Paniagua et al., 2008). Actualmente, se sabe que los céstodos de la familia Taeniidae poseen un sistema antioxidante compuesto de una Superóxido dismutasa Cu/Zn, 3 clases de glutatión transferasas, un sistema de Tiorredoxina-Glutatión Reductasa y una 2-Cys peroxirredoxina típica (Vaca-Paniagua et al., 2008, Rendon et al., 2004).

2.7 Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Prxs) son una familia de enzimas ubicuas cuya función es la reducción de hidroperóxidos (H_2O_2), óxidos nítricos (NO), y peroxinitritos (ONOO⁻). Poseen un plegamiento tipo tiorredoxina que consiste en 8 láminas β -plegadas rodeadas de 4 α -hélices, y un sitio catalítico conformado por 2 cisteínas, Cys⁴⁷ y Cys¹⁷⁰ (Lee et al., 2001; Rhee et al., 2011).

Las Prxs han sido clasificadas de acuerdo a si poseen 1 o 2 cisteínas en su sitio catalítico, 1-CysPrxs y 2-CysPrxs respectivamente. Adicionalmente, las 2-CysPrxs se subdividen en típica y atípica. La 2-CysPrx típica, en su forma oxidada, forma enlaces disulfuro intermoleculares, lo que le da una conformación dimérica. Por otro lado, la 2-CysPrx atípica, en su forma oxidada, forma enlaces intramoleculares lo que le permite permanecer como monómero (Rhee et al., 2005).

2.8 2-CysPrx

2.8.1 Importancia Biológica

La 2-CysPrx puede ser inactivada por fosforilación, en el residuo Tyr¹⁹⁴, por tirosinas quinasas de la familia Src. Este fenómeno sucede en células estimuladas; vía receptores de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial (EFG), o receptores inmunes, como el receptor de linfocito T o B (TCR y BCR).

En la literatura se reporta que la fosforilación selectiva de la 2-CysPrx permite la acumulación de un gradiente de H₂O₂, vía Oxidasa de NADPH (NOX), lo que propicia la alteración en la función de otras enzimas por oxidación. Este cambio en el estado REDOX permite la inhibición o activación de diferentes rutas metabólicas (Fig. 3). Por lo que, en este contexto, la 2-CysPrx actúa como un regulador importante del metabolismo celular (Woo et al., 2010).

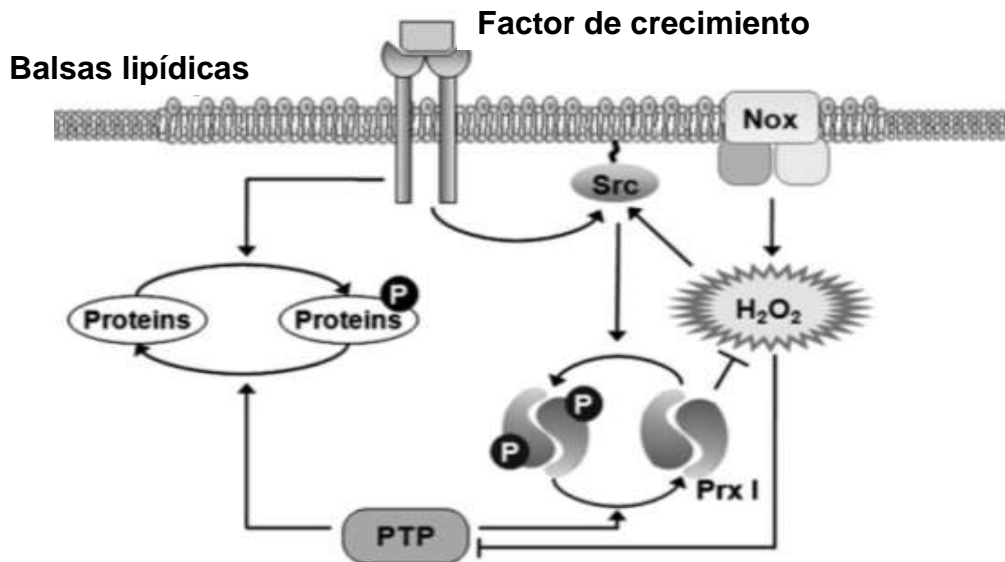


Figura 3. Mecanismo de inactivación por fosforilación de la 2-CysPrx para la señalización por H₂O₂. La unión de un factor de crecimiento con su receptor permite la generación de H₂O₂ por acción de la NOX, al mismo tiempo esta primera señal fosforila a las cinasas de la familia Src que inactivan a la Prx permitiendo la acumulación de H₂O₂ dentro del citoplasma con fines de señalización celular (Rhee et al., 2011).

Otra función importante de la 2-CysPrx, es su habilidad para unirse a otras proteínas sin perder su actividad de peroxidasa, tal es el caso de su actividad en el gen supresor de tumor fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) (Rhee et al., 2011).

2.9 2-Cys peroxirredoxina de *Taenia solium*

Los helmintos presentan una 2-CysPrx típica. Esta enzima se ha clonado y caracterizado en protozoos, como *Plasmodium falciparum* (Kawasu et al., 2001) y *Trypanosoma brucei* (Tanja, 2007); en metazoos trematodos, como: *Fasciola hepática* (Salazar-Calderón, 2000), *Schistosoma mansoni* y *Schistosoma japonicum* (Kumagai et al., 2006; Sayed et al., 2004); y en cestodos, como *Echinococcus granulosus* (Salinas et al., 1998), *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* (Molina et al., 2006; Vaca-Paniagua et al., 2009).

La 2-CysPrx típica de *Taenia solium* (Ts2-CysPrx) es transcrita por un solo gen de 598 pb que codifica a una proteína de 197 aminoácidos con un peso molecular de 21,836 Da y un punto isoelectrico de 6.21. Posee 2 sitios catalíticos, el primero (⁴⁹FVCP⁵²) con la cisteína peroxidática (CP) en la posición 51, y el segundo (¹⁷¹VCPA¹⁷⁴) con la cisteína de resolución (CR) en el residuo 172, (Molina-López et al., 2006; Vaca-Paniagua et al., 2009); cabe resaltar, que esta enzima guarda un 96% de identidad con la 2-CysPrx de *Taenia crassiceps*. Presenta 3 sitios potenciales para la fosforilación por proteínas cinasas PAPGF¹⁶TCKALV, AWNNV⁹⁰SRKEGG y DAFQF¹⁶⁴TDKHGE; adicionalmente, presenta los motivos ⁹⁴GGVQ⁹⁷ y ¹⁹³FM¹⁹⁴ en lugar de los conservados GGLG y YF, lo que le proporciona resistencia a la hiperoxidación (Molina-López et al., 2006; Vaca-Paniagua et al., 2009).

Debido a que los parásitos pertenecientes al filo Platyhelminthes, como *Taenia solium*, carecen de catalasa, y a que la actividad de su glutatión peroxidasa es baja, se ha planteado que la 2-CysPrx es la fuente principal para la desintoxicación de hidroperóxidos en estos parásitos (Vaca-Paniagua et al., 2009).

Ensayos de inmunofluorescencia mostraron que la Ts2-CysPrx es sintetizada en el tegumento del parásito, por las células subtegumentales del cisticerco, y de ahí es distribuida a la pared vesicular del parásito (Molina-López et al., 2006). La localización de la enzima en el tegumento del cisticerco de *Taenia solium* y su expresión en diferentes etapas del ciclo de vida, sugiere su participación protegiendo al parásito de la respuesta inmune del hospedero (Molina-López et al., 2006).

2 ANTECEDENTES

Se ha demostrado que las enzimas pertenecientes al sistema antioxidante de diversos organismos, en su mayoría helmintos y nematodos, tienen la habilidad de inducir la activación de macrófagos murinos.

Vega-Ángeles y colaboradores reportaron que macrófagos peritoneales estimulados por 24 h con la Glutación transferasa de *Taenia solium* aumentaron la transcripción del marcador de activación clásica *Nos2* y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86; además de acentuar la producción de las citocinas proinflamatorias IL-12 y TNF. Finalmente, cuando estos macrófagos fueron cocultivados con linfocitos T CD4+, estos aumentaron significativamente su proliferación además de su producción de IFN- γ (Vega-Angeles et al., 2019).

Donnelly y colegas demostraron que la administración de la Tiorredoxina Peroxidasa (Tpx) recombinante de *Fasciola hepatica*, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, inducía un aumento en la expresión del gen *Arg-1* así como la producción de IL-10 y prostaglandina E2 en macrófagos peritoneales murinos. Características correspondientes a un fenotipo M2 (Donnelly et al., 2005).

La 2-CysPrx, en cambio, ha despertado controversia; debido a que su efecto polarizando macrófagos y células dendríticas, parece diferir entre organismos. Por ejemplo; la inyección intraperitoneal de 20 μ g de la 2-CysPrx de *Fasciola hepática* o *Schistosoma mansoni* induce el reclutamiento de macrófagos que expresan el marcador M2 *Chil3*; este fenómeno se observó incluso en macrófagos murinos IL-4^{-/-} e IL-13^{-/-}, lo que confirma que el efecto es independiente de la señalización de ambas citocinas (Donnelly et al., 2008).

En contraste, células dendríticas murinas derivadas de médula ósea (MBDC) incubadas con Prx5, una 2-CysPrx típica de mamíferos, aumentaron, de manera dosis dependiente, la expresión del marcador M1 *Il-23p*. Por otro lado, cuando se estimularon MBDC TLR4^{-/-} y TLR2^{-/-}, estas no presentaron el transcrito de *Il-23p*.

Estos resultados sugieren que la expresión de dicho marcador fue inducido de manera TLR dependiente (Shichita et al., 2012).

3 HIPOTESIS

La 2-CysPrx típica de *Taenia solium* (Ts2-CysPrx), al ser una proteína que puede ser reconocida por receptores de la inmunidad innata, modifica el estado de activación de macrófagos murinos J774.1.

4 OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar si la 2-Cys Peroxirredoxina típica recombinante de *Taenia solium* (Ts2-CysPrx) modifica la expresión de genes marcadores M1 y M2 en macrófagos murinos J774.1.

Objetivos Particulares

Expresión y purificación de la Ts2-CysPrx mediante columnas de afinidad a Ni²⁺.

Eliminación y cuantificación del LPS bacteriano en la Ts2-CysPrx purificada.

Determinar las concentraciones IFN- γ y/o LPS e IL-4 necesarias para la obtención de macrófagos J774.1 activados M1 y M2.

Determinar los cambios en la expresión de genes marcadores de activación en macrófagos naive estimulados con la Ts2-CysPrx, mediante PCR.

Determinar los cambios en la producción de citocinas de macrófagos naive estimulados con la Ts2-CysPrx, mediante ELISA.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Línea Celular

Se utilizaron macrófagos de la línea celular J774.1 (ATCC® TIB-67™). Estos macrófagos son adherentes y provienen de ratones BALB/c hembra con sarcoma de células reticuladas.

Establecimiento del Cultivo

Se descongeló un vial, con aproximadamente 1×10^6 células, a una temperatura de 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas en 10 mL medio DMEM (Gibco) tibio y centrifugadas a 1200 g por 5 min. Una vez centrifugado, se resuspendió el pellet en 5 mL de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 100 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco) y se incubó, en botellas de plásticos de 25cm², a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, hasta alcanzar una confluencia del 90%.

Subcultivos

Los macrófagos adheridos a la botella fueron tratados con 1 mL de tripsina 0.05% a 37°C por 5 minutos; a continuación, las células fueron despegadas mediante pipeteo y la tripsina fue inactivada con 5 mL de medio DMEM completo. El medio fue centrifugado a 1200 g por 5 min y el pellet fue resuspendido en 3 mL de medio. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y se realizó la determinación de viabilidad por tinción con azul tripano. Finalmente, se sembraron 1×10^6 células por pozo, en una placa de 24 pozos (Costar, Corning Inc.), y se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, por 24 h.

Determinación de los estímulos para la obtención de macrófagos M1 y M2

Los macrófagos J774.1 fueron cultivados en 5 tratamientos; sin estimular (C); 100 ng de IFN- γ [M(IFN- γ)] o 100 ng de IFN- γ y 30 ng de LPS [M(IFN- γ /LPS)], para macrófagos M1 (Geng et al., 2017); y 20 ng [M(IL-4)1], o 100 ng de IL-4 [M(IL-4)2], para macrófagos M2 (Lin et al., 2017).

Dichas concentraciones fueron incorporadas a 2 mL de medio DMEM completo, por pozo, y se utilizaron para estimular a los macrófagos por 20 h.

El sobrenadante fue recuperado para la cuantificación de citocinas, y las células fueron lisadas en 700 μ L TRIzol (Invitrogen) para la posterior purificación de RNA total. El sobrenadante y el TRIzol fueron almacenados a -20°C y -75°C respectivamente, hasta su posterior uso.

Purificación de la Ts2-CysPrx recombinante

Se utilizaron células de *Escherichia coli* transformadas con el vector de expresión pRSET-Ts2-CysPrx; este vector contenía el ADN complementario que codifica a la Ts2-CysPrx fusionada a una cola de 6 histinas en su amino terminal (Molina-López et al., 2006).

Las bacterias fueron crecidas a 37°C , en 500 mL de medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600nm. En ese momento, se indujo la expresión de la proteína adicionando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM e incubando en agitación por 4 h a 37°C . Transcurrido el tiempo, el medio fue centrifugado a 10,500 g por 30 min y el precipitado de bacterias se disgregó por sonicación en el amortiguador TrisED (Tris 10 mM, EDTA 1mM, 2-mercaptoetanol 2 mM y Urea 4 M, pH 7.5); a continuación se centrifugo, nuevamente, y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante se pasó por una columna de afinidad a Ni^{2+} (HiTTrap de Invitro Gene) y se lavó con el amortiguador TrisED. La Ts2-CysPrx unida a la columna fue eluida con un gradiente de imidazol (50, 100, 200 y 500 mM); las fracciones de elusión fueron dializadas contra el amortiguador Tris (pH 7.5) a 4°C toda la noche.

La pureza de las fracciones eluidas se determinó en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12 % teñido con azul brillante de Coomassie (Gibco-BRL, USA). Se escogieron las fracciones que presentaron mayor concentración y pureza de la proteína, y fueron concentradas 10 veces en un aparato Amicon (Millipore, USA).

La cuantificación de la Ts2-CysPrx se llevó a cabo por el método de Lowry, leyendo a una absorbancia de 600nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Bioscience, USA).

Detección de la Ts2-CysPrxr por inmunoelectrotransferencia

Se corrió 1 µg/mm de la Ts2-CysPrx purificada en un SDS-PAGE al 12%; posteriormente, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Suecia) utilizando un equipo MiniTransblot de Bio-Rad. La membrana se bloqueó 2 h en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con albumina de suero bovino (BSA) 1% y Tween 0,05 % a temperatura ambiente. Tres tiras conteniendo la proteína se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un suero anti-Ts2-CysPrx (Molina-López et al., 2006), un suero anti-*E. coli* o un suero preinmune de conejo en una dilución 1:1000 ; ambos producidos en el laboratorio de Biología molecular de *Taenia solium*. La membrana se lavó tres veces por 5 minutos con PBS Tween 0,05 % y se incubó durante 1 h con un anticuerpo anti-IgG de conejo, hecho en cabra acoplado con la peroxidasa de rábano (HRP, diluido 1:2.000). Finalmente, los anticuerpos unidos a las membranas se revelaron con 3,3 µL de 3,3-diaminobencidina (DAB) y H₂O₂.

Eliminación y cuantificación del LPS remanente en la Ts2-CysPrxr purificada.

El LPS contenido en la Ts2-CysPrx purificada se eliminó utilizando el kit ProteoSpin Endotoxin Removal micro-kit (Norgen), siguiendo las recomendaciones del

fabricante. Este kit utiliza una serie de detergentes que retiran el LPS mientras la proteína de interés es retenida en la matriz de la columna de cromatografía.

Para la cuantificación del LPS remanente se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción de los amebocitos del cangrejo herradura (Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation, Thermo Scientific); de manera general, el LPS contenido en la muestra activa una proenzima que dirige la formación de un compuesto que puede ser fotométricamente medido a 405 nm.

Curva de estimulación de macrófagos J774.1 con Ts2-CysPrx

Para determinar la concentración y/o concentraciones de la Ts2-CysPrx que alteraran la expresión de marcadores M1 y M2 en macrófagos murinos, se llevó a cabo una curva de estimulación dosis /respuesta. Aproximadamente 2×10^6 macrófagos fueron estimulados con 0,1 μg (45nM) ,5 μg (227nM) ,10 μg (454 nM) ,20 μg (909 nM) y 50 μg (2227 nM) de Ts2-CysPrx por 20 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Una vez transcurrido el tiempo, se recuperó el medio de cultivo para la cuantificación de citocinas, y las células pegadas a la placa fueron lisadas en 700 μL de TRIzol (Invitrogen) para la posterior purificación de RNA total. El medio de cultivo y el TRIzol fueron almacenados a -20°C y -75°C respectivamente, hasta su posterior uso.

Extracción de RNA y transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Los volúmenes de TRIzol fueron utilizados para la extracción de RNA total; técnica que se realizó utilizando el estuche Direct-zol RNA Miniprep (Zimo Research).

El RNA total obtenido fue aforado a un volumen final de 35 μL , usando agua libre de RNAsas, y cuantificado en un nanodrop BioDrop DUO a 260 nm. La pureza se determinó mediante la relación de absorbancia 260nm/280nm, y la integridad del RNA fue determinada en un gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio.

El cDNA fue sintetizado a partir de 800 ng de RNA utilizando el kit RevertAid first-strand cDNA synthesis (Thermo Scientific). Para la PCR se utilizaron 50 ng de cDNA y 2 oligonucleótidos específicos para amplificar una región de cada marcador de activación de macrófagos: *Nos2*, *Il1b*, *Il6*, *Ptgs2*, *Il12b* y *Cd274* (Nair et al., 2003) como marcadores M1; *Arg1* y *Mrc1* como marcadores M2, y *Gapdh* como gen constitutivo (Renshaw et al., 2002).

Previo a la PCR, la muestra se incubó a 50°C por 30 min; a continuación, se realizó la PCR bajo el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 35 seg, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min. Los fragmentos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Los geles fueron visualizados en el programa Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) y la transcripción relativa de los genes fue determinada mediante el programa ImageJ.

Determinación de Interleucinas por ELISA indirecta

Para determinar la concentración de citocinas presentes en el sobrenadante de los cultivos celulares se realizaron ELISAS indirectas.

En detalle, se absorbieron los anticuerpos anti-Interleucina 10, 12 y TNF a las placas de ELISA (nun MxiSop Apogent) 1µg/mL/pozo a 4°C toda la noche. Después de la incubación se lavó la placa y se bloqueó con BSA al 1% durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados, se agregaron 100 µL/pozo de los sobrenadantes y se incubaron toda la noche a 25°C. Al día siguiente se lavó nuevamente la placa y se agregó el segundo anticuerpo, de acuerdo a la citocina en cuestión. Se incubó por 2 h a 37°C, se lavó la placa y reveló por medio de la reacción del anticuerpo biotinilado con avidina y ABTS/H₂O₂.

Se determinó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas MULTISCAN Ascent (Termolab system).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de ANOVA, con prueba de Bonferroni, y se consideró significativo una $p < 0.05$ con un intervalo de confianza del 99%.

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 7.00.159.

6 RESULTADOS

Purificación de la Ts2-CysPrx recombinante

En la primera parte del estudio se realizó la expresión y la purificación de la proteína recombinante a partir de una clona de *E.coli* que contenía el vector pRSET-Ts2-CysPrx que expresa a la Ts-2CysPrx unida a 6 histidinas (Molina-López et al., 2006).

En la Figura 4 carril 1 y 2 se muestra la composición del lisado de la clona bacteriana antes y después de inducir la expresión; se observa, en ambos carriles, proteínas solubles en un rango de 25 a 150 kDa. La expresión de la proteína recombinante se muestra como una banda intensa de ~22 kDa en el carril 1 (Molina-López et al., 2006).

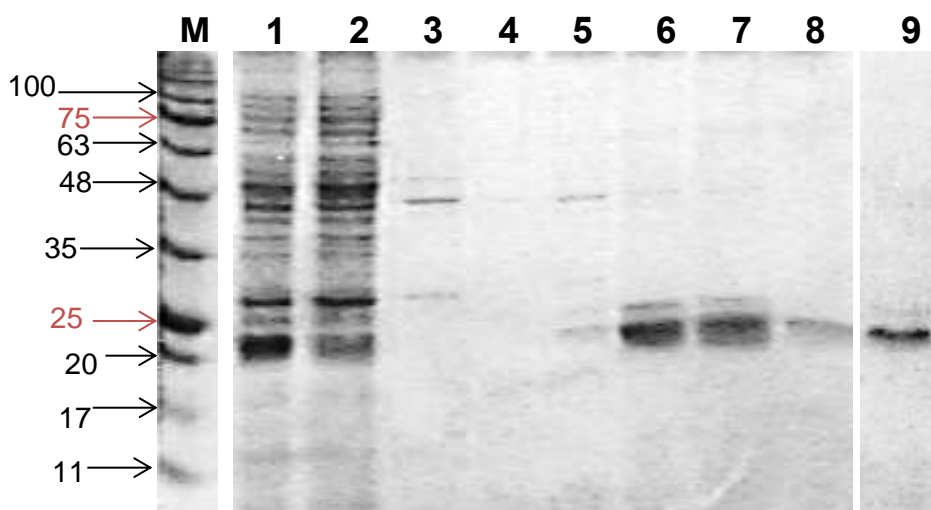


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 12% con SDS en el que se muestra la purificación de la Ts2-CysPrx recombinante por columna de afinidad a Ni^{2+} . 1=Sobrenadante del sonificado de la clona de *E. coli* con el plásmido pRSET-Ts2-CysPrx inducida con IPTG, 2=Sobrenadante anterior pasado por la columna, 3 y 4= Primer y último lavado de la columna, 5 al 8= Fracciones de la proteína unida eluida con un gradiente de Imidazol (50, 100, 200 y 500 mM), 9= Muestra la Ts-2CysPrx pura, después de un segundo proceso de purificación. M= Marcadores comerciales de peso molecular de 11 a 230 kDa. Gel teñido con azul brillante de Coomassie.

Las seis histidinas fusionadas en el amino terminal de la Ts2-CysPrx permitieron realizar su purificación a través de una cromatografía de afinidad a Ni²⁺ (HiTrap).

En el primer lavado (carril 3) observamos la elusión de proteínas no afines a la columna, con un peso aproximado de 30, 48 y 50 kDa. Estas proteínas ya no son visibles en el último lavado (carril 4). Una vez realizados los lavados, la Ts2-CysPrx unida a la columna fue eluida con diferentes concentraciones de Imidazol: 50, 100, 200 y 500 mM (carriles del 5 al 8). La Ts2-CysPrx comenzó a eluir a partir de la fracción con 50 mM de imidazol (carril 5), aunque su pureza se vio reducida por la presencia de dos proteínas contaminantes, 30 y ~44kDa respectivamente. En contraste, las fracciones de 100, 200 y 500 mM de imidazol (carriles 6,7 y 8) mostraron tener a la proteína con un mayor grado de pureza; por lo que, se decidió mezclarlas, dializarlas y concentrarlas. Si bien, al incorporar dichas fracciones, se obtuvo una Ts2-CysPrx más concentrada y pura, aún era posible observar proteínas contaminantes (resultados no mostrados).

Las 2-Cys Prxs típicas tiene la capacidad de formar enlaces disulfuros con otras proteínas, cuando están oxidadas; y de esta manera, conformar agregados de mayor peso molecular. Con lo anterior en mente, decidimos utilizar un agente reductor que nos permitiera mantener a la proteína como monómero y así facilitar su purificación. Siguiendo el protocolo propuesto por Jiménez y colaboradores en el 2015, utilizamos 1 mM de DTT y volvimos a pasar la muestra por la columna (Jiménez et al., 2015).

Como en la purificación anterior, la proteína eluyó en las fracciones de 100,200 y 500 mM de imidazol; estas fracciones fueron incorporadas, dializadas, concentradas y se corrieron en un SDS-PAGE al 12% (carril 9).

Obteniendo así 7.41 mg de proteína a partir de 500 mL de medio de cultivo

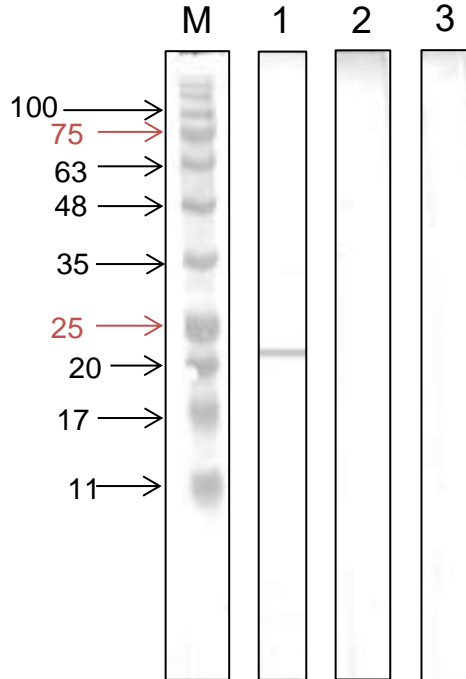


Figura 5. Inmunoelctrotransferencia de la Ts2-CysPrx recombinante (1 μ g/carril) incubada con los siguientes sueros: 1) Anti-Ts2-CysPrx. 2) pre-inmune, y 3) Anti-*E. coli* de conejo diluidos (1:1000). M = Marcadores comerciales de peso molecular de 11 a 230 kDa.

Detección de la Ts2-CysPrxr por inmunoelctrotransferencia

Para corroborar que la proteína purificada correspondía a la Ts2-CysPrx y, que además, se encontraba libre de proteínas contaminantes de *E. coli*, se realizó un ensayo de inmunoelctrotransferencia (Figura 5). Se transfirió 1 μ g de la proteína pura a una membrana de nitrocelulosa, y posteriormente, se incubó con un suero policlonal anti-Ts2-CysPrx de conejo, un suero anti-*E.coli* o un suero preinmune de conejo, como control negativo.

No se observó reconocimiento en la membrana incubada con el suero preinmune de conejo (carril 3); en contraste, el suero anti-Ts2-CysPrx reconoció una proteína de ~22KDa (carril 1); confirmando la presencia de la Ts2-CysPrx dentro de nuestra muestra. Finalmente, el suero anti-*E.coli* no fue capaz de identificar ninguna

proteína dentro de la muestra (carril 2). Lo que nos corrobora el alto grado de pureza de nuestra proteína purificada.

Eliminación y cuantificación del LPS en la Ts2-CysPrx purificada

El LPS es un componente estructural de las bacterias Gram negativas, esta molécula puede ser reconocida por los macrófagos e inducir su activación; en consecuencia, su eliminación dentro de la muestra es un paso decisivo.

El LPS contenido en la Ts2-CysPrx purificada se eliminó utilizando el kit ProteoSpin Endotoxin Removal micro-kit (Norgen), y el LPS remanente fue cuantificado por medio del ensayo del lisado de Amebocitos del cangrejo herradura *Limulus*. En la Tabla 1, se presentan los valores de EU/mL de la Ts2-CysPrx antes de pasar por la columna del kit ProteoSpin, en la primera y en la segunda elusión. Podemos ver como la concentración de LPS disminuye de 2.89 EU/mL (289 ng/mL) a 0.86 EU/mL (86ng/mL) en la primera elusión y hasta 0.54 EU/mL (54 ng/mL) en la segunda elusión. Con base a estos valores, se decidió utilizar la proteína contenida en la segunda elusión.

Tabla 1. Purificación y cuantificación del LPS (EU/mL) remanente en la Ts2-CysPrx recombinante.

MUESTRA	Amortiguador Tris pH 7.4	Ts2-CysPrx AP	Primera Elusión	Segunda Elusión
CONCENTRACIÓN (EU/mL)	0.01841	2.8995	0.8607	0.5412

Determinación por RT-PCR y ELISA de los estímulos para la obtención de macrófagos M1 y M2

Un objetivo particular, dentro del presente estudio, fue obtener macrófagos J774.1 activados, M1 y M2, que nos sirvieran como punto de referencia para distinguir el fenotipo de activación inducido por la Ts2CysPrx en macrófagos J774.1 naive.

Para lograr este objetivo, se estimularon a los macrófagos con 5 concentraciones distintas de estímulos: sin estímulo (C), M(IFN- γ), M(IFN- γ /LPS) ,M(IL-4)1 o M(IL-4)2; y se comparó el nivel de expresión de diferentes marcadores M1 (*Nos2*, *Il1b*, *Il6*, *Ptgs2*, *Il12b* y *Cd274*) y M2 (*Arg1* y *Mrc1*).

En la Figura 6A y 6B observamos el nivel de transcripción relativa de marcadores M1. Los macrófagos no estimulados, presentan un nivel basal de los marcadores *Nos2*, *Il6*, *Ptgs2*, y *Cd274*. En tanto, los macrófagos M(IFN- γ) aumentaron la expresión de los marcadores *Nos2*, *Il1b*, *Il6*, *Ptgs2* y *Cd274*, siendo estadísticamente significativa la expresión de *Ptgs2*, comparado con los macrófagos M(IL-4)2 (Fig. 6B).

Por otro lado, los macrófagos M(IFN- γ /LPS) aumentaron significativamente la expresión de *Nos2*, *Il1b*, *Il6* y *Cd274* , comparado con todos los demás tratamientos (Fig. 6B) ; de igual manera , estos macrófagos comenzaron a expresar el marcador *Il12b*.

Por último, tanto los macrófagos M(IL-4)1 como M(IL-4)2 expresaron niveles basales de los marcadores *Nos2*, *Il6*, *Ptgs2* y *Cd274*.

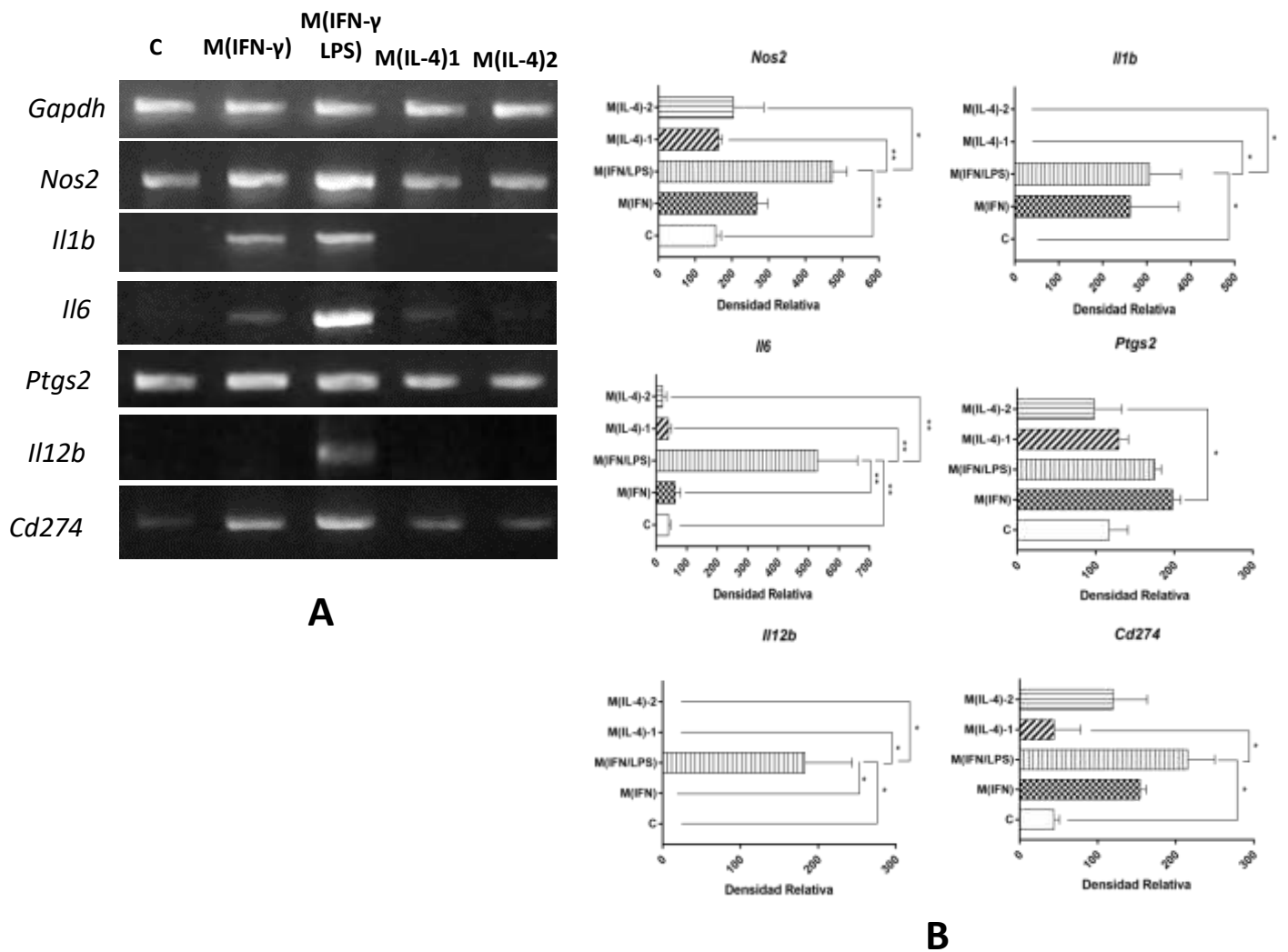


Figura 6. RT-PCR de RNA total de macrófagos J774.1 activados M(IFN- γ), M(IFN- γ /LPS), M(IL-4)-1 y M(IL-4)-2. Nivel de expresión de los marcadores M1 (*Nos2*, *Il1b*, *Il6*, *Ptgs2*, *Il12b*, *Cd274*). A: Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. B: Análisis de la transcripción relativa de los marcadores M1 mediante densitometría (ImageJ), valores expresados en unidades de densidad relativa. Los datos se presentan como el promedio de 3 repeticiones + desviación estándar (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$).

En la Figura 7A y 7B se muestra el nivel de transcripción relativa de marcadores M2. Observamos como los macrófagos sin estimular presentan una expresión basal del gen *Arg1*; misma que se mantiene en los macrófagos M(IFN- γ) y aumentan ligeramente en los macrófagos M(IFN- γ /LPS). Asimismo, los macrófagos M(IL-4)-1 y M(IL-4)-2 aumentaron de manera significativa la expresión de este marcador, en comparación con el control y los macrófagos M(IFN- γ) ; aunque, sin diferencia estadística entre ambos tratamientos. Finalmente, el marcador *Mrc1* se transcribió solo en los macrófagos M(IL-4)2.

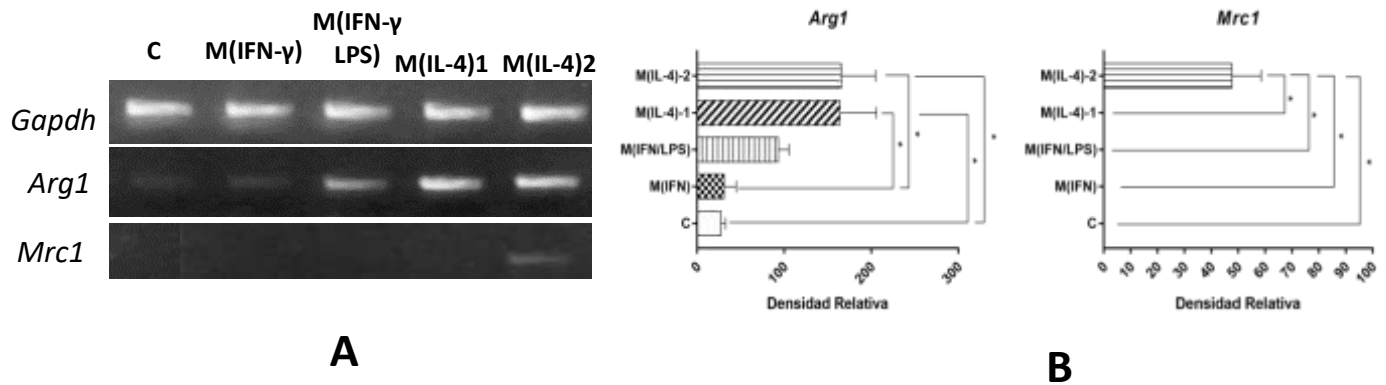


Figura 7. RT-PCR de RNA total de macrófagos J774.1 activados M(IFN- γ), M(IFN- γ /LPS), M(IL-4)-1 y M(IL-4)-2. Nivel de expresión de los marcadores M2 (Arg1 y Mrc1) . A: Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. B: Análisis de la transcripción relativa de los marcadores M1 mediante densitometría (ImageJ), valores expresados en unidades de densidad relativa. Los datos se presentan como el promedio de 3 repeticiones + desviación estándar (*= P<0.05).

En la Figura 8 se presenta la cuantificación de las citocinas (TNF, IL-12 e IL-10) secretadas por los macrófagos J774.1 activados con diferentes estímulos M1 y M2. En la primera gráfica, observamos que los macrófagos sin estimular presentan una secreción basal de TNF misma que se mantiene en los macrófagos M(IFN- γ), M(IL-4)1 y M(IL-4)2. Los macrófagos M(IFN- γ /LPS), en cambio, secretaron la mayor concentración de TNF (****=P0.0001).

En el caso de la IL-12 sucede algo similar, los macrófagos C, M(IFN- γ), M(IL-4)1 y M(IL-4)2 no presentaron la secreción de dicha citocina, pero los macrófagos M(IFN- γ /LPS) secretaron la concentración más alta.

Finalmente, en la tercera gráfica observamos que los macrófagos sin estimular presentan una concentración basal de IL-10, misma que disminuye en los macrófagos M(IFN- γ) y M(IFN- γ /LPS). Los macrófagos M(IL-4)1, por su parte, presentaron una secreción de IL-10, estadísticamente significativa en comparación al control. Sin embargo, los macrófagos M(IL-4)2 expresaron la mayor concentración de IL-10, en comparación a todos los tratamientos.

Con base a los resultados obtenidos en los RT-PCR y en las ELISAS, se decidió utilizar como controles M1 y M2 los macrófagos M(IFN- γ /LPS) y M(IL-4)2, respectivamente; mismos que serán referidos en experimentos posteriores como M(IFN- γ /LPS) y M(IL-4) .

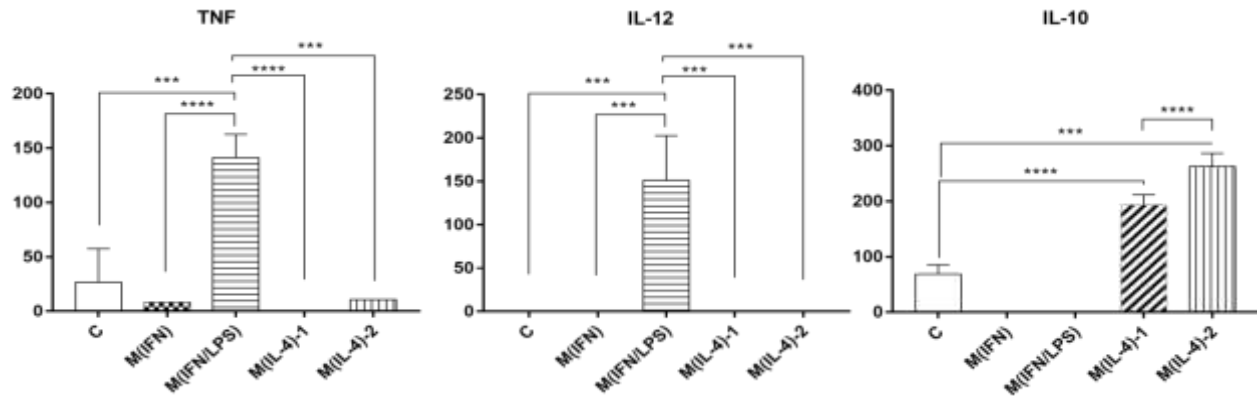


Figura 8. Determinación por ELISA de las citocinas (IL-12, TNF e IL-10) secretadas por macrófagos estimulados por 20 h. M(IFN- γ), M(IFN- γ /LPS), M(IL-4)-1 y M(IL-4)-2. Los datos se presentan como el promedio de 3 repeticiones + desviación estándar (*= P<0.05; ** = P<0.01; ***=P<0.001; ****=P<0.0001).

Determinación del efecto que tiene la Ts2-CysPrx en la expresión de genes marcadores de activación en macrófagos J774.1 mediante RT-PCR y ELISA

Con el fin de determinar la concentración y/o concentraciones de la Ts2-CysPrx que alteraran la expresión marcadores M1 y M2 en macrófagos J774.1, se llevó a cabo una curva *in vitro* de estimulación dosis /respuesta con 0,1 μ g (45nM) ,5 μ g (227nM) ,10 μ g (454 nM) ,20 μ g (909 nM) y 50 μ g (2227 nM) de Ts2-CysPrx.La transcripción relativa obtenida, de los marcadores M1 y M2, fue comparada con la de macrófagos estimulados con LPS/IFN- γ o IL4.

En la Figura 9A y 9B se muestra el nivel de transcripción relativa de marcadores M1. Observamos que los macrófagos sin estimular presentan una transcripción basal del marcador *Nos2*; esta expresión aumenta, ligeramente, cuando lo

macrófagos se tratan con 45 nM Ts2-CyPrx, aunque no es estadísticamente significativo; y se mantiene a pesar de aumentar la concentración de la proteína. Los macrófagos M(IFN- γ /LPS) , en cambio, presentaron la expresión más alta de este gen, en comparación con todos los demás tratamientos. Por otro lado, los macrófagos M(IL-4) incrementaron la expresión de este mismo marcador, pero sin alcanzar el nivel presentado por las células M(IFN- γ /LPS).

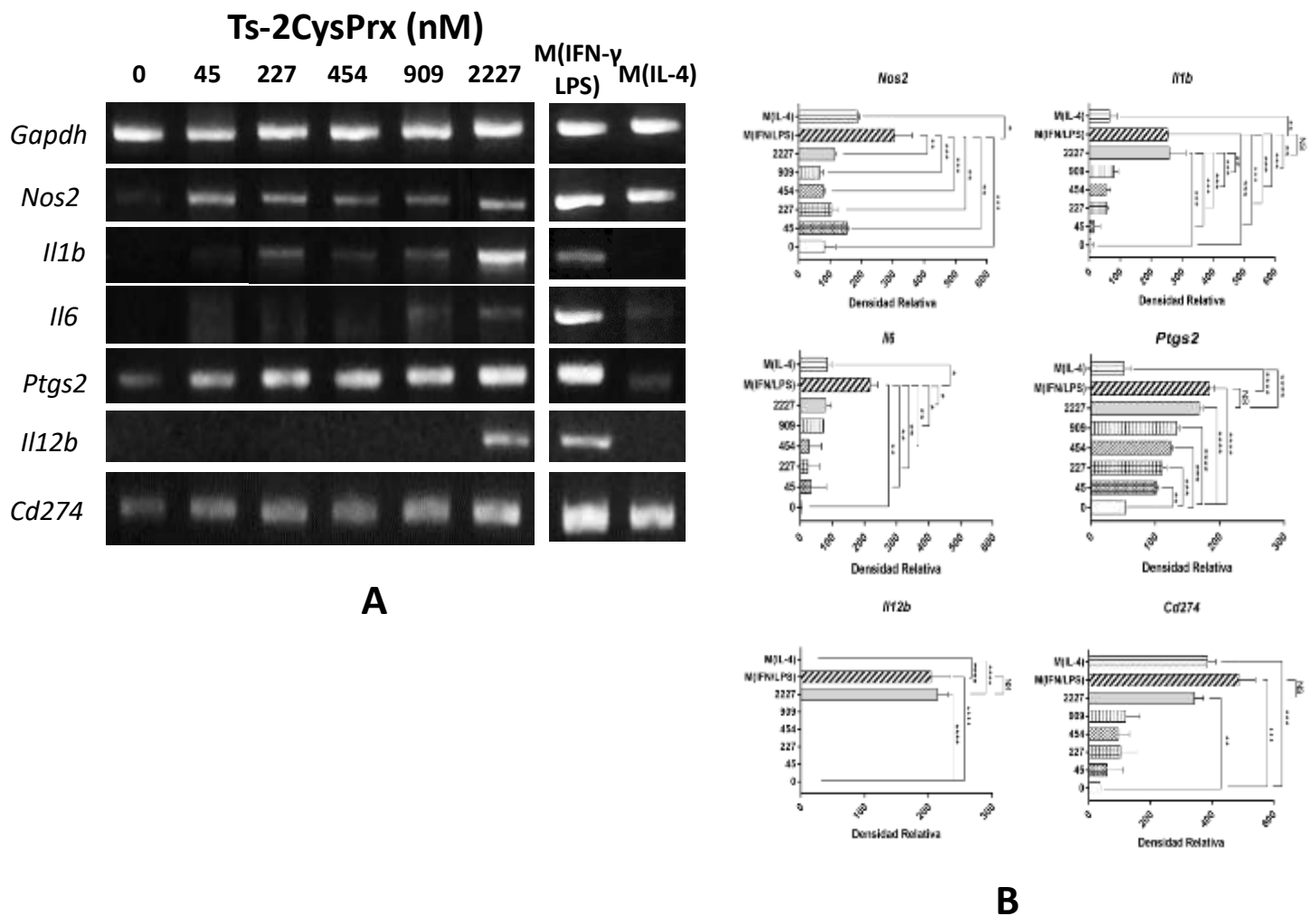


Figura 9. RT-PCR de RNA total de macrófagos J774.1 activados con 45,227,454,909 y 2227 nM de Ts-2CysPrx, M(IFN- γ /LPS) y M(IL-4). Nivel de expresión de los marcadores M1 (*Nos2*, *Il1b*, *Il6*, *Ptgs2*, *Il12b*, *Cd274*). A: Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. B: Análisis de la transcripción relativa de los marcadores M1 mediante densitometría (ImageJ), valores expresados en unidades de densidad relativa. Los datos se presentan como el promedio de 3 repeticiones + desviación estándar (*= P<0.05; ** = P<0.01; ***=P<0.001, ****=P<0.0001).

El marcador *I11b*, por su parte, comenzó a ser transcrito a partir de 45 mM de la Ts2-CysPrx y siguió un comportamiento dosis dependiente, llegando a su punto más alto en los macrófagos estimulados con 2227 mM. El nivel de transcripto obtenido por estos macrófagos solo es comparado con el obtenido por las células M(IFN- γ /LPS). Las células estimuladas con IL-4, por el contrario, no presentaron expresión del marcador, como ya se había observado con anterioridad.

La transcripción relativa del marcador *I16* se mantuvo sin cambios a lo largo de toda la curva de estimulación y en los macrófagos M(IL-4). Lo únicos en presentar un aumento en la expresión de este gen fueron los macrófagos M(IFN- γ /LPS).

Por otro lado, la expresión del gen *Ptgs2* aumentó, de manera significativa, en 45 mM y siguió este comportamiento de manera dosis dependiente, llegando a su nivel más alto con 2227 mM; los macrófagos M(IFN- γ /LPS), así mismo, aumentaron la expresión de este marcador. Las células estimuladas con IL-4, en cambio, presentaron niveles basales de *Ptgs2*.

La expresión del gen *I12b* solo se presentó en los macrófagos estimulados con la concentración más alta de la proteína (227mM) y en los macrófagos M(IFN- γ /LPS).

Finalmente, el nivel transcripción del gen *Cd274* se mantuvo en los macrófagos estimulados con 0, 45, 227 y 909 mM de la Ts2-CysPrx. No obstante, los macrófagos estimulados con 227mM de la enzima alcanzaron los niveles más altos de expresión, junto con los macrófagos M(IFN- γ /LPS) y los M(IL-4) .

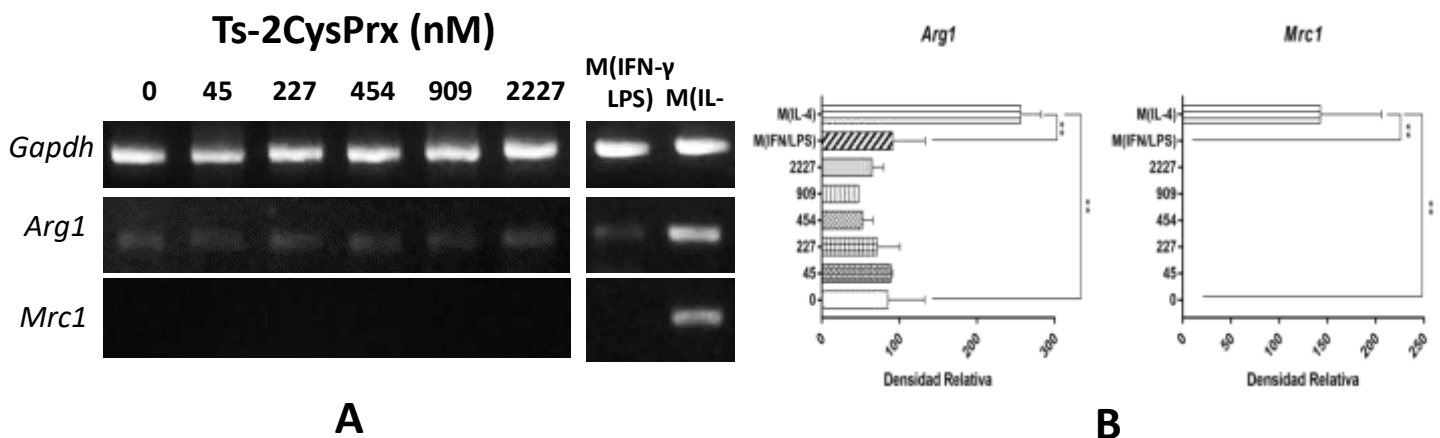


Figura 10. RT-PCR de RNA total de macrófagos J774.1 activados con 45, 227, 454,909 y 2227 nM de Ts-2CysPrx, M(IFN- γ), M(IFN- γ /LPS) y M(IL-4). Nivel de expresión de los marcadores M2 (Arg1 y Mrc1) A: Gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio. B: Análisis de la transcripción relativa de los marcadores M1 mediante densitometría (ImageJ), valores expresados en unidades de densidad relativa.Los datos se presentan como el promedio de 3 repeticiones + desviación estándar (*= P<0.05; ** = P<0.01; ***=P<0.001).

En la Figura 10A y 10B se muestra el nivel de transcripción relativa de marcadores M2. Observamos como el gen *Arg1* se mantiene constante desde los macrófagos sin estimular y hasta los estimulados con 227mM de la proteína. Lo mismo sucede con las células M(IFN- γ /LPS). No obstante, los macrófagos M(IL-4) mostraron el mayor nivel del transcrito.

Este mismo comportamiento es observado en la transcripción del gen *Mrc1*.

En la Figura 11 se presenta el efecto que tiene la Ts2-CysPrx en la de las citocinas TNF, IL-12 e IL-10. En la primera gráfica observamos que la presencia de la enzima no altera la producción de TNF. Sin embargo, los macrófagos estimulados con IFN- γ /LPS, secretaron la mayor concentración de la citocina.

En el caso de la IL-12, las células estimuladas con 2227 mM de la proteína mostraron un aumento significativo de esta citocina, en comparación con las células no tratadas y los macrófagos M(IL-4); aunque, su producción no llegó a los niveles de secreción de los macrófagos M(IFN- γ /LPS).

Por último, la secreción de IL-10 aumentó de manera significativa en las células estimuladas con 45 mM de la Ts2-CysPrx para, posteriormente, disminuir y mantenerse, a pesar de aumentar la concentración de la enzima. Los macrófagos M(IFN- γ /LPS), por su parte, presentaron niveles reducidos de esta citocina; a diferencia de los macrófagos estimulados con IL-4, los cuales presentaron la concentración más alta de IL-10.

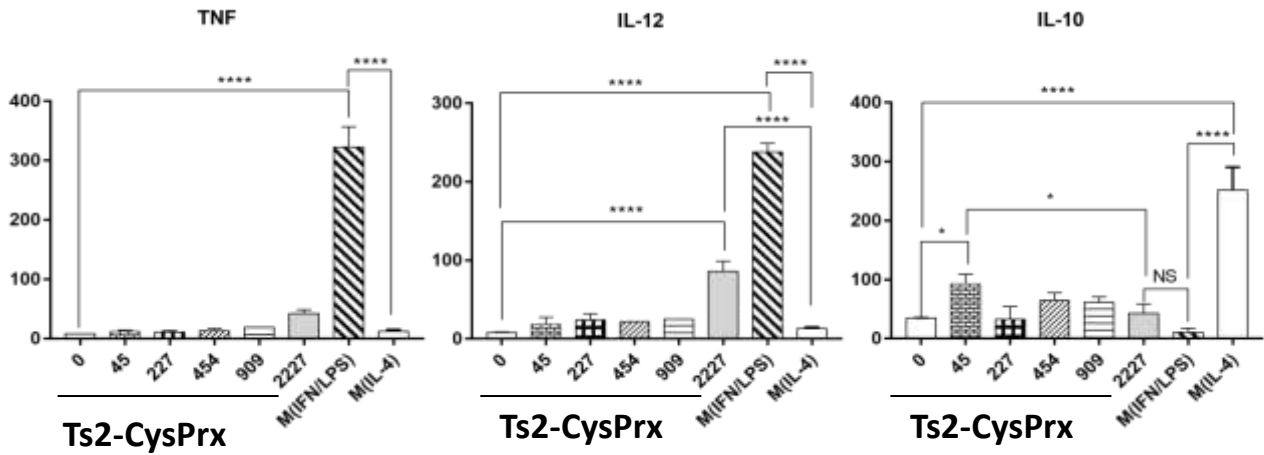


Figura 11. Determinación, por ELISA, de las citocinas (IL-12, TNF e IL-10) secretadas por macrófagos estimulados por 20 h por 20 h con 45, 227, 454, 909 y 2227 nM de Ts-2CysPrx; como controles macrófagos J774.1 estimulados con 100 ng de LPS y 30 ng IFN- γ (M(IFN- γ /LPS)) y 100 ng de IL-4 (M(IL-4)). Los datos se presentan como el promedio de 3 repeticiones + desviación estándar (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; **** = $P < 0.0001$).

7 DISCUSIÓN

Los macrófagos son un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa; interactúan directamente con los patógenos, y por medio de citocinas y receptores, promueven la diferenciación de los linfocitos T CD4+ naive en células efectoras.

Existe evidencia que sugiere que los productos de secreción-excreción de helmintos modulan la respuesta inmune del hospedero a través de la diferenciación de macrófagos. No obstante, se desconoce que moléculas participan en este fenómeno.

De acuerdo a la literatura, la 2-CysPrx tiene la capacidad de inducir la diferenciación de macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, la información que reportan diversos estudios parece contraponerse; mientras algunos autores argumentan el desarrollo de un fenotipo M2 (Donnelly et al., 2008) algunos otros sostienen la inducción de un fenotipo M1 (Shichita et al., 2012).

Por otro lado, aún se desconoce si la 2-CysPrx de *Taenia solium* tiene algún efecto en la polarización de macrófagos.

En el presente estudio se demostró que la estimulación de macrófagos J774.1 con la enzima Ts2-CysPrx tiene un efecto, dosis dependiente, en la expresión y producción de marcadores M1.

La Ts2-CysPrx fue purificada por medio de una cromatografía de afinidad a Ni²⁺ aprovechando las histidinas fusionadas al amino terminal de la enzima recombinante (Joshua et al., 2011). Los análisis de la proteína pura en electroforesis y en inmunoelectrotransferencia, utilizando un suero específico anti-Ts2-CysPrx, mostraron una banda de 22 KDa. Este peso coincide con el reportado por Molina y colegas para la Ts2-CysPrx (Molina et al., 2006). Asimismo, se confirmó la ausencia de proteínas contaminantes de la bacteria por medio de una inmunoelectrotransferencia utilizando un suero hiperinmune anti-*E. coli*.

El LPS es un compuesto característico de la pared celular de bacterias Gram negativas que tiene la capacidad de unirse a PRRs, como TLR 4 y 2, y con ello diferenciar a macrófagos naive en efectores M1 productores de NO y citocinas pro inflamatorias (Cohly et al., 2001; Zhao et al., 2016; Menzies et al., 2010). Por esta razón fue de suma importancia técnica reducir la concentración de dicha molécula en nuestro lote de proteína pura. Para lograr esto se utilizó el estuche ProteoSpin Endotoxin Removal micro-kit (Norgen), y el LPS remanente fue cuantificado por medio del ensayo del lisado de Amebocitos del cangrejo herradura *Limulus*. Se obtuvieron 2 eluciones, las cuales, están por debajo de los valores límites recomendados por la Food and Drug Administration (FDA).

Otro de los objetivos particulares del estudio fue determinar las concentraciones de IFN- γ y/o LPS e IL-4 necesarias para la obtención de macrófagos J774.1 activados M1 y M2. Para lo cual se utilizaron las concentraciones reportadas por (Geng et al., 2017) y (Lin et al., 2017).

Las células sin estímulo presentaron la transcripción basal de los genes marcadores M1: *Nos2*, *Ptgs2* y *Cd274*; lo anterior coincide con lo reportado por Geng y colegas ,quienes describieron la expresión constitutiva de marcadores proinflamatorios por parte de esta línea celular (Geng et al. 2017; Lin et al., 2017).

Por otro lado, los macrófagos estimulados con 100 ng de IFN- γ no presentaron un aumento significativo en ninguno de los marcadores M1, tanto genes como citocinas, lo que deja en evidencia su incapacidad para adquirir el fenotipo de activación clásica. En contraste, los macrófagos estimulados con 100 ng de IFN- γ y 30ng de LPS mostraron un incremento, estadísticamente significativo, en la transcripción relativa de *Nos2*, *Il1b*, *Il6*, *Il12b* y *Cd274* así como en la producción de las citocinas proinflamatorias TNF e IL12. Todos estos, marcadores característicos del fenotipo de activación clásica (Rath et al., 2014; Murray et al., 2014; Tan et al., 2016).

Si bien, el IFN- γ es capaz de activar los factores de transcripción STAT1 y 2 responsables de la activación de genes proinflamatorios, su acción es transitoria,

limitada e insuficiente para polarizar macrófagos; por esta razón, la literatura sugiere su utilización en conjunto con un agonista de TLR, como el LPS. La adición de LPS activa la secreción de TNF, una citocina que actúa de manera autocrina y que activa el factor nuclear κ B (NF- κ B) y las protein-cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), lo que resulta en el establecimiento exitoso de un fenotipo de activación clásica. (Mosser et al., 2008).

En cuanto a la diferenciación M2, tanto los macrófagos estimulados con 40ng como los estimulados con 100ng de IL-4, mostraron un aumento significativo en el marcador de activación alternativa *Arg1* y en la citocina antiinflamatoria IL-10. No obstante, los macrófagos cultivados con 100ng de IL-4 fueron los únicos en expresar el marcador M2 *Mrc1*; además, de producir la mayor concentración de IL-10. Un comportamiento similar, ya se había identificado con anterioridad en la literatura. Lin y su equipo reportaron que la estimulación con IL-4 en macrófagos J774.1 mostraba un comportamiento dosis dependiente, siendo las poblaciones estimuladas con las más altas dosis las que desarrollaban mejor el fenotipo M2 (Lin et al., 2017).

Las Prxs de parásitos inactivan a las RNS y ROS liberadas por efectores de la respuesta inmune del hospedero (Callahan et al., 1988; Vaca-Paniagua et al., 2008, Rendon et al., 2004). También, se ha visto que no sólo tienen un papel desintoxicante, sino además están involucradas en el crecimiento, señalización y diferenciación; características que las han hecho relevantes en enfermedades parasitarias y en el cáncer (Rhee et al., 2011; Woo et al., 2010; Robinson et al., 2010; Perkins et al., 2015; Cha et al., 2009). Adicionalmente, se ha observado que las Prxs pueden fungir como ligando de receptores de inmunidad innata, como TLR4 (Furuta et al., 2008). Por todo lo anterior, se consideró evaluar su efecto en la expresión de genes marcadores que conducen al desarrollo del fenotipo de activación de los macrófagos murinos J774.1.

Los PCRs llevados a cabo con el RNA total de los macrófagos estimulados con la Ts-2CysPrx muestran, de manera general, un aumento en la transcripción relativa de los marcadores M1 *Il1b*, *Ptgs2*, *Il12b* y *Cd274*. Sin embargo, los marcadores

I11b, *I112b* y *Cd274* solo se presentaron con la concentración más alta de la proteína (2227nM), y sorprendentemente, la cantidad de transcrito fue similar con el generado por el tratamiento M(IFN- γ /LPS), es decir por macrófagos activados M1.

Interesantemente el gen marcador *Ptgs2* fue el único que mostró un incremento dosis dependiente, presentándose desde la concentración más baja de la enzima (45nM) y llegando a su máximo en 2227nM. Cabe mencionar, que el nivel de transcrito generado con esta dosis de la enzima fue similar al producido por el control M1.

Con respecto a la determinación de citocinas, se encontró que los macrófagos estimulados con 45 nM de la Ts2-CysPrx presentaron un aumento en la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10; mismo que disminuye, de manera dosis dependiente, hasta llegar a la concentración más baja en 2227nM. Valor equiparable con la producción de IL-10 de macrófagos activados M1. Adicionalmente, las células estimuladas con 2227nM de la enzima, tuvieron un aumento significativo en la producción de la citocina pro inflamatoria IL-12.

La IL-12 es una citocina producida por células dendríticas y macrófagos, cuya función es activar la capacidad citotóxica de las células asesinas naturales (NK) y estimular su producción de IFN- γ . También juega un rol indispensable en la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en efectores TH1 (Tait-Wojno et al. 2019).

El efecto mostrado por la Ts-2CysPrx sobre la expresión de genes marcadores de del fenotipo M1 y la producción de la citocina proinflamatoria IL-12, nos lleva a proponer que la enzima conduce a macrófagos murinos J774.1 a un fenotipo M1. Sin embargo, el alcance del estudio presente nos limita a llegar a esa conclusión puesto que no se corroboró la habilidad de macrófagos JJ774.1 estimulados con la Ts2-CysPrx para inducir la diferenciación de linfocitos T CD4+ naive en linfocitos CD4+ TH1. Por lo que se propone un estudio subsecuente donde se aborde esta interrogante.

En apoyo a nuestra propuesta, ya existen diversos grupos de investigación alrededor del mundo que han comprobado las propiedades proinflamatorias de las

Prx, y en especial de las 2-CysPrx (Riddell et al., 2010, Zhao et al., 2016, Rhee et al., 2011).

Por ejemplo, Futura y colegas demostraron que macrófagos y células dendríticas estimulados con la 2-CysPrx del protozooario *Plasmodium berghei* ANKA mostraron una alta producción de TNF; mediada por la unión de ésta con TLR 4 (Furuta et al., 2008).

Otro estudio relevante, fue el llevado a cabo por Shichita y su equipo (2012) quienes estimularon MBDC con una 2-CysPrx típica de mamíferos. Como consecuencia, estas células, aumentaron, de manera dosis dependiente, la expresión del marcador M1 *Il-23p*. Por otro parte, cuando se estimularon MBDC TLR4^{-/-} y TLR2^{-/-}, estas no presentaron el transcrito de *Il-23p* lo que sugieren que la expresión de dicho marcador fue inducido de manera TLR dependiente (Shichita et al., 2012).

Si bien, en el estudio presente no se abordó el posible mecanismo molecular detrás de la inducción del fenotipo M1 por parte de la Ts2-CysPrx, proponemos que podría estar asociada a la unión de esta a TLR4. Sustentamos esta hipótesis debido a que los genes *Il1b* (gen que codifica la IL-1 β) e *Il12b* (gen que codifica una subunidad de la IL-12), son transcritos por la vía de señalización río abajo de TLR4. Aunado a esto, la unión de IL1- β con su receptor permite la interacción de los dominios TIR los cuales reclutan a Myd88 (proteína adaptadora que también se encuentra en la vía de TLR4) la cual inicia la señalización citosólica para la activación de NF- κ B. Este último es esencial para la transcripción de *Cd274* (PD-L1 en humanos) y *Ptgs2* (gen que codifica para la enzima Cox-2), ambos genes sobreexpresados en los macrófagos estimulados con la mayor concentración de la enzima (Tang et al. 2017; Zong et al. 2019).

Finalmente, vale la pena mencionar que la Ts2-CysPrx tuvo la habilidad de potencializar la expresión de los genes asociados a macrófagos tipo M1 sobre los macrófagos J774.1, a pesar de que estos ya presentaban un trasfondo proinflamatorio. Esta característica podría ser abordada en trabajos posteriores.

8 CONCLUSIONES

Se logró producir Ts2-CysPrx con alto grado pureza y libre de LPS a partir de 500 mL de medio de cultivo bacteriano.

Se logró la obtención de macrófagos J774.1 activados M1 y M2, a partir de la estimulación *in vitro* de macrófagos J774.1 naive con 100 ng de IFN- γ y 30 ng de LPS, y 50 ng de IL-4 respectivamente.

La estimulación de macrófagos J774.1 con la Ts-2CysPrx induce la expresión de genes asociados a macrófagos tipo M1 la producción de la citocina proinflamatoria IL-12. Características que podrían dirigir al establecimiento de una respuesta TH1-protectora.

LITERATURA CITADA

Becerra-Díaz, M. & Terrazas, L.I., 2014. *Taenia crassiceps* infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . International Journal for Parasitology, 44(9), pp.613–623. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.012>.

Callahan, H. L., Crouch R. K., James E. R., 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? Parasitology Today, 4(8), pp. 218–225.

Cohly, H. 2001., Cell culture conditions affect LPS inducibility of the inflammatory mediators in J774A.1 murine macrophages. Immunological investigations, 30(1), pp.1–15.

Cha, M.-K., Suh, K.-H. & Kim, I.-H., 2009. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma. Journal of experimental & clinical cancer research 28, pp.93.

Doyle, A.G., Herbein G, Montaner L.J., Minty A.J., Caput D., Ferrara P. and Gordon S.,1994. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. Eur J Immunol 24, pp.1441-5.

Donnelly, S., Neill S. M. O., Sekiya M., Dalton J. P. and Mulcahy, G., 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* Induces the alternative activation of macrophages .Infection and Immunity 73(1), 166–173.

Donnelly, S., Stack M. C., Neill S. M. O, Sayed A. A., Williams D.L. and Dalton P. J., 2008.Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. FASEB Journal 22, 4022-4032.

Espinoza-Jiménez, A., De Haro, R. & Terrazas, L.I., 2017. *Taenia crassiceps* Antigens Control Experimental Type 1 Diabetes by Inducing Alternatively Activated Macrophages. Mediators of Inflammation, 2017, pp.1–15. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/8074329/>.

Furuta, T., 2008. Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like receptor 4 by malarial peroxiredoxin. *European Journal of Immunology*, 38(5), pp.1341–1350.

Geng, L.X., 2017. Inhibition of M1 macrophage specific gene expression and promotion of M2 macrophage specific gene expression by bone mesenchymal stem cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(1), pp.750–759.

Gordon, S. and Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), pp.593–604.

Jenkins, S.J. and Allen J.E., 2010. Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Jiménez, L., 2015. Characterization of a Thioredoxin-1 Gene from *Taenia solium* and Its Encoding Product. *BioMed Research International*, 2015, pp.1–10. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/453469/>.

Joshua, A., Bornhorst J. and Falke J., 2011. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol*, 4(164).

Kawasu, S., Komaki K., Tsuji N., Kawai S., Ikenoue N., Hatabu T., Ishikawa H. and Yatsumoto Y., 2001. Molecular characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 116, pp. 73-79

Kumagai, T., Osada Y. and Kanazawa T., 2006 2 Cys peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum*: the expression profile and localization in the life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 149: 135- 143.

Lin, L. & Hu, K., 2017. Tissue-type plasminogen activator modulates macrophage M2 to M1 phenotypic change through annexin A2-mediated NF- κ B pathway. *Oncotarget*, 8(50), pp.88094–88103.

Lee, S., Kim S. M., and Lee R. T., 2013. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, no. 10, pp. 1165–1207

Loke, P., 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunology*, 3(7), pp.1–11.

Mantovani, A., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), pp.677–686.

Mehlhorn, H., 2012. *The parasites of humans 7th edn.* Springer Spektrum, Heidelberg.

Menzies, F.M., 2010. Sequential expression of macrophage anti-microbial/inflammatory and wound healing markers following innate, alternative and classical activation. *Clinical and Experimental Immunology*, 160(3), pp.369–379.

Molina-López, J., Jiménez L., Ochoa-Sánchez A., Landa A. 2006. Molecular cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Taenia solium*. *J Parasitol* 92, pp.796–802

Mosser, M.D. and Zhang X., 2008. Activation of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol*.

Mosser, D.M. & Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp.958–969.

Murray, P.J., 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1), pp.14–20

Perkins, A., 2015. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(8), pp.435–45.

Rath, M., 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5, pp.1–10.

Raes, G., 2002. Differential expression of FIZZ1 and YM1 in alternatively versus classically activated macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 71(4), pp.597–602.

Rhee, S.G. & Woo, H.A., 2011. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3), pp.781–94.

Rendon, J.L., del Arenal I.P., Guevara-Flores A., Uribe A., Placarte A., Mendoza-Hernández G. 2004. “Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (Cysticerci)”. *Mol Biochem Parasitol* 133, pp. 61-69.

Reyes, J.L. ,2009. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), pp.1115–1127.

Reyes, J.L. ,2011. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cellular Immunology*, 267(2), pp.77–87.

Riddell, J.R., 2010. Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 184(2), pp.1022–30.

Robinson, M.W., 2010. Peroxiredoxin: A central player in immune modulation. *Parasite Immunology*, 32(5), pp.305–313.

Rodriguez, S., Wilkins P. and Dorny P., 2012. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathogens and Global Health*.VOL 106 pp- 286-29

Rodriguez-Sosa, M., 2002a. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling . *The Journal of Immunology*, 168(7), pp.3135–3139.

Rodríguez-Sosa, M., 2002b. 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), pp.3656–3664.

Rhee, S.G. & Woo, H.A., 2011. Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3), pp.781–94.

Shichita, 2012. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nature Medicine*, 18(6), pp.911–917. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2749>.

Salazar-Calderon. M. , Martin-Alonso J., Ruiz de Eguino A. D. , Casais R., Marin M. y Parra F. 2000. *Fasciola hepática* heterologous expression and functional characterization of a thioredoxin peroxidase. *Exp. Parasitol* 95, pp. 63-70.

Salinas, G., Fernandez V., Fernandez C. , Selkirk M. E. 1998 “Echinococcus granulosus : cloning of a thioredoxin peroxidase. *Exp. Parasitol* 94, pp. 56-59.

Sayed, A. A. , Williams D. L. 2004. “Biochemical characterization of 2- Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni* “. *J. boil. Chem.* 279, pp.26159-26166.

Sies, H. 1993. “Strategies of antioxidants defense”. *Eur. J. Biochem* 15, pp.213-219

Stein, B.M. ,1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. , 176.

Tait-Wojno, E.D., Hunter, C.A. & Stumhofer, J.S., 2019. The immunobiology of the interleukin-12 family: room for discovery. *Immunity*, 50(4), pp.851–870.

Tanja, S., Marcelo A. C, Johannes M., Ruppert T., and Luise Krauth-Siege R.. 2007.“Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei* “*Biochem J.* 405,pp. 445–45

Terrazas, I.L., Bojalli R.,Govenzensky T. and Larralde C.1998.”Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)” *J. Parasitol.*, 84(1), 1998p. 74-81.

Terrazas, I.L., Cruz M., Rodríguez-Sosa M., García-Tamayo F. and Larralde C. 1999. "Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*, Parasitol Res 85: 135-141

Terrazas, L.I., 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. International Journal for Parasitology, 35(13), pp.1349–1358.

Ulett, G.C. et al., 2000. Cytokine Gene Expression in Innately Susceptible BALB/C Mice and Relatively Resistant C57bl/6 Mice During Infection With Virulent *Burkholderia Pseudomallei* et al. Infect Immun 68 (4), pp. 2034-2042.

Vaca-Paniagua, F., Torres-Rivera A, Parra-Unda R and Landa A. 2009. Characterization of one typical 2-Cys Peroxiredoxin gene of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. Parásitol Res 105, pp. 781-787

Vaca-Paniagua, F., Torres-Rivera A., Parra-Unda R. and Landa A 2008. "*Taenia solium* antioxidant metabolism enzymes as targets for cestocidal drugs and vaccines. Curr Top Med Chem 8, pp. 393-399.

Vega-Angeles ,V. T., Terrazas I.L., Ledesma-Soto Y., Jiménez L. and Landa A. 2019. *Taenia solium* glutathione transferase fraction activates macrophages and favors the development of Th1-type response. Biosciences Reports .

Willms, K. and Zurabian, R., 2010 "*Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models," Parasitology, Cambridge University Press, 137(3), pp. 335–346.

Terrazas, L.I. et al., 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). The Journal of Parasitology, 84(1), pp.74–81.

Terrazas, L.I. et al., 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. Parasitology Research, 85(2), pp.135–141.

Woo, H.A., 2010. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. Cell, 140(4), pp.517–528. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.009>.

Zhao, L.X., 2016. Differences in proinflammatory property of six subtypes of peroxiredoxins and anti-inflammatory effect of ligustilide in macrophages. *PLoS ONE*, 11(10), pp.1–15.

Zong, Z. et al., 2019. M1 macrophages induce PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma cells through IL-1 β signaling. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY), pp.1–12.