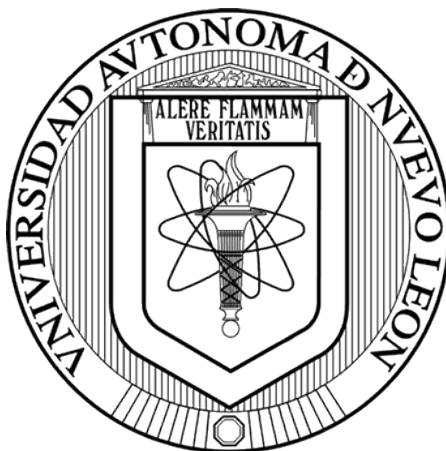


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



SERPINAS RECOMBINANTES DE *Trichinella spiralis*
COMO POSIBLES MODULADORES DE LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL A
MACRÓFAGOS M2

Por

M.C. LUIS JESÚS CORTEZ DE LA FUENTE

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA
MÉDICA

Diciembre 2022

SERPINAS RECOMBINANTES DE *Trichinella spiralis*
COMO POSIBLES MODULADORES DE LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL A
MACRÓFAGOS M2

Comisión de Tesis



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Director de Tesis



Dr. C. Rómel Hernández Bello
Co-Director de Tesis



Dr. C. Gloria María González González
Miembro de la Comisión



Dr. C. Miguel Ángel Becerril García
Miembro de la Comisión



Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez
Miembro de la Comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

SERPINAS RECOMBINANTES DE *Trichinella spiralis*
COMO POSIBLES MODULADORES DE LA DIFERENCIACIÓN TERMINAL A
MACRÓFAGOS M2

Por

M.C. Luis Jesús Cortez de la Fuente

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. José Prisco Palma Nicolás.



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó como uno de los requisitos parciales para obtener el grado de Doctor en Ciencias con orientación en Microbiología Médica, y contó con el apoyo de una beca por parte de CONACyT (CVU 557895) durante la estancia en el postgrado. También se recibió apoyo de CONACyT a través de los proyectos 238125 y 255173 del “Fondo Sectorial de Investigación para la Educación”.

DEDICATORIAS

A mi padre **Luis Lorenzo Cortés Tejeda**, quien me enseñó a confrontar cualquier desafío, a seguir siempre un camino de rectitud y a nunca darme por vencido. Su ejemplo y sus enseñanzas siempre estuvieron presentes en el desarrollo de este trabajo. A mi madre **Lidia Gloria de la Fuente Martínez**, quien me brindó su apoyo incondicional, su cariño, y sus consejos. Siempre estuvo presente en los momentos más críticos y sus palabras de aliento permitieron levantarme en los días más oscuros. A mi hermana **Lidia Gloria Cortez de la Fuente**, quien me estuvo acompañando a la distancia durante todo este tiempo. Su gran afecto y sus invaluable consejos me convirtieron en un mejor hermano y una mejor persona.

Al **Dr. C. José Prisco Palma Nicolás**, quien me mostró los desafíos a los que se tiene que enfrentar un investigador, pero sobretodo el despertar de la curiosidad por aquellas preguntas que aún no tienen respuesta y la búsqueda interminable por contestar dichos cuestionamientos. También agradezco el haber tenido mucha perseverancia en el proyecto, siempre que se presentaban obstáculos, encontraba formas ingeniosas para resolverlo. Espero en el futuro aplicar sus enseñanzas. Al **Dr. C. Rómel Hernández Bello**, por sus consejos y siempre estar abierto para cualquier duda que pudiera surgir en la realización de este proyecto. También agradezco el que me haya ayudado a encontrar una estancia en donde alojarme. Sin su apoyo no habría manera de poder continuar con el programa. A la **Dra. C. Gloria González González**, por haberme abierto las puertas al Departamento de Microbiología. El 15 de abril del 2013 marcó un punto de inflexión en mí vida, en donde se forjaron las bases de mi carrera profesional, tanto en la

investigación como en la docencia, encontrando un gusto por la búsqueda de nuevo conocimiento y en transmitirlo a las nuevas generaciones. Estoy orgulloso y muy agradecido por haber pertenecido al Departamento de Microbiología. A los **Dr. C. Miguel Ángel Becerril** y **Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez**, de quienes recibí mucho conocimiento y siempre estuvieron ahí cuando necesitaba de algún consejo. Al **Dr. C. Gerardo García González**, de quién además de mostrarme todo lo relacionado con los protocolos experimentales y los fundamentos teóricos detrás de cada experimento, obtuve su valiosa amistad.

A todos mis amigos y compañeros que conocí a lo largo de mi estancia en el doctorado, por haber recorrido este largo camino conmigo y hacer las jornadas de trabajo en el laboratorio muy amenas: **Gerardo, Orlando, Martín, Caro, Felipe, Luis, Juan, Anita, Mimi, Liz, Liz, Liz, Joan, Brenda, Sergio, Oscar y Gabriel.**

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Súper familia de las serpinas	1
1.2 Estructura y mecanismo de inhibición de las serpinas	2
1.3 Función de las serpinas como factores de virulencia	4
1.4 Serpinas como factores de virulencia en los parásitos	6
1.5 Características del género <i>Trichinella</i>	9
1.5.1 Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i>	10
1.5.2 Enfermedad clínica de la Triquinelosis	11
1.5.3 Proteínas funcionales de <i>Trichinella spiralis</i>	11
1.5.4 Interacciones con el sistema inmunológico	13
1.5.5 Mecanismos de modulación	15
1.5.6 Manipulación de las células dendríticas	16
1.5.7 Manipulación de las células B reguladoras	18
1.5.8 Manipulación de los macrófagos	18
2. ANTECEDENTES.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo General	25
5.2 Objetivos Específicos	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
6.1 Bioética y seguridad	26
6.2 Búsqueda de serpinas anotadas en el genoma de <i>Trichinella spiralis</i>	27
6.3 Obtención de <i>Trichinella spiralis</i> en diferentes estadios	27
6.4 Obtención del extracto crudo y los antígenos de E/S de <i>Trichinella spiralis</i>	28
6.5 Determinación de la concentración de proteínas.....	29
6.6 Extracción de ARN total de <i>Trichinella spiralis</i>	29
6.7 Oligonucleótidos empleados en el estudio	30

6.8 Síntesis del ADN complementario	31
6.9 Amplificación de los transcritos Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570.....	32
6.10 Purificación de los insertos.....	33
6.11 Digestión de los insertos con las enzimas de restricción <i>Xho</i> I y <i>Not</i> I.....	34
6.12 Extracción del plásmido pPICZ α A.....	35
6.13 Digestión del vector pPICZ α A con las enzimas de restricción <i>Xho</i> I y <i>Not</i> I.....	36
6.14 Purificación de los plásmidos.....	36
6.15 Ligación del inserto y el vector	38
6.16 Generación de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α con electrocompetencia	38
6.17 Transformación de los vectores recombinantes en <i>Escherichia coli</i> DH5 α	39
6.18 Extracción de los vectores recombinantes por medio de lisis alcalina.....	40
6.19 Caracterización de los vectores recombinantes con enzimas de restricción	41
6.20 Linearización de los vectores recombinantes con <i>Sac</i> I.....	42
6.21 Generación de células de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H con electrocompetencia	43
6.22 Transfección de levaduras de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H con los vectores recombinantes.....	44
6.23 Extracción de ADN genómico de las clonas de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	45
6.24 Caracterización de las clonas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H por PCR	46
6.25 Análisis por secuenciación de las clonas de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H recombinantes.....	47
6.26 Fermentación de las cepas de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H recombinantes	48
6.27 Dializado de los sobrenadantes	49
6.28 Precipitación de proteínas por el método Metanol/Cloroformo	49
6.29 Caracterización de la serpina recombinante por medio de SDS PAGE y WB.....	49
6.30 Purificación de la serpina recombinante por cromatografía de afinidad a níquel	52
6.31 Desalado de las proteínas recombinantes por columnas de sefadex	53
6.32 Producción de suero policlonal anti-serpina recombinante.....	53
6.33 Adsorción del suero anti-serpina recombinante	54
6.34 Análisis de la reactividad del suero anti-serpina por <i>Dot Blot</i>	54
6.35 Localización de la serpina nativa en diferentes estadios del parásito	55
6.36 Ensayo de actividad bioquímica contra Tripsina.....	57

6.37	Ensayo de diferenciación de macrófagos en monocitos de la línea celular THP-1..	57
6.38	Ensayo de viabilidad celular.....	59
6.39	Cuantificación de citocinas por ELISA.....	59
6.40	Ensayo de inmunofluorescencias	60
6.41	Análisis estadísticos	61
7.	RESULTADOS.....	62
7.1	Análisis de las serpinas anotadas Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 del genoma de <i>Trichinella spiralis</i>	62
7.2	Síntesis del ADN complementario	64
7.3	Amplificación de los transcritos Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570.....	65
7.4	Clonación del transcrito Tsp_01570 en <i>Escherichia coli</i> DH5 α	68
7.5	Caracterización de los vectores recombinantes.....	71
7.6	Transfección de la construcción Tsp_01570/pPICZ α A en <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	73
7.7	Genotipificación de las clonas de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H recombinantes.....	75
7.8	Análisis por secuenciación de Sanger de las clonas de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H recombinantes.....	76
7.9	Evaluación del crecimiento de las clonas de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H recombinantes.....	79
7.10	Caracterización de la serpina Tsp_01570 recombinante por medio de SDS PAGE y WB.....	80
7.11	Efecto del pH en la producción de la serpina Tsp_01570 recombinante	82
7.12	Análisis de la reactividad del suero anti-serpina por <i>Dot Blot</i>	83
7.13	Localización de la serpina nativa en diferentes estadios del parásito	83
7.14	Efecto bioquímico de la serpina Tsp_01570 recombinante contra la Tripsina	84
7.15	Efecto biológico de la serpina Tsp_01570 recombinante en monocitos de la línea celular THP-1	85
7.16	Efecto biológico de la estimulación con la serpina Tsp_01570 recombinante en la secreción de citocinas	87
7.17	Efecto biológico de la estimulación con la serpina Tsp_01570 recombinante en la expresión de marcadores M1 y M2	88
8.	DISCUSIÓN	91
9.	CONCLUSIÓN.....	96

10. REFERENCIAS..... 97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especies y genotipos que componen el género <i>Trichinella</i>	9
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio.....	30
Tabla 3: Controles experimentales empleados para la electroporación de <i>Escherichia coli</i> DH5 α	40
Tabla 4: Controles experimentales empleados para la electroporación de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H.....	45
Tabla 5: Estímulos utilizados para el ensayo de diferenciación de células THP-1.....	59
Tabla 6: Diluciones de anticuerpos y rango de concentración para la curva de calibración de los ELISA.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura y diferentes conformaciones de las serpinas en la interacción con proteasas de serina.....	4
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	10
Figura 3: Esquema de inmunización con la serpina Tsp_01570 recombinante.....	53
Figura 4: Análisis filogenético de los inhibidores de proteasas de serina de <i>Trichinella spiralis</i>	63
Figura 5: Predicción de dominios de la súper familia de las serpinas.	63
Figura 6: Alineamiento del dominio RCL de las serpinas anotadas.....	64
Figura 7: Amplificación por PCR de la subunidad 18S del ARN ribosomal de <i>Trichinella spiralis</i>	64
Figura 8: Representación de la secuencia codificante completa y traducción del transcrito del gen Tsp_00173.....	65
Figura 9: Representación de la secuencia codificante completa y traducción del transcrito del gen Tsp_00174.....	66
Figura 10: Representación de la secuencia codificante completa y traducción del transcrito del gen Tsp_01570.....	67
Figura 11: Amplificación de los transcritos Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570.....	67
Figura 12: Estrategia de clonación de la serpina Tsp_01570 en el plásmido pPICZ α A. ...	69
Figura 13: Reacción de digestión en simultáneo con las enzimas de restricción <i>Xho</i> I y <i>Not</i> I.....	69
Figura 14: Clonación del transcrito Tsp_01570 en <i>Escherichia coli</i> DH5 α	70
Figura 15: Tamizaje del ADN plasmídico de las clonas de <i>Escherichia coli</i> DH5 α recombinantes	72
Figura 16: Verificación de las clonas recombinantes de <i>Escherichia coli</i> DH5 α por ensayos de restricción.	72
Figura 17: Linearización de la construcción Tsp_01570/pPICZ α A con la enzima de restricción <i>Sac</i> I.....	74
Figura 18: Transfección de la construcción Tsp_01570/pPICZ α A en <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	74
Figura 19: Caracterización de las clonas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H .	75

Figura 20: Alineamiento de la secuenciación del casete de expresión Tsp_01570/AOX1 variante contra el transcrito Tsp_01570 de referencia	76
Figura 21: Cinética de crecimiento de las clonas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	80
Figura 22: Caracterización de la serpina Tsp_01570 recombinante por SDS PAGE y WB	81
Figura 23: Expresión de la serpina Tsp_01570 recombinante a diferentes pHs.....	82
Figura 24: Ensayo de <i>Dot Blot</i> para determinar la reactividad del anti-suero policlonal contra la serpina Tsp_01570 recombinante.....	83
Figura 25: Localización de la serpina Tsp_01570 nativa en diferentes fases de <i>Trichinella spiralis</i>	83
Figura 26: Determinación de la actividad inhibitoria de la serpina Tsp_01570 recombinante contra la Tripsina.....	84
Figura 27: Caracterización del perfil inhibitorio de la serpina Tsp_01570 recombinante .	85
Figura 28: Análisis de viabilidad celular en monocitos de la línea celular THP-1 estimulados con la serpina Tsp_01570 recombinante.....	86
Figura 29: Efecto de la estimulación de células THP-1 con la serpina Tsp_01570 recombinante en la secreción de citocinas	87
Figura 30: Efecto de la estimulación de células THP-1 con la serpina Tsp_01570 recombinante en la expresión de marcadores M1	89
Figura 31: Efecto de la estimulación de células THP-1 con la serpina Tsp_01570 recombinante en la expresión de marcadores M2	90

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AAM	Macrófagos activados de forma alternativa
ACT	Alfa-1 anti-quimotripsina
Ad	Fase Adulto
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
ADNp	ADN plasmídico
AOX1	Alcohol Oxidasa 1
Arg-1	Arginasa-1
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNasa	Nucleasa de ARN
AT	Anti-trombina
BApNA	N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida
BCA	Ácido Bicinconínico
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
BMGY	Búffer Mínimo con Glicerol e Histidina
BMMY	Búffer Mínimo con Metanol e Histidina
C1INH	Inhibidor de la esterasa C1
CAM	Macrófagos Activados Clásicamente
CBP1	Proteína de Unión a Calcineurína 1
CD	Célula dendrítica
CD	Clúster de diferenciación
CDS	Secuencia Codificante Completa
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio
DAMP	Patrones MOleculares Asociados a Daño
DAPI	4', 6-diamino-2-fenil dihidroclorado
DNTPs	Desoxinucleotidos Trifosfato
DO	Densidad Óptica

E/S	Excreción/Secreción
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
F	Oligonucleótido en dirección "sentido"
FcR	Receptor del Factor cristalizante
g	Gravedades
HCII	Cofactor II de Heparina
HCl	Ácido Clorhídrico
HRP	Peroxidasa de Rábano
ICAM-1	Moléculas de Adhesión Intercelular-1
IFN-γ	Interferón gama
IL	Interleucina
IRF-4	Factor Regulador de Interferón 4
KCl	Cloruro de Potasio
kDa	KiloDaltón
KLF	Factor Tipo Kruppel
LB	Luria Bertani
LM	Larva Muscular
LN	Libre de nucleasas
M	Molaridad
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
MHC-II	Complejo de Histocompatibilidad Mayor tipo II
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	MiliMolar
M-MLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
MWCO	Punto de Corte de Peso Molecular
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NIH	Instituto Nacional de Salud
NO	Óxido Nítrico

NPV	Virus de Poliedrosis Nuclear
OVA	Ovalbúmina
PAI-1	Inhibidor del Activador de Plasminógeno 1
PAI-2	Inhibidor del Activador de Plasminógeno 2
PBS	Búffer Salino de Fosfatos
PC	Fosforilcolina
PCI	Inhibidor de la Proteína C
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEDF	Factor Derivado del Pigmento Epitelial
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de Hidrógeno
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
P-NA	p-nitroanilina
PSA	Persulfato de Amonio
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
R	Oligonucleótido en dirección "anti-sentido"
RCL	Centro Reactivo tipo Lazo
RPBI	Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rTsp_01570	Tsp_01570 recombinante
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SDS PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes
Serpina	Inhibidor de Proteasas de Serina
SFB	Suero Bovino Fetal
STAT-4/IL-12	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 4-IL-12
TBG	Globulina de Unión a Tiroxina
TBST	Solución Salina, Tris, Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

TGF-β	Factor de Crecimiento Tumoral Beta
Th1	T cooperador 1
Th2	T cooperador 2
TLR-2	Receptor Tipo Toll 2
TLR-4	Receptor Tipo Toll 4
TMB	3, 3, 5, 5'-Tetrametilbenzidina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSLP	Linfopoyetina Estromal Tímica
TSNT	Tritón X-100, SDS, NaCl, Tris HCl, EDTA
TsTPX2	Tiorredoxina Peroxidasa-2 de <i>T. spiralis</i>
U/μL	Unidades por microlitro
UV	Ultra Violeta
WB	<i>Western Blot</i>
YNB	Base de Nitrógeno de Levadura
YPD	Extracto de Levadura Peptona Dextrosa
α1AT	Alfa-1 Anti.Tripsina
α2AP	Alfa-2 Anti-Plasmina
β-ME	Beta-Mercaptoetanol
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

M.C. Luis Jesús Cortez de la Fuente

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Número de páginas: 104

Candidato al grado de Doctorado en Ciencias con orientación en Microbiología Médica

Área de estudio: Parasitología, Biología Molecular, Inmunología

Título del estudio:

“Serpinas recombinantes de *Trichinella spiralis* como posibles moduladores de la diferenciación terminal a macrófagos M2”

Propósito y método de estudio: Las serpinas representan una de las súper familias más diversa de inhibidores de proteasas de serina. Se encuentran virtualmente en todos los organismos y a pesar de su gran complejidad, juegan un papel importante en el control de la homeostasis como los procesos de coagulación, inflamación, fibrinólisis, respuestas inmunológicas, condensación de cromatina, supresión de tumores y apoptosis. Recientemente, ha sido de gran interés la búsqueda de serpinas como factores de virulencia en los parásitos. Dentro de los helmintos, *Trichinella spiralis* es uno de los pocos parásitos con una fuerte habilidad para inducir un efecto modulador en la respuesta inmune del hospedero. Estudios previos en *Trichinella* demuestran que las serpinas se expresan diferencialmente en determinadas etapas del parásito. Cobra mayor relevancia la serpina de *T. pseudospiralis*, ya que altera la polarización de los macrófagos *in vitro*, lo que podría significar la relevancia de las serpinas, en los procesos de modulación de la respuesta inmune. En este trabajo se expresó la serpina putativa Tsp_01570 de *T. spiralis* en el sistema eucariótico de *Pichia pastoris* SMD1168H, se evaluó su presencia en las distintas fases del parásito, encontrándola en el extracto crudo de la fase de adulto y se determinó su actividad bioquímica como contra la tripsina. También se probó el efecto de la serpina recombinante en las células THP-1 al cuantificar las citocinas secretadas IL-12p40, TNF- α , IL-4 e IL-10 por ELISA. También se evaluó la expresión de los marcadores M1: CCRT, CD86, y los marcadores de M2: CD163 y CD206 por inmunofluorescencia.

Conclusiones y contribuciones: Se produjo de forma recombinante la serpina Tsp_01570 de *Trichinella spiralis* en la levadura *Pichia pastoris* SMD1168H. La serpina nativa fue localizada en el extracto total de la fase adulto del parásito, por lo que podría tener algún rol en el desarrollo del parásito. No se encontró actividad inhibitoria contra la tripsina y no se observó ningún efecto modulador al usar la serpina recombinante como estímulo en la polarización de las células THP-1.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Súper familia de las serpinas

Las serpinas pertenecen a una de las súper familias más extensa y variada de inhibidores de proteasas de serina^[1]. Los genes que codifican este tipo de inhibidores se han logrado identificar virtualmente en todos los dominios. A diferencia de los eucariotas, los cuales cuentan con una gran cantidad de genes de serpinas^[2], en los procariotas estos se encuentran poco distribuidos y en la mayoría de los casos cuentan con un solo gen^[3]. El nombre serpina, proviene del acrónimo en inglés *serpin* para inhibidor de proteasa de serina (*serine protease inhibitor*), debido a que fue la primera función descrita para esta súper familia. Sin embargo, no es la única. Existen serpinas con la capacidad para inhibir a las caspasas^[4] y proteasas de cisteína tipo papaína^[5]. Incluso, se han descrito serpinas cuyas funciones son ajenas a la inhibición de proteasas, como es el caso de los transportadores hormonales^[6], chaperonas^[7] o supresores de tumores^[8].

Un estudio filogenético de esta súper familia las clasifica en 16 clados, y las designa con el código SERPIN**Xn**, siendo **X** el clado y **n** el número de serpina correspondiente a ese clado^[1]. Dentro del clado **A** se encuentran las serpinas tipo anti-tripsina y son secretadas al exterior de las células^[9]. El clado **B** está constituido por serpinas intracelulares, incluyendo a las ovoserpinas, las cuales se consideran más ancestrales que las serpinas extracelulares^[1]. Los miembros de esta división tienen una C

y N terminal más cortos que los del clado **A**, y carecen de un péptido señal^[2]. El clado **C** solo lo constituye SERPINC1, más conocida como anti-trombina, con capacidad para inhibir los factores de coagulación IX y X^[10]. El clado **D** está integrado por SERPIND1, una proteína extracelular conocida como cofactor II de heparina y con capacidad para inhibir la trombina^[11]. El clado **E** lo conforman SERPINE1, también llamado inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y con actividad inhibitoria para trombina, la SERPINE2, la cual es una nexina derivada de la glía, y la SERPINE3, de función desconocida. Las serpinas SERPINF1, también llamado factor derivado del pigmento epitelial (PEDF) y un ejemplo de serpina no inhibitoria con capacidad para regular la angiogénesis, y SERPINF2, la anti-plasmina- α -2 con capacidad inhibitoria de fibrinólisis, componen el clado **F**. El clado **G** está constituido por SERPING1, un inhibidor de esterasa del complemento I^[12]. El clado **H** está representado por la proteína de choque térmico HSP47, no tiene ningún efecto inhibitorio pero actúa como chaperona del colágeno^[13]. El clado **I** lo conforman dos neuroserpinas (NS). SERPINI1 es una serpina inhibidora de plasmina^[14]. Por otro lado, SERPINI2 tiene una función hasta el momento desconocida. Las serpinas comprendidas entre los clados **A** e **I** corresponden a las del humano y el ratón (*Mus musculus*). Por su parte, los clados **J**, **K**, **L**, **M**, **N**, **O** y **P** están conformados por las serpinas de la cacerola de mar, insectos, **nematodos**, esquistosomas, serpinas virales 1 y 2, serpina viral 3 y de las plantas respectivamente^[1].

1.2 Estructura y mecanismo de inhibición de las serpinas

La secuencia aminoacídica de una serpina nativa consta de aproximadamente 400 residuos, esta se pliega para formar un dominio helicoidal en el extremo N terminal, y un dominio barril- β en el extremo C terminal^[15]. Los dos principales rasgos de la estructura

de la serpina relacionados con la función inhibitoria son las 5 láminas β centrales que conforman el dominio barril- β y el centro reactivo tipo lazo (RCL) que también se encuentra presente en otros inhibidores de proteasas, con la diferencia que en las serpinas, este motivo se encuentra constituido por aproximadamente 20-24 residuos, es flexible y se asemeja al domino tipo lazo presente en el sustrato^[16](**Figura 1A**). Cuando ocurre una escisión en el enlace peptídico de los aminoácidos P1 y P1', se desencadena un cambio en la conformación de la serpina, lo que se traduce en la incorporación del RCL como la hebra 4 del dominio de las láminas β , pasando de una conformación meta-estable a una híper-estable^[17](**Figura 1B**). Esta característica es importante en la clasificación de las serpinas, ya que permite distinguir a las que tienen la capacidad inhibitoria, como es el caso de la α -1 anti-tripsina (α 1AT), de las no inhibitorias como la ovoalbúmina (OVA)^[18]. La incorporación del RCL al dominio de láminas β sugiere la estabilización de la conformación de la serpina al formar un complejo con la proteasa, lo cual se ha evidenciado por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS PAGE)^[19]. A su vez, estudios de fluorescencia encontraron que en el complejo α 1AT-tripsisina, la proteasa se encontraba por debajo de la serpina, unida a esta de manera covalente por el residuo catalítico Ser195 de la proteasa y el grupo carbonilo del residuo P1 de la serpina, formando así un enlace tipo éster^[15](**Figura 1C**). Este complejo es irreversible, haciendo al complejo susceptible a degradación por ubiquitinación, por lo que a las serpinas también se les suele denominar “trampas suicidas”.

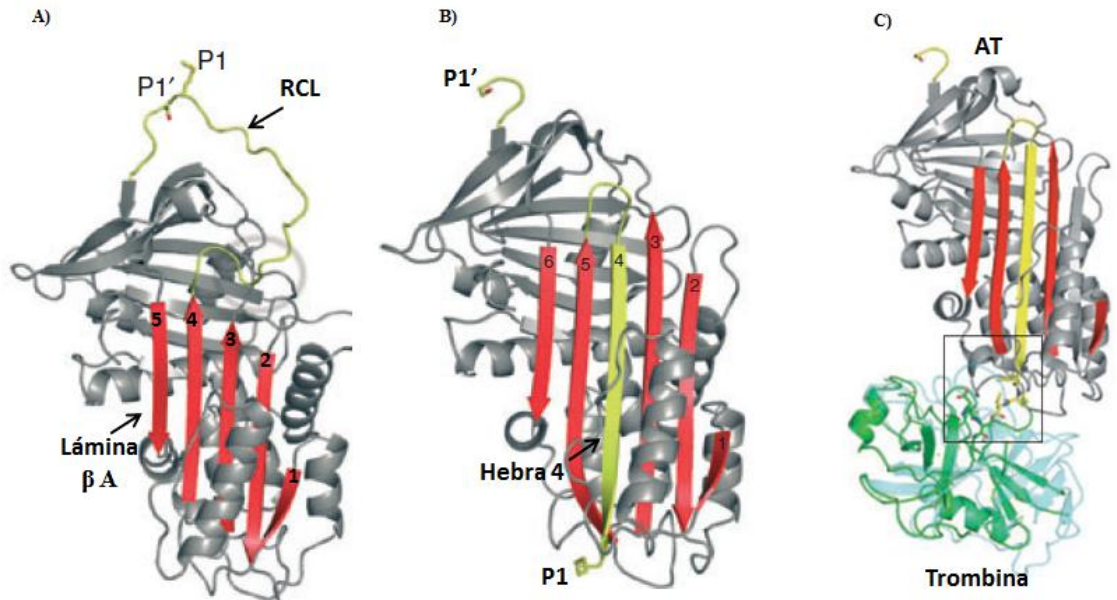


Figura 1: Estructura y diferentes conformaciones que adoptan las serpinas al interactuar con una proteasa de serina. (A) Serpina nativa en conformación meta-estable. (B) Cuando el enlace peptídico P1-P1' es escindido, el RCL se inserta en el dominio de láminas β , cambiando la estructura a una conformación híper-estable. (C) La interacción entre la serpina y la proteasa de serina forma el complejo Proteasa-Serpina, en el cual se forma un enlace covalente tipo éster, este proceso es irreversible.

1.3 Función de las serpinas como factores de virulencia

Con base en su capacidad para inhibir la actividad enzimática de las proteasas, las serpinas se pueden clasificar como inhibidoras y no inhibidoras. Dentro de las serpinas no inhibidoras, se encuentra la globulina de unión a corticoesteroides (CBG)^[20] y la globulina de unión a tiroxina (TBG)^[21], los cuales se unen a hormonas para que estas lleven a cabo su función. Otras, como la Angiotensina, funcionan como precursores hormonales^[22]. La proteína de unión a calcineurina 1 (CBP1), actúa como chaperona^[23]. Por otro lado, las serpinas inhibidoras participan en procesos que permiten mantener la homeostasis en el organismo. Como ejemplo se tienen las serpinas α 1AT^[24] y alfa-1 anti-quimotripsina (ACT)^[25] que regulan los procesos inflamatorios, Megsina^[26] y Maspina^[27] en el desarrollo y maduración celular, α 1AT^[28] y ACT^[29] en el remodelado de la matriz extracelular, Anti-trombina (AT)^[30], el inhibidor de la proteína

C (PCI)^[31], el PAI-1^[32] y el cofactor II de Heparina (HCII)^[33] en la coagulación, PAI-1^[34], PAI-2^[35], alfa-2 anti-plasmina (α 2AP)^[36] y NS^[37] en la fibrinólisis, y el inhibidor de la esterasa C1 (C1INH)^[38] en la respuesta inmune.

En los últimos años, se ha puesto un mayor énfasis en el estudio de las funciones de las serpinas en cuanto a las infecciones, esto debido al descubrimiento y caracterización de nuevas serpinas de patógenos. Las serpinas derivadas de estos organismos pueden facilitar su propagación en el hospedero o aumentar sus probabilidades de supervivencia. Son varios los ejemplos en los cuales las serpinas de los patógenos participan como factores de virulencia, ya sea en la inhibición de proteínas pro-inflamatorias o de sus células efectoras, o la disrupción de la apoptosis de la célula huésped.

Las serpinas virales juegan un papel importante en la supervivencia y patogenicidad de los virus en las células infectadas. En el virus mixoma, se identificaron las serpinas SERP1, SERP2 y SERP3 como responsables de su virulencia^[39]. También se han identificado en los virus *orthopox*, nombradas como SPI-1, SPI-2 y SPI-3^[40]. Es importante resaltar que en la posición P1 de las serpinas SERP2 y SPI-2 se encuentra un residuo de aspartato, por lo que sus blancos potenciales son las caspasas y la granzima B^[41]. Recientemente se identificó la serpina Hesp018 del virus de poliedrosis nuclear (NPV). Estudios han demostrado su posible participación en la interrupción de la apoptosis, al observar un aumento en la producción viral en células Sf9 de insecto^[42].

También se han encontrado serpinas en bacterias, relacionadas con la supresión de proteasas pro-inflamatorias. *Tannerella forsythia* secreta una serpina denominada miropina, la cual inhibe de manera irreversible endopeptidasas de tipo serina y cisteína

del hospedero, contribuyendo a la periodontitis crónica^[43]. Otras dos serpinas, nombradas como siropina-1 y siropina-2, fueron aisladas de bacterias comensales del tracto gastrointestinal humano, y se encontró que inhiben a la elastasa de neutrófilos y la proteinasa-3, asociadas con la enfermedad intestinal crónica humana^[44].

1.4 Serpinas como factores de virulencia en los parásitos

Los parásitos son organismos que viven a expensas de su hospedero. Es fundamental la evasión de la respuesta inmunológica por parte del parásito, así como su invasión en los diferentes nichos para completar su ciclo de vida. Se ha encontrado que las serpinas juegan un papel importante en las interacciones parásito-hospedero, facilitando su propagación y su sobrevivencia.

La serpina EgAgB, una proteína altamente inmunogénica producida por las larvas de *Equinococcus granulosus*^[45], se aisló y caracterizó la subunidad de 12kDa, la cual inhibió la actividad de la elastasa porcina, teniendo así un probable rol en la evasión del sistema inmunológico del huésped^[46]. A partir de oncoesferas de *E. multilocularis* se clonó una serpina, la cual se designó como serpin^{Emu}^[47]. Los ensayos de inhibición demostraron que tenía capacidad para inhibir la tripsina de mamífero y la elastasa pancreática, evadiendo así su eliminación por estas enzimas digestivas. En *Schistosoma haemobotium* se produjo una proteína recombinante a partir de la clona SHW 4-2, con una secuencia de aminoácidos muy similar a la de la súper familia de las serpinas^[48]. El análisis reveló una alta similitud con las nexinas de la glía, las cuales tienen como blancos a la trombina, por lo que podrían tener un rol en la coagulación de la sangre^[49]. La obtención de su estructura cristalizada demostró que esta serpina forma un complejo con la tripsina humana, lo que podría sugerir una forma de evasión del sistema

inmunológico al ocultar la parte más inmunogénica de la molécula^[50]. A partir de extractos del adulto de *S. mansoni* se identificó la serpin Smpi56^[51]. Los ensayos de inhibición demostraron que bloqueaba la actividad de la elastasa de neutrófilos humanos. Se encontró un homólogo de la contrapsina de ratón en *S. mansoni* que reacciona de forma específica contra las proteasas de tipo tripsina^[52]. Al igual que con Smpi56, forma un complejo que podría conferirle a la molécula evasión contra el sistema inmunológico. En *S. japonicum* se caracterizó la serpin Sj, la cual es una proteína localizada en el tegumento de los adultos y en la fase de cercaria^[53]. Se inmunizaron ratones con esta serpin, y se encontró que les confirió protección contra el parásito, por lo que se sugiere que la serpin podría tener un papel importante en la modulación del sistema inmunológico. En el parásito *Clonorchis sinensis* se caracterizaron dos serpinas. La expresión de CsproSERPIN fue mayor en la etapa de metacercaria, lo que sugiere un rol en el desenquistamiento presente en este estadio^[54]. Por otro lado, la expresión de CsSERPIN mostró un mayor incremento en la fase de adulto y en los huevos^[55]. Además de su expresión, esta inhibió a la quimotripsina. Debido a su localización en los huevos uterinos, podría estar involucrada en el desarrollo y la maduración dentro del huevo al modular las proteasas endógenas del parásito. En *Paragonimus westermani* se encontró y caracterizó una serpin^[56]. Los análisis de expresión indicaron que se expresó en todos los estadios del parásito, con un ligero incremento en los transcritos de la fase de metacercaria. Los ensayos de inhibición mostraron actividad contra la tripsina porcina, quimotripsina bovina y la trombina humana, lo que sugiere un rol en la regulación de las proteasas de serina endógenas. Se han logrado identificar y caracterizar dos genes que codifican para serpinas en la filaria *Brugia malayi*, designados como Bm-SPN-1^[57] y Bm-SPN-2^[58]. La expresión de Bm-

SPN-1 está presente en todas las fases del parásito. Además, se demostró que la serpina era inmunogénica en jerbos, siendo reconocida por el suero de estos animales previamente inmunizados, lo que sugiere un rol en la sobrevivencia del parásito dentro del hospedero. Por otro lado, Bm-SPN-2 se expresó de forma específica en la fase de microfilaria. Esta proteasa mostró un efecto inhibitorio contra las proteasas elastasa y catepsina G de manera específica y dependiente de su concentración. En otro estudio, se infectaron ratones con la microfilaria de *B. malayi* y se montó una respuesta tipo Th1 fuerte pero breve y específica para Bm-SPN-2, además de un incremento en la producción de INF- γ ^[59]. Estos resultados sugieren que una de las funciones de esta serpina es la de neutralizar la catepsina G, contribuyendo a la longevidad y patogenicidad de la microfilaria en el torrente sanguíneo. La serpina del parásito *Haemonchus contortus* Hc-serpin fue identificada y caracterizada, mostrando actividad contra la tripsina y prolongó el tiempo de la coagulación en la sangre de conejo *in vivo* ^[60]. Se identificó la serpina TvSERP de *Trichostrongylus vitrinus* ^[61]. El análisis por inmunoblot reveló que se expresa en todas las fases del parásito, formando complejos con otras proteínas endógenas, lo que sugiere un rol en la regulación de las proteasas del propio parásito. Por otra parte, los ensayos de inhibición de proteasas demostraron que no solo tiene un efecto inhibitorio en las proteasas endógenas, sino también en las producidas por el hospedero como las proteasas de mastocitos. Estos resultados indican un posible papel por parte de esta serpina en la regulación de las proteasas endógenas de *T. vitrinus*, así como la modulación de la respuesta inmune del hospedero al inhibir la actividad de las proteasas de serina de las células inflamatorias.

Las serpinas, además de participar en la regulación de la homeostasis al inhibir las proteasas endógenas, adquieren un rol muy importante cuando se establece una

relación hospedero-patógeno, ya que al tener un efecto sobre proteasas del huésped, las serpinas le confieren al organismo parásito una nueva estrategia como factor de virulencia. Además de los ejemplos ya mencionados, es relevante puntualizar como las serpinas podrían participar en el establecimiento de *Trichinella spiralis*, uno de los nematodos de mayor importancia médica, se ha descrito a detalle su ciclo biológico y se tiene evidencia de ser un parásito con capacidad para modular la respuesta inmune.

1.5 Características del género *Trichinella*

Los nematodos que pertenecen al género *Trichinella* infectan a mamíferos, aves y reptiles. Dentro de los principales reservorios se encuentra tanto los cerdos salvajes y de ganadería (*Sus scrofa*), la rata común, armadillos, gatos, perros y una gran variedad de carnívoros silvestres. Una característica interesante de este género es la alternancia en su ciclo biológico, el cual se puede dividir en una fase entérica y una fase muscular. El género comprende once especies (**Tabla 1**), los cuales constituyen dos clados: las especies que producen cápsula de colágeno en la célula nodriza y las que no^[62].

Tabla 1: Especies y genotipos que componen el género *Trichinella*

Encapsuladas	No encapsuladas
<i>T. britovi</i>	<i>T. pseudospiralis</i>
<i>T. murreli</i>	<i>T. papuae</i>
<i>T. nativa</i>	<i>T. zimbabwensis</i>
<i>T. nelsoni</i>	
<i>T. spiralis</i>	
<i>Trichinella T6</i>	
<i>Trichinella T8</i>	
<i>Trichinella T9</i>	

Trichinella spiralis ha sido la causa más importante de triquinelosis en humanos y se encuentra en el clado de las especies encapsuladas. La inducción de la capsula de colágeno en la célula nodriza podría reflejar una ventaja evolutiva con respecto a las especies no productoras, lo que le permite su establecimiento en el hospedero.

1.5.1 Ciclo biológico de *Trichinella spiralis*

Se podría considerar a *T. spiralis* como un nematodo pequeño: las hembras adultas miden de 1.4 a 4 mm, los machos adultos de 1.4 a 1.8 mm y las larvas musculares 1 mm. El ciclo biológico (**Figura 2**) comienza con la fase entérica, cuando una persona (u otro animal) ingiere carne contaminada con la larva muscular (LM) enquistada.

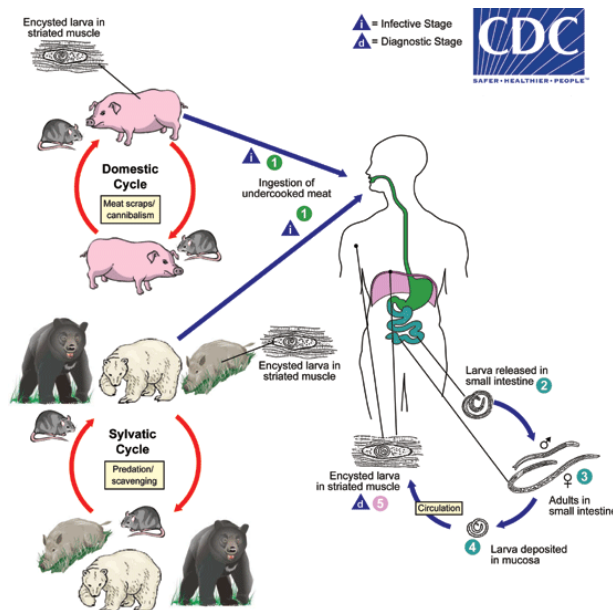


Figura 2: Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. La forma más común de infección es la ingesta de carne de cerdo contaminada con larvas musculares (LM). Las LM se liberan en el intestino delgado del hospedero, donde maduran y se reproducen. Posteriormente, las larvas recién nacidas (LRN) migran al tejido muscular.

El jugo gástrico (HCl y pepsina) disuelve la cápsula y libera la LM, la cual pasa al intestino delgado^[63]. Después de mudar 4 veces, la LM madura hasta convertirse en

adulto (Ad). Luego de la cópula, las hembras producen cerca de 500 a 1,500 larvas recién nacidas (LRN) antes de su expulsión por el sistema inmunológico. Las LRN atraviesan los tejidos para llegar a los nódulos linfáticos y al torrente sanguíneo por medio de los capilares en donde se distribuyen a varios tejidos, incluyendo las fibras musculares. En este punto inicia la fase muscular de la infección. Finalmente las LRN se desarrollan a LM, se vuelven infectivas a los 15 días y pueden permanecer en la célula nodriza por meses o incluso años.

1.5.2 Enfermedad clínica de la Triquinelosis

Los síntomas que se presentan en la infección por *T. spiralis* (tanto en los reservorios principales como en el humano) están correlacionados con las etapas de la infección (fase entérica o muscular), así como la cantidad de LM ingeridas. Los síntomas comienzan después de la ingestión de carne contaminada: diarrea, náusea, vómitos, dolor abdominal, malestar general y febrícula, esto debido a la invasión tanto de las LM y Ad a la mucosa intestinal^[64]. Ya que estos síntomas son muy similares a otros desórdenes entéricos, la fase intestinal de la Triquinelosis es muy difícil de diagnosticar. Luego de 2 a 6 meses, periodo en el que migran las LRN y comienza la infección de las células musculares, aparecen nuevos síntomas: mialgia difusa, parálisis, edema periorbital y/o facial, conjuntivitis, fiebre, cefalea, erupción cutánea, etc^[65]. Dentro de los principales factores que determinan la severidad de la enfermedad se encuentran: inmunidad del hospedero, edad, sexo e higiene^[66].

1.5.3 Proteínas funcionales de *Trichinella spiralis*

La transformación de la célula muscular a célula nodriza es iniciada por los antígenos de excreción y secreción (E/S)^[67]. Las LM de *T. spiralis* producen una gran

cantidad de proteínas biológicamente activas, pudiendo estar presentes en los antígenos de E/S. Estos productos afectan principalmente las células y diversos tejidos del hospedero, mientras que las proteínas que no se encuentran en los antígenos E/S se encargan de la regulación de los procesos endógenos del parásito^[68]. Los antígenos E/S no solo han recibido especial atención desde el punto de vista inmunológico, sino por las interacciones hospedero-parásito, ya que se asume que los parásitos intracelulares secretan proteínas funcionales que podrían alterar las células del huésped hasta un punto que facilitaría el establecimiento y la supervivencia de *T. spiralis* por un tiempo prolongado.

Dentro de los antígenos de E/S se encuentran las glicoproteínas de 43, 45 y 53 kDa, las cuales contienen tigelosa, el principal antígeno que es reconocido por el hospedero durante la infección^[69]. Se ha demostrado que estas proteínas son importantes para la transformación de la célula muscular a célula nodriza, la formación de la cápsula y el establecimiento del parásito por más tiempo^[70-72].

Entre las proteínas funcionales, las proteinasas son las que más se han estudiado. Las proteinasas secretadas por los parásitos podrían estar involucradas en procesos tales como penetración de tejidos, migración larvaria, evasión de la respuesta inmune, retardo en el proceso de coagulación, digestión, muda y degradación de la matriz celular^[73]. Dentro de los antígenos E/S de LM y de adultos se han identificado principalmente proteasas de serina y metaloproteinasas^[74]. En un estudio, se demostró que las proteinasas secretadas por la fase de Ad tenían la capacidad para degradar fibrinógeno y plasminógeno, y eran susceptibles a la acción por parte de inhibidores de proteasas del tipo serina, cisteína y aspartato^[75].

Por otro lado, se han caracterizado inhibidores de proteasas, destacando principalmente las cistatinas y las serpinas. Las cistatinas comprenden un grupo diverso de inhibidores de proteasas de cisteína, las cuales se consideran como factores moduladores cuando son secretadas por los nematodos. La expresión de este tipo de inhibidores se restringe principalmente en la fase de Ad^[76]. Es interesante señalar que este tipo de inhibidores no se encuentran presentes en los antígenos de E/S de *T. pseudospiralis*, lo que podría explicar porque la respuesta inflamatoria es menor que en *T. spiralis*, por lo que la cistatina de este último actúa como un factor pro-inflamatorio^[77]. De igual forma, se han postulado funciones a la serpinas relacionadas con la modulación y la inhibición de la respuesta inmune, pero sin ejemplos concretos en *T. spiralis* que puedan evidenciar esta afirmación^[78]. Para poder dilucidar las posibles implicaciones de las serpinas, es necesario revisar el panorama completo de *T. spiralis* y el fenómeno de la modulación de la respuesta inmunológica.

1.5.4 Interacciones con el sistema inmunológico

Cuando las larvas infectivas de *Trichinella spiralis* llegan al intestino, son detectadas por células de penacho, las cuales son activadas por los antígenos de E/S o por patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMP), por lo que comienzan a secretar citocinas como interleucina (IL)-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP)^[79]. Estas alarminas a su vez activan las células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) para liberar una variedad de citocinas como IL-5 e IL-13. La producción de IL-13 es relevante, ya que se establece un efecto de retroalimentación en el que se promueve la generación de las células epiteliales de linaje de penacho o de cáliz secretoras de IL-25^[80]. En breve, las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas

inician la respuesta inmunológica adaptativa, necesaria para la eliminación de la infección y la reparación de tejidos.

Los antígenos de E/S contienen además del arsenal de proteínas proteolíticas, productos de inmunorregulación (proteínas efectoras) que se liberan a las células de penacho y dendríticas, responsables de inducir una respuesta inmunológica predominantemente del tipo Th2^[81]. Esta polarización involucra la producción de subclases de anticuerpos específicos como IgE, IgG1 e IgG4, citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-21 e IL-33, lo cual resulta en la expansión y movilización de ciertas poblaciones celulares como células T cooperadoras, eosinófilos, basófilos, mastocitos, macrófagos y fibroblastos^[82]. La sinergia que se produce entre los diferentes tipos de células y los anticuerpos desencadenan reacciones de hipersensibilidad, las cuales se caracterizan por infiltrado celular vascular, hiper-contractibilidad del músculo liso, angiogénesis, secreción de moco por las células de cáliz y deposición de colágeno, en conjunto son estrategias defensivas contras las infecciones de helmintos^[83]. Además de la respuesta inmune a una tipo Th2, se sabe que también existe una inducción de células y mediadores de la respuesta del tipo reguladora, como las células T y B reguladoras, macrófagos activados de forma alternativa (AAM), y el factor de crecimiento transformante (TGF- β)^[84].

A diferencia de otros helmintos, *T. spiralis* destaca en que los adultos y las larvas musculares se establecen en dos nichos diferentes: el intestino delgado y el músculo esquelético respectivamente, por lo que se considera una especie bifásica. Durante la fase intestinal, hay una respuesta moderada del tipo Th1, la cual va cambiando a una respuesta tipo Th2 más robusta^[85]. La inmunidad Th2 también es modulada a nivel de músculo esquelético. La respuesta reguladora se activa para prevenir el daño al parásito

y a los tejidos del hospedero, sin embargo, este tipo de respuesta elimina los adultos, por lo que la larva muscular es la que prevalece dentro de la célula nodriza^[86].

Trichinella spiralis puede modular la respuesta del huésped mediante varios mecanismos: inducción de supresión inmunitaria, activación de linfocitos policlonales, inducción de eosinofilia en sangre y tejidos, y regulación a la baja del transductor de señal y activador de la transcripción 4-IL-12 (STAT 4/IL-12)

1.5.5 Mecanismos de modulación

Durante la triquinelosis, se ha observado supresión inmunológica en experimentos de rechazo de aloinjertos de piel, y también una respuesta reprimida contra varios antígenos no parasitarios como el virus B de la encefalitis japonesa y la toxina del cólera en modelo murino^[87]. Esta supresión es evidente durante la producción de LRN; lo que sugiere la capacidad de este estadio para liberar factores linfocitotóxicos, aún no identificados. Los componentes de los antígenos E/S derivados de *T. spiralis* pueden suprimir la respuesta a los antígenos del parásito dependientes del timo, pero no la independiente^[88]. Se demostró la supresión de la respuesta dependiente del timo del huésped contra el antígeno FCp1 de *T. spiralis*, una molécula que contiene fosforilcolina (PC). Esta inmunomodulación actúa durante las respuestas primarias y secundarias a la infección por *T. spiralis*, y está dirigida exclusivamente contra antígenos propios y no contra otros antígenos portadores de PC derivados del parásito.

Se ha observado un aumento en los niveles de IgG e IgM tanto en animales de experimentación infectados, así como en humanos. Sin embargo, la principal característica de la triquinelosis está representada por niveles elevados de IgE total, lo que podría considerarse como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune^[89].

El aumento de los eosinófilos en la sangre y los tejidos es una característica de las infecciones por helmintos y en consecuencia, de *Trichinella* spp. Sin embargo, el rol de estas células en la protección del huésped o del parásito abre el debate: si en una infección primaria los eosinófilos protegen al parásito de la activación de los macrófagos y la posterior producción de óxido nítrico (NO); en una infección secundaria, cuando los anticuerpos están presentes, es claro que actúan protegiendo al huésped pero a la vez se beneficia el parásito^[90].

Al detectar una regulación a la baja de STAT-4/IL-12^[91] se identificó a la cistatina, TsCstN, como una proteína derivada de la etapa LM de *T. spiralis*. Usando la TsCstN recombinante, se demostró que esta proteína se internaliza en los macrófagos y es capaz de alterar el *priming* de células T río abajo. El control de la respuesta de los macrófagos y sus interacciones con las células T por lo regular están coordinados por el factor de transcripción STAT-4. Los efectos de la TsCstN recombinante, derivada de LM de *T. spiralis*, se evidenciaron en la regulación negativa de la fosforilación de IL-12 y STAT-4. Esto conduciría a una supresión específica de la producción de IFN- γ , pero no de IL-17A. De esta manera, se podría suponer que el parásito podría evadir la respuesta Th1, facilitando así su establecimiento de la fase de LM.

1.5.6 Manipulación de las células dendríticas

La interacción activa de *Trichinella* y las células dendríticas (CD) sigue la tendencia habitual de los helmintos de modular la respuesta inmunitaria mediante la estimulación de las CD. Estas adquieren un fenotipo tolerogénico y parcialmente maduro tras la estimulación por antígenos de *Trichinella*^[82]. Se demostró que los antígenos aislados de las tres etapas del ciclo de vida de *T. spiralis* inducen la

maduración incompleta de las células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC), aisladas de ratas Agouti oscuras y la consiguiente polarización de la respuesta inmune hacia Th2^[92]. Además, las CD de rata estimuladas con antígeno de *T. spiralis* exhibieron una maduración incompleta con falla en la regulación positiva del complejo mayor de histocompatibilidad clase 2 (MHC-II) y una mayor expresión de los marcadores del clúster de diferenciación (CD)86 y moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)^[82]. También se ha evidenciado en experimentos *in vitro* que las CD estimuladas con los antígenos E/S de larvas musculares de *T. spiralis* inducen una fuerte respuesta Th2 después del cultivo concurrente con células T vírgenes y un patrón mixto de citocinas Th1/Th2 después del cocultivo con células T sensibilizadas con *Trichinella*^[93], similar al perfil de citocinas detectado en la infección establecida por *T. spiralis*^[94]. Así mismo, el *priming* de células T mediante la administración intraperitoneal de CD estimuladas con los antígenos E/S de LM produjo una respuesta Th1/Th2 mixta con predominio de Th2. Recientemente, se ha demostrado que la proteína de choque térmico Ts-Hsp 70 de *T. spiralis* induce respuestas inmunitarias contra la infección por *Trichinella* mediante la activación de las CD a través de los receptores tipo toll (TLR)-2 y TLR-4, ya sea *in vivo* o *in vitro*^[95]. Otra molécula descubierta, la glutatión-S-transferasa de *T. spiralis* recombinante, modifica la maduración y la función de las CD^[96]. También se ha demostrado que, bajo el efecto de los antígenos E/S de LM, las CD derivadas de células mononucleares humanas exhibieron una maduración alterada pero mantuvieron su capacidad para inducir la diferenciación de las células T, es decir, adquirieron un fenotipo tolerogénico^[92]. Esto se caracterizó por una escasa expresión del receptor del antígeno leucocitario humano D (HLA-DR), CD86 y CD83, así como una expresión moderada de CD40, además de una generación inalterada de IL-12 y una mayor

producción de las citocinas reguladoras TGF- β e IL-10, en comparación con los controles. Se ha descubierto que la capacidad de los antígenos E/S de L1 para producir CD tolerogénicas ocurre a través de la estimulación de TLR-2 y 4.

1.5.7 Manipulación de las células B reguladoras

Las células B secretoras de IL-10, inducen respuestas inmunitarias reguladoras a través de receptores de células B, CD40 y posiblemente señalización de TLRs. Las células B reguladoras (Bregs) ejercen una función reguladora mediante la secreción de TGF- β e incluso mediante la activación o reclutamiento de células T reguladoras (Tregs)^[97]. Se ha descrito en un modelo murino de esquistosomiasis, que la señalización dependiente del receptor de la fracción cristalizable (FcR) mediada por células B está implicada en la regulación a la baja de la respuesta Th2, ya que los ratones deficientes en linfocitos B o del receptor Fc exhibieron una marcada inflamación granulomatosa exacerbada^[98]. Asimismo, se encontró que las células B que expresan IL-4R α modulan a la baja la inflamación granulomatosa del tejido inducida por el huevo, lo que resulta perjudicial para el huésped al mejorar la supervivencia del parásito durante la esquistosomiasis en ratones^[99]. En cuanto a la primera evidencia de expansión de Bregs durante la infección por *T. spiralis* en ratones, se detectaron niveles elevados de IL-10 en el bazo y los ganglios linfáticos mesentéricos en los animales infectados^[100]. Además, las tasas de células Bregs productoras de IL-10 aumentaron durante la infección.

1.5.8 Manipulación de los Macrófagos

Entre los intentos de *T. spiralis* para controlar los procesos inflamatorios y el daño tisular posterior, inhibe los macrófagos activados clásicamente (CAM) y en su lugar induce los macrófagos AAM o M2. A diferencia de los CAM, los AAM no

generan NO a partir de la L-arginina, sino que producen arginasa^[101]. Los AAM se pueden identificar por la expresión de varios marcadores moleculares: la enzima arginasa-1 (Arg-1), miembros de la familia de las quitinasas (YM-1 y YM-2), moléculas de tipo resistina (miembros de la familia Fizz), TGF- β y receptor de manosa (MMR/CD206)^[83]. Además, varios factores de transcripción, como STAT-6, factor tipo Kruppel (KLF) 4 y factor regulador de interferón (IRF)-4, están asociados con los AAM^[102]. Los AAM están activos en al menos tres categorías funcionales. En primer lugar, y en marcado contraste con las CAM que son eficaces en la protección inmunitaria pero producen productos pro-inflamatorios que pueden inducir daño tisular colateral, las AAM producen moléculas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β y ejercen funciones inmunosupresoras selectivas, protegiendo así los tejidos contra las respuestas inmunitarias perjudiciales. En segundo lugar, están implicados en la reparación y curación de tejidos, ya que estimulan la actividad fibrinogénica y promueven la angiogénesis y la reparación de tejidos. Finalmente, existe fuerte evidencia de su papel como células efectoras, mediando algunas respuestas inmunes contra parásitos^[103]. Los helmintos exhiben gran capacidad para inducir AAM como estrategia de modulación del sistema inmunitario del huésped. Los AAM parecen interferir con algunos aspectos de las potentes respuestas inmunitarias efectoras Th2 y amortiguan la inflamación excesiva que puede producirse durante la infección. Casi todos los helmintos residentes y migratorios de tejidos muestran tal capacidad de inducción de AAM^[83]. Al igual que otros helmintos, *T. spiralis* es un potente inductor de la polarización de los macrófagos hacia la vía AAM muy temprano en el curso de la infección. Los AAM han sido inducidos por los antígenos E/S de *Trichinella* tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Muchos estudios en modelos animales de trastornos

autoinmunes, especialmente enfermedades inflamatorias del intestino, confirmaron la inducción de AAM en el intestino por antígenos de *Trichinella*. Durante la fase intestinal temprana de la infección por *T. spiralis*, los macrófagos peritoneales aumentaron significativamente y confirmaron su fenotipo activado alternativamente. En cuanto a la fase muscular, los macrófagos están aumentados en el músculo alrededor de la célula nodriza o dentro de ellas. Sin embargo, no hay datos disponibles sobre si estas células son AAM^[86]. En un estudio realizado *in vitro*, se investigó el efecto inmunomodulador de la tiorredoxina peroxidasa-2 (TsTPX2) de las larvas musculares de *T. spiralis* en la regulación de la respuesta Th2. Se descubrió que la TsTPX2 recombinante podría conducir directamente a los macrófagos peritoneales al fenotipo AAM. Además, demostraron que la TsTPX2 recombinante indujeron la supresión de Th1 con niveles reducidos de citocinas Th1 como IFN- γ , IL-12 y TNF- α , y niveles elevados de citocinas Th2 IL-4 e IL-10^[104]. En otro estudio *in vitro* se evidenció que la proteína P53 recombinante *T. spiralis* polarizó macrófagos derivados de la médula ósea en AAM^[105].

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

Dentro del género *Trichinella*, se han producido de forma recombinante serpinas, las cuales, además de caracterizarse como inhibidoras de proteasas de serina, se las ha descrito como moléculas con actividad biológica en determinadas etapas de su desarrollo.

La proteína recombinante codificada por la clona Ts11-1 de *Trichinella spiralis* y producida en el sistema eucariótico de *Escherichia coli* corresponde a una serpina con la capacidad para inhibir la actividad enzimática de la tripsina^[106]. Se detectó la presencia de la proteína nativa en los extractos crudos de las larvas recién nacidas y en las larvas musculares de 18 días post infección, por lo que los autores sugieren la importancia de la expresión de esta serpina durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.

A partir de la clona TspAd5 de *T. spiralis* se produjo una proteína recombinante expresada en *E. coli* y con capacidad para inhibir la proteasa α -quimotripsina^[107]. De manera semejante a la serpina Ts11-1, los transcritos de TspAd5 se encuentran en mayor proporción en la etapa de LM que en los adultos, lo que da un acercamiento del rol de esta serpina en las etapas iniciales del parásito.

A diferencia de los otros dos ejemplos, la serpina Tp-Serpin presentó un efecto biológico más concreto. Esta serpina de *T. pseudospiralis* se produjo de manera recombinante en sistema de expresión de *E. coli* y presentó actividad bioquímica contra la elastasa porcina, elastasa humana y proteasa 1 de mastocitos de ratón^[108]. Esta serpina

tuvo un efecto directo en la polarización de macrófagos *in vitro* de la línea celular J774A.1 murina. Se analizó la expresión de los marcadores M1 CD16/32, en donde el tratamiento de LPS y la serpina la inhibió de forma significativa con respecto a la inducción de M1 convencional. En cuanto al marcador de M2 CD206, el estímulo solo con la serpina recombinante indujo su expresión de forma significativa. Este efecto también se observó en la disminución en la secreción de las citocinas IL-1 β e INF- γ con el estímulo de M1 y la serpina, y en el aumento significativo en la secreción de las citocinas TGF- β e IL-10 contra las células control.

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Trichinella spiralis posee factores de virulencia que regulan la respuesta inmunológica del hospedero, promoviendo el tipo Th2 que le permite establecerse por más tiempo. Dentro de las proteínas de E/S destacan las proteasas de serina y las serpinas, siendo estas últimas un posible factor modulador en el proceso de maduración de macrófagos. Sin embargo, esto no está plenamente demostrado. En este trabajo se propuso determinar si los genes Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 de *T. spiralis* codifican para serpinas funcionales como inhibidores de proteasas de serina y su probable efecto como factor de virulencia en la modulación de la polarización M1/M2 de monocitos humanos.

CAPÍTULO 4

HIPÓTESIS

Las serpinas codificadas por los genes Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 de *Trichinella spiralis* tienen la capacidad de inhibir la actividad de serin proteasas y modular la polarización M1/M2 de macrófagos humanos.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de las serpinas de *Trichinella spiralis* como moduladores de la polarización de macrófagos humanos.

5.2 Objetivos Específicos

- 1) Expresar las serpinas codificadas por los genes Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 en el sistema eucariótico de *Pichia pastoris* SMD1168H.
- 2) Caracterizar el perfil inhibitorio de las serpinas mediante el uso de proteasas de referencia.
- 3) Determinar la capacidad de las serpinas para modular la diferenciación M1/M2 en macrófagos humanos.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Bioética y bioseguridad

El cuidado de los ratones BALB/c y sus protocolos fueron evaluados y aprobados por los comités de Ética e Investigación, así como por el CICUAL de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (MB19-00001). Toda la metodología desarrollada en este estudio siguió los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), la cual se apega de forma estricta a las recomendaciones de la Guía del Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH de los Estados Unidos de América.

Los agentes biológicos que se utilizaron en el proyecto fueron las cepas de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, MA, EUA), la levadura *Pichia pastoris* SMD1168H (Invitrogen, MA, EUA), el plásmido pPICZ α A (Invitrogen, MA, EUA) y los monocitos de la línea celular THP-1 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), los cuales se encuentran categorizados dentro del Grupo de Riesgo Biológico 1. Por otro lado, el parásito *Trichinella spiralis* ISS 406 corresponde a un patógeno perteneciente al Grupo de Riesgo Biológico 2. Para la manipulación de los organismos antes mencionados se siguió la normativa establecida por el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud del 2014. Todos los materiales y deshechos considerados como Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) fueron dispuestos para su manejo como se establece en la NOM-087.ECOL-SSA1-2002.

6.2 Búsqueda de serpinas anotadas en el genoma de *Trichinella spiralis*

Para llevar a cabo la caracterización de serpinas putativas, se hizo una búsqueda extensiva en las bases de datos de GenBank de la NIH <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, así como de WormBase Parasite <https://parasite.wormbase.org/index.html>. Las secuencias obtenidas fueron comparadas contra serpinas ya conocidas, así como de otros inhibidores de proteasas, como el caso de los tipos Kunitz y Kazal, por medio del programa Clustal X 2.1. Las secuencias que se encontraron más relacionadas con las serpinas ya caracterizadas fueron analizadas con la herramienta web <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cg> para la búsqueda de dominios conservados de serpina y el motivo RCL.

6.3 Obtención de *Trichinella spiralis* en diferentes estadios

Se infectaron de forma sistemática ratones hembras de 6 semanas de la cepa BALB/c con 300 LM del parásito por medio de una cánula gástrica. A los 30 días post infección, los ratones infectados fueron sacrificados en una cámara de inducción a una dosis letal de SevoraneTM (Abbott Laboratories, IL, EUA) al 8% durante 2 min. Después de corroborar la muerte de los ratones, se les realizó una dislocación cervical. Se retiró la piel y los órganos, dejando intacta la carcasa, la cual fue macerada y posteriormente digerida de forma artificial con 100 mL de solución con HCl (J.T. Baker, NJ, EUA) al 1% y Pepsina (Sigma-Aldrich, MA, EUA) al 1% durante 3 h a 37 °C. La solución se filtró con una gasa, dejando sedimentar a las LM por 20 min. Luego se realizaron entre 5 y 6 lavados con solución salina [NaCl (J.T. Baker, NJ, EUA) 0.9%].

Para la obtención de *T. spiralis* en su fase de Ad, los ratones fueron infectados con 1,500 LM por medio de una cánula gástrica y a los 3 días fueron sacrificados. Se

extrajo el intestino delgado, el cual fue cortado de forma longitudinal. El intestino fue filtrado por medio de un colador sobre un recipiente con solución salina y se incubó a 37 °C por 3 h. Los Ad cribados se lavaron 3 veces con solución salina 0.9%.

Tanto las LM sedimentadas y los Ad fueron concentrados en un microtubo de 1.5 mL. Se recortó el extremo de una punta amarilla de 200 µL, y con una micropipeta se tomó 20 µL de solución salina con las LM previamente homogenizadas y la gota se depositó en un portaobjetos. Con un estereoscopio (Olympus, Shinjuku, Japón) se realizó el conteo de los parásitos en 10 campos. Luego de obtener el promedio, se determinó la cantidad de LM y Ad presentes en 1 mL de solución salina. Se retiró el sobrenadante y los parásitos fueron resguardados a -20 °C hasta su uso.

6.4 Obtención del extracto crudo y los antígenos E/S de *Trichinella spiralis*

Las LM y los Ad de *T. spiralis* fueron macerados en buffer de lisis [Tris HCl 100 mM (Sigma-Aldrich, MA, EUA), Tritón-100-X 1% (Sigma-Aldrich, MA, EUA), Glicerol 10% (Jalmek, NL, México), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM (Sigma-Aldrich, MA, EUA), SDS 1% (Bio Basic, Ontario, Canadá), pH 8.0] suplementado con una tableta de cóctel inhibidor de proteasas cOmplete™ (Roche, Basel, Suiza), luego el homogenizado fue centrifugado a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un microtubo de 1.5 mL, donde se realizó una segunda centrifugación, siendo el último sobrenadante el extracto crudo.

5,000 LM fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 1.0 U/mL, y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con 95% aire y 5% CO₂ durante 72 h. Se tomaron los sobrenadantes y los antígenos E/S

fueron concentrados por medio de una unidad de filtrado por centrifugación Amicon™ (Sigma-Aldrich, MA, EUA) con un MWCO de 3 kDa.

6.5 Determinación de la concentración de proteínas

Para cuantificar la concentración de proteínas del Extracto Crudo y de los antígenos E/S se siguió el protocolo de Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). De tal modo, se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina, como proteína estándar, dentro del rango de 15.6 a 1,000 µg/mL. El reactivo de trabajo se preparó mezclando 50 partes de la solución A con 1 de la solución B (50:1, v/v). En una placa de 96 pozos (Corning, NY, EUA) se depositaron 25 µL de cada muestra, estándares y el blanco de reactivo, por duplicado, luego se mezclaron con 200 µL del reactivo de trabajo. La placa se agitó por 30 s y se incubó a 37 °C por 30 min por medio del espectrofotómetro *Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) se tomaron las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Finalmente los resultados de concentración fueron calculados empleando la ecuación de la recta obtenida a partir de los datos de absorbancia de la curva de calibración. Las muestras fueron resguardadas a -20 °C hasta su uso.

6.6 Extracción de ARN Total de *Trichinella spiralis*

Las LM y Ad de *T. spiralis* obtenidos se pesaron, y se agregó Trizol (Molecular Research Center, Ohio, EUA) en proporción 1 mL por cada 100 mg de parásito. La muestra fue homogenizada por medio de un macerador de tejidos durante 10 min en hielo. Luego el homogenizado se transfirió a un microtubo de 1.5 mL y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después se agregó 200 µL de cloroformo (Sigma-Aldrich, MA,

EUA) y se agitó por medio de vórtex (Scientific Industries, NY, EUA) durante 30 s. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min, para luego centrifugarse a 12,000 g por 15 min a 4 °C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL. Por cada mL de Trizol utilizado se precipitó el ARN total con 0.5 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich, MA, EUA) y se mezcló por inmersión. Se dejó reposando a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12,000 g por 8 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de ARN total se lavó con 1 mL de Etanol (J.T. Baker, NJ, EUA) al 75%. Luego de mezclar por vórtex, se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de ARN total se secó al aire por 5 min. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 50 µL de buffer TE (Tris HCl 1M, EDTA 0.5M, pH 8.0) 1X y resguardada a -70 °C hasta su uso.

6.7 Oligonucleótidos empleados en el estudio

Las secuencias de oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa Oligo v 4.0 y fueron sintetizados por la compañía Alpha DNA (QC, Canadá). En la **Tabla 2** se resume la información de los oligonucleótidos empleados.

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Producto	Clave	Secuencia	Tamaño (pb)	Sitios de restricción
ARNr 18S (Detección)	18S-F	5'-ACGAAAGTTAGAGGTTTCGAA-3'	419	
	18S-R	5'-CCCTCTAAGAAGTGATCAGC-3'		
Caveolina (Detección)	CTNT-F	5'-ACCATGTCATCTGAGGAA-3'	442	
	CTNT-R	5'-GCGCAATGTGTTAAACG-3'		
Tsp_00173 (Clonación)	Tsp_00173-F	5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGTT-TGTTGTCTCTGCGAG-3'	1806	<i>Xho</i> I
	Tsp_00173-R	5'-GAAAGCTGGCGCCGGACAAAAAATCAGAAAAAC-3'		<i>Not</i> I
Tsp_00174 (Clonación)	Tsp_00174-F	5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGGA-ATCAAAAAGTTTCAA-3'	1244	<i>Xho</i> I
	Tsp_00174-R	5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCAACTGATGTGAAGGGAGC-GTA-3'		<i>Xba</i> I

Producto	Clave	Secuencia	Tamaño (pb)	Sitios de restricción
Tsp_01570 (Clonación)	Tsp_01570-F	5'-GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT-ATGTCGTCCGTCAATTCG-3'	1190	<i>Xho</i> I
	Tsp_01570-Not	5'-CTGGCGGCCGCACCACGATAGCTTCCCATG-AAC-3'		<i>Not</i> I
Tsp_01570 (Secuenciación)	Factor- α	5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'	1230	
	Tsp_01570-Not	5'-CTGGCGGCCGCACCACGATAGCTTCCCATG-AAC-3'		
AOX1 (Secuenciación)	AOX1-F	5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'	1778	
	AOX1-R	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'		

6.8 Síntesis del ADN complementario

Previo al protocolo, se descongelaron las muestras de ARN total, así como los reactivos empleados en hielo. Para la transcripción inversa de ARN total se preparó la siguiente reacción: 2 μ g de ARN total, 2 μ L de oligo dT 50 μ M (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) y se agregó agua libre de nucleasas (Invitrogen, MA, EUA) para un volumen final de 12 μ L. La mezcla se incubó a 70 °C durante 3 min, luego se dejó reposando en hielo. Luego se adicionaron los siguientes componentes: 2 μ L de Buffer de síntesis de la primera hebra 10X (Invitrogen, MA, EUA), 4 μ L de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (2.5 μ M cada uno) (Bioline, Londres, UK), 1 μ L de Transcriptasa inversa del M-MLV 100 U/ μ L (Invitrogen, MA, EUA) y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 20 μ L. La mezcla se incubó a 42 °C por 1 h, luego se inactivó a 92 °C por 1 h. Las muestras se resguardaron a -20 °C hasta su uso.

Para corroborar la síntesis del ADNc, se llevó a cabo una PCR para la amplificación del ARN ribosomal 18S, utilizando los oligonucleótidos 18S-F y 18S-R. La reacción consistió en 10 μ L de Buffer My TaqTM 5X (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂) (Bioline, Londres, UK), 1 μ L de ADNc de *Trichinella spiralis*, 2 μ L de los cebadores

18S-F y 18S-R (100 μ M), 1 μ L de ADN Polimerasa 5U/ μ L (Bioline, Londres, UK) y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 50 μ L.

Las condiciones programadas en el Termociclador (BioRad, CA, EUA) fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 94 °C por 30 s, una de alineamiento a 56 °C por 30 s y una de elongación a 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 7 min.

Al término de la amplificación, se cargaron 5 μ L de la reacción de PCR con 3 μ L de Buffer de carga (azul de bromofenol 0.3% (Sigma-Aldrich, MA, EUA), EDTA 60 mM, Glicerol 60%) 6X y 3 μ L del marcador de peso molecular *Direct Load Wide Range DNA Marker* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) en geles de agarosa (Bioline, Londres, UK) al 1% teñidos con bromuro de etidio (200 ng/mL) (Invitrogen, MA, EUA), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador (Analytik Jena, Jena, Alemania).

6.9 Amplificación de los transcritos Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570

Para la amplificación de las secuencias codificantes completas de las serpinas putativas, se utilizaron los cebadores Tsp_00173-F y Tsp_00173-R, Tsp_00174-F y Tsp_00174-R, y Tsp_01570-F y Tsp_01570-R. La reacción consistió en 10 μ L de Buffer Super FiTM II 5X (1.75 mM MgCl₂) (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), 1 μ L de ADNc de *Trichinella spiralis* (LM o Ad), 2.5 μ L de los cebadores (10 μ M), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 1 μ L de ADN Polimerasa 2U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 50 μ L.

Las condiciones programadas en el Termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos constituidos por una fase de

desnaturalización a 94 °C por 30 s, una de alineamiento a 65 °C por 30 s y una de elongación a 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Al término de la amplificación, se cargaron 5 µL de las reacciones de PCR con 3 µL de Buffer de carga 6X y 3 µL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 µL de las reacciones de PCR para cuantificar la concentración de ADN por medio de un espectrofotómetro. El producto de PCR fue resguardado a 4 °C hasta su uso.

6.10 Purificación de los insertos

Previo a los ensayos de restricción, los productos de PCR se purificaron utilizando el protocolo de purificación *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1% sin Bromuro de etidio. En uno de los carriles se cargó 5 µL del producto amplificado y 0.1 µL de Bromuro de etidio, correspondiendo a la “reacción guía”, en el carril contiguo se cargó 3 µL del marcador de peso molecular y en el espacio que conforman los siguientes tres carriles se cargaron 100 µL del producto de PCR y 20 µL de Buffer de carga 6X. El corrimiento electroforético se realizó a 100 V durante 1 h. Al terminó se ubicó la banda correspondiente al producto de PCR con ayuda de un transiluminador, evitando el contacto prolongado con la luz UV. La banda fue escindida con un bisturí estéril para evitar contaminación y se depositó en un microtubo de 1.5 mL previamente pesado. Para su disolución, se adicionó buffer L3 en la siguiente proporción: 3 µL de buffer L3 por 1 mg de gel. El contenido del tubo se calentó a 50 °C por 10 min en el *thermoblock* (Labnet, NJ, EUA). Pasados 5 min, el volumen de gel

disuelto se pasa a una columna de purificación y se centrifugó a 14,000 g por 1 min. Luego de descartar el sobrenadante se adicionaron 500 μL de buffer de lavado W1 y se centrifugó la columna a 14,000 g por 1 min. El sobrenadante se eliminó y se centrifugó la columna a 14,000 g por 2 min para eliminar el exceso de buffer de lavado W1. El tubo colector fue remplazado por un microtubo de 1.5 mL y se adicionó a la columna de purificación 30 μL de agua libre de nucleasas previamente atemperado. El tubo se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min y finalmente fue centrifugado a 14,000 g por 1 min.

Al final, se cargaron 5 μL de los productos de PCR purificados con 3 μL de Buffer de carga 6X y 3 μL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μL de los purificados para cuantificar la concentración de ADN por medio de un espectrofotómetro. El producto purificado de PCR fue resguardado a 4 °C hasta su uso.

6.11 Digestión de los insertos con las enzimas de restricción *Xho* I y *Not* I

Los productos de PCR fueron sometidos a un ensayo de restricción con las endonucleasas *Xho* I y *Not* I, por lo que se realizó una reacción de digestión de la siguiente manera: 2 μL de Buffer Anza 10X (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), 1 μL de *Xho* I 20 U/ μL (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), 1 μL de *Not* I 20 U/ μL (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), 1 μg del inserto amplificado y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 20 μL .

Las reacciones se incubaron a 37 °C por 1 h y se cargaron 5 μL de los productos digeridos con 3 μL de Buffer de carga 6X y 3 μL del marcador de peso molecular en

geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μ L de las digestiones para cuantificar la concentración de ADN por medio de un espectrofotómetro. Las digestiones se resguardaron a 4 °C hasta su uso.

6.12 Extracción del plásmido pPICZ α A

Para llevar a cabo la extracción del plásmido se siguió el protocolo de *Pure link quick plasmid DNA miniprep kit*. La cepa *Escherichia coli* DH5 α portadora del vector pPICZ α A fue sembrada en tubos con 4 mL de medio LB [Extracto de levadura 0.5 % (Sigma-Aldrich, MA, EUA), Peptona 1% (Becton Dickinson, NJ, EUA) y NaCl 1%] por 24 h a 37 °C y 200 rpm. Las células fueron sedimentadas por medio de la centrífuga refrigerada 5418R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) a 14,000 rpm por 5 min. Luego de eliminar el sobrenadante, a la pastilla se le adicionó 250 μ L de buffer de resuspensión R3 con ARNasa y 250 μ L de buffer de lisis L7. Luego de mezclar por inmersión, se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Se añadió 350 μ L de buffer de precipitación N3 y el contenido del microtubo fue homogenizado por pipeteo. Luego el lisado fue centrifugado a 12,000 g por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se depositó en una columna de purificación. Se centrifugó a 12,000 g por 10 min y se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 700 μ L de buffer de lavado W9 y la columna se centrifugó a 12,000 g por 1 minuto. Se volvió a centrifugar con las mismas condiciones para eliminar los restos de buffer de lavado. Se depositó en la columna 30 μ L de agua libre de nucleasas previamente atemperado y se dejó reposando por 10 min a temperatura ambiente. Luego la columna se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min, recolectando el plásmido en un microtubo de 1.5 mL.

Al final se cargaron 5 μL del vector purificado con 3 μL de Buffer de carga 6X y 3 μL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μL de las digestiones para cuantificar la concentración de ADN por medio de un espectrofotómetro. El plásmido fue resguardado a 4 °C hasta su uso.

6.13 Digestión del vector pPICZ α A con las enzimas de restricción *Xho I* y *Not I*

Los productos de PCR fueron sometidos a un ensayo de restricción con las endonucleasas *Xho I* y *Not I*, por lo que se realizó una reacción de digestión de la siguiente manera: 2 μL de Buffer Anza 10X, 1 μL de *Xho I* 20 U/ μL , 1 μL de *Not I* 20 U/ μL , 1 μg del plásmido pPICZ α A y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 20 μL .

La reacción se incubó a 37 °C por 1 h y se cargó 5 μL de la digestión con 3 μL de Buffer de carga 6X y 3 μL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μL de las digestiones para cuantificar la concentración de ADN por medio de un espectrofotómetro. La digestión fue resguardada a 4 °C hasta su uso.

6.14 Purificación de los plásmidos

Previo al ensayo de ligación, los plásmidos digeridos se purificaron utilizando el kit *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1% sin Bromuro de etidio. En uno de los carriles se cargó 5 μL del producto amplificado y 0.1 μL de

Bromuro de etidio, correspondiendo a la “reacción guía”, en el carril contiguo se cargó 3 μL del marcador de peso molecular y en el espacio que conforman los siguientes tres carriles se cargaron 100 μL del producto digerido y 20 μL de Buffer de carga 6X. El corrimiento electroforético se realizó a 100 V durante 1 h. Al terminó se ubicó la banda correspondiente al producto de PCR con ayuda de un transiluminador, evitando el contacto prolongado con la luz UV. La banda fue escindida con un bisturí estéril para evitar contaminación y se depositó en un microtubo de 1.5 mL previamente pesado. Para su disolución, se adicionó buffer L3 en la siguiente proporción: 3 μL de buffer L3 por 1 mg de gel. El contenido del tubo se calentó a 50 °C por 10 min en *Thermoblock* (Labnet, NJ, EUA). Pasados 5 min, el volumen de gel disuelto se pasó a una columna de purificación y se centrifugó a 14,000 g por 1 min. Luego de descartar el sobrenadante se adicionaron 500 μL de buffer de lavado W1 y se centrifugó la columna a 14,000 g por 1 min. El sobrenadante se eliminó y se centrifugó la columna a 14,000 g por 2 min para retirar el exceso de buffer de lavado W1. El tubo colector fue remplazado por un microtubo de 1.5 mL y se adicionó a la columna de purificación 30 μL de agua libre de nucleasas previamente atemperada. El tubo se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min y finalmente fue centrifugado a 14,000 g por 1 min.

Al final, se cargaron 5 μL de los plásmidos digeridos con 3 μL de Buffer de carga 6X y 3 μL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μL de los purificados para cuantificar la concentración de ADN por medio de un espectrofotómetro. El producto purificado fue resguardado a 4 °C hasta su uso.

6.15 Ligación del inserto y el vector

Para catalizar la reacción de síntesis de los enlaces entre el inserto y el vector se utilizó la enzima ADN ligasa T4 (Roche, Basel, Suiza), por lo que se preparó la siguiente reacción: 3 μ L de Buffer de ligación 10X (Roche, Basel, Suiza), 1 μ L de ADN ligasa T4 1 U/ μ L, 100 ng del vector pPICZ α A y 300 ng del inserto, de manera que se conservara la relación estequiométrica 1:3 (inserto:vector). La reacción de ligación se llevó a cabo a 16 °C durante toda la noche. Al término, fue resguardada a -20 °C hasta su uso.

6.16 Generación de células de *Escherichia coli* DH5 α con electrocompetencia

Se realizó la inoculación de una asada de cultivo de la cepa de *E. coli* DH5 α en un tubo con 4 mL de caldo LB, el cual fue incubado a 37 °C, a 200 rpm y por 24 h. Luego se tomaron 2 mL para inocular un matraz con 100 mL de caldo LB, el cual se incubó a 37 °C, a 200 rpm por un periodo de entre 2 a 4 h, hasta que el cultivo alcanzó la fase logarítmica (DO₆₀₀= 0.4 – 0.6). El cultivo se dividió en dos partes iguales en tubos cónicos de 50 mL, los cuales se mantuvieron a 4 °C por 15 min. Se centrifugaron a 4,000 g por 10 min para sedimentar las células. Luego se realizó una serie de lavados con 50 y 20 mL de agua destilada fría y 20 mL de una solución de agua y glicerol estéril en una proporción 9:1 fría, centrifugando en cada lavado a 4,000 g por 10 min. Después del último lavado, las células fueron resuspendidas en 1 mL de solución agua/glicerol (9:1, v/v) con pipeteo suave. Al final, las células fueron almacenadas en alícuotas de 80 μ L a -70 °C hasta su uso.

6.17 Transformación de los vectores recombinantes en *Escherichia coli* DH5 α

El producto de la reacción de ligación se precipitó adicionando 5 volúmenes de Isopropanol a -20 °C por toda la noche. Luego se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. La pastilla se lavó con Etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 20 min. El sobrenadante se descartó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, luego fue resuspendida en 5 µL de agua libre de nucleasas. Se tomaron 2.5 µL del producto de ligación y se mezclaron con 80 µL de células de *E. coli* DH5α electrocompetentes. Todo el volumen se cargó en una celda de electroporación de 0.2 cm (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y en seguida fueron pulsadas con 1,800 V en un electroporador 2510 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se adicionaron 100 µL de caldo LB a la celda de electroporación para recuperar el mayor volumen posible de las células, las cuales se inocularon en un tubo con 1 mL de caldo LB, el cual fue incubado a 37 °C, a 200 rpm por 2 h para permitir el restablecimiento de las células. El cultivo se depositó en un microtubo de 1.5 mL y las células fueron empaquetadas a 6,000 rpm por 5 min. Se hizo una suspensión con 100 µL de caldo LB fresco, la cual se utilizó para inocular con varilla de vidrio la superficie de placas con medio LB [Extracto de levadura 0.5 %, Peptona 1%, NaCl 1% y Agar 2.2% (Sigma-Aldrich, MA, EUA) + Zeocina (Invitrogen, MA, EUA) (100 µg/mL) Los controles experimentales utilizados en este ensayo se detallan en la **Tabla 3**. Finalmente las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

Tabla 3: Controles experimentales empleados para la electroporación de *Escherichia coli* DH5 α

Tratamientos	Producto a electroporar
Control de viabilidad	Agua LN
Control de antibiótico	Agua LN
Control de electroporación	Vector vacío circularizado
Reacción de ligación	Vector recombinante

6.18 Extracción de los vectores recombinantes por medio de lisis alcalina

Las colonias que crecieron en las placas fueron respaldadas en una nueva placa con medio LB + Zeocina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en paralelo estas colonias fueron inoculadas en tubos con caldo LB + Zeocina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tanto los tubos como las placas fueron incubados a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h, siendo los tubos sometidos a una agitación constante de 200 rpm. A partir de los tubos con caldo LB + Zeocina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se tomaron 2 mL y se depositaron en un microtubo de 2 mL. Las células se empaquetaron a 6,000 rpm por 5 min y el botón se resuspendió en 100 μL de la solución I [Glucosa 50 mM (J.T. Baker, NJ, EUA); Tris-HCl 25 mM, pH 8.0; EDTA 10 mM, pH 8.0] fría, se agitó usando un vórtex por 1 min y se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Se adicionaron 200 μL de la solución II [NaOH (Bio Basic, Ontario, Canadá) 0.2 N, SDS 1%] fresca, se mezcló por inversión y se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Luego se añadió 150 μL de la solución III [Acetato de amonio (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 7.5 M] fría, se mezcló por inversión y se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Después el tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min, 500 μL del sobrenadante se depositaron en un microtubo de 2 mL, se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich, MA, EUA) en una proporción 1:1 (v/v), por medio vórtex se mezcló por 30 s y se centrifugó a 14,000 rpm

por 10 min. Posteriormente se transfirieron 400 μ L de la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL, se precipitó el ADNp obtenido con 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío y se incubó a -20 °C toda la noche. Luego de la precipitación, el tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. La pastilla de ADNp se lavó con 500 μ L de Etanol 70% y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Al final el botón se resuspendió en 50 μ L de agua estéril con ARNasa.

Se cargó 5 μ L del ADNp con 3 μ L de Buffer de carga 6X en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μ L de las digestiones para cuantificar la concentración de ADNp por medio de un espectrofotómetro. El ADNp fue resguardado a 4 °C hasta su uso.

6.19 Caracterización de los vectores recombinantes por enzimas de restricción

Para realizar la verificación de las construcciones, se realizó un escrutinio inicial del ADNp de las colonias que pudieron crecer en el medio de selección LB + Zeocina (100 μ g/mL). Este consistió en el análisis de su corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL). Las colonias cuyo ADNp presentaron un retardo en su migración fueron seleccionadas para los ensayos de restricción.

Para evidenciar la adquisición del inserto por parte del vector por diferencia de tamaño, se tomó el ADNp de las colonias seleccionadas y se realizó una digestión con la endonucleasas *Xho* I de la siguiente manera: 2 μ L de Buffer Anza 10X, 1 μ L de *Xho* I 20

U/ μ L, 1 μ g del ADNp y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 20 μ L.

Para corroborar que la diferencia en el tamaño del vector recombinante corresponde al tamaño del inserto, se realizó una digestión en simultaneo con las endonucleasas *Xho* I y *Not* I para liberar al inserto de la siguiente manera: 2 μ L de Buffer Anza 10X, 1 μ L de *Xho* I 20 U/ μ L, 1 μ L de *Not* I 20 U/ μ L, 1 μ g del ADNp y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 20 μ L.

Para demostrar que el inserto se unió en el sitio *Xho* I correcto se realizó una digestión con la endonucleasa *Eco* RI para evidenciar la pérdida del sitio de restricción de esta enzima de la siguiente manera: 2 μ L de Buffer Anza 10X, 1 μ L de *Eco* RI 20 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), 1 μ g del ADNp y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 20 μ L.

Todas las reacciones se incubaron a 37 °C por 1 h y se cargó 5 μ L de las digestiones con 3 μ L de Buffer de carga 6X y 3 μ L del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentaron por medio de un transiluminador de luz UV.

6.20 Linearización de los vectores recombinantes con *Sac* I

Previo a los ensayos de transfección con *Pichia pastoris* SMD1168H, se llevó a cabo una reacción de digestión con la endonucleasa *Sac* I (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) de la siguiente manera: 5 μ L de Buffer Anza 10X, 1 μ L de *Sac* I 20 U/ μ L, 10 μ g del ADNp recombinante y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen de 50 μ L.

La reacción se incubó a 37 °C por 1 h y se cargó 5 µL de la digestión con 3 µL de Buffer de carga 6X y 3 µL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV.

El resto de la digestión fue precipitada adicionando 0.1 volúmenes de Acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto, e incubando toda la noche a -20 °C. Luego se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla de ADN se lavó con 200 µL de Etanol absoluto frío centrifugando a 14,000 rpm por 20 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 10 µL de agua libre de nucleasas y se resguardó a -20 °C hasta su uso.

6.21 Generación de células de *Pichia pastoris* SMD1168H con electrocompetencia

El proceso inició con la inoculación de una asada de *P. pastoris* SMD1168H en un tubo con 4 mL de caldo YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2% (J.T. Baker, NJ, EUA) incubado a 30 °C, con 200 rpm de agitación, por 24 h. Se tomaron 500 µL del cultivo para inocular 100 mL de caldo YPD y se incubó a 30 °C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar la fase logarítmica ($DO_{600} = 1.3 - 1.5$) en un periodo aproximado de 18 h. Luego, el cultivo de levaduras se dividió en dos partes iguales y se depositó en dos tubos falcón de 50 mL, los cuales fueron incubados a 4 °C por 15 min. Las células se empaquetaron a 1,500 g y a 4 °C por 5 min. Se descartó el sobrenadante y las levaduras se lavaron con 50 mL de agua destilada fría, y se centrifugó a 1,500 g y a 4 °C por 5 min. Se realizaron una serie de lavados con 20 mL de agua destilada y con 20 mL de Sorbitol (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 1 M frío, con las mismas

condiciones de centrifugación. Se desechó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1 mL de Sorbitol 1 M. Las células se utilizaron en el proceso de transfección inmediatamente.

6.22 Transfección de las levaduras *Pichia pastoris* SMD1168H con los vectores recombinantes

Se tomaron 5 μ L de los plásmidos recombinantes digeridos y se resuspendieron en una alícuota de levaduras de *Pichia pastoris* SMD1168H electrocompetentes por pipeteo suave. Estas fueron transferidas a una celda de electroporación de 0.4 cm y pulsadas con 1,500 V por medio de un electroporador 2510. Las células pulsadas se recuperaron con 100 μ L de sorbitol 1 M frío, se depositaron en un tubo falcón de 15 mL con 900 μ L de la misma solución y se incubaron a 30 °C por una h sin agitación. Luego se les añadió 1 mL de caldo YPD fresco a las levaduras y se incubaron a 30 °C por 3 h y 180 rpm de agitación para permitir su restablecimiento. Pasado este tiempo, las levaduras se concentraron a 1,500 g por 5 min y a 4 °C, y se resuspendieron en 500 μ L de YPD fresco. Se utilizaron volúmenes entre 200 μ L y 100 μ L de células electroporadas para inocular placas de medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%, Agar 2.2%) + Zeocina (100 μ g/mL). Todos los controles utilizados en el protocolo de transformación se detallan en **Tabla 4**. Las placas se incubaron a 30 °C hasta la aparición de colonias en un periodo de tiempo entre las 48 h y 72 h.

Tabla 4: Controles experimentales empleados para la electroporación de *Pichia pastoris* SMD1168H

Tratamientos	Producto a electroporar
Control de viabilidad	Agua LN
Control de antibiótico	Agua LN
Digestión con <i>Sac</i> I	Vector linearizado

6.23 Extracción de ADNg de las clonas de *Pichia pastoris* SMD1168H

Las clonas recombinantes fueron respaldadas en placas de medio YPD + Zeocina (100 µg/mL) y se inocularon en tubos con 4 mL de caldo YPD + Zeocina (100 µg/mL). Las placas fueron incubadas a 30 °C por 24h y los tubos a 48 h con agitación de 200 rpm.

Se tomaron 2 mL de los caldos de cultivo y se transfirieron a microtubos de 2 mL. Las células se empaquetaron a 13,000 rpm por 1 min y la pastilla obtenida se resuspendió con 200 µL del buffer TSNT (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM). Luego de homogenizar con vórtex por 30 s, se añadió 200 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1,v/v/v) y se mezcló con vórtex por 5 min con agitación vigorosa. Después se adicionó 300 µL de buffer TE 1X, se mezcló por 30 s en vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm por 7 min. Se transfirieron 400 µL de la fase acuosa a un microtubo de 1.5 mL y se precipitó con 2.5 volúmenes de Etanol absoluto a -70 °C por toda la noche. Luego el tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min y 4 °C. Después la pastilla se lavó con 500 µL de Etanol 70% frío a 14,000 rpm por 15min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Al final la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas con ARNasa.

Se cargaron 3 μL del ADNg con 3 μL de Buffer de carga 6X en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV; y se utilizó 1 μL del ADNg para cuantificar su concentración por medio de un espectrofotómetro. El ADNg se resguardó a 4 °C hasta su uso.

6.24 Caracterización de las clonas recombinantes de *Pichia pastoris* SMD1168H por PCR

Para evidenciar de manera indirecta la construcción de las clonas recombinantes de *Pichia pastoris* SMD1168H se amplificó el gen AOX1 utilizando los oligos AOX1-F y AOX1-R.

La reacción de PCR consistió en 10 μL de Buffer My TaqTM 5X (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂), 1 μL del ADNg de las clonas recombinantes, 2 μL de los cebadores (100 μM), 1 μL de ADN Polimerasa 5U/ μL y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 50 μL .

Las condiciones programadas en el Termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C por 1 min, 30 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 95 °C por 15 s, una de alineamiento a 59 °C por 15 s y una de elongación a 72 °C por 10 s, y una extensión final a 72 °C por 3 min.

Al término de la amplificación se cargaron 5 μL de las reacciones de PCR con 3 μL de Buffer de carga 6X y 3 μL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV.

Para evidenciar de manera directa la construcción de las clonas recombinantes de *Pichia pastoris* SMD1168H se amplificó el transcrito Tsp_01570 con los oligos Tsp_01570-F y Tsp_01570-R.

La reacción de PCR consistió en 10 µL de Buffer My Taq™ 5X (5 mM dNTPs, 15 mM MgCl₂), 1 µL del ADNg de las clonas recombinantes, 2 µL de los cebadores (100 µM), 1 µL de ADN Polimerasa 5U/µL y agua libre de nucleasas para llevar la reacción a un volumen final de 50 µL.

Las condiciones programadas en el Termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos constituidos por una fase de desnaturalización a 94 °C por 30 s, una de alineamiento a 65 °C por 30 s y una de elongación a 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Al término de la amplificación se cargaron 5 µL de las reacciones de PCR con 3 µL de Buffer de carga 6X y 3 µL del marcador de peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de etidio (200 ng/mL), se corrió una electroforesis a 100V por 40 min y se foto documentó por medio de un transiluminador de luz UV.

6.25 Análisis por secuenciación de las clonas de *Pichia pastoris* SMD1168H recombinantes

Tomando como templado el ADNg de las clonas de *Pichia pastoris* SMD1168H, se realizó la amplificación del gen Tsp_01570, con las mismas especificaciones contenidas en el apartado **6.23**. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados, tal y como se indica en la sección **6.10**. Posteriormente, los productos purificados fueron diluidos con agua libre de nucleasas a una concentración entre 40 y 60 ng/µL y se mandaron a la compañía Eurofins Genomics para su secuenciación.

6.26 Fermentación de las cepas de *Pichia pastoris* SMD1168H recombinantes

Para la inducción de las serpinas recombinantes, se inoculó una asada de cultivo en tubos cónicos de 15 mL con 4 mL de caldo YPD + Zeocina (100 µg/mL), los cuales se incubaron a 30 °C con 230 rpm de agitación. Pasadas 24 h de incubación, los cultivos alcanzaron una $DO_{600} = 0.5-0.7$, suficiente para que las células pudieran ser concentradas a 5,000 g por 5 min y resuspendidas en 100 µL de caldo YPD. Se tomaron 10 µL para inocular tubos cónicos de 50 mL con 5 mL de medio BMGY [Peptona 2%, Extracto de levadura 1%, fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 100 mM (pH 6.0), YNB (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 1.34%, Biotina (Sigma-Aldrich, MA, EUA) $4 \times 10^{-5}\%$, Glicerol (Jalmek, NL, México) 1%], los cuales se incubaron a 30 °C con 230 rpm de agitación por 48 h. Después de este periodo de incubación, el cultivo alcanzó una $DO_{600} = 2-6$, suficiente para que las levaduras fueran empaquetadas a 5,000 g por 5 min e inmediatamente lavadas con 4 mL de medio BMMY [Peptona 2%, Extracto de levadura 1%, YNB (YNB 3.4%, Sulfato de Amonio 10%) 3.4%, Buffer de fosfatos (Fosfato de Potasio Monobásico 0.698 M, Fosfato de Potasio Dibásico 0.3014M) 100 mM, Biotina $4 \times 10^{-5}\%$, Metanol (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 1%] bajo las mismas condiciones. Las pastillas de las levaduras se resuspendieron en 500 µL de medio BMMY para inocular un matraz con 25 mL de medio BMMY, en donde se alcanzó una $DO_{600} = 1.0$. El matraz se incubó por 4 días a una temperatura de 30 °C con agitación constante de 230 rpm, y su crecimiento se monitoreó haciendo lecturas de la DO cada 24 h por medio de un espectrofotómetro. Para la inducción de las serpinas recombinantes se añadieron 250 µL de Metanol absoluto al cultivo, alcanzando así una concentración final de 1%. Luego de los 4 días de fermentación, el cultivo se centrifugó a 5,000 g por 5 min y los sobrenadantes se resguardaron a 4 °C hasta su uso.

6.27 Dializado de los sobrenadantes

Los sobrenadantes obtenidos fueron dializados por 24 h contra agua destilada por medio de membranas de diálisis con abertura de poro de 12 – 14 kDa *Snake Skin* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). El proceso de dializado se llevó a cabo a 4 °C manteniendo una agitación constante de 200 rpm, realizando un cambio de agua a las 12 h. Para determinar la concentración de proteínas de los dializados se siguió el protocolo de Pierce BCA descrito a detalle en la sección **6.5**. Los dializados se resguardaron a 4 °C hasta su uso.

6.28 Precipitación de proteínas por el método Metanol/Cloroformo

Se tomaron 4 mL de los dializados, los cuales se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL, se precipitó añadiendo 1.5 volúmenes de Metanol absoluto y 1 volumen de Cloroformo, y mezcló por inversión. Luego se centrifugó a 12,000 rpm por 90 s y se descartó la fase orgánica sin alterar la interface de proteínas. Después se agregó un volumen de Metanol absoluto. Las proteínas se concentraron en microtubos de 1.5 mL a 14,000 rpm por 3 min y a 4 °C. La pastilla se dejó secar brevemente a temperatura ambiente, luego se resuspendió en 80 µL de buffer de Laemmli (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, SDS 10%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0.1%) 2× y 8 µL de β-ME 10X (Sigma-Aldrich, MA, EUA). Las muestras se calentaron a 95–100 °C por 5 min en el *thermoblock*. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

6.29 Caracterización de la serpina recombinante por medio de SDS PAGE y WB

De las muestras de los precipitados de la proteína se cargaron 10 µL por pozo en geles de poliacrilamida: gel concentrador [Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.8; Acrilamida/Bisacrilamida (BioRad, CA, EUA) 5%, SDS 0.1%, PSA (Sigma-Aldrich,

MA, EUA) 0.1%, TEMED (BioRad, CA, EUA) 0.1%] y gel separador (Tris-HCl 0.1875 M, pH 8.8; Acrilamida/Bisacrilamida 12.5%, SDS 0.1%, PSA 0.1%, TEMED 0.1%) junto con 7 μ L del marcador de peso molecular SeeBlue® Pre-Stained Standard (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), y fueron resueltos a 150 V por 1 h y a 4 °C. Como control negativo se cargó 10 μ L del dializado de la cepa *Pichia pastoris* SMD1168H.

Al término de la electroforesis, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie [Azul de Coomassie R250 (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 0.5%, Metanol absoluto 50%, Ácido acético glacial (J.T. Baker, NJ, EUA) 10%] con 100 rpm de agitación por toda la noche. Luego se decoloró con solución desteñidora (Metanol absoluto 40%, Ácido acético glacial 10%) por 2 h y 100 rpm de agitación. El gel fue analizado usando un transiluminador.

Se tomó otro de los geles previamente resueltos por SDS PAGE para equilibrarlo por 30 min y en agitación de 100 rpm, en buffer de transferencia para cámara semi seca (Tris-HCl 25 mM, pH 8.3; Glicina (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 192 mM, Metanol absoluto 20%), junto con una membrana de PVDF (previamente hidrofiliada en Metanol absoluto por 30 min y 100 rpm de agitación) y cuatro almohadillas de papel filtro, los cuales tienen las siguientes dimensiones: 5.5×8.5 cm. Después de ser equilibradas se armó un “sándwich” (almohadilla, almohadilla, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, almohadilla, almohadilla) para la electrotransferencia de proteínas usando una cámara semi-seca (BioRad, CA, EUA) a 20 V por 30 min.

Luego de verificar la transferencia de las proteínas al revisar la presencia del marcador de peso molecular en la membrana de PVDF, esta se equilibró en buffer TBST [Tris-HCl 20 mM, pH 7.5; NaCl 500 mM, Tween-20 (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 0.1%]

por 20 min y 100 rpm de agitación, y se incubó por 30 min y 100 rpm de agitación en buffer de bloqueo [Leche descremada *Svelty* (Nestlé, Vevey, Suiza) 5%/TBST, g/v]. Después, la membrana de PVDF se expuso al anticuerpo primario anti-c-Myc (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) a una dilución 1:3,000 (v/v), y se mantuvo con 100 rpm de agitación por toda la noche. Al término de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron cuatro lavados con TBST con 100 rpm de agitación por 5 min cada uno, para posteriormente incubar la membrana de PVDF por 2 h y 100 rpm de agitación en presencia del anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado con HRP, a una dilución 1:5,000 (v/v), y finalmente se hicieron cinco lavados con TBST por 5 min y 100 rpm de agitación.

Para evidenciar la presencia de la proteína, la membrana se cubrió con el sustrato luminol *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) por 1 min, posteriormente se colocó en un casete de revelado entre dos acetatos. El revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro con una lámpara con luz roja como única fuente de iluminación. Las películas radiográficas X-OMAT (Carestream, NY, EUA) fueron expuestas sobre los acetatos dentro del casete a diferentes tiempos (30s a 5 min), luego se sumergieron en solución de revelado (Carestream, NY, EUA), se enjuagaron en agua corriente, se fijaron con solución de fijado (Carestream, NY, EUA) y finalmente se volvieron a enjuagar. Luego de secarse, las películas radiográficas se sobrepusieron a la membrana de PVDF entre los acetatos y con un transiluminador se analizó la ubicación de la proteína de la película con respecto al marcador de peso molecular de la membrana.

6.30 Purificación de las serpinas recombinantes por cromatografía de afinidad a níquel

A partir de 2 mL de resina de níquel ProBond (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) se dispensó 1 mL en un tubo cónico de 50 mL y se centrifugaron a 800 g por 1 min para separar el sobrenadante de la resina. La resina se lavó con 6 mL de agua destilada, se resuspendió y sedimentó a 800 g por 1 min para retirar el agua. Se realizaron dos lavados con buffer de purificación para condiciones nativas [Fosfato de Sodio Dibásico (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 50 mM, pH 8.0; NaCl 500 mM], se homogenizó la resina y se descartó el buffer luego de la sedimentación. Se tomaron 100 mL del dializado correspondiente a la fermentación de las clonas de *Pichia pastoris* SMD1168H recombinantes y se dispensaron 50 mL en los tubos cónicos para su interacción con la resina. Estos se incubaron en un horno de hibridación (Analytik Jena, Jena, Alemania) a temperatura ambiente y en agitación constante por 3 h. Al término, los tubos se centrifugaron a 800 g por 1 min y los sobrenadantes fueron resguardados a 4 °C para su posterior análisis. La resina se resuspendió por pipeteo y se dispensó en una columna de polipropileno (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), en donde se realizó una serie de cinco lavados con 8 mL de buffer de lavado [Imidazol (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 20 mM, pH 8.0] y finalmente se adicionó a la columna 9 mL del buffer de elusión (Imidazol 500 mM, pH 8.0) para la obtención de la proteína. Los 9 mL de la elusión fueron colectados en fracciones independientes de 1.5 mL. A partir de cada una de las fracciones se tomaron 100 µL para su análisis por SDS PAGE y WB (6.29).

6.31 Desalado de las proteínas recombinantes por columnas de sefadex

Para llevar a cabo el desalado se utilizaron columnas PD-10 con sefadex G-25 (Sigma-Aldrich, MA, EUA), estas se colocaron en tubos cónicos de 50 mL. Se cargaron las dos primeras fracciones de la proteína previamente purificada (2.8 mL) a la columna y se centrifugaron a 1,000 g por 2 min. Luego se realizaron 3 eluciones, utilizando como fase móvil agua destilada estéril. Cada una de las eluciones fue colectada en tubos independientes. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteína por el protocolo de Pierce BCA (6.5) y se analizaron por SDS PAGE y WB (6.29).

6.32 Producción de suero policlonal anti-serpina recombinante

Tres ratones hembras de la cepa BALB/c fueron inmunizados por vía peritoneal con 20 µg de la serpina recombinante previamente purificada y desalada en 200 µL de PBS [NaCl 137 mM, KCl (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 2.7 mM, Fosfato de Sodio Dibásico 10 mM, Fosfato de Potasio Monobásico]. Cada 7 días se aplicó un refuerzo y a los 28 días los ratones fueron desangrados de acuerdo con el esquema de inmunización (Figura 3). La sangre colectada se centrifugó a 15,000 g por 15 min y se transfirió el suero (sobrenadante) a microtubos de 1.5 mL. Los sueros anti-serpina recombinante se resguardaron a -20 °C hasta su uso.

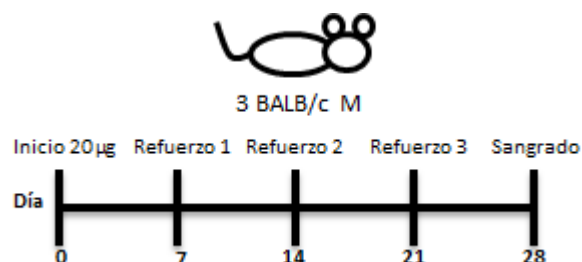


Figura 3: Esquema de inmunización con la serpina Tsp_01570 recombinante

6.33 Adsorción del suero anti-serpina recombinante

A partir de 5mL de un cultivo de la cepa *Pichia pastoris* SMD1168H en medio BMGY ($DO_{600} = 2-6$) (6.25), se centrifugó a 5,000 g por 5 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla de levaduras se dejó en hielo y se resuspendió con 100 μ L de buffer de lisis [Fosfato de Sodio Monobásico (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 50 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM, Glicerol 5%]. Luego se agregó 150 μ L de perlas tratadas con HCl y 150 μ L del cóctel de inhibidor de proteasas cComplete™. Después de 8 ciclos de agitación máxima con vórtex, los lisados se centrifugaron a máxima velocidad por 10 min. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteína por el protocolo de Pierce BCA (6.5).

El extracto total de *P. pastoris* SMD1168H se diluyó 1:10 en buffer TBST. Luego se utilizó para recubrir una membrana de PVDF de 5.5x8.5 cm, esta se incubó por 1 h a temperatura ambiente con 100 rpm de agitación constante. El extracto total se retiró y la membrana de PVDF se incubó con buffer de bloqueo por 1 h. Luego se realizaron 4 lavados con TBST por 5 min y 100 rpm de agitación. El suero policlonal anti-serpina se diluyó 1:100 en TBST. La dilución del suero se utilizó para ser adsorbida por 1 h por el extracto total de *P. pastoris* SMD1168H contenido en la membrana de PVDF. Al término, el suero adsorbido fue recuperado y resguardado a -20 °C hasta su uso.

6.34 Análisis de la reactividad del suero anti-serpina por *Dot Blot*

A partir de diferentes concentraciones de la serpina recombinante Tsp_01570 (1,000, 500, 100, 50 y 10 ng/ μ L) se tomó 1 μ L y se cargó en cuadros de 1x1cm de membrana de nitrilo (GE Healthcare, IL, EUA). Después de secarse, las membranas se

incubaron en buffer de bloqueo por 1 h con 100 rpm de agitación. Luego se realizaron 4 lavados con buffer TBST por 5 min y 100 rpm de agitación. Después se incubaron con el suero anti-serpina previamente adsorbido (1:100) por 1 h. Al término del quinto lavado con buffer TBST, las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-ratón, conjugado con HRP, a una dilución 1:5,000 (v/v), y finalmente se hicieron otros cinco lavados con TBST por 5 min y 100 rpm de agitación.

Para el revelado del *Dot Blot*, las membranas se cubrieron con el sustrato luminol por 1 min, posteriormente se colocaron ordenadas de mayor a menor concentración en un casete de revelado entre dos acetatos. El revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro con una lámpara con luz roja como única fuente de iluminación. Las películas radiográficas fueron expuestas sobre los acetatos dentro del casete a diferentes tiempos (30s a 5 min), luego se sumergieron en solución de revelado, se enjuagaron en agua corriente, se fijaron con solución de fijado y finalmente se volvieron a enjuagar. Luego de secarse, las películas radiográficas se analizaron con ayuda de un transiluminador.

6.35 Localización de la serpina nativa en diferentes estadios del parásito

Se cargaron 10 μ L del precipitado del dializado de la clona de *Pichia pastoris* SMD1168H recombinante, así como 0.5 μ g de la proteína Tsp_01570 recombinante y 30 μ g de los extractos crudos de las LM, Ad y antígenos de E/S de *Trichinella spiralis* cada uno por pozo en geles de poliacrilamida al 12.5%, junto con 7 μ L del marcador de peso molecular, y fueron resueltos a 150 V por 1 h y a 4 °C. Como control negativo se cargó 10 μ L del dializado de la cepa *Pichia pastoris* SMD1168H.

Al término de la electroforesis, uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie con 100 rpm de agitación por toda la noche. Luego se destiñó por 2 h y 100 rpm de agitación. El gel fue analizado usando un transiluminador.

Se tomó otro de los geles previamente resueltos por SDS PAGE para equilibrarlo por 30 min y con agitación de 100 rpm, en buffer de transferencia para cámara semi seca, junto con una membrana de PVDF (GE Healthcare, IL, EUA) y cuatro almohadillas de papel filtro, los cuales tuvieron las siguientes dimensiones: 5.5×8.5 cm. Después de ser equilibradas se armó un “sándwich” para la electrotransferencia de proteínas usando una cámara semi-seca a 20 V por 30 min.

Luego de verificar la transferencia de las proteínas al revisar la presencia del marcador de peso molecular en la membrana de PVDF, esta se equilibró en buffer TBST por 20 min y 100 rpm de agitación, y se incubó por 30 min y 100 rpm de agitación en buffer de bloqueo. Después, la membrana de PVDF se expuso al suero policlonal anti-serpina previamente adsorbido y a una dilución 1:10,000 (v/v), y se mantuvo con 100 rpm de agitación por toda la noche. Al término de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron cuatro lavados con TBST con 100 rpm de agitación por 5 min cada uno, para posteriormente incubar la membrana de PVDF por 2 h y 100 rpm de agitación en presencia del anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado con HRP, a una dilución 1:5,000 (v/v), y finalmente se hicieron cinco lavados con TBST por 5 min y 100 rpm de agitación.

Para evidenciar la presencia de la proteína, la membrana se cubrió con el sustrato luminol por 1 min, posteriormente se colocó en un casete de revelado entre dos acetatos. El revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro con una lámpara con luz roja como única fuente de iluminación. Las películas radiográficas fueron expuestas sobre los

acetatos dentro del casete a diferentes tiempos (30s a 5 min), luego se sumergieron en solución de revelado, se enjuagaron en agua corriente, se fijaron y finalmente se volvieron a enjuagar. Luego de secarse, las películas radiográficas se sobrepusieron a la membrana de PVDF entre los acetatos y con un transiluminador se analizó la ubicación de la proteína nativa de la película con respecto al marcador de peso molecular de la membrana.

6.36 Ensayo de actividad bioquímica contra Tripsina

Previo a la reacción de proteólisis, en un volumen de 60 μL se incubó Tripsina y la serpina Tsp_01570 recombinante en las siguientes proporciones: (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 26.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 13.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) respectivamente, a temperatura ambiente por 30 min y por duplicado. Al término, se adicionó a 140 μL de buffer de reacción (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0) junto con el sustrato cromogénico BApNA (Sigma-Aldrich, MA, EUA) 5 μM . La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos *nunc* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). La hidrólisis del sustrato cromogénico se monitoreo al realizar lecturas a 415 nm con un espectrofotómetro cada 5 min por 2 h. Para determinar la actividad enzimática proporcionada por las lecturas de absorbancia de la tripsina, producto de su interacción previa con la serpina recombinante, estas se interpolaron en una curva de calibración, empleando la tripsina como un referente.

6.37 Ensayo de diferenciación de macrófagos en monocitos de la línea celular THP-

1

Para la propagación y mantenimiento de la línea celular THP-1, se sembraron 0.5×10^6 células/mL en frascos de cultivo de 75 cm^2 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) con medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio 1 mM (Sigma-

Aldrich, MA, EUA), aminoácidos no esenciales 0.01 mM (Sigma-Aldrich, MA, EUA), β -ME 0.05 mM, antibióticos penicilina 100U/mL y estreptomicina 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich, MA, EUA) y SFB al 10% (Gibco, MA, EUA). Las células se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante tres días. Para los subcultivos, las células fueron transferidas a un tubo cónico de 15 mL y centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. El medio fue retirado y las células fueron resuspendidas con 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado fresco y se determinó la viabilidad celular con azul tripano (Sigma-Aldrich, MA, EUA) para el ajuste de la densidad celular a 0.5×10^6 células/mL en medio RPMI-1640 suplementado. El volumen de cultivo que se mantuvo fue de 25 mL, de los cuales 20 mL correspondieron a la suspensión de células THP-1 y 5 mL al sobrenadante de cultivo anterior.

Para el protocolo de polarización de macrófagos, se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 96 pozos (Corning, NY, EUA) y en placas de 8 pozos *Nunc Lab Tek Chamber Slides* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) con 50 μ L de medio RPMI-1660 suplementado. Estas fueron estimuladas con PMA (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) a una concentración final de 5 ng/mL para un volumen final de 100 μ L. Las células se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂, por 24 h. El medio de cultivo se retiró y se reemplazó con medio fresco y las células se sometieron a una segunda incubación por 48 h. Luego, el medio de cultivo fue retirado, sustituido por los estímulos de diferenciación a macrófagos M1/M2, así como por la serpina recombinante, tal y como se indica en la **Tabla 5**. Luego de adicionar los tratamientos, las células se incubaron por 72 h bajo las mismas condiciones de cultivo. Finalmente, se retiraron los sobrenadantes, los cuales se resguardaron a -20 °C hasta su análisis para la detección de citocinas por ELISA, y las placas de 8 pozos se utilizaron para el protocolo de inmunofluorescencia.

Tabla 5: Estímulos utilizados para el ensayo de diferenciación de células THP-1

Tratamientos	Estímulo
M1	INF- γ (40 ng/mL), LPS (200 ng/mL)
M2	IL-4 (40 ng/mL)
Serpina	rTsp_01570 (5 μ g/mL)
M1 + Serpina	INF- γ (40 ng/mL), LPS (200 ng/mL), rTsp_01570 (5 μ g/mL)
M2 + Serpina	IL-4 (40 ng/mL), rTsp_01570 (5 μ g/mL)

6.38 Ensayo de viabilidad celular

Al término del protocolo de diferenciación celular se realizó la determinación de la viabilidad celular en la placa de cultivo. Se adicionó 100 μ L de medio RPMI-1660 suplementado fresco a los pozos con células, luego se agregó 20 μ L del reactivo de MTS CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, WI, EUA). La placa de 96 pozos se incubó por 30 min a 37 °C y a una atmósfera de CO₂ al 5%. La absorbancia de las muestras fue detectada a 490 nm con un espectrofotómetro.

6.39 Cuantificación de citocinas por ELISA

Para la determinación de las citocinas IL-4, IL-10, IL-12p40 y TNF- α , se empleó el kit comercial de OptEIA (Becton Dickinson, NJ, EUA), siguiendo las especificaciones del fabricante. En las placas de 96 pozos *nunc* se agregó 100 μ L por pozo del anticuerpo de captura diluido en buffer de carbonatos (NaHCO₃ 85 mM, Na₂CO₃ 15 mM, pH 9.5), luego se incubaron a 4 °C por toda la noche. Después de retirar el anticuerpo de captura, los pozos se lavaron tres veces con 250 μ L de buffer de lavado (PBS 1X, Tween-20 al 0.05%). Luego, las placas se bloquearon por 2 h. con 200 μ L de diluyente de ensayo (PBS 1X, SFB 3%) a temperatura ambiente. En seguida, se

realizaron tres lavados. Las muestras, controles y estándares se adicionaron en volúmenes de 100 µL por pozo, usando el diluyente de ensayo para el ajuste de las concentraciones. La placa se incubó por toda la noche a temperatura ambiente. Luego, el contenido de las placas se retiró y se realizaron cinco lavados. Después, se adicionó 100 µL del anticuerpo de detección a los pozos correspondientes. La placa se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 7 lavados, y se agregó 100 µL por pozo del reactivo TMB (Sigma-Aldrich, MA, EUA). La placa se incubó en obscuridad por 10 min. La reacción se detuvo con 50 µL de H₂SO₄ 2N y se detectó la absorbancia a 450 nm, con corrección a 595 nm con un espectrofotómetro. Las diluciones de cada anticuerpo de captura, anticuerpo de detección y los rangos de concentración para la curva estándar se detallan en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Diluciones de anticuerpos y rango de concentración para la curva de calibración de los ELISA.

Citocina	Dilución Ac. Captura	Dilución Ac.		Rango de concentración (pg/mL)
		Detección		
IL-4	1:250	1:1000		500-62.5
IL-10	1:251	1:1000		500-31.2
IL-12p40	1:252	1:250		2000-125
TNF-α	1:253	1:250		500-62.5

6.40 Ensayo de inmunofluorescencias

Las células THP-1 adheridas en las placas de 8 pozos se fijaron con PFA al 4% por 25 min y las placas fueron bloqueadas con 100 µL de suero humano por 1 h. Las células fueron etiquetadas con los siguientes anticuerpos: anti-CCR7 humano (1:100) y anti-CD86 humano (1:100), anti-CD183 humano (1:100) y anti-CD206 humano (1:100);

en conjunto con el anticuerpo secundario de conejo IgG (H + L) anti-ratón conjugado con Alexa FluorTM 555 (Invitrogen, MA, EUA) (1:400) y el anticuerpo secundario de cabra IgG (H + L) anti-ratón conjugado con Alexa FluorTM 488 (Abcam, Cambridge, UK) (1:400) respectivamente. Las placas de 8 pozos con las células marcadas fueron fijadas para su análisis por microscopía de fluorescencia usando el reactivo *Prolong Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), el cual contiene DAPI para la tinción de los núcleos. La inmunofluorescencia fue capturada por medio de la cámara *Evolution 5.1 MP Digital CCD color camera* (Media Cybernetics, Md, EUA), el microscopio de fluorescencia *AxioPlan Fluorescence Microscope* (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y el programa *Q-capture Pro 7* (QImaging, Surrey, Canadá). La CTCF fue calculada usando el programa *ImageJ*.

6.41 Análisis estadísticos

El análisis de significancia de las diferencias se estimó por medio de la prueba de ANOVA de un solo factor con corrección de Bonferroni *post hoc* para más de dos grupos analizados. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa PrismTM versión 7.0 de *Graph Pad*. La significancia estadística en las gráficas fue representada como *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Análisis de las serpinas anotadas Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 del genoma de *Trichinella spiralis*

Para la obtención de secuencias de serpinas como potenciales moduladores de la respuesta inmune se realizó una búsqueda exhaustiva de inhibidores de proteasas de serina anotadas en las bases de datos de GenBank de la NIH, así como de WormBase Parasite (6.2). De los resultados obtenidos se realizó un alineamiento y se construyó un árbol filogenético para determinar el grado de similitud de las serpinas anotadas con respecto a otras ya caracterizadas, así como otros inhibidores de proteasas de tipo Kunitz y Kazal (Figura 4). Las secuencias de los genes Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 encontrados guardaron una mayor similitud entre ellas y con las serpina humana del clado B10, así mismo, los inhibidores de proteasas tipo Kunitz y Kazal se encontraron más alejados en el árbol filogenético con respecto a las serpinas anotadas.

Luego de identificar a los inhibidores de proteasas de serina como serpinas, se realizó la búsqueda de dominios presentes en las serpinas (6.2), como el barril de láminas β y el RCL (Figura 5). Con base en las predicciones se idéntico que gran parte de las secuencias guardan una gran similitud con serpinas ya reportadas, pero más interesante aún fue encontrar la localización del motivo RCL. Al realizar una nueva serie de alineamientos, se logró determinar la secuencia del RCL, así como los residuos P1 y P1' cuyo enlace peptídico es escindido por las proteasas de serina (Figura 6).

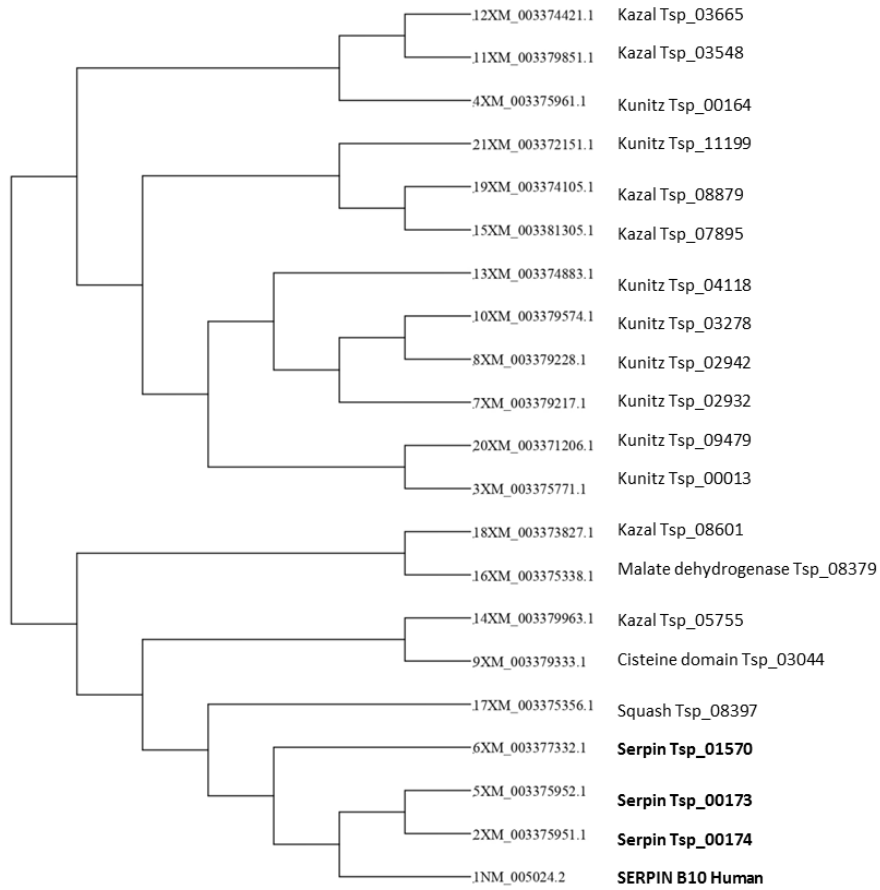


Figura 4: Análisis filogenético de los inhibidores de proteasas de serina del tipo Kunitz, Kazal y Serpinas de *Trichinella spiralis*

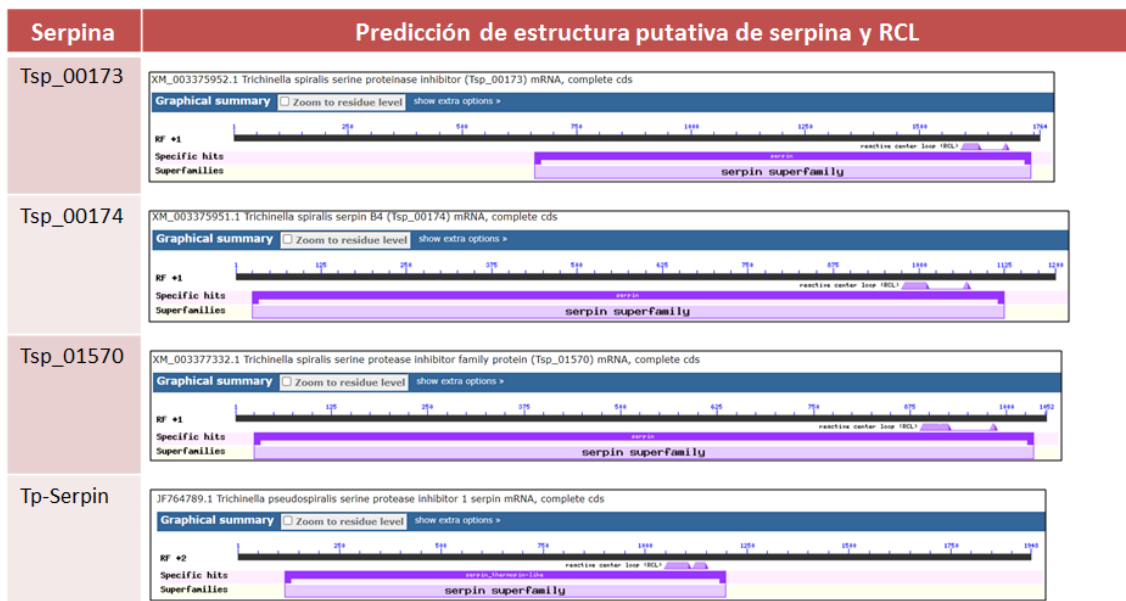


Figura 5: Predicción de dominios de la súper familia de las serpinas

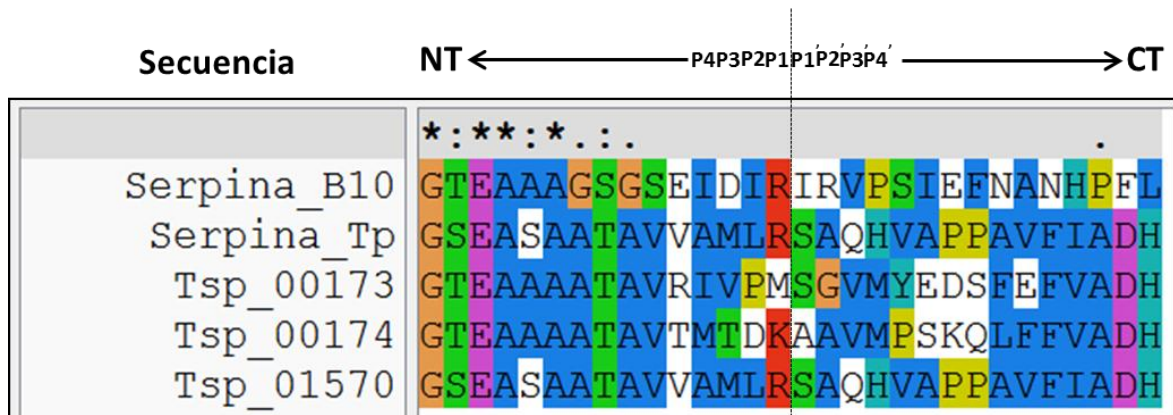


Figura 6: Alineamiento del dominio RCL de las serpinas anotadas. Extremo N terminal (NT), Extremo C terminal (CT).

7.2 Síntesis del ADN complementario

Previo a la amplificación de las secuencias codificantes, es necesario sintetizar el ADNc a partir de los transcritos presentes en el ARN total de las LM y los Ad de *Trichinella spiralis*, ya que al tratarse de un organismo eucariota la amplificación directa de su ADNg incluiría intrones, es decir, elementos no codificantes. Luego de realizar la extracción del ARN total (6.6) se sintetizó el ADNc por RT PCR (6.8). Para corroborarlo, se realizó la amplificación de un fragmento de 419 pb del gen que codifica la sub unidad 18S del ARNr de *T. spiralis* (Figura 7).

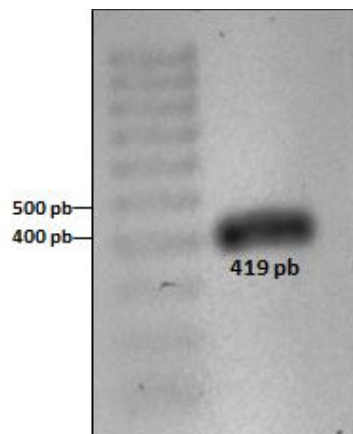


Figura 7: Amplificación por PCR de la subunidad 18S del ARNr de *T. spiralis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

A)

ATGGAATCAAAAAGTTTCAAATGAAGTCACCGAATTCATTTGGAAATTATTCCAAAAATCAAAAAGCTCCAA
AAAAGTTTCGGAATGTATTTTCTTATCACCAATGTCAGTGTGGCTTGCAATTGGTATGGCATATTTTGGAG
CAGCTGGAAAAACAAAAC TAGAAATTCACGAGCCATCTTCGGTGATACAGCAAAGGAGAAAAGATGTACGA
GCACTGTTTGTGGAAATTAATAAAATTTTAACAACAGAAAAGCAAAAATTTCAATAAAGTGAAATTGCTCGT
CGCAAAC TGC GTTTACATTCAAGAAGGATTCAAAC TGC T GACTCCTTATGTTGAGGATATTAATAAAATCT
CCTCAGACATCATCGAGGTGGATTTTATGGATATTAAGAGGGCAAGATTGGTGATCAATCAATGGATTTGT
AATAAAAATGAACGAAAAATGAAAATCTCATTCCACCTGGTCTTCTACAACCAATTACAACATCAGTGAT
CGCGAATGCTATATATTTCAAAGCGCAATGGGCAAGACGATTCGAAGTACAAAATACTGTTAATTCTGATT
TTTTCTGTGATGAAATTCGCAGAATTAAGTGAAAATGATGCGTGACAAGCAAGAATTTTATTATTATGAA
AATGAAC TTTGCCAACTTTTGGGAATCAGTTACAAAGAGAACAATTTTGGATGTATTTTTACTGCCCAA
GCAACGATTCGCGTTGGAAGAGATGGAAAATTCATTGACAAGCAGTCAATTAGCAGAAATGTTTCAAACG
GTGCTATGGTTGATGTTACTGTAAAAATTCAAAATTCACTTTCCACCAGCGCATTAACATGAAAGACGTG
CTAACTGAGCTTGAATGGGCATCATTTTTGATGGTGAAAATGCTGATTTTTCCAAAATTTGCAAAAGGAA
AGACATTTTCGTCTCTGATATTTGCACAAAGCATTTTTAGAAAGTAAATGAAGAAGGCACTGAAGCCGCTG
CGGCAACAGCCGTGACAATGACAGACAAAGCAGCGGTGATGCCATCAAAGCAACTTTTTTTTGTTCAGAT
CATCCATTTTTATTTTTCATTTGCAATCCAAAAATTCATACC ACTATTTTTGGGTCGCTACACTGGTCT
AAACGTCAAATCAGATAATGCTGAAACCAATGCATT CAG TACGCTCCCTTCACATCAGTT TAA

B)

MESKSFNEVTEFIWKLFQKIKSSKKVSECIFLSPMSVLLAIGMAYFGAAGKTKLEIQRAIFGDTAKEKDVR
ALFVEINKILTTESKNFNKVKLLVANCVYIQEGFKLLTPYVEDIKKISSDIEVDFMDIKEARLVINQWIC
NKTERKIENLIPPGLLPITTSVIANAIYFKAQWARRFEVQNTVNSDFFCDEIRRIKVKMMRDKQEFYYE
NELCQLLGISYKENNFWMYILLPKQRFAL EEMENSLTSSQLAEMFQNGAMVDVTVKIPKFTFTSALNMKDV
LTELGMGIIIFDGENADFSKICKRKDIFVSDILHKAFLEVNEE GTEAAAATAVTMTDKAAVMPSKQLFFVAD
HPFLFFICNPKNCIPLFLGRYTGLNVKSDNAETKCIQYAPFTSV

Figura 9: Representación de la (A) secuencia codificante completa y (B) traducción del transcrito del gen Tsp_00174. Lo subrayado en rojo representa las bases nucleotídicas que se hibridan con el oligo en 5', en rojo con el oligo en 3' y en amarillo se localiza el motivo RCL.

A)

```
ATGTCGTCCTCGCAATTTTCGACATTAGCATGGCTAATTTTTGCGATGGAGTTGTACCGTCAGTCGTTTTAACAA  
CCAATCCAACGTCCTTCTTCTCGCCCTGTTTCGATTGTTTTAACGTTGGCGATGACTTATTTCCGGCTCTTCCG  
GTACGACGAAGCAGCAGTTGAAGGATCGCCTGTTTCAGTCTGTTGCCGGCATATTTGGCTCGAATACGGCAA  
ACATTCAAAGCTGACGTGGATCTAATGGATTTTACGCAACGGCGCCGCCGCTGCTGAGAAGATCAACCGTTG  
GGTGGCGAACGAGACGAACGATAAGATACAAAATTTAATCCCTCTGGATGTGCTGGACGAAATGACGTGTC  
TGGTGTGGTGAACGCGATTTATTTCAAAGGCAACTGGCAGACGAGATTTGCCCCGAGAATCCACTTCCAAG  
CAATATTTTTCCGTCGACCAAAAATACAAACAAGCTGGTGGACATGATGCATGTCAACGATACGTTTCCAGGCA  
TGCCGAATACGAGCAGTTTCAAATTTTGCATTACCATACGAAAACCTCAAATTAGCAATGTGCGTTCTGC  
TACCAAAAGAGAAGTTTCGGTTTGGAAAAATTAGCCAGCCAGTTGAGTGGAGAACAATTGCTGGACTATATG  
GAAGAGATGATCAGTAAAAAAGTTTCAATCACGTTTCCAAAGTTCAAACCTGAAGAAACATTGCCGTTGAA  
AAAAATTTTACTCCAACCTCGGCTTAAACAAGCATGTTTCGACCACAGTATGGCCGATTTTTCCATGATGACTG  
GCGACCGTAGTGTTCATCGTTTTCGGATGCTTTTACAAAAGCACAAATCGAAGTAATCGTACCCATCGTGCAC  
AACACTCACTACACGGGCAGGTTATTTGTAAATGAAGAAGGAAGCGAAGCTTCTGCAGCCACAGCAGTCGT  
AGCAATGCTGAGAAGTGCGCAACATGTTGCACCTCCAGCCGTATTTATTGCTGACCATCCATTTATGTTCT  
TAATTGCCGACATGCAAACGCAAACAATA TTGTTTCATGGGAAGCTATCGTGGT TAA
```

B)

```
MSSVNFDISMANFAMELYRQSFNNQSNVFFSPCSIVLTLAMTYFGSSGTTKQQLKDRLFSLLPAYLARIRQ  
TFKADVDLMDFSNGAAAAEKINRWVANETNDKIQNLIPLDVLDENTCLVLVNAIYFKGNWQTRFARETSK  
QYFSVDQNTNKLVDMMHVNDTFRHAEYEQFQILQLPYENSKLAMCVLLPKEKFGLEKQLSLSGELLDDYM  
EEMISKKVSITFPKFKLEETLPLKKILLQLGLTSMFDHSMADFSMMTGDRSVIVSDAFHKAQIEVIVPIVH  
NTHYTGRFLFVNEE GSEASAATAVVAMLRSAQHVAPPVFIADHPFMFLIADMQTQTILFMGSYRG
```

Figura 10: Representación de la (A) secuencia codificante completa y (B) traducción del transcrito del gen Tsp_01570. Lo subrayado en rojo representa las bases nucleotídicas que se hibridan con el oligo en 5', en rojo con el oligo en 3' y en amarillo se localiza el motivo RCL.

Se realizaron las amplificaciones con los primers correspondientes (6.7) y las reacciones se resolvieron en un gel de agarosa al 1 % (Figura 11).

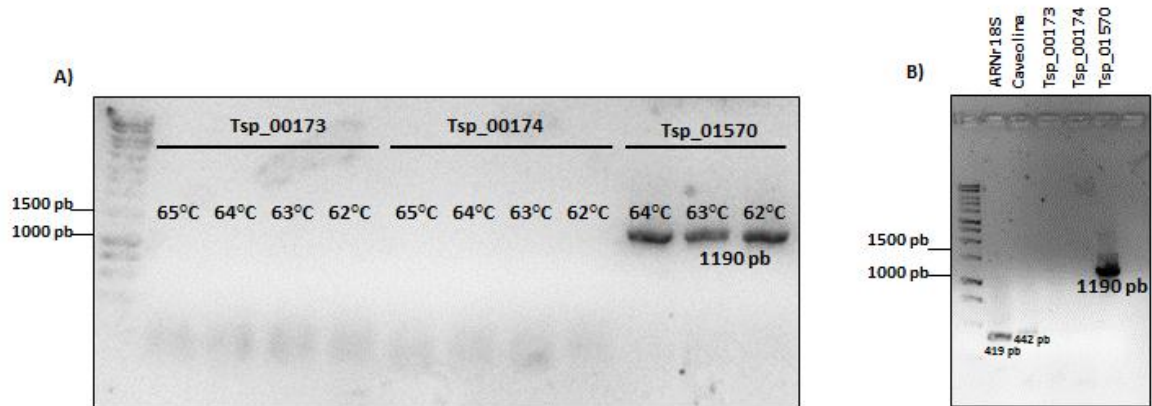


Figura 11: Amplificación de la secuencia codificante completa de los genes Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570, utilizando como plantillas (A) el ADNc de LM y (B) Ad de *T. spiralis*. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para la amplificación, se utilizó un gradiente de temperaturas de alineamiento de los 65 °C hasta los 62 °C. En la **Figura 11A** se observa que no se obtuvo ningún amplicón para los transcritos Tsp_00173 y Tsp_00174, mientras que para Tsp_01570 se obtuvo un amplicón de 1190 pb. Sin embargo, esto no corresponde con el tamaño teórico de 1091 pb. Al no obtener productos de PCR para Tsp_00173 y Tsp_0174, se probó utilizar como templado el ADNc obtenido del ARN total de los Ad de *T. spiralis*, considerando que los transcritos para esos dos genes se encuentran en la fase de adulto (**Figura 11B**). Sin embargo, se obtuvo el mismo resultado que con el templado de la fase de LM. Es necesario resaltar que el amplicón que corresponde a Tsp_01570 fue de un tamaño de 1190 pb, lo que coincide con el producto de PCR obtenido con el templado de LM, pero contrasta con el tamaño teórico. Al no obtener la secuencia codificante completa de los genes ya mencionados, se continuó con el protocolo de clonación, utilizando como inserto el producto de PCR de Tsp_01570.

7.4 Clonación del transcrito Tsp_01570 en *E. coli* DH5 α

Los productos de PCR de la secuencia codificante del gen Tsp_01570 fueron purificados (**6.10**) y el plásmido pPICZ α A vacío se extrajo de un cultivo de *E. coli* DH5 α (**6.12**). Para llevar a cabo la inserción del transcrito de la serpina en el vector de clonación, el producto amplificado generado cuenta con dos sitios de restricción: el sitio de restricción *Xho* I en el extremo 5' y el sitio *Not* I en el extremo 3', los cuales también se localizan en el sitio de clonación múltiple de pPICZ α A (**Figura 12**).

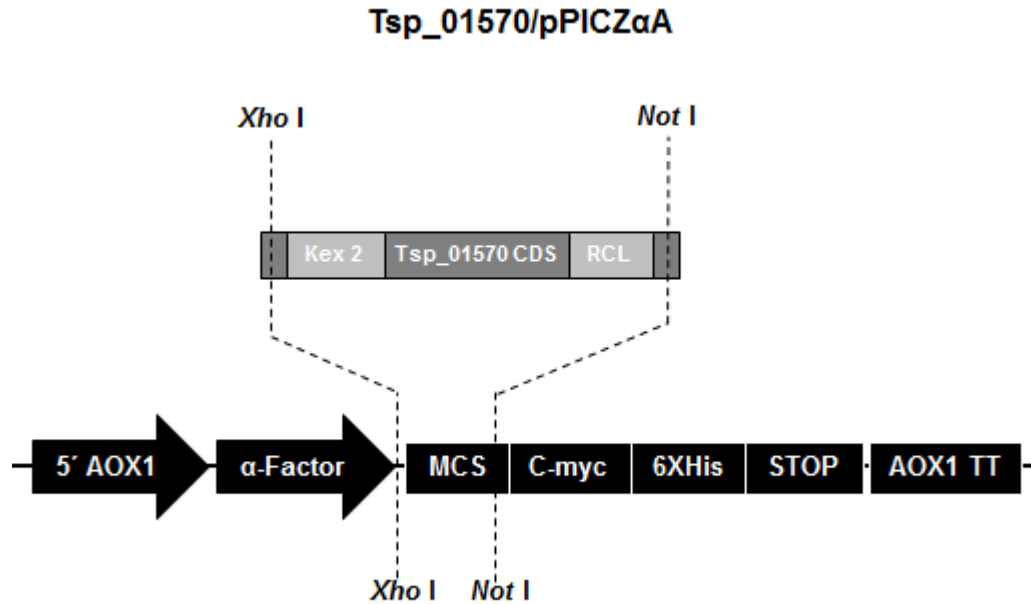


Figura 12: Estrategia de clonación de la serpina Tsp_01570 en el plásmido pPICZαA. Tanto en la secuencia completa codificante como en el sitio de clonación múltiple se encuentran los sitios de restricción *Xho* I y *Not* I, lo que permite al transcrito insertarse en el vector. El vector de clonación/expresión cuenta con el epítipo c-Myc, la etiqueta de histidinas y el codón de terminación de la proteína recombinante.

Tanto el inserto como el vector fueron sometidos a un ensayo de digestión con las enzimas de restricción previamente mencionadas (**Figura 13**).

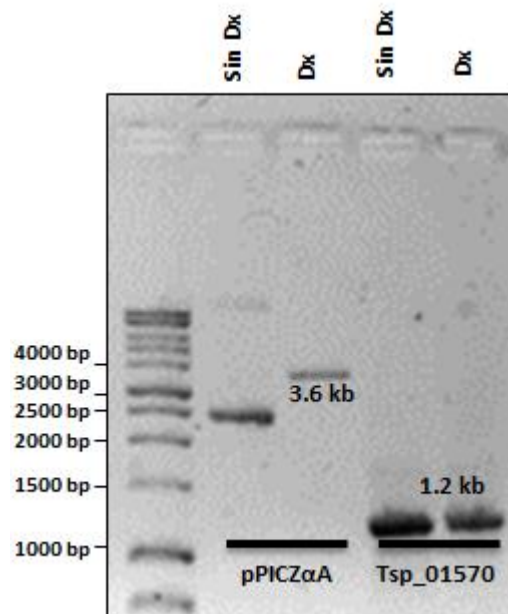


Figura 13: Reacción de digestión en simultáneo con las enzimas de restricción *Xho* I y *Not* I. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Al digerir con *Xho* I y con *Not* I, el plásmido se linearizó, por lo que se pudo apreciar un tamaño de aproximadamente 3.6 kb. En contraste, no fue posible diferenciar el tamaño del inserto digerido (1190 pb) contra el control sin digerir (1174 pb). Previo al ensayo de restricción, el plásmido digerido fue purificado (6.14) para evitar que el remanente no digerido pudiera generar falsos positivos al sembrar las células transformadas de *E. coli* DH5 α .

Al término de los ensayos de restricción, el inserto y el vector fueron ligados (6.15) y las reacciones de ligación fueron utilizadas para la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α (6.17). Finalmente, las células electroporadas con la reacción de ligación, así como sus respectivos controles se sembraron en placas con medio LB + Zeocina (100 μ g/mL), las cuales se incubaron a 37 °C por 24 h (Figura 14).

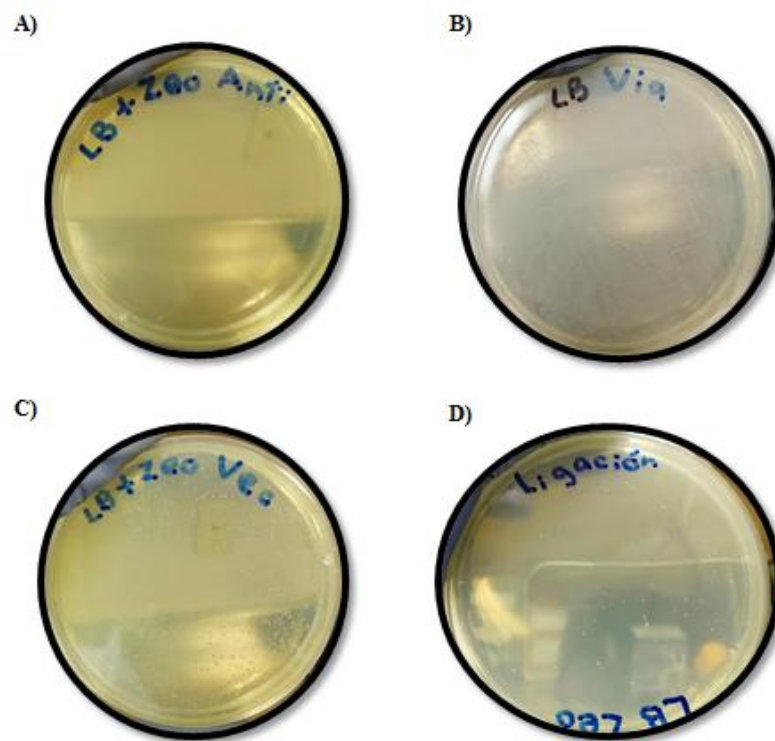


Figura 14: Clonación del transcrito Tsp_01570 en *Escherichia coli* DH5 α . (A) Control de antibiótico, (B) Control de viabilidad, (C) Control de electroporación y (D) Ligación de Tsp_01570 con pPICZ α A.

Al sembrar las células de *E. coli* electroporadas con agua libre de nucleasas en placas con medio LB + Zeocina (100 µg/mL), no se observó el crecimiento de ninguna colonia, por lo que se validó la estabilidad del fármaco en el medio de selección (**Figura 14A**), por otro lado, cuando estas mismas células se inocularon en medio LB sin Zeocina, se observó un crecimiento tipo césped, validando la viabilidad de las células de *E. coli* DH5α luego de ser electroporadas (**Figura 14B**). Cuando se sembraron células electroporadas con el vector pPICZαA, se obtuvo una gran cantidad de colonias aisladas (**Figura 14C**), a diferencia de las colonias obtenidas por la transformación con la reacción de ligación de Tsp_01570 y el vector, las cuales estaban más aisladas y en menor cantidad (**Figura 14D**).

Las colonias obtenidas, producto de la transformación con la reacción de ligación, fueron resguardadas en placas con medio LB + Zeocina (100 µg/mL) y se crecieron en tubos con caldo LB + Zeocina (100 µg/mL) para su posterior verificación.

7.5 Caracterización de los vectores recombinantes

A partir de los cultivos con caldo LB + Zeocina (100 µg/mL) se extrajo el ADN plasmídico de las células de *E. coli* DH5α transformadas por medio de lisis alcalina (**6.18**). Luego se hizo el tamizaje de los plásmidos de las colonias obtenidas, esto por medio del corrimiento electroforético en geles de agarosa (**Figura 15**).

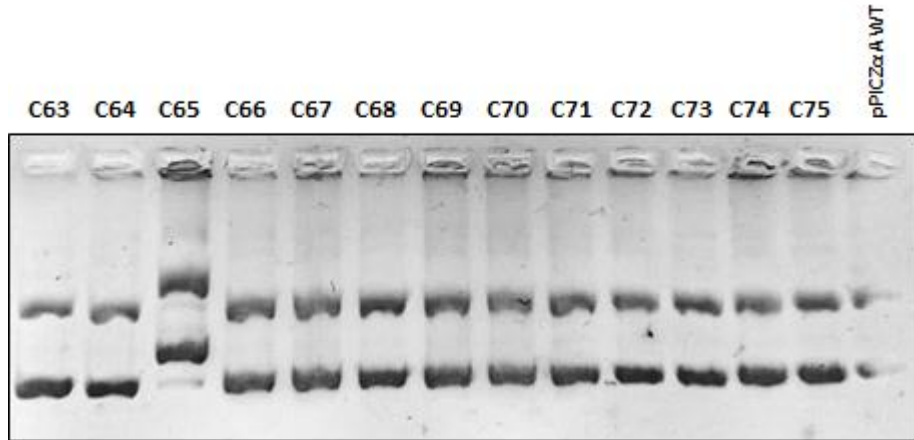


Figura 15: Tamizaje del ADN plasmídico de las clonas de *Escherichia coli* obtenidas en el ensayo de transformación de las células de DH5 α . pPICZ α A WT corresponde a un plásmido vacío utilizado como control negativo. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Se realizó una búsqueda exhaustiva de los plásmidos que presentaron un retraso en la migración, producto de la incorporación del inserto Tsp_01570 en pPICZ α A, haciéndolo más pesado con respecto a los plásmidos vacíos. Al analizar 75 clonas, se encontró que la número 65 tenía este patrón, por lo que se utilizó su plásmido para la verificación con enzimas de restricción (**Figura 16**).

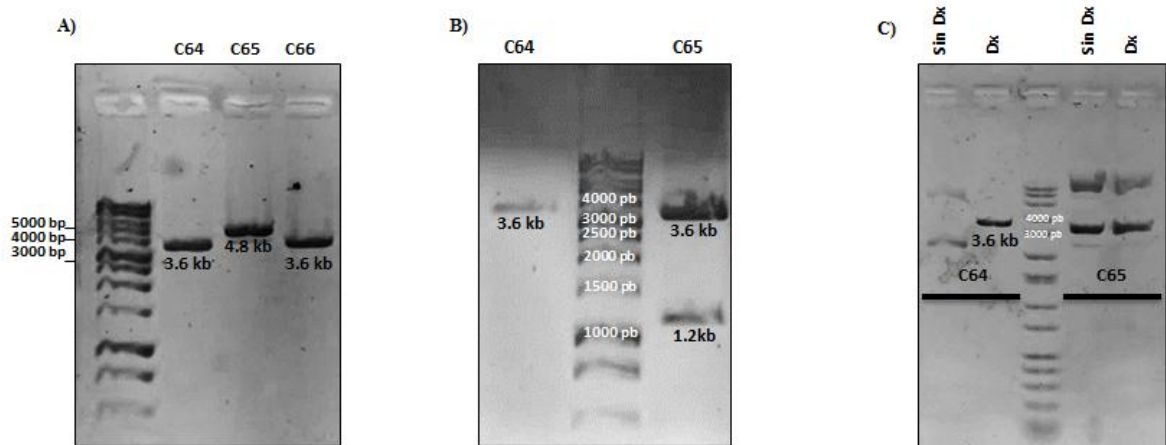


Figura 16: Verificación de las clonas recombinantes por ensayos de restricción. (A) Linearización del plásmido de la clona 65 con *Xho* I. (B) Liberación del inserto con la digestión en simultáneo *Xho* I/*Not* I. (C) Pérdida del sitio *Eco* RI. Electroforesis en gels de agarosa al 1%.

Al realizar una reacción de digestión con la enzima *Xho* I, los plásmidos adquirieron una conformación lineal, por lo que al comparar el tamaño del ADN

plasmídico de las clonas control con respecto a la clona 65, se encontró una diferencia de 1.2 kb, lo que corresponde al tamaño del inserto (**Figura 16A**). Al realizar una digestión en simultáneo con *Xho* I y *Not* I, se evidenció esta diferencia, distinguiendo así una banda de 3.6 kb correspondiendo al vector pPICZ α A y el inserto de 1.2 kb (**Figura 16B**). La presencia del segundo sitio *Xho*-I representó la posibilidad de que el inserto se uniera de forma incorrecta en el vector, generando una proteína cuyo extremo N terminal contaría con 13 aminoácidos adicionales comparado con la proteína nativa, lo que podría comprometer el mecanismo de acción de la proteína. Al evaluar la digestión del plásmido de la clona 65 con *Eco* RI, no se linearizó, a diferencia del plásmido de las clonas control, por lo que el inserto Tsp_01570 fue correctamente insertado en el vector pPICZ α A (**Figura 16C**).

7.6 Transfección de la construcción Tsp_011570/pPICZ α A en *P.pastoris* SMD1168H

El vector pPICZ α A cuenta con un sitio *Sac* I en la secuencia promotora de AOX1, el cual al ser escindido permite su integración en el genoma de la levadura *P. pastoris* SMD1168H por recombinación homóloga. Se utilizó la construcción Tsp_01570/pPICZ α A de la clona 65 y se linearizó con la enzima *Sac* I (**Figura 17**).

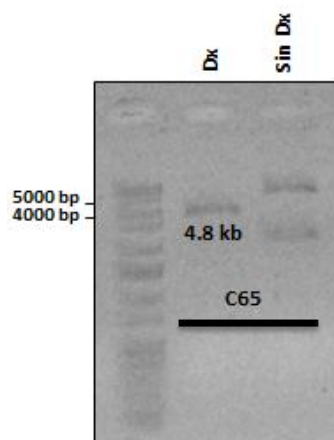


Figura 17: Linearización de la construcción Tsp_01570/pPICZ α A con la enzima de restricción *Sac* I. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Luego del ensayo de restricción, las digestiones fueron utilizadas para la transformación de células electrocompetentes de *P. pastoris* SMD1168H (6.22). Finalmente, las células electroporadas con la digestión, así como sus respectivos controles fueron sembraron en placas con medio YPD + Zeocina (100 μ g/mL), las cuales se incubaron a 30 °C por 48 h (Figura 18).



Figura 18: Transfección de la construcción Tsp_01570/pPICZ α A en *Pichia pastoris* SMD1168H

Después del tiempo de incubación, se revisaron las placas, obteniendo un total de 8 colonias aisladas en las 3 placas inoculadas. Las colonias fueron respaldadas en una placa con medio YPD y se inocularon en caldo YPD para la genotipificación de las clonas recombinantes.

7.7 Genotipificación de las clonas de *P. pastoris* SMD1168H recombinantes

Luego de crecer las clonas de *P. pastoris* SMD1168H recombinantes en caldo YPD se realizó la extracción del ADNg (6.23) para ser utilizado como templado para la genotipificación por PCR. Para ello se utilizaron los oligos (6.7) AOX1-F y AOX1-R para una caracterización indirecta (Figura 19A), y los iniciadores Tsp_01570-F y Tsp_01570 R para la genotipificación directa (Figura 19B).

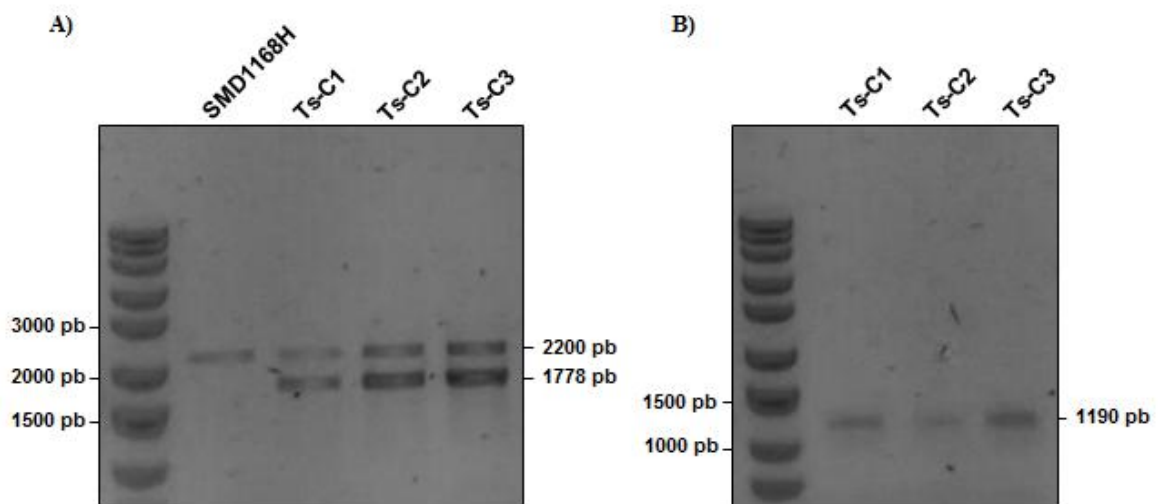


Figura 19: Caracterización de las clonas recombinantes de *Pichia pastoris* SMD1168H. (A) Genotipificación indirecta con oligos específicos para AOX1. (B) Genotipificación directa con oligos específicos para el transcrito Tsp_01570. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En la genotipificación indirecta (Figura 19A), a diferencia del control negativo en donde solo se obtuvo el producto amplificado de 2,200 pb del gen AOX1 endógeno, en las clonas analizadas se observa también una banda de 1778 pb, que corresponde al tamaño del transcrito de 1190 pb obtenido en la verificación directa (Figura 19B) más un segmento de 588 pb del gen AOX1.

7.8 Análisis por secuenciación de Sanger de las clonas de *P. pastoris* SMD1168H recombinantes

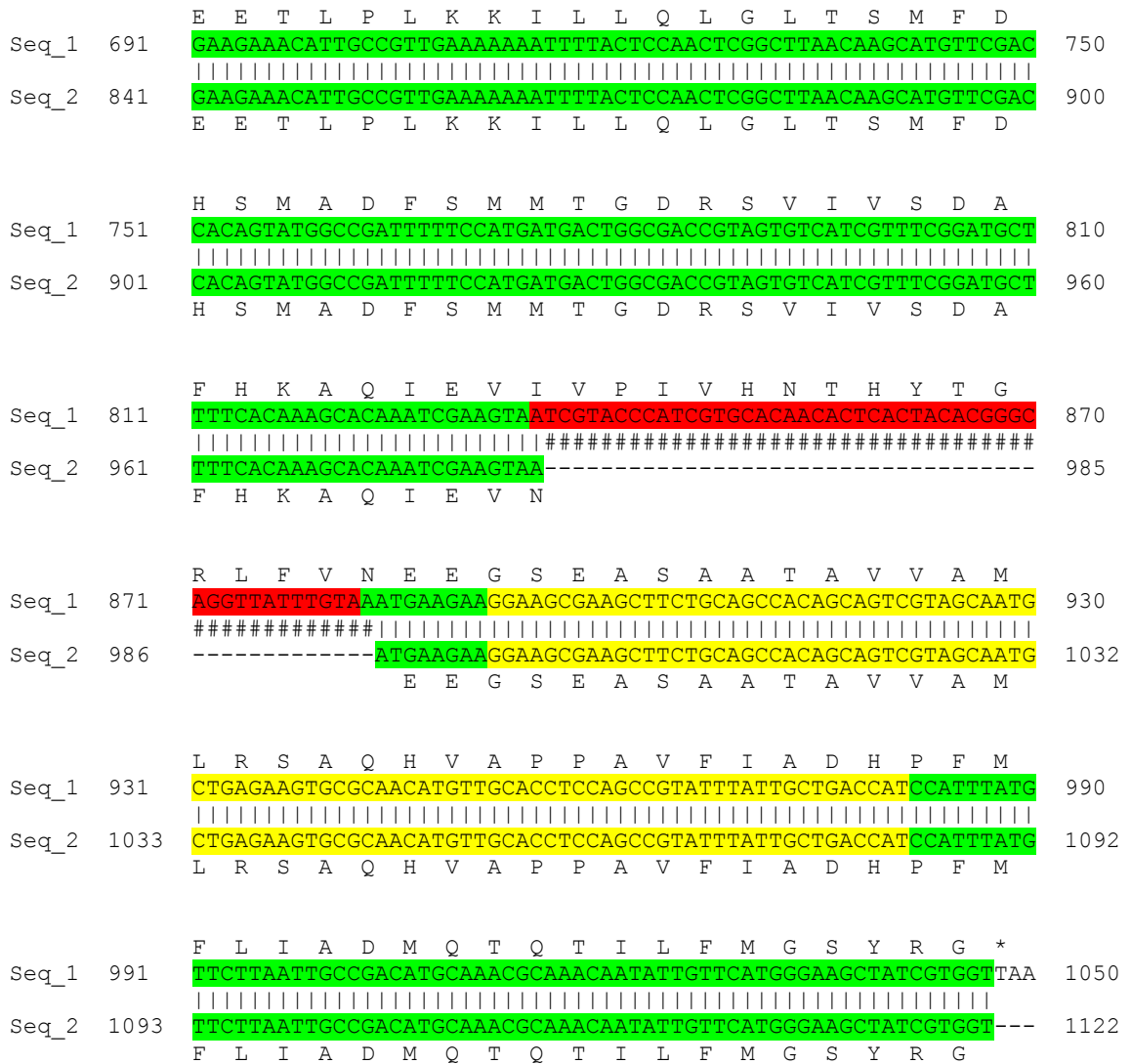


Figura 20: Alineamiento del producto de la secuenciación del casete de expresión Tsp_01570/AOX1 de una clona recombinante de *Pichia pastoris* SMD1168H (Tsp_01570_VARIANTE) contra el transcrito Tsp_01570 de referencia (Tsp_01570_REFERENCIA). En verde se señalan los nucleótidos homólogos, en rojo los no coincidentes y en amarillo el dominio RCL.

Al analizar la secuencia obtenida por PCR del casete de expresión Tsp_01570/AOX1 de una de las clonas recombinantes, ahora denominada variante, con respecto al transcrito de referencia, se identificaron dos diferencias notables. La primera, consiste en la presencia del intrón I de 150 pb (50 aminoácidos) en la secuencia variante y reportada en la base de datos de GenBank (Gene ID: 10911629). El intrón se localiza

entre el nucleótido 180 y el 331 de la variante. La segunda inconsistencia se localiza entre los nucleótidos 834 y 883 del transcrito de referencia que corresponde con el exón III, también anotado en GenBank. Esta secuencia de 48 nucleótidos (16 aminoácidos) se encuentra deletada en la variante. El resultado es una proteína de 383 aminoácidos correspondiente a la variante, contra 349 aminoácidos de la serpina de referencia. A pesar de esta diferencia de 34 aminoácidos, el marco de lectura no fue alterado, y la secuencia de nucleótidos coincide con el tamaño del producto amplificado del transcrito de la variante Tsp_01570 (1190 pb) con respecto al teórico de la referencia reportada (1091 pb).

7.9 Evaluación del crecimiento de las clonas de *P. pastoris* SMD1168H recombinantes

Las clonas recombinantes Ts-C1, Ts-C2 y Ts-C3 de *P. pastoris* SMD1168H mostraron por genotipificación la presencia del casete de expresión ni alteraciones en su marco de lectura, por lo que fueron seleccionadas como candidatas a la evaluación de la producción de la serpina recombinante Tsp_01570. Estas fueron inoculadas en el medio BMMY para inducir la producción de proteínas con metanol al 1% siguiendo las condiciones estándar de pH 6.0 por un periodo de cuatro días (6.26). El crecimiento de las clonas recombinantes fue monitoreado haciendo una lectura de densidad óptica a 595 nm cada 24 h hasta el término de la fermentación (Figura 21).



Figura 21: Cinética de crecimiento de las clonas recombinantes de *Pichia pastoris* SMD1168H

Analizando la cinética de crecimiento, este fue exponencial entre las 48 y las 72 h, con ninguna diferencia entre las tres cepas recombinantes con respecto a la cepa silvestre SMD1168H, por lo que todas presentaron el fenotipo para metabolizar metanol Mut⁺.

7.10 Caracterización de la serpiente recombinante por medio de SDS PAGE y WB

Los sobrenadantes de las levaduras recombinantes fueron dializados (6.27) y la concentración de proteínas fue cuantificada (6.5), obteniendo un rango de 1.3 a 2.0 mg/mL de proteína dializada. La clona Ts-C2 fue seleccionada para futuros análisis debido a que presentó una mayor tasa de producción con respecto a las otras. El sobrenadante dializado de la clona Ts-C2, así como las muestras purificadas por columna de níquel (6.30) y desaladas (6.30) fueron concentradas (6.28) para posteriormente ser resueltas por SDS PAGE y caracterizadas por WB (Figura 22).

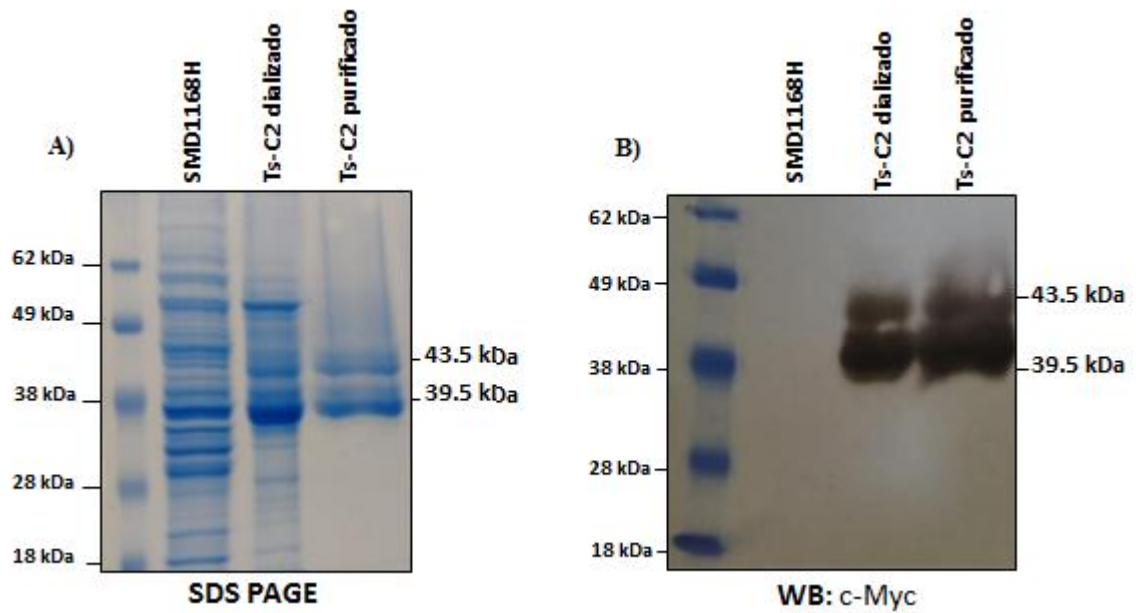


Figura 22: Caracterización de la serpina Tsp_01570 recombinante por (A) SDS PAGE y (B) detección del c-Myc por *Western Blot*. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%.

En el gel teñido con Coomassie (**Figura 22A**) se muestra un patrón de bandas predominante entre los marcadores de peso molecular de 38 y 49 kDa en el sobrenadante dializado de Ts-C2, y en la muestra purificada, producto de la unión de la etiqueta de histidinas a la resina de níquel, se generó un patrón de doble banda, el cual también fue consistente con la detección del c-Myc en el ensayo de *Western Blot* (**Figura 22B**). El peso teórico de la serpina recombinante es de 39.5 kDa, pero la presencia del intrón en el casete de expresión produjo una proteína de 43.5 kDa, lo cual coincide con la **Figura 22B**. También es relevante mencionar que hay una mayor reactividad al c-Myc en la banda de menor peso molecular, lo que sugiere la predisposición de la levadura de secretar en mayor proporción la proteína de 39.5 kDa con respecto a la de 43.5 kDa producto del *splicing* alternativo.

7.11 Efecto del pH en la producción de Tsp_01570 recombinante

Para descartar una posible retención de la secuencia señal, producto del procesamiento incompleto por la proteasa endógena de *P. pastoris* SMD1168H KEX2, la cual es una proteasa dependiente de pH en la vía secretora de la levadura, se realizó un ensayo de expresión de la serpina recombinante a un rango de pHs de 4.0 a 7.0 (Figura 23).

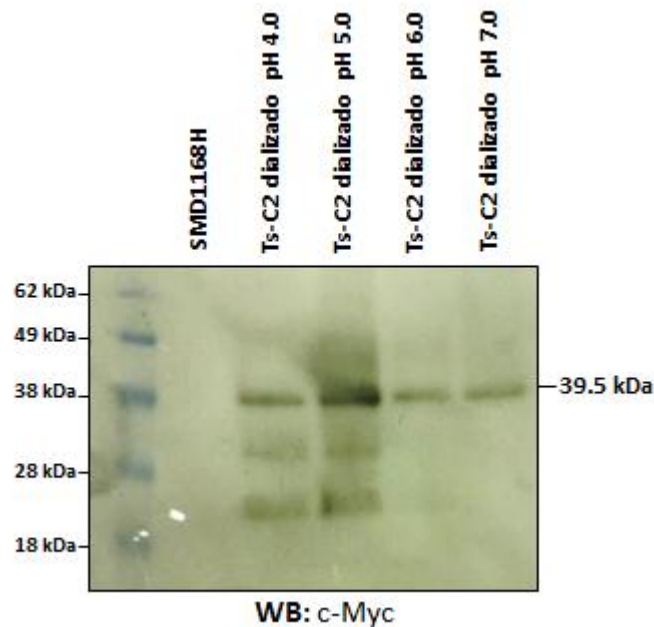


Figura 23: Expresión de la serpina Tsp_01570 recombinante a diferentes pHs

En el análisis por *Western Blot*, se mostró que a pH 6.0 y 7.0, solo se detectó la banda con el peso teórico esperado de 39.5 kDa, lo que indica el correcto procesamiento de la secuencia señal en la proteína recombinante. También es necesario mencionar que a pH 4.0 y 5.0, se detectaron dos bandas adicionales de bajo peso molecular, lo que podría estar relacionado con un aumento en la actividad proteolítica a pHs ácidos.

7.12 Análisis de la reactividad del suero anti-serpina por *Dot Blot*

Se produjo antisuero policlonal contra la serpina recombinante Tsp_01570 al inmunizar ratones de la cepa BALB/c por vía peritoneal siguiendo el esquema de inmunización de la sección 6.32. Se realizó un *pool* con el suero de los ratones inmunizados, el cual se utilizó en el ensayo de *Dot Blot* para determinar la capacidad de los anticuerpos generados para detectar la serpina recombinante Tsp_01570. Se encontró que en una dilución 1:10,000, el antisuero es capaz de detectar hasta 50 ng de la proteína recombinante (Figura 24).

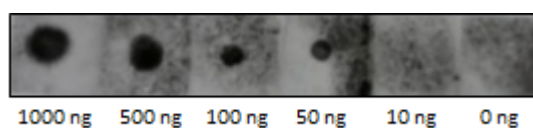


Figura 24: Ensayo de *Dot Blot* para determinar la reactividad del anti-suero policlonal contra la serpina Tsp_01570 recombinante. Dilución del suero 1:10,000.

7.13 Localización de la serpina nativa en diferentes estadios del parásito

Luego de comprobar que el antisuero fuera capaz de reaccionar con la proteína recombinante Tsp_01570, este se utilizó para la detección de la serpina nativa en los extractos crudos de *Trichinella spiralis* de las fases de LM, Ad y en los antígenos E/S (Figura 25).

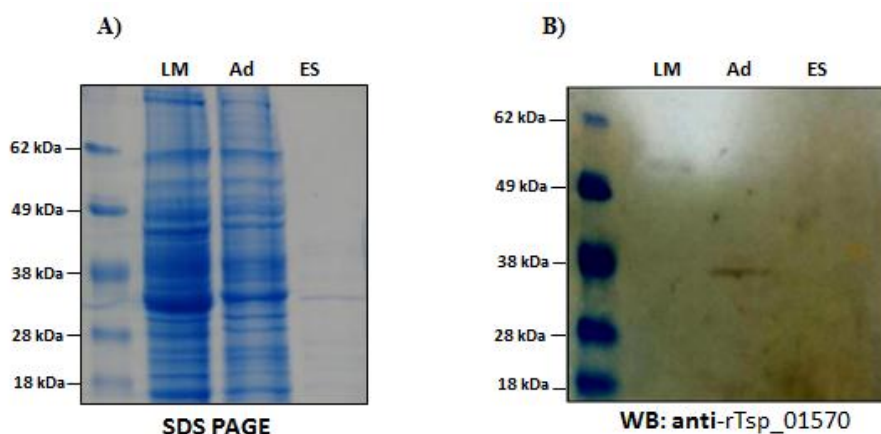


Figura 25: Localización de la serpina Tsp_01570 nativa en diferentes fases de *Trichinella spiralis*. (A) SDS PAGE. (B) *Western Blot*.

En el *Western Blot* se encontró una banda tenue muy cercana al marcador de peso molecular de 38 kDa en el extracto crudo de *T. spiralis* en el estadio de Ad, lo que corresponde con la el peso teórico de la proteína nativa.

7.14 Efecto bioquímico de la serpina Tsp_01570 recombinante contra la Tripsina

De acuerdo con el análisis filogenético, el RCL de la serpina Tsp_01570 de *T. spiralis* es igual que la serpina Tp-Serpin en *T. pseudospiralis* (**Figura 6**), por lo que se decidió probar su actividad inhibidora contra la tripsina, ya que ya se ha descrito en Tp-Serpin su actividad bioquímica para esa proteasa de serina^[108]. Para ello, se realizó un análisis de proteólisis empleando el sustrato N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (BAPNA). Cuando el sustrato BAPNA es procesado proteolíticamente por una serin proteasa con actividad del tipo tripsina, este generará un producto de color amarillo derivado de la hidrólisis de la p-NA y el N α -Benzoil-L-arginina, siempre y cuando no sea inhibido por la serpina (**Figura 26**).

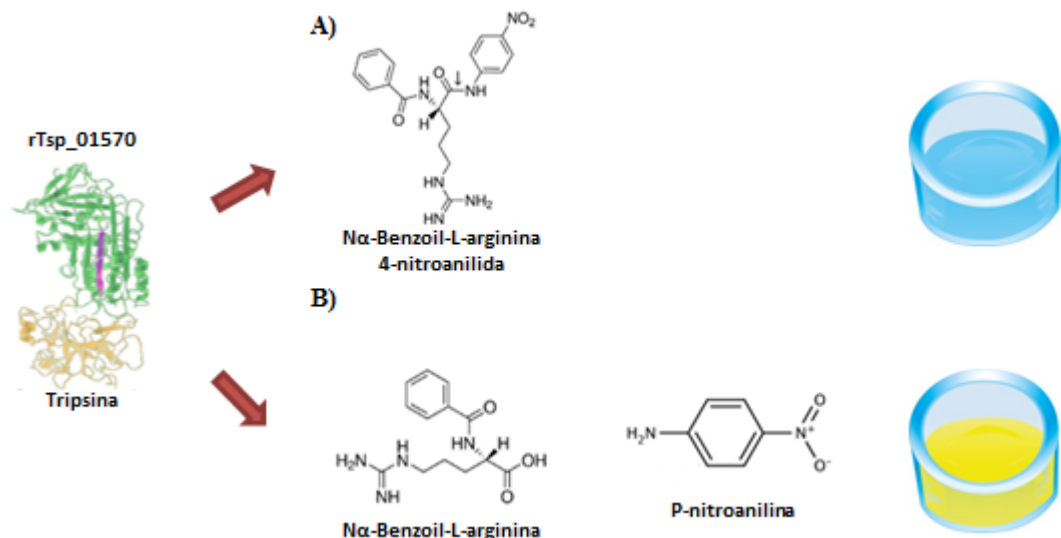


Figura 26: Determinación de la actividad inhibitoria de la serpina Tsp_01570 recombinante contra la tripsina. (A) Si se forma el complejo Proteasa-Serpina, el sustrato no se hidroliza. (B) Si no se forma el complejo, la proteasa de serina descompone el sustrato en N α -Benzoil-L-arginina y P-nitroanilina, siendo este último detectado a 405 nm.

Después de incubar la serpina Tsp_01570 y la tripsina a diferentes concentraciones (6.36), se adicionó el sustrato cromogénico a la reacción de proteólisis y se monitoreó la liberación de p-NA midiendo su absorbancia a 450 nm durante una cinética de 2 h. Con base en esta se construyó una curva de calibración (Figura 27A) para determinar la relación entre la densidad óptica del analito y la concentración de p-NA, para así poder interpolar la actividad de la tripsina a partir de las absorbancias obtenidas de sus reacciones proteolíticas (Figura 27B) empleando el sistema previamente definido (6.36).

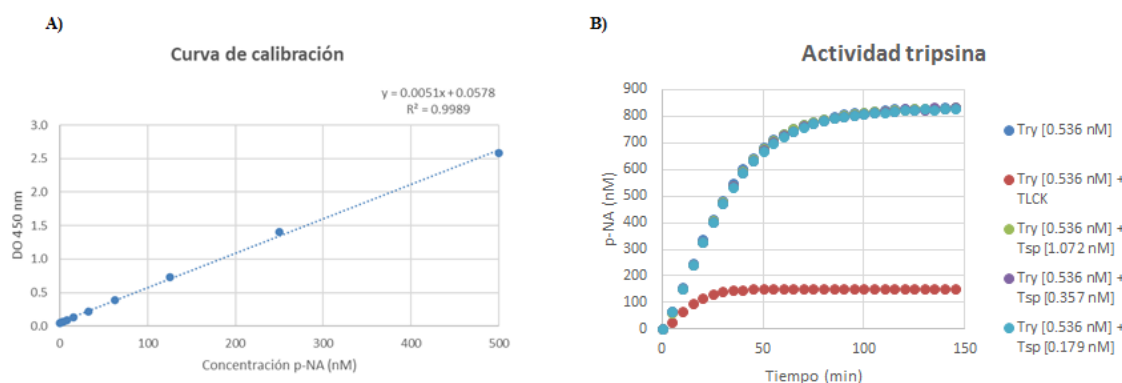


Figura 27: Caracterización del perfil inhibitorio de la serpina Tsp_01570 recombinante. (A) Curva de calibración de la concentración de p-NA con respecto a la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 450 nm. (B) Actividad de la tripsina contra la serpina Tsp_01570 a diferentes concentraciones.

Se observó una tasa de hidrólisis muy parecida entre las diferentes condiciones, excepto en el tratamiento con el inhibidor TLCK, por lo que la serpina recombinante Tsp_01570 no mostró actividad inhibitoria contra la tripsina.

7.15 Efecto biológico de la serpina Tsp_01570 recombinante en monocitos de la línea celular THP-1

Se evaluó el efecto biológico de la serpina recombinante Tsp_01570 en el fenómeno de polarización de monocitos de la línea celular THP-1 (6.37). Para ello,

500,000 células fueron cultivadas y pre-diferenciadas con PMA por 1 día. A las 72 h fueron estimuladas con M-CSF, y finalmente recibieron un tratamiento durante 48 h con los siguientes estímulos: TNF y LPS para M1, IL-4 para M2, la serpina Tsp_01570 a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y la coestimulación de M1 + serpina y M2 + serpina. Pasado este tiempo se realizaron tinciones (6.40) de las células adheridas para determinar la expresión de marcadores de maduración de los fenotipos M1 y M2, y se tomaron los sobrenadantes para determinar la secreción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (6.39). Previo a estos protocolos, se evaluó el efecto que podría tener la serpina en la viabilidad celular por medio de un ensayo de MTS (Figura 28), y se encontró que dentro de un rango de 5 a 0.625 μg no hubo un efecto citotóxico en los monocitos de la línea celular THP-1, por lo que se usó una concentración de 5 μg para los ensayos, la cual también se utilizó en los ensayos de polarización con la serpina de *T. pseudospiralis*^[108].

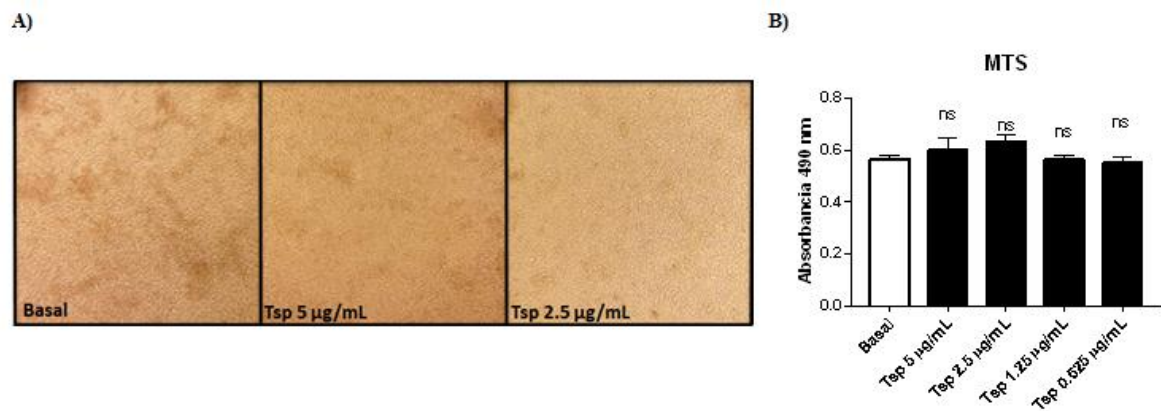


Figura 28: Análisis de viabilidad celular en monocitos de la línea celular THP-1 estimulados con la serpina Tsp_01570 recombinante. (A) Cultivo celular *in vitro* de células THP-1 estimuladas a diferentes concentraciones. (B) Análisis de viabilidad por ensayo de MTS.

7.16 Efecto biológico de la estimulación con la serpina Tsp_01570 recombinante en la secreción de citocinas

Para evaluar el efecto de la serpina en la secreción de citocinas, se cuantificaron IL-12p40 y TNF- α como citocinas pro-inflamatorias, e IL-4 e IL-10 como citocinas antiinflamatorias (**Figura 29**).

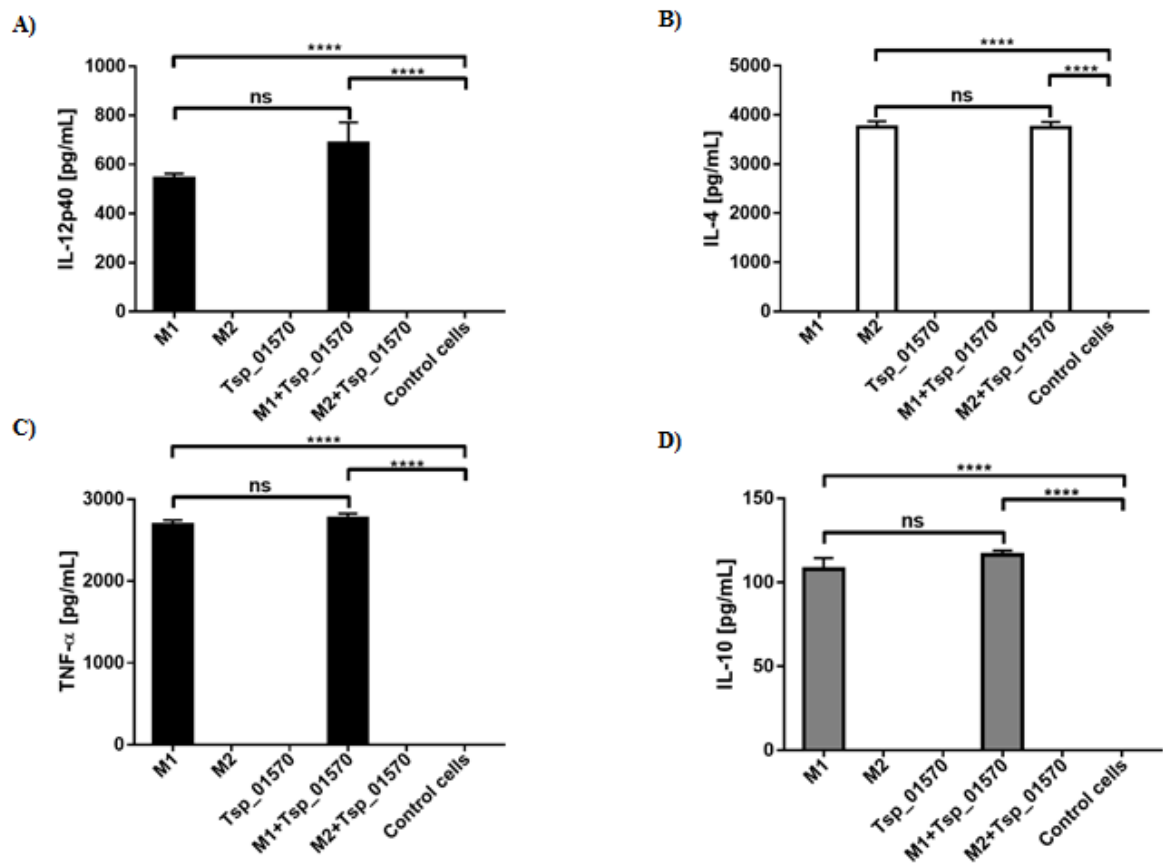


Figura 29: Efecto de la estimulación de células THP-1 con la serpina Tsp_01570 recombinante en la secreción de citocinas (A) IL12p40, (B) IL-4, (C) TNF- α y (D) IL-10.

Tanto para IL-12p40 y TNF-alfa, el estímulo para la polarización con M1 indujo de forma significativa la secreción de estas citocinas, lo cual nos permitió validar el modelo de trabajo. Para M2 no se encontraron niveles detectables de estas citocinas, al

igual que en las células estimuladas con la serpina recombinante. En el tratamiento con la coestimulación M1-serpina, si hubo una liberación de citocinas significativa, sin embargo, esto se debe al efecto *per se* del INF- γ y el LPS, y no al de la serpina. Para IL-4, se detectaron niveles significativos de esta citocina en las células THP-1 estimuladas para M2, lo que validó nuestro modelo. Lo mismo sucedió para el tratamiento en conjunto de serpina y M2. Sin embargo, esto se debe al efecto de IL-4 y no de la serpina, además que el efecto de la serpina sola no se logró detectar IL-4. Para el caso de IL-10, se encontró una secreción de IL en las células tratadas con INF- γ y LPS, así como el de M1 y serpina, sin embargo, no fue significativo al adicionar la serpina recombinante. La presencia de IL-10 en M1 tiene sentido, ya que su liberación fue producto de una respuesta de retroalimentación por parte de una respuesta pro-inflamatoria inducida por INF- γ y LPS. En resumen, la serpina no indujo la secreción de las citocinas y tampoco participa en su modulación.

7.17 Efecto biológico de la estimulación con la serpina Tsp_01570 recombinante en la expresión de marcadores M1 y M2

También se evaluó el efecto de la serpina en la expresión de marcadores de maduración M1 y M2 (**Figura 30**). Para el caso de M1, se encontró que hubo una mayor expresión de CCR7 y CD86 con respecto al control, lo que valida el modelo de diferenciación utilizado. La serpina por sí sola no mostró un cambio en la expresión de estos marcadores. Finalmente, la expresión de CCR7 y CD86 en las células tratadas con estímulos para M1 y serpina muestra una diferencia significativa con respecto al control, pero no es significativo al comparar las células diferenciadas a M1. Por lo que se

concluyó que la serpina recombinante no tuvo un efecto directo en la expresión de CCR7 ni CD86, ni en la modulación de la polarización a M1.

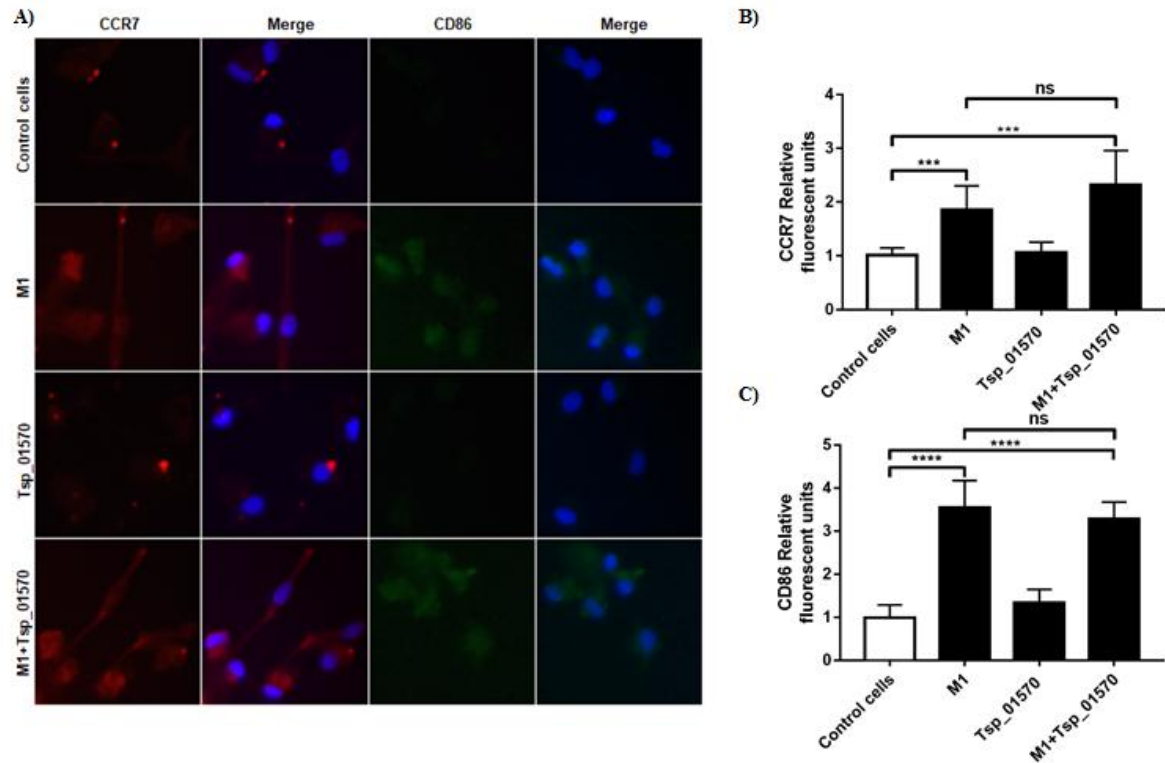


Figura 30: Efecto de la estimulación de células THP-1 con la serpina Tsp_01570 recombinante en la expresión de marcadores M1 (A). Fluorescencia total corregida para CCR7 (B) y CD86 (C).

Para el fenotipo M2, se evaluaron los marcadores CD163 y CD206. En las células estimuladas con IL-4, se observó una expresión significativa de ambos marcadores, lo que validó el protocolo de diferenciación de células THP-1 al fenotipo M2 (**Figura 31**). También se reportó una expresión significativa en el estímulo de la serpina y la IL-4. Sin embargo, al comparar ambos tratamientos, no se encontró una diferencia significativa, por lo que el estímulo con la serpina no fue relevante en la polarización al fenotipo M2. De esta manera se pudo concluir que la serpina Tsp_01570 recombinante no afectó en la expresión de CD163 y CD206, ni participó en la modulación de la diferenciación de macrófagos.

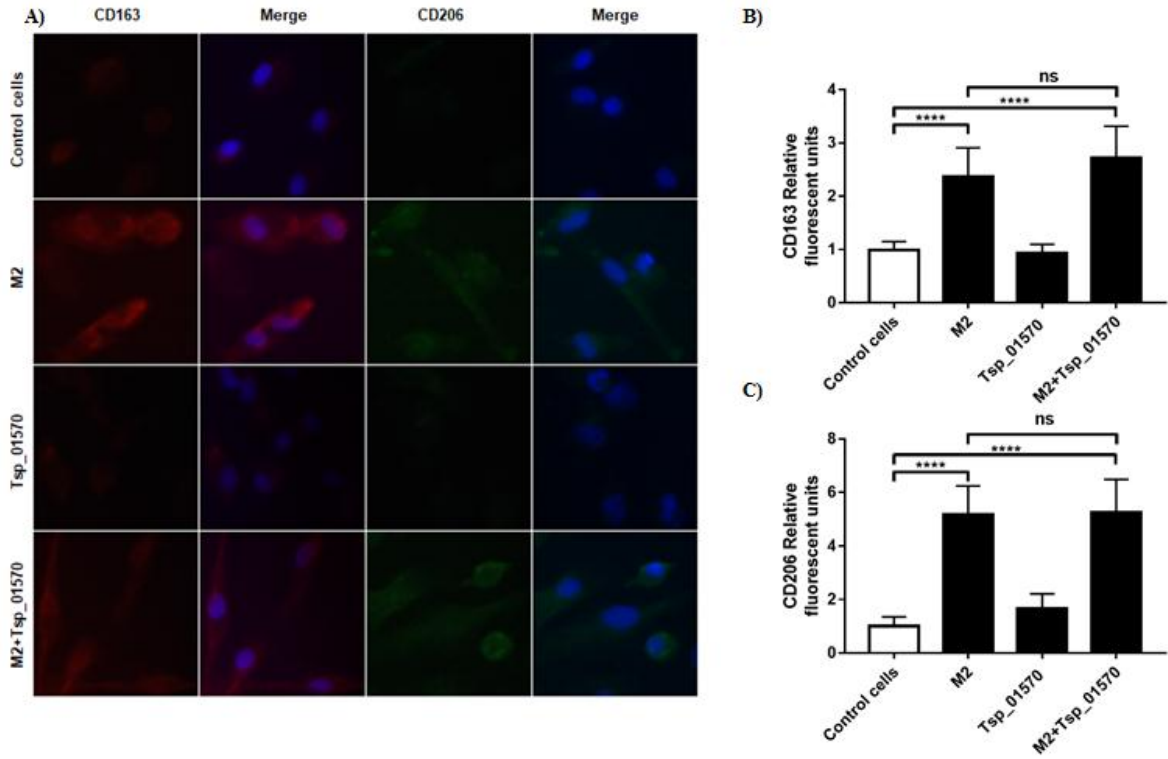


Figura 31: Efecto de la estimulación de células THP-1 con la serpina Tsp_01570 recombinante en la expresión de marcadores M2 (A). Fluorescencia total corregida para CD163 (B) y CD206 (C).

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

Las serpinas de los patógenos parasitarios desempeñan un papel importante en la evasión del reconocimiento y los procesos de respuesta inmunitarios en el huésped. Se ha descrito que algunas serpinas de nematodos son más activas durante ciertas fases de su ciclo biológico y con capacidad para inhibir proteasas de serina, como Bm-SPN-2 de *Brugia malayi*, en donde la microfilaria tiene capacidad para neutralizar la elastasa y la catepsina G, mejorando así la virulencia del parásito^[109]. Asimismo, TvSERP de *Trichostrongylus vitrinus* tiene la facultad de inhibir las proteasas exógenas de los mastocitos, eludiendo la respuesta inmune del huésped^[109]. Estos antecedentes dan peso a la evidencia de que las serpinas no solo actúan como moléculas reguladoras de sus proteasas endógenas, sino de su capacidad para interferir en los procesos del organismo que están parasitando y la importancia de su expresión en determinadas fases de su ciclo biológico para completar su desarrollo.

La serpina codificada por el gen Tsp_01570 (XM_003377332.1) de *Trichinella spiralis* no se ha descrito previamente. De acuerdo con la búsqueda realizada en bases de datos y artículos publicados, Tsp_01570 no se ha expresado antes como una proteína recombinante, ni se han abordado sus propiedades bioquímicas ni biológicas. Es decir, solo se cuenta anotada en la base de datos de Genbank como una serpina con base en la similitud que comparte su secuencia de nucleótidos con otros inhibidores de proteasas de serina previamente descritos. De acuerdo con nuestra caracterización molecular, la

estructura putativa de Tsp_01570 mostró el dominio Centro Reactivo tipo Lazo (RCL) intacto cerca del extremo C terminal, por lo que la proteína resultante podría ser estructuralmente una serpina, independientemente de una posible función inhibidora de la proteasa.

A diferencia de Tsp_01570, las secuencias que codifican para las serpinas Tsp_00173 y Tsp_00174 no pudieron ser amplificadas. Esto se intentó buscando los transcritos en el ARN total de *T. spiralis*, tanto en la fase de LM como en la de Ad, pero no se tuvo éxito. Se sabe que la expresión de los ARNm de las serpinas en *Trichinella* es diferencial entre los distintos estadios del parásito. Tal es el caso de Ts11-1 en donde los transcritos son más abundantes en las etapas de LM de 18 días^[68], en la serpina de la clona Ad48h-Ts5 hay una mayor expresión en los adultos de 5 días^[110] y en la clona L48h-Ts5 en las larvas recién nacidas de 48 h^[110]. Por lo que es necesario explorar otras fases del desarrollo de *T. spiralis* para lograr su amplificación.

Se desarrolló un sistema de expresión para producir una proteína recombinante que pudiera ser procesada y secretada por el organismo eucariota (*P. pastoris*) para así evaluar si la serpina recombinante tuviera un efecto biomodulador en los monocitos humanos. Para este estudio, se decidió utilizar a la cepa *P. pastoris* SMD1168H, la cual es deficiente en la secreción de proteasa A, proteasa B y carboxipeptidasa Y, debido a que estudios previos reportaron que la actividad proteolítica de dichas proteasas endógenas podría interferir en el rendimiento de la proteína recombinante^[111]. Se indujo la expresión de la serpina Tsp_01570 en las clonas de *P. pastoris* SMD1168H con metanol al 1 % en medio BMMY durante un máximo de 96 h en lugar del habitual período de fermentación de 120 h, porque se encontró una ligera disminución en la

densidad óptica en el día 5. Esta inhibición en el crecimiento podría explicarse por niveles más altos de acumulación de formaldehído y peróxido de hidrógeno, lo que podría conducir a la muerte de las levaduras^[112].

Para verificar la integridad del casete de expresión Tsp_01570/AOX1, se mandó a secuenciar por el método de Sanger una serie de productos de PCR, los cuales fueron comparados con el transcrito de Tsp_01570 que se tenía de referencia en el GenBank. A diferencia de la secuencia anotada, el casete de expresión contaba con la presencia del Intrón I y 48 nucleótidos del Exón III deletados. Esto explica la diferencia entre el tamaño teórico esperado de 1091 pb con el amplicón obtenido de 1190 pb. Se realizó un alineamiento con SERPINB6 de *T. nativa*, y se encontró que compartían la misma secuencia, incluyendo las dos discrepancias presentes con la Tsp_01570 de referencia. Esto podría explicarse por un evento de un *splicing* alternativo al momento de procesar el transcrito, generando una variante, lo cual se ha descrito en serpinas que pertenecen al clado B^[113].

Durante la caracterización de la serpinas Tsp_01570 recombinante, se encontró un patrón de doble banda para la detección de la etiqueta c-Myc. Se realizó un ensayo de expresión en un rango de pHs de 4.0 a 7.0, para probar si el procesamiento parcial de la proteína madura por la proteasa de *Pichia pastoris* KEX 2 estaba interfiriendo^[114]. Se encontró que a pHs ácidos (4.0-5.0) había una mayor actividad proteolítica de la proteína, esto con la presencia de bandas de menor peso molecular, junto con las bandas de 39.5 kDa y de 43.5 kDa correspondientes a la proteína teórica del transcrito de referencia y a la variante. Por otro lado, se demostró que el rango óptimo para producir la serpinas Tsp_01570 recombinante se encuentra entre los pHs 6.0 y 7.0, ya que no se

observó la presencia de las bandas de bajo peso molecular y se favoreció la producción de la isoforma de 39.5 kDa con respecto a la de la variante.

En la mayoría de los casos, las serpinas de los helmintos parásitos tienen una fuerte inmunorreactividad y se clasifican en categorías secretoras o intracelulares^[109]. En este trabajo, se demostró que la Tsp_01570 recombinante fue reconocida por el suero de ratones BALB/c inmunizados con la serpina. También se determinó la localización de la serpina nativa en diferentes fases del parásito por WB. Los resultados mostraron que la serpina Tsp_01570 estaba presente en el extracto crudo de los adultos. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para validar la ausencia de la serpina en los otros estadios del parásito. De todos modos, este resultado podría ser un primer avistamiento de su relevancia en la etapa de adulto. En las primeras fases de la infección por *T. spiralis*, el huésped provoca una respuesta de células T cooperadoras tipo 1 (Th1) para protegerse del parásito, caracterizada por un aumento de los niveles de interferón gamma (IFN- γ) e IL-12 en el bazo y el suero del huésped^[115]. El aumento de la circulación de citocinas aumenta el reclutamiento de células inmunitarias en el intestino y la reposición de células epiteliales intestinales (IEC) invadidas por *T. spiralis*^[116]. Una vez que los adultos de *T. spiralis* invaden los enterocitos del yeyuno, se desencadena una respuesta de citocinas tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) orquestada por células T CD4⁺ en la linfa mesentérica, por lo que en el estadio de los en los adultos se observa el cambio de una respuesta Th1 a Th2.

En cuanto a su actividad bioquímica, la serpina Tsp_01570 recombinante no pudo inhibir la actividad enzimática de la tripsina. En otros trabajos se han encontrado blancos como α -quimotripsina, elastasa^[107], por lo que podrían ser objetivos potenciales.

Al realizar el análisis molecular, se encontró que Tsp_01570 comparte la misma secuencia que SERPINB6 de *T. nativa*, por lo que las catepsinas, un blanco común para las serpinas del clado B^[117], podría ser otra opción para encontrar blancos potenciales de inhibición.

El estímulo con la serpina Tsp_01570 no pudo inducir la liberación de las citocinas IL-12, TNF- α , IL-4 e IL-10 en células THP-1. Además, su coestimulación con IFN- γ y LPS (M1), así como IL-4 (M2), no tuvieron un efecto modulador en la polarización de alguno de los fenotipos. Tampoco hubo un efecto en la expresión de los marcadores de maduración CCR7 y CD163 (M1), así como de CD123 y CD206 (M2). A su vez, su estímulo en conjunto con IFN- γ y LPS (M1), así como IL-4 (M2) no interfirió en la polarización de ningún fenotipo. Se ha descrito que el uso de antígenos de E/S de *T. spiralis* como estímulo de macrófagos M1 inhibe la producción de IL-12p70 y TNF- α ; y como tratamiento directo incrementa la secreción de IL-10^[118]. Tp-Serpin de *T. pseudospiralis* se encontró en los productos de E/S y presentó actividad biológica^[108]. Por el contrario, la Tsp_01570 no fue localizada en los antígenos E/S. Además, comparte su secuencia de nucleótidos con SERPINB6, cuyo clado se encuentra constituido por serpinas intracelulares, por lo que podría tratarse de una serpina con potencial modulador de proteasas endógenas de *T. spiralis*.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIÓN

Se produjo de forma recombinante la serpina Tsp_01570 de *Trichinella spiralis* en la levadura *Pichia pastoris* SMD1168H. La serpina nativa fue localizada en el extracto total de la fase adulto del parásito, por lo que podría tener algún rol en el desarrollo del parásito.

La hipótesis planteada “Las serpinas codificadas por los genes Tsp_00173, Tsp_00174 y Tsp_01570 de *T. spiralis* tienen la capacidad de inhibir la actividad de serin proteasas y modular la polarización M1/M2 de monocitos humanos” no se conserva.

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

1. Irving, J.A., et al., *Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function*. Genome research, 2000. **10**(12): p. 1845-1864.
2. Silverman, G.A., et al., *The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature*. Journal of Biological Chemistry, 2001.
3. Irving, J., P. Steenbakkers, and A. Lesk, *Op den Camp HJ, Pike RN, Whisstock JC (2002) Serpins in prokaryotes*. Mol Biol Evol, 1881. **19**(11): p. 1881-1890.
4. Ray, C.A., et al., *Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme*. Cell, 1992. **69**(4): p. 597-604.
5. Irving, J.A., et al., *Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering α 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases*. Biochemistry, 2002. **41**(15): p. 4998-5004.
6. Pemberton, P., et al., *Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation*. Nature, 1988. **336**(6196): p. 257.
7. Nagata, K., *Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone*. Trends in biochemical sciences, 1996. **21**(1): p. 23-26.
8. Zou, Z., et al., *Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells*. Science, 1994. **263**(5146): p. 526-529.
9. Heit, C., et al., *Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily*. Human genomics, 2013. **7**(1): p. 22.
10. Huntington, J.A., *Shape-shifting serpins—advantages of a mobile mechanism*. Trends in biochemical sciences, 2006. **31**(8): p. 427-435.
11. Vicente, C.P., et al., *Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice*. Blood, 2004. **104**(13): p. 3965-3970.
12. Beinrohr, L., et al., *C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparin potentiation and conformational disease*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(29): p. 21100-21109.
13. Widmer, C., et al., *Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(33): p. 13243-13247.
14. Osterwalder, T., et al., *The axonally secreted serine proteinase inhibitor, neuroserpin, inhibits plasminogen activators and plasmin but not thrombin*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(4): p. 2312-2321.

15. Huntington, J., *Serpin structure, function and dysfunction*. Journal of thrombosis and haemostasis, 2011. **9**: p. 26-34.
16. Stein, P.E., et al., *Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins*. Nature, 1990. **347**(6288): p. 99-102.
17. Kaslik, G., et al., *Effects of serpin binding on the target proteinase: global stabilization, localized increased structural flexibility, and conserved hydrogen bonding at the active site*. Biochemistry, 1997. **36**(18): p. 5455-5464.
18. Stein, P.E., D.A. Tewkesbury, and R.W. Carrell, *Ovalbumin and angiotensinogen lack serpin S-R conformational change*. Biochemical Journal, 1989. **262**(1): p. 103-107.
19. Lawrence, D.A., et al., *Serpin-Protease Complexes Are Trapped as Stable Acyl-Enzyme Intermediates (*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(43): p. 25309-25312.
20. Seralini, G., *A new role for corticosteroid binding globulin (CBG), member of SERPIN superfamily*. Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales, 1991. **185**(6): p. 500-509.
21. Zhou, A., et al., *Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(36): p. 13321-13326.
22. Corvol, P., et al., *Inhibition of angiogenesis: a new function for angiotensinogen and des (angiotensin I) angiotensinogen*. Current hypertension reports, 2003. **5**(2): p. 149-154.
23. Görlach, J., et al., *Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in Cryptococcus neoformans*. The EMBO journal, 2000. **19**(14): p. 3618-3629.
24. Jonigk, D., et al., *Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of α 1-antitrypsin without inhibition of elastase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(37): p. 15007-15012.
25. Janciauskiene, S. and H. Wright, *Inflammation, antichymotrypsin, and lipid metabolism: autogenic etiology of Alzheimer's disease*. Bioessays, 1998. **20**(12): p. 1039-1046.
26. Miyata, T., et al., *Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(5): p. 585-593.
27. Bailey, C.M., et al., *Biological functions of maspin*. Journal of cellular physiology, 2006. **209**(3): p. 617-624.
28. Geraghty, P., et al., *Alpha-1-antitrypsin aerosolised augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloprotease 2 in vivo and in vitro*. Thorax, 2008. **63**(7): p. 621-626.
29. Han, Y.-P., C. Yan, and W.L. Garner, *Proteolytic activation of matrix Metalloproteinase-9 in skin wound healing is inhibited by α -1-Antichymotrypsin*. Journal of investigative dermatology, 2008. **128**(9): p. 2334-2342.
30. Quinsey, N.S., et al., *Antithrombin: in control of coagulation*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(3): p. 386-389.
31. Cooper, S.T., et al., *Intermolecular interactions between protein C inhibitor and coagulation proteases*. Biochemistry, 1995. **34**(40): p. 12991-12997.

32. Madoiwa, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1 promotes a poor prognosis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation*. International journal of hematology, 2006. **84**(5): p. 398-405.
33. Noda, A., et al., *Plasma levels of heparin cofactor II (HCII) and thrombin-HCII complex in patients with disseminated intravascular coagulation*. Clinical and applied thrombosis/hemostasis, 2002. **8**(3): p. 265-271.
34. Skurk, T. and H. Hauner, *Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1*. International journal of obesity, 2004. **28**(11): p. 1357-1364.
35. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. British journal of haematology, 2005. **129**(3): p. 307-321.
36. Kotschy, M., et al., *Antithrombin III and alpha-2-antiplasmin activities compared with other hemostasis parameters in uncomplicated diabetes mellitus, type 2*. Polski Tygodnik Lekarski (Warsaw, Poland: 1960), 1992. **47**(1-2): p. 17-18.
37. Chéret, J., et al., *Expression of neuroserpin, a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the human skin*. Experimental dermatology, 2012. **21**(9): p. 710-711.
38. Sim, R.B., G.J. Arlaud, and M.G. Colomb, *C1 inhibitor-dependent dissociation of human complement component C1 bound to immune complexes*. Biochemical Journal, 1979. **179**(3): p. 449-457.
39. MacNeill, A.L., P.C. Turner, and R.W. Moyer, *Mutation of the Myxoma virus SERP2 PI-site to prevent proteinase inhibition causes apoptosis in cultured RK-13 cells and attenuates disease in rabbits, but mutation to alter specificity causes apoptosis without reducing virulence*. Virology, 2006. **356**(1-2): p. 12-22.
40. Macen, J.L., et al., *Differential inhibition of the Fas-and granule-mediated cytotoxicity pathways by the orthopoxvirus cytokine response modifier A/SPI-2 and SPI-1 protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(17): p. 9108-9113.
41. Turner, P.C., et al., *Myxoma virus Serp2 is a weak inhibitor of granzyme B and interleukin-1 β -converting enzyme in vitro and unlike CrmA cannot block apoptosis in cowpox virus-infected cells*. Journal of virology, 1999. **73**(8): p. 6394-6404.
42. Ardisson-Araujo, D.M., et al., *Functional characterization of hesp018, a baculovirus-encoded serpin gene*. Journal of General Virology, 2015. **96**(5): p. 1150-1160.
43. Goulas, T., et al., *A structure-derived snap-trap mechanism of a multispecific serpin from the dysbiotic human oral microbiome*. Journal of Biological Chemistry, 2017: p. jbc.M117.786533.
44. Mkaouar, H., et al., *Siropins, novel serine protease inhibitors from gut microbiota acting on human proteases involved in inflammatory bowel diseases*. Microbial cell factories, 2016. **15**(1): p. 201.
45. Li, J., et al., *A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis*. The Journal of infectious diseases, 2003. **188**(12): p. 1951-1960.
46. Shepherd, J.C., A. Aitken, and D.P. McManus, *A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis*. Molecular and biochemical parasitology, 1991. **44**(1): p. 81-90.

47. Merckelbach, A. and A. Ruppel, *Biochemical properties of an intracellular serpin from Echinococcus multilocularis*. Molecular and biochemical parasitology, 2007. **156**(1): p. 84-88.
48. Blanton, R.E., L.S. Licate, and R.A. Aman, *Characterization of a native and recombinant Schistosoma haematobium serine protease inhibitor gene product*. Molecular and biochemical parasitology, 1994. **63**(1): p. 1-11.
49. Monard, D., et al., *Steps in establishing a biological relevance for glia-derived nexin*, in *Serine Proteases and Their Serpin Inhibitors in the Nervous System*. 1990, Springer. p. 275-281.
50. Huang, W., et al., *Purification and crystallization of a novel membrane-anchored protein: the Schistosoma haematobium serpin*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1999. **55**(1): p. 350-352.
51. Ghendler, Y., R. Arnon, and Z. Fishelson, *Schistosoma mansoni: isolation and characterization of Smpi56, a novel serine protease inhibitor*. Experimental parasitology, 1994. **78**(2): p. 121-131.
52. Modha, J. and M. Doenhoff, *Schistosoma mansoni host-parasite relationship: interaction of contrapsin with adult worms*. Parasitology, 1994. **109**(4): p. 487-495.
53. Yan, Y., et al., *Characterization of a novel vaccine candidate and serine proteinase inhibitor from Schistosoma japonicum (Sj serpin)*. Veterinary parasitology, 2005. **131**(1-2): p. 53-60.
54. Yang, Y., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel serpin gene of Clonorchis sinensis, highly expressed in the stage of metacercaria*. Parasitology research, 2009. **106**(1): p. 221-225.
55. Kang, J.-M., et al., *Identification and characterization of a serine protease inhibitor of Clonorchis sinensis*. Acta tropica, 2010. **116**(2): p. 134-140.
56. Hwang, J.-H., et al., *Identification and characterization of a serine protease inhibitor of Paragonimus westermani*. Parasitology research, 2009. **104**(3): p. 495-501.
57. Yenbutr, P. and A.L. Scott, *Molecular cloning of a serine proteinase inhibitor from Brugia malayi*. Infection and immunity, 1995. **63**(5): p. 1745-1753.
58. Zang, X., et al., *A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode Brugia malayi inhibits human neutrophil serine proteinases*. Blood, 1999. **94**(4): p. 1418-1428.
59. Zang, X., et al., *The serpin secreted by Brugia malayi microfilariae, Bm-SPN-2, elicits strong, but short-lived, immune responses in mice and humans*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(9): p. 5161-5169.
60. Meeusen, E.N., A. Balic, and V. Bowles, *Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2005. **108**(1-2): p. 121-125.
61. MacLennan, K., K. McLean, and D. Knox, *Serpin expression in the parasitic stages of Trichostrongylus vitrinus, an ovine intestinal nematode*. Parasitology, 2005. **130**(3): p. 349-357.
62. Zarlenga, D., et al., *Identification and classification within the genus Trichinella, with special emphasis on non-encapsulated species*. Vet. Parasitol, 2004. **125**: p. 75-78.

63. Katz, M., D.D. Despommier, and R. Gwadz, *Parasitic diseases*. 2012: Springer Science & Business Media.
64. Kociecka, W. *Early clinical syndromes of severe trichinellosis*. in *Trichinellosis. Proceedings of the 8th International Conference on Trichinosis*. 1993.
65. Grove, D.I., J. Hamburger, and K.S. Warren, *Kinetics of immunological responses, resistance to reinfection, and pathological reactions to infection with Trichinella spiralis*. *Journal of Infectious Diseases*, 1977. **136**(4): p. 562-570.
66. Kim, C.W., *The significance of changing trends in trichinellosis*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 1991. **22**: p. 316-320.
67. Ko, R., et al., *Changes in host muscles induced by excretory/secretory products of larval Trichinella spiralis and Trichinella pseudospiralis*. *Parasitology*, 1994. **108**(2): p. 195-205.
68. Nagano, I., Z. Wu, and Y. Takahashi, *Functional genes and proteins of Trichinella spp.* *Parasitology research*, 2009. **104**(2): p. 197-207.
69. Appleton, J., *Consensus on Trichinella spiralis antigens and antibodies*. *Parasitol. Today*, 1991. **7**: p. 190-192.
70. Wisniewski, N., et al., *Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from Trichinella spiralis muscle stage larvae*. *Molecular and biochemical parasitology*, 1993. **61**(1): p. 25-35.
71. Romarís, F., et al., *Monoclonal antibodies raised in Btkxid mice reveal new antigenic relationships and molecular interactions among gp53 and other Trichinella glycoproteins*. *Molecular and biochemical parasitology*, 2002. **125**(1-2): p. 173-183.
72. Arasu, P., et al., *Molecular analysis of antigens targeted by protective antibodies in rapid expulsion of Trichinella spiralis*. *Molecular and biochemical parasitology*, 1994. **65**(2): p. 201-211.
73. Todorova, V.K. and D.I. Stoyanov, *Partial characterization of serine proteinases secreted by adult Trichinella spiralis*. *Parasitology Research*, 2000. **86**(8): p. 684-687.
74. Criado-Fornelio, A., et al., *Proteolytic enzymes from Trichinella spiralis larvae*. *Veterinary parasitology*, 1992. **45**(1-2): p. 133-140.
75. Todorova, V., D. Knox, and M. Kennedy, *Proteinases in the excretory/secretory products (ES) of adult Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 1995. **111**(2): p. 201-208.
76. Robinson, M.W., D.H. Massie, and B. Connolly, *Secretion and processing of a novel multi-domain cystatin-like protein by intracellular stages of Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2007. **151**(1): p. 9-17.
77. Sugane, K. and T. Matsuura, *Molecular analysis of the gene encoding an antigenic polypeptide of Trichinella spiralis infective larvae*. *Journal of helminthology*, 1990. **64**(1): p. 1-8.
78. Macen, J.L., et al., *SERP1, a serine proteinase inhibitor encoded by myxoma virus, is a secreted glycoprotein that interferes with inflammation*. *Virology*, 1993. **195**(2): p. 348-363.
79. Grecis, R.K., N.E. Humphreys, and A.J. Bancroft, *Immunity to gastrointestinal nematodes: mechanisms and myths*. *Immunological reviews*, 2014. **260**(1): p. 183-205.

80. Gazzinelli-Guimaraes, P. and T. Nutman, *Helminth parasites and immune regulation*. *F1000Res*. 2018; 7. 2018, Epub 2018/11/13. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15596.1> PMID: 30416709.
81. Maizels, R.M., et al., *Helminth parasites—masters of regulation*. *Immunological reviews*, 2004. **201**(1): p. 89-116.
82. Ilic, N., A. Gruden-Movsesijan, and L. Sofronic-Milosavljevic, *Trichinella spiralis: shaping the immune response*. *Immunologic research*, 2012. **52**(1): p. 111-119.
83. Faz-López, B., J. Morales-Montor, and L.I. Terrazas, *Role of macrophages in the repair process during the tissue migrating and resident helminth infections*. *BioMed research international*, 2016. **2016**.
84. Sorobetea, D., M. Svensson-Frej, and R. Grecis, *Immunity to gastrointestinal nematode infections*. *Mucosal immunology*, 2018. **11**(2): p. 304-315.
85. Wang, N., et al., *Primary characterization of the immune response in pigs infected with Trichinella spiralis*. *Veterinary research*, 2020. **51**(1): p. 1-14.
86. Fabre, M., et al., *Immunity to Trichinella spiralis muscle infection*. *Veterinary parasitology*, 2009. **159**(3-4): p. 245-248.
87. Bruschi, F., *The immune response to the parasitic nematode Trichinella and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection*. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 2002. **2**(3): p. 269-280.
88. Leiro, J., et al., *Immunomodulation by Trichinella spiralis: primary versus secondary response to phosphorylcholine-containing antigens*. *Medical microbiology and immunology*, 1988. **177**(3): p. 161-167.
89. Watanabe, N., F. Bruschi, and M. Korenaga, *IgE: a question of protective immunity in Trichinella spiralis infection*. *Trends in parasitology*, 2005. **21**(4): p. 175-178.
90. Huang, L. and J.A. Appleton, *Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes*. *Trends in parasitology*, 2016. **32**(10): p. 798-807.
91. Kobpornchai, P., et al., *A novel cystatin derived from Trichinella spiralis suppresses macrophage-mediated inflammatory responses*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2020. **14**(4): p. e0008192.
92. Ilic, N., et al., *Characterization of rat bone marrow dendritic cells initially primed by Trichinella spiralis antigens*. *Parasite Immunology*, 2008. **30**(9): p. 491-495.
93. Gruden-Movsesijan, A., et al., *The impact of Trichinella spiralis excretory–secretory products on dendritic cells*. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2011. **34**(5): p. 429-439.
94. Gruden-Movsesijan, A., et al., *Mechanisms of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic Trichinella spiralis infection in Dark Agouti rats*. *Parasite immunology*, 2010. **32**(6): p. 450-459.
95. Zhang, R., et al., *Ts-Hsp70 induces protective immunity against Trichinella spiralis infection in mouse by activating dendritic cells through TLR2 and TLR4*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2018. **12**(5): p. e0006502.
96. Jin, X., et al., *Glutathione-S-transferase of Trichinella spiralis regulates maturation and function of dendritic cells*. *Parasitology*, 2019. **146**(14): p. 1725-1732.

97. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nature immunology, 2002. **3**(10): p. 944-950.
98. Jankovic, D., et al., *CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(4): p. 619-629.
99. Ndlovu, H., et al., *Interleukin-4 receptor alpha expressing B cells are essential to down-modulate host granulomatous inflammation during schistosomiasis*. Frontiers in immunology, 2018. **9**: p. 2928.
100. Xie, J., et al., *Induction of the IL-10-producing regulatory B cell phenotype following Trichinella spiralis infection*. Molecular Immunology, 2021. **133**: p. 86-94.
101. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nature reviews immunology, 2003. **3**(1): p. 23-35.
102. Date, D., et al., *Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(15): p. 10318-10329.
103. Noël, W., et al., *Alternatively activated macrophages during parasite infections*. Trends in parasitology, 2004. **20**(3): p. 126-133.
104. Jin, Q.-W., et al., *Trichinella spiralis thioredoxin peroxidase 2 regulates protective Th2 immune response in mice by directly inducing alternatively activated macrophages*. Frontiers in Immunology, 2020: p. 2015.
105. Chen, Z., et al., *Effect of rTsP53 on the M1/M2 activation of bone-marrow derived macrophage in vitro*. International journal of clinical and experimental pathology, 2015. **8**(10): p. 13661.
106. Nagano, I., et al., *Molecular cloning and characterization of a serine proteinase inhibitor from Trichinella spiralis*. Parasitology, 2001. **123**(1): p. 77-83.
107. Zhang, Z., et al., *High-level expression and characterization of two serine protease inhibitors from Trichinella spiralis*. Veterinary Parasitology, 2016. **219**: p. 34-39.
108. Xu, N., et al., *Recombinant Trichinella pseudospiralis serine protease inhibitors alter macrophage polarization in vitro*. Frontiers in microbiology, 2017. **8**: p. 1834.
109. Molehin, A.J., G.N. Gobert, and D.P. McMANUS, *Serine protease inhibitors of parasitic helminths*. Parasitology, 2012. **139**(6): p. 681-695.
110. Zocevic, A., et al., *Identification of Trichinella spiralis early antigens at the pre-adult and adult stages*. Parasitology, 2011. **138**(4): p. 463-471.
111. Jönsson, L.J., M. Saloheimo, and M. Penttilä, *Laccase from the white-rot fungus Trametes versicolor: cDNA cloning of lcc1 and expression in Pichia pastoris*. Current genetics, 1997. **32**(6): p. 425-430.
112. Sreekrishna, K. and K.E. Kropp, *Pichia pastoris*, in *Nonconventional yeasts in biotechnology*. 1996, Springer. p. 203-253.
113. Wright, H., *Introns and higher-order structure in the evolution of serpins*. Journal of molecular evolution, 1993. **36**(2): p. 136-143.
114. Antunes, A.A., et al., *Thermodynamic analysis of Kex2 activity: The acylation and deacylation steps are potassium-and substrate-dependent*. Biophysical Chemistry, 2018. **235**: p. 29-39.

115. Kang, S.A., et al., *Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during Trichinella spiralis infection*. Veterinary parasitology, 2012. **186**(3-4): p. 319-327.
116. Ming, L., et al., *Invasion by Trichinella spiralis infective larvae affects the levels of inflammatory cytokines in intestinal epithelial cells in vitro*. Experimental Parasitology, 2016. **170**: p. 220-226.
117. Heit, C., et al., *Update of the human and mouse SERPIn gene superfamily*. Human genomics, 2013. **7**(1): p. 1-14.
118. Han, C., et al., *Immunomodulatory effects of Trichinella spiralis excretory-secretory antigens on macrophages*. Experimental parasitology, 2019. **196**: p. 68-72.