



+ Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA UNIDAD
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QFB

SERVICIO SOCIAL

Evaluación de moléculas de excreción-secreción de *Clinostomum marginatum* en modelos *in vitro*

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

MARIA ESTHER CASTILLA CABRERA

Matrícula
2192033857

ASESORES:

M. en C. MIGUEL ANGEL MOSQUEDA CABRERA

Departamento El Hombre y su Ambiente

No. Eco.: 22011

DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS

Departamento de Sistemas Biológicos

No. Eco.: 33148

MARZO 2024

CONTENIDO

RESUMEN

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| MARCO TEÓRICO | 4 |
| Helmintos | 4 |
| Morfología de del género <i>Clinostomum</i> | 5 |
| Ciclo de vida de trematodos (<i>Clinostomum marginatum</i>)..... | 6 |
| Helmintos en la inflamación..... | 7 |
| Mecanismo de los helmintos y sus MES para reducir la inflamación: | 8 |
| • Inducción de macrófagos M2 | 8 |
| • La infección por helmintos y sus MES reclutan otras células inmunológicas para regular la inflamación | 9 |
| • La infección por helmintos interactúa con la microbiota intestinal..... | 9 |
| Inflamación..... | 10 |
| • Células que participan en la inflamación | 10 |
| Macrófagos | 11 |
| • Polarización de los macrófagos en la inflamación | 12 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 13 |
| OBJETIVO GENERAL | 14 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 14 |
| METODOLOGIA..... | 14 |
| Preparación de las MES de <i>Clinostomum marginatum</i> | 14 |
| Preparación del medio de cultivo DMEM..... | 14 |
| Conteo celular en cámara de Neubauer | 15 |
| Viabilidad celular | 15 |
| Modelo de estimulación de macrófagos J774A.1 | 15 |
| Determinación de la producción de óxido nítrico | 16 |
| RESULTADOS Y DISCUSION | 17 |
| CONCLUSION..... | 21 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 22 |

RESUMEN

Actualmente en el mundo hay 1,500 millones de personas que tienen una o más infecciones por helmintos, sin embargo la mortalidad debida a las infecciones es rara, se sabe que existe una correlación inversa entre las infecciones por helmintos y las enfermedades inflamatorias conocida como la hipótesis de higiene, la cual propone que la menor cantidad de infecciones (especialmente helmintos) en la infancia conduce a mayores posibilidades de desarrollar enfermedades alérgicas, inflamatorias y metabólicas en el futuro. Las infecciones por helmintos o sus MES suprimen la diferenciación de Th1 y Th17 modulando la respuesta del huésped a un estado llamado tolerancia antiinflamatoria mediante sus moléculas de excreción-secreción (MES), las cuales contienen una mezcla de proteínas y moléculas de bajo peso molecular con diferentes mecanismos, estas proteínas son secretadas o excretadas tanto por parásitos naturales como cultivados en laboratorio. Se llevo a cabo la obtención de las larvas de *C. marginatum* a partir de la musculatura y tubo digestivo de peces de agua dulce se obtuvieron, las larvas fueron cultivadas en RPMI 1640 durante un mes, colectando 1mL de medio cada tercer día. Posteriormente las muestras fueron dializadas, liofilizadas y cuantificadas por el método de Lowry. Para evaluar la actividad anti-inflamatoria utilizamos la línea celular de macrófagos J774A.1 y macrófagos RAW, primero se llevó a cabo una evaluación de viabilidad celular para determinada la concentración de trabajo. Posteriormente, se formaron cuatro grupos de estudio, i macrófagos control (sin ningún estímulo), ii los macrófagos se estimularon con 5µg/mL de lipopolisacarido (LPS) para inducir la inflamación, iii células con diclofenaco 31µM (anti-inflamatorio) + 5µg/mL LPS y iv células con 800µg/mL MES + 5µg/mL LPS. Transcurridos los tiempos de incubación se determinó la producción de ON con un kit comercial (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. En la presente investigación, las moléculas de excreción-secreción del helminto *Clinostomum marginatum* demostraron no alterar la viabilidad en dos líneas diferentes de macrófagos y tener una actividad antinflamatoria a una concentración de 800 µg/ml. Lo anterior fue comprobado mediante las características morfológicas de los macrófagos y mediante la reducción en la producción de óxido nítrico (ON) en 72.8%, 72.2% y 74% en macrófagos J774A.1 y 42.7% y 23.2% en macrófagos RAW 264.7.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta de los organismos a diferentes estímulos biológicos, químicos o físicos endógenos o exógenos, en condiciones normales la inflamación aguda es un mecanismo de defensa de primera línea activando varios componentes de defensa, incluidas las células inmunitarias, los agentes antiinflamatorios endógenos para permitir la resolución de la inflamación aguda, cuando esta inflamación no se resuelve se liberan más moléculas inflamatorias dando como resultado una respuesta inmune a largo plazo conocida como inflamación crónica. Muchas enfermedades prevalentes están relacionadas con la inflamación crónica como el asma, la diabetes mellitus (DM) tipo 1 y 2, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares (Chantree et al., 2023; Furman et al., 2019; Tansey et al., 2022; Wang et al., 2020).

Se sabe que los helmintos tienen la capacidad de modular la respuesta del huésped a un estado llamado tolerancia antiinflamatoria mediante sus moléculas de excreción-secreción (MES), las cuales contienen una mezcla de proteínas y moléculas de bajo peso molecular con diferentes mecanismos, estas proteínas son secretadas o excretadas tanto por parásitos naturales como cultivados en laboratorio (Arai et al., 2022; Kahl et al., 2018; Ryan et al., 2020).

Las moléculas de excreción-secreción del helminto *Clinostomum marginatum* demostraron no alterar la viabilidad en macrófagos y tener una actividad antiinflamatoria al disminuir la producción de óxido nítrico (ON) en un 72.8%, 72.2% y 74% en macrófagos J774A.1 y 42.7% y 23.2% en macrófagos RAW 264.7.

MARCO TEÓRICO

Helmintos

Actualmente en el mundo hay 1,500 millones de personas que tienen una o más infecciones por helmintos, la mayoría de estas se presentan en países de bajos ingresos, convirtiéndose en un grave problema de salud pública en el mundo (Gazzinelli et al., 2018). Los helmintos parásitos han coevolucionado con los humanos durante milenios, la evidencia más antigua de helmintiasis se remonta al año 3200 a.C. en el antiguo Egipto, las momias encontradas conservaban óvulos de lombrices intestinales demostrando así que la asociación entre huésped-parasito es íntima. Casi 300 especies de helmintos infectan a los humanos causando helmintiasis, entre estas especies están *Schistosoma* spp. y los helmintos transmitidos por el suelo, incluidos *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis* (Douglas et al., 2021; Drurey et al., 2020).

Los helmintos taxonómicamente comprenden 2 filos distintos, por un lado, los nematodos los cuales son gusanos redondos que se transmiten por el suelo y platelmintos los cuales son gusanos planos que incluyen trematodos como los esquistosomas y cestodos como las tenias (Douglas et al., 2021). Los gusanos helmintos son organismos multicelulares que miden entre 100 μm y 1000 μm o más (Cox, 2022) que tienen ciclos de vida diversos, sus ciclos de vida pueden ser directos (simple) o indirectos (complejos), en el primero los parásitos crecen y maduran sexualmente en un solo huésped antes de liberar huevos o larvas, mientras que los parásitos con ciclos de vida complejos infectan uno o más huéspedes intermedios antes de la transmisión a un huésped definitivo o final (Benesh et al., 2021).

La transmisión de los parásitos es tróficamente, un huésped es devorado por el siguiente huésped y los gusanos solo se reproducen después de haber sido transmitidos a través de cuatro o cinco huéspedes, los parásitos con un ciclo de vida simple corren el riesgo de morir sin reproducir, en caso de que el primer huésped muera sin encontrar al segundo huésped o de la muerte del parásito antes de la maduración sexual en el segundo huésped, es por esto que los helmintos se adaptaron para minimizar estos riesgos mediante los ciclos de vida complejos que retrasan la reproducción a expensas de la mortalidad de manera que antes de reproducirse, infectan sucesivamente a múltiples huéspedes de taxones diferentes (Froelick et al., 2021; Benesh et al., 2021).

Los ciclos de vida complejos en los helmintos evolucionan mediante dos procesos diferentes, uno de estos procesos es la incorporación ascendente donde se agrega un nuevo huésped definitivo que se alimenta del huésped definitivo original, por lo que el huésped original se convierte en un huésped intermediario, en el que se suprime la reproducción, en el segundo proceso es la incorporación descendente, en la que se agrega un nuevo huésped intermediario en un nivel trófico inferior, para facilitar la transmisión al huésped definitivo original (Parker et al., 2003).

Morfología de *Clinostomum* spp.

Los tremátodos del género *Clinostomum* (Digenea: Clinostomidae), son un grupo de trematodos que prevalece en ambientes acuáticos de agua dulce y se encuentran comúnmente en la cavidad bucal y el esófago de una variedad de aves piscívoras (Calhoun et al., 2020; Rosser et al., 2018). Los trematodos se caracterizan por ser gusanos aplanados típicamente en forma de hoja, son organismos parásitos debido a que requieren obligatoriamente estar dentro de un huésped para poder subsistir y son ovíparos. Morfológicamente los trematodos presentan un sistema digestivo incompleto ya que no tiene un orificio anal, solo presenta una cavidad bucal, la cual continua con la faringe y el esófago que se comunica con el intestino. Este último se divide en dos tubos que son longitudinales donde se lleva a cabo la absorción de los nutrientes. El sistema de excreción está formado por dos conductos que se encuentran a ambos lados del cuerpo y presentan una vejiga que desemboca en un poro

excretor. La gran mayoría de los tremátodos son hermafroditas, el sistema reproductor masculino está constituido por un par de testículos, por otro lado, el sistema reproductor femenino consta de un único ovario, del cual surge el oviducto (Lat, 2020).

Ciclo de vida de trematodos (*Clinostomum marginatum*)

Los trematodos tienen un ciclo de vida que involucra una serie de transformaciones hasta alcanzar la fase adulta; además, que contempla la intervención de varios intermediarios como lo pueden ser moluscos y crustáceos. El ciclo de vida inicia con la liberación de los huevos mediante las heces o la orina por parte del hospedador definitivo (aves), los huevos liberados deben alcanzar un medio acuoso con condiciones de humedad y temperatura para poder eclosionar. Cuando el huevo se encuentra en las condiciones ideales, en su interior se forma una larva conocida como miracidio, que está rodeada de cilios para facilitar el movimiento y desplazamiento por el medio acuoso. Al encontrar a su huésped ideal que a menudo es un caracol de la familia Planorbidae (primer huésped intermediario), la larva penetra su piel y entra en su torrente sanguíneo. La larva en los tejidos del caracol, se convierte en el esporocisto, generando en su interior masas germinativas. Estas últimas forman las redias, que presentan una estructura con una faringe fácilmente identificable e indicios del intestino y del sistema excretor. Las redias rompen la membrana del esporocisto y continúan desarrollándose en el interior del huésped (caracol), posteriormente en la pared de las redias comienzan a formarse varias masas germinativas, a partir de las cuales se forma el siguiente estadio conocido como cercaría (Calhoun et al., 2020; Lat, 2020; Rosser et al., 2018; Tavares et al., 2023).

La cercaría tiene una estructura interna parecida a la de un trematodo adulto, sin embargo el sistema reproductor aún no se encuentra del todo maduro, la cercaría nada libremente infectando una amplia gama de especies de anfibios, peces de agua dulce o fijarse a alguna superficie dura como alguna planta y transformarse en metacercarias que pueden vivir en segundos huéspedes intermediarios hasta por cuatro años y se convierten en adultos una vez que un huésped definitivo adecuado que consume una planta /anfibio/pez infectado. Por ejemplo, si el ser humano se alimenta de alguna planta que contenga metacercarias, estas transitan por las vías digestivas hasta llegar al duodeno. En este último experimentan un proceso de desenquistamiento, entrando al torrente sanguíneo para iniciar la migración hacia otros órganos para madurar completamente y se convierten en parásitos adultos. Posteriormente los adultos se reproducen comenzando a poner huevos, los cuales son liberados a través de las heces iniciando el ciclo (Calhoun et al., 2020; Lat, 2020).

Los trematodos del género *Clinostomum* poseen un grupo diverso de huéspedes, siendo conocidos como parásitos de anfibios, peces, reptiles y, en ocasiones, de mamíferos como los humanos. *Clinostomum marginatum* es un trematodo digenético común con una distribución cosmopolita. La

cercaria de *Clinostomum marginatum* tiene la cola bifurcada que penetra en el pez de agua dulce, que es el huésped inmediato, donde se desarrolla una gran metacercaria conocida como 'gusano amarillo'. Cuando aves acuáticas como varias especies de garzas o aves piscívoras distribuidas en los continentes de América del Sur y del Norte, comen peces infectados, las larvas amarillas se liberan y migran a la cavidad oral del huésped definitivo donde alcanzan la madurez sexual en unos pocos días (Akinsanya et al., 2021; De Souza et al., 2020).

De acuerdo con De Souza y colaboradores en 2020 se identificó la presencia de *Clinostomum marginatum* en peces *Pterygoplichthys pardalis* en la cavidad ocular y región de la aleta. Estos peces se encuentran naturalmente en la región tropical de América del Sur (Amazonas), sin embargo, se ha demostrado su expansión a los Estados Unidos, México, Serbia, Filipinas, Vietnam, Singapur, Malasia e Indonesia y son de importancia comercial en la acuicultura como peces ornamentales o para el consumo humano, siendo ampliamente comercializados en ferias y comercios. De igual manera Morais y colaboradores en 2011 determinaron la presencia de helmintos en filetes de la piraña roja (*Pygocentrus nattereri*), todos los peces analizados presentaban quistes amarillos en la musculatura del filete, encontraron 69 quistes pertenecientes a las metacercárias de la especie *Clinostomum marginatum* y solo 3 para *Austrodiplostomum compactum* demostrando una mayor susceptibilidad de *P. nattereri* para metacercárias de *C. marginatum* (Akinsanya et al., 2021)

Las zoonosis por trematodos de peces tienen una gran importancia médica principalmente en el extremo este y sureste de Asia, donde se infectan hasta 30 millones de personas, debido a que el pescado crudo es parte de la dieta básica que constituye la principal fuente de proteínas de estas personas. La infección se produce por el consumo de pescado crudo contaminado con metacercarias que se encuentran principalmente en el tejido muscular y subcutáneo del pez, si un humano consume pescado crudo, el paracito se adhiere accidentalmente a la superficie de la mucosidad de la garganta (Akinsanya et al., 2021; Morais et al., 2011; Park et al., 2009). De esta manera Park y colaboradores (2009) describieron el segundo caso de infección humana con *Clinostomum* en la membrana mucosa de la laringe del paciente, el primer registro de una infección por *Clinostomum* fue reportado en Japón, tratándose de un hombre coreano que había comido varios tipos de pescado crudo de agua dulce. Sin embargo, las infecciones ocasionadas por *Clinostomum marginatum* son raras y ocasionales, por lo que no presentan importancia patogénica, sugiriendo una larga coadaptación evolutiva entre este parásito y humanos (Dai et al., 2022; Morais et al., 2011).

Helminthos en la inflamación

A pesar que la mortalidad debida a la infección por helmintos es rara, la mejora de la atención sanitaria y la desparasitación en los países de alto riesgo dio como resultado una baja prevalencia de

infecciones por helmintos, sin embargo, se vio un aumento en la incidencia de enfermedades inflamatorias. Esta correlación inversa entre las infecciones por helmintos y las enfermedades inflamatorias concuerda con la hipótesis de higiene también llamada hipótesis del viejo amigo la cual propone que la menor cantidad de infecciones (especialmente helmintos) en la infancia conduce a mayores posibilidades de desarrollar enfermedades alérgicas, inflamatorias y metabólicas en el futuro (Arai et al., 2022; Dai et al., 2022; Rajamanickam et al., 2020; Shi et al., 2022).

Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por un desequilibrio de las células T CD4+, en específico los subconjuntos T auxiliares tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), tipo 17 (Th17), foliculares (Tfh) y células T reguladoras (Treg) con producción de interleucina-1 (IL-1), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Mientras que helmintos inducen la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th2 (antiinflamatoria), con producción de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), induciendo la activación de linfocitos B y su diferenciación (Bravo et al., 2020; Rajamanickam et al., 2020; Shi et al., 2022).

Los helmintos tienen la capacidad de modular la respuesta del huésped a un estado llamado tolerancia antiinflamatoria mediante sus moléculas de excreción-secreción (MES) que contienen una mezcla de proteínas y moléculas de bajo peso molecular con diferentes mecanismos, estas proteínas son secretadas o excretadas tanto por parásitos naturales como cultivados en laboratorio (Arai et al., 2022; Kahl et al., 2018).

Mecanismo de los helmintos y sus MES para reducir la inflamación

Inducción de macrófagos M2

El lipopolisacárido (LPS) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) polarizan a los macrófagos hacia el fenotipo "activado clásicamente" (tipo M1) que libera citocinas proinflamatorias (como IL-6, TNF- α) para proteger al huésped contra los patógenos, seguido de la polarización M2 para formar una respuesta antiinflamatoria y promover la reparación del tejido. La infección por helmintos se acompaña de la inducción de la polarización M2 de los macrófagos, se ha determinado que la infección por *Heligmosomoides polygyrus* induce la polarización de los macrófagos M2 con regulación positiva de citocinas en ratones, la infección por *Schistosoma mansoni* induce la polarización M2 de los macrófagos mejorando así la hiperlipidemia y la aterosclerosis, también se sabe que la infección crónica de *Trypanosoma cruzi* causa un cambio en la relación M2/M1 hacia un fenotipo antiinflamatorio. Las MES también inducen la polarización de macrófagos M1, por ejemplo, Omega-1 una glicoproteína inmunomoduladora en los huevos de *S. mansoni*, induce una respuesta

inmune tipo 2, también se ha informado que las MES de *Echinococcus multilocularis* desencadenan la producción de citocinas antiinflamatorias mediante la activación de los macrófagos M2, también se ha determinado que la infección de *Trichinella spiralis* y sus MES inducen la polarización de macrófagos M2 debido a la IL-4 y suprimir la polarización de macrófagos M1 inducida por LPS *in vitro* (Holzmüller et al., 2018; Martínez et al., 2019; Wang et al., 2020).

La infección por helmintos y sus MES reclutan otras células inmunológicas para regular la inflamación

las células T, las células B y los eosinófilos son mediadores importantes para la homeostasis del metabolismo y la inmunidad. Generalmente, las células T helper1 (Th1), las células Th17, las células T CD8+ y las células B2 son responsables de la inflamación, mientras que las células T reguladoras (Tregs), las células B reguladoras (Bregs), las células Th2, las células B1 y los eosinófilos contribuyen a la respuesta antiinflamatoria (Abou et al., 2022).

Las infecciones por helmintos o sus MES suprimen la diferenciación de Th1 y Th17, además de promover la inducción de Tregs y Bregs, diferentes estudios determinaron que la infección por *S. mansoni* induce poblaciones de Tregs disminuyendo así la inflamación alérgica de las vías respiratorias y sus MES promueven la activación de eosinófilos secretando IL-4 que mantiene la polarización de los macrófagos M2. También que se sabe que *Schistosoma japonicum* induce células Bregs además controlar los niveles de citocinas proinflamatorias mediante la secreción de IL-10 para proteger contra la inflamación inducida por parásitos. Abou y colaboradores (2022) concluyeron que la infección de *Toxocara canis* induce una respuesta inflamatoria innata tipo Th2, aumentando las citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33. Se ha informado que en la infección por *Brugia malayi* existe un predominio de citoquinas como IL-10 y TGF- β que lleva a un fenotipo Th2 (Hewitson et al., 2008).

La infección por helmintos interactúa con la microbiota intestinal

Diferentes estudios proponen que las alteraciones en la microbiota inducidas por helmintos y sus MES tienen un efecto protector frente a la inflamación, por ejemplo, la infección por *Strongyloides venezuelensis* provoca modificaciones en la microbiota intestinal aumentando la población de *Lactobacillus* spp., cambiando los macrófagos M1 a M2 así aumentando los niveles de citocinas antiinflamatorias y disminuyendo el LPS. Por otro lado, la infección por *Heligmosomoides polygyrus* modifica la microbiota gastrointestinal de ratones infectados (Rooney et al., 2022). También la infección por *Echinostoma caproni* cambia la microbiota intestinal del huésped mediante la IL-25 responsable del mantenimiento de la homeostasis intestinal (Cortés et al., 2018).

Inflamación

La inflamación es una respuesta de los organismos a diferentes estímulos biológicos, químicos o físicos endógenos o exógenos, este proceso ocurre como parte de la respuesta inmune innata como de la adquirida, dependiendo del tiempo del progreso de la inflamación se puede clasificar de 2 maneras: Fase aguda o crónica, la primera comienza en minutos u horas donde las células del sistema inmunológico migran al sitio de la lesión en una secuencia de eventos facilitados por mediadores solubles como citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda y mecanismos de respuesta inmune innata que activan la adquirida. Si la inflamación persiste por días, semanas o meses como resultado de una exposición prolongada a la estimulación, se considera como fase crónica, donde participa la respuesta innata, pero es la adquirida la que mantiene el proceso en el tiempo produciendo daño tisular y fibrosis (Germolec et al., 2018; González et al., 2019).

Células que participan en la inflamación

Las células que participan en la inflamación forman parte de la inmunidad innata como los neutrófilos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas a nivel del epitelial, estas últimas son las que detectan el daño por sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que median las respuestas locales al daño tisular y a la infección. En los sitios de lesión tisular, las células epiteliales y endoteliales dañadas liberan factores desencadenantes de la cascada inflamatoria, junto con quimiocinas que atraen primero a neutrófilos, seguidos por monocitos y células asesinas naturales (células NK) que sintetizan interleucina-32 (IL-32) y por último mastocitos (González et al., 2019; Oishi et al., 2018).

Los monocitos se diferencian en macrófagos y células dendríticas, reclutados mediante quimiotaxis en tejidos dañados. Los neutrófilos median la respuesta inflamatoria programando células presentadoras de antígenos para activar las células T y liberar factores que inducen una respuesta inflamatoria local y sistémica como el TNF- α , IL-1 que estimulan la síntesis y liberación del óxido nítrico; otras orientan el curso futuro de la respuesta inmune adaptativa (interleucina 12 -IL-12-, interleucina 18 -IL-18-); median el reclutamiento de leucocitos en el tejido inflamado (IL-8 y diversas quimioquinas) e inducen la proliferación y/o diferenciación de precursores leucocitarios al actuar a nivel de la médula ósea (IL-7 e IL-15), para atraer monocitos y células dendríticas, los macrófagos presentan antígenos, sufren fagocitosis y modulan la respuesta inmune mediante la producción de citocinas como la IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, el factor activador plaquetario, interferones, eicosanoides. y factores de crecimiento. Los mastocitos, que residen en matrices de tejido conectivo y en superficies epiteliales, son células efectoras que inician respuestas inflamatorias. Los mastocitos activados liberan una variedad de mediadores inflamatorios, que incluyen citocinas, quimiocinas,

histamina, proteasas, prostaglandinas, leucotrienos y proteoglicanos de serglicina (González et al., 2019; Oishi et al., 2018; Solís et al., 2020).

Por otro lado, los linfocitos T y B son los efectores de la inmunidad adquirida. Durante la inflamación los linfocitos T CD4⁺ del tipo helper proinflamatorios (LTh1 y LTh17) coordinan la respuesta inmune adaptativa mediante la secreción de diversas citoquinas, como INF- γ , TNF α , IL-6 e Interleucina 17A (IL17) (Oishi et al., 2018; Prat et al., 2021).

Macrófagos

Los macrófagos son células inmunes innatas de todos los tejidos, necesarias para la homeostasis, debido a que detectan y responden a patógenos u otros desafíos ambientales, además de participar en la reparación de tejidos después de una lesión. También desempeñan diversas funciones en el desarrollo respuesta aguda a la infección y la lesión tisular, y la reparación de tejidos (Watanabe et al., 2019).

Los macrófagos tienen cierto grado de plasticidad que dependerá de las señales del entorno extracelular, exhibiendo 2 fenotipos: M1 o M2. Los macrófagos M1 también llamados macrófagos activados clásicamente polarizados por lipopolisacáridos (LPS), asociados con citocinas Th1, se consideran un fenotipo proinflamatorio, con una sólida capacidad fagocítica y citotóxica, que expresan citocinas proinflamatorias IL-6, IL-12, IL-1 β y TNF- α y quimiocinas como CCL2, CCL5, lo que refleja su capacidad para reclutar otras células inmunitarias como células T y células B al sitio de la infección, también regulan positivamente la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) para producir óxido nítrico a partir de arginina y muestran un metabolismo glucolítico mejorado (Pérez et al., 2022; Ross et al., 2021).

Los macrófagos M2 también llamados macrófagos alternativamente activados, están polarizados por citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) participan en la resolución de la inflamación, además de reparación de tejidos, los macrófagos M2 cuentan con varios subtipos (M2a, M2b, M2c, M2d) que producen combinaciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, los macrófagos M2a están asociados con la inflamación alérgica polarizada Th2 en el pulmón siendo inducidos por IL-4 y/o IL-13 y expresan altos niveles de IL-10, TGF- β y quimiocinas inflamatorias como CCL17, CCL18, CCL22, y CCL24. Por otro lado, los macrófagos M2b desempeñan funciones importantes en las respuestas inmunes Th2 debido a la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 y CCL1. Cuando existe un ambiente rico en IL-10 y prostaglandina E2 se producen macrófagos M2c que expresan IL-10 así como TGF- β , que son moléculas importantes para la resolución de la inflamación y la reparación de

tejidos. Por último, los macrófagos M2d expresan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la IL-10 (González et al., 2019; Pérez et al., 2022; Ross et al., 2021).

Durante los procesos inflamatorios los macrófagos M1 están implicados en el inicio y mantenimiento liberando TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-23, que es contrarrestada por los macrófagos M2 debido a que secretan grandes cantidades de IL-10 y TGF- β para suprimir la cascada inflamatoria, contribuir a la reparación tisular, favorecer la remodelación tisular, iniciar la vasculogénesis y preservar la homeostasis tisular, por lo que el equilibrio entre macrófagos M1/M2 está relacionado con la progresión de la inflamación (Pérez et al., 2022).

Polarización de los macrófagos en la inflamación

Clasificar los macrófagos in vivo no es fácil debido a que la denominación M1 o M2 se estableció basándose principalmente en observaciones de macrófagos cultivados en un entorno in vitro, donde la exposición a ligandos del receptor tipo Toll, lipopolisacáridos (LPS) o citocinas Th1 (TNF- α e IFN- γ) polariza los macrófagos a un fenotipo proinflamatorio M1 aumentando la expresión de citocinas proinflamatorias y la producción de especies reactivas de oxígeno. Mientras que la administración de IL-4 e IL-13 da como resultado la expresión de citocinas antiinflamatorias, incluidas IL-10, TGF- β y la enzima citosólica arginasa-1 (González et al., 2019; Oishi et al., 2018; Watanabe et al., 2019).

El lipopolisacárido (LPS) bacterias gramnegativas es un potente estimulador de las respuestas inflamatorias de activa rápidamente los macrófagos M1 y estimula la secreción de citocinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) a través de iNOS, el exceso de NO induce el desarrollo de enfermedades inflamatorias y la prostaglandina E₂ (PGE₂) por la ciclooxigenasa (COX) (Moon et al., 2018; Ren et al., 2020).

JUSTIFICACIÓN

La inflamación es un mecanismo de protección del cuerpo de bacterias, virus, toxinas e infecciones eliminando patógenos y promoviendo la reparación y recuperación de los tejidos, en condiciones normales la inflamación aguda es un mecanismo de defensa de primera línea activando varios componentes de defensa, incluidas las células inmunitarias, los agentes antiinflamatorios endógenos para permitir la resolución de la inflamación aguda, cuando esta inflamación no se resuelve se liberan más moléculas inflamatorias dando como resultado una respuesta inmune a largo plazo conocida como inflamación crónica. Muchas enfermedades prevalentes están relacionadas con la inflamación crónica como el asma, la diabetes mellitus (DM) tipo 1 y 2, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide (Chantree et al., 2023; Furman et al., 2019; Tansey et al., 2022; Wang et al., 2020).

Los helmintos tienen una gran capacidad de infectar a millones de humanos y animales en todo el mundo, se estima que hay 1,500 millones de personas que tienen una o más infecciones por helmintos, Dai y cols. (2022) mencionaron que existe una correlación inversa entre las infecciones por helmintos y las enfermedades inflamatorias (hipótesis de higiene) a menor cantidad de infecciones especialmente de helmintos en la infancia conduce a mayores posibilidades de desarrollar enfermedades alérgicas, inflamatorias y metabólicas en el futuro. También se sabe que los helmintos tienen la capacidad de modular la respuesta del huésped a un estado llamado tolerancia antiinflamatoria mediante sus moléculas de excreción-secreción (MES), las cuales contienen una mezcla de proteínas y moléculas de bajo peso molecular con diferentes mecanismos, estas proteínas son secretadas o excretadas tanto por parásitos naturales como cultivados en laboratorio (Arai et al., 2022; Kahl et al., 2018; Ryan et al., 2020).

En México existe una gran variedad de especies acuáticas con gran interés económico como los peces para consumo humano directo, los estados con mayor número de pescadores son Tamaulipas, Veracruz y Campeche. *Millerichthys robustus* (*M. robustus*) es un pez anual endémico de las cuencas de los ríos Papaloapan y Coatzacoalcos en Veracruz, entre la helmintofauna de *M. robustus* están las especies alogénicas *Valipora minuta*, *Clinostomum marginatum*, *Contracaecum* sp., *Serpinema trispinosum*, *Eustrongylides* sp., *Gnathostoma lamothei* y *Polymorphus* sp. (Domínguez et al., 2018; Mosqueda et al., 2019; Secretaría de agricultura y desarrollo rural, 2020). Aunque *Clinostomum marginatum* es un helminto que se encuentra en un pez endémico de México no es un parásito que este ampliamente estudiado, es por ello que en este proyecto nos enfocamos en investigar si sus MES tienen actividad antiinflamatoria.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de las moléculas de excreción-secreción (MES) de *Clinostomum marginatum* en macrófagos J774A.1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivo de macrófagos J774A.1.
- Estandarización de los modelos *in vitro* con macrófagos.
- Evaluar la antiinflamatoria de las moléculas excreción- secreción de *Clinostomum marginatum* en macrófagos J774A.1.

METODOLOGIA

Preparación de las MES de *Clinostomum marginatum*

La obtención de las metacercarias de *C. marginatum* fue de la musculatura y celoma de peces de agua dulce. Las larvas de parásitos se mantuvieron en medio RPMI 1640 durante 30 días, colectándose 1mL de medio cada tercer día y adicionando 1ml de medio nuevo. Tras la recolección las muestras fueron dializadas, liofilizadas y cuantificadas por el método de Lowry. La identificación de las proteínas presente en los sobrenadantes se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% (EGPA), para la determinación del peso molecular se usó un marcador de peso molecular con un rango de 10-250 KDa.

Preparación del medio de cultivo DMEM para macrófagos J774A.1

Los macrófagos se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium) con 10% de suero bovino fetal y antibióticos 2%, a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% (Forma-Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator Series II). El medio debe ser reemplazado por medio nuevo, se agregan 3mL de medio DMEM o 5mL si es viernes y se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%.

Preparación del medio de cultivo DMEM para macrófagos RAW 264.7

Los macrófagos se mantuvieron en medio DMEM / F-12 GIBCO (Dulbecco's Modified Eagle's Médium: Nutrient mixture F-12) con 10% de suero bovino fetal, antibióticos 2%, aminoácidos al 1% y L-glutamina 1%, a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% (Forma-Scientific CO₂ Water Jacketed

Incubator Series II). El medio debe ser reemplazado por medio nuevo, se agregan 3mL de medio DMEM o 5mL si es viernes y se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%.

Conteo celular en cámara de Neubauer

Las células se desprendieron con un gendarme de las cajas de cultivo, con ayuda de una pipeta se recuperó el sobrenadante en un tubo falcón, se centrifugo a 2000 rpm durante 7 min, el sedimento celular se resuspendió con 1mL de medio DMEM, posteriormente se realizó una dilución 1:10 de azul tripano con las células resuspendidas (90µL+ 10µL respectivamente), se tomaron 10µL de la dilución anterior y se colocó en la cámara de Neubauer para el conteo en microscopio. Para determinar la cantidad a tomar del sedimento celular se utilizó la siguiente fórmula: total de células (millones) = número de células contadas/4 x factor de dilución x superficie de la cámara x mililitros en los que se resuspendió el sedimento celular. La cantidad que se tomó del sedimento celular se completó para 1mL de medio DMEM para cada pozo.

Viabilidad celular

Este modelo se llevó a cabo en placas de 96 pozos, cada pozo contenía 40,000 macrófagos en 100 µL de medio con un periodo de establecimiento de 24h, pasado el tiempo las columnas 1, 2 y 3 de la placa fueron los blancos, desde la columna 4 hasta la 12 de la fila A se estimularon los macrófagos con 10µL de MES para una concentración final en el pozo de 100 µg/ mL, así sucesivamente con la fila B (200µg/mL), fila C (400µg/mL), fila D (600µg/mL), fila E (800µg/mL), fila F (1000µg/mL), fila G (1500µg/mL) y fila H (2000µg/mL) para macrófagos J774A.1, mientras que se agregaron las concentraciones de 3000µg/mL, 4000µg/mL, 5000 µg/mL y 6000 µg/mL para macrófagos después de estimular todos los pozos, se incubaron a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% por 24h. Trascorridas las 24h, se pesaron 10mg de MTT reconstituyéndolo en 2ml de PBS para una concentración final de 5mg/mL teniendo cuidado de no exponerlo a la luz, con una pipeta multicanal se agregaron 20µL de la solución de MTT a cada pozo, se incubaron 45 minutos hasta que se observaron cristales azules en los pozos (en microscopio). Se tira el medio y se adicionan 100µL de DMSO para solubilizar los cristales, se agita la placa por 15 minutos, por último, se lee a una absorbancia 540nm en un lector de microplacas (iMark de BIO RAD).

Modelo de estimulación de macrófagos J774A.1

Se siembran placas de 6 pozos con 400,000 células que son incubadas 24h. se formaron grupos de estudio los 2 primeros pozos fueron blancos, los pozos 3-4 macrófagos estimulados con 5µg/mL de LPS, los pozos 5-6 macrófagos tratados con un antiinflamatorio (diclofenaco 31 µM), los pozos 7-8 macrófagos tratados primero diclofenaco 31 µM a los que trascorridas 2h se le agregar 5 µg/mL de LPS, los pozos 9-10 macrófagos tratados con 800µg/mL de MES y por último los pozos 11-12 fueron

macrófagos tratados con 800µg/mL de las MES a los que trascurridas 2h se le agregar 5µg/mL de LPS. Para llevar a cabo el proceso primero se estimularán los pozos con las concentraciones de MES y diclofenaco. Trascurridas 2h de lo anterior se agregaron las concentraciones de LPS y se incubaron las placas a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5% por 24h.

Determinación de la producción de óxido nítrico

Para la determinación de óxido nítrico se utilizó el kit de Sistema de reactivos de Griess (Promega) el cual se dejó atemperar 20 min antes de usar, para este procedimiento primero se obtuvieron 200µL de los sobrenadantes de cada pozo de las placas estimuladas en microtubos de 600µL, estos microtubos se centrifugaron y se conservaron en hielo. Para determinar el óxido nítrico primero se construyó una curva de calibración por duplicado en una placa de 96 pozos de la siguiente manera, se prepararon 3 diluciones 1:10 consecutivas del estándar de nitrito 0.1M con medio DMEM de manera que la última dilución tuviera una concentración de 100µM, se pusieron 50µL de medio DMEM en los pocillos de las filas B a H de las columnas 1 y 2, posteriormente se agregaron 100µL de la solución de nitrito 100µM a los 2 pocillos restantes de la fila A, se tomaron 50µL del pocillo A de la columna 1 y se pasaron al pocillo B de la misma columna se homogenizo y se repitió el mismo procedimiento has el pocillo G, se repitió el procedimiento para la columna 2 de manera que las concentraciones de la curva fueron 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ,1.56 y 0µM. Para seguir con la determinación se agregaron 50 µL del sobrenadante de los pozos por triplicado, posteriormente utilizando una pipeta multicanal, se agregaron 50µL de la solución de sulfanilamida en todos los pocillos, se dejaron incubar 10 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Pasado el tiempo se agregaron 50µL de solución NED a todos los pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, protegido de la luz, por último, se leyó a una absorbancia de 540nm en un lector de microplacas (iMark de BIO RAD). Para saber la concentración de óxido nítrico se sacaron los promedios de las lecturas de las muestras, al igual de la curva de calibración y mediante la fórmula $X = (y - b) / m$ se obtuvo la concentración de NO.

RESULTADOS Y DISCUSION

La viabilidad de los macrófagos J774A.1 no se vio alterada por la presencia de concentraciones de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ de MES con respecto a las células del grupo control (Figura 1) y la IC_{50} fue de 1569 $\mu\text{g/mL}$. El efecto se repitió en los macrófagos RAW 264.7 (Figura 2); sin embargo, el IC_{50} aumento a 6851.8 $\mu\text{g/mL}$, Por lo tanto, para el experimento de óxido nítrico se eligieron las concentraciones más bajas de MES, hasta llegar a la concentración óptima de 800 $\mu\text{g/mL}$.

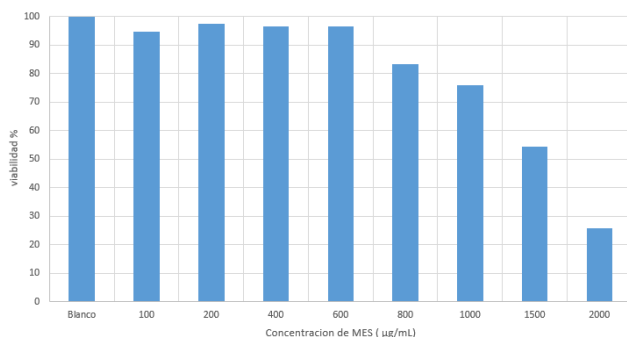


Figura 1. Viabilidad celular de macrófagos J774A.1 con MES.

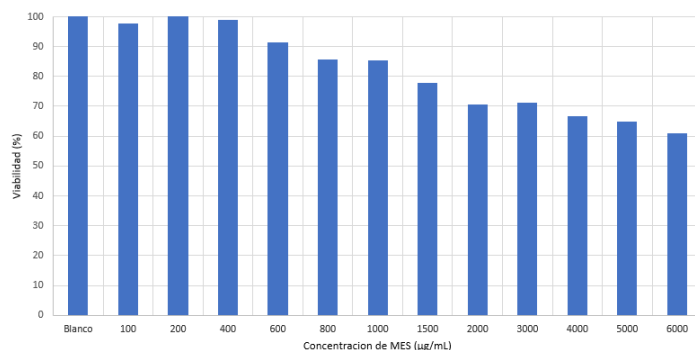


Figura 2. Viabilidad celular de RAW 264.7 con MES.

Se determinó que las MES de *C. marginatum* tienen actividad antiinflamatoria mediante la disminución de NO en macrófagos J774A.1 estimulados con 5 μg de LPS, obteniendo una disminución de 72.8%, 72.2% y 74% de ON a una concentración de MES de 800 μg , como se muestra en las tablas 1-3, también se determinó la estimulación de los macrófagos por medio de sus características morfológicas (Figura 3).

Tabla 1. Experimento 1 de óxido nítrico en macrófagos J774A.1.

| | ABS promedio | [ON] (μM) | % LPS vs Control | Disminución de ON (%) con respecto al LPS |
|--|---------------------|------------------|-------------------------|--|
| Control | 0.0622 | 1.8 | 5.7 | 94.3 |
| LPS [5 μg/mL] | 0.2332 | 30.9 | 100 | 0 |
| Diclofenaco [31 μM]+LPS [5 μg/mL] | 0.1928 | 24 | 45.9 | 54.1 |
| MES [800 μg/mL]+ LPS [5 μg/mL] | 0.1011 | 8.4 | 27.2 | 72.2 |

La actividad pro inflamatoria del LPS fue ideal al aumentar un 94.3 % con respecto al grupo control, por otro lado, la actividad antiinflamatoria de las MES [800 μg/mL] fue de 72.81% resultando ser mejor que el antiinflamatorio comercial que solo disminuyo la concentración de ON en un 54.1 %.

Tabla 2. Experimento 2 de óxido nítrico en macrófagos J774A.1.

| | ABS promedio | [ON] (μM) | % LPS vs Control | Disminución de ON (%) con respecto al LPS |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------|--|
| Control | 0.0767 | 2,7 | 18.2 | 81.2 |
| LPS [5 μg/mL] | 0.1630 | 15.1 | 100 | 0 |
| MES [800 μg/mL]+ LPS [5 μg/mL] | 0.086 | 4.2 | 27.8 | 72.2 |

La actividad antiinflamatoria de las MES se ve representada con una disminución del 72.2 % con respecto al LPS del cual la actividad pro inflamatoria fue ideal al aumentar la concentración de ON en un 81.2 % con respecto a los macrófagos control.

Tabla 3. Experimento 3 de óxido nítrico en macrófagos J774A.1.

| | ABS promedio | [ON] (μM) | % LPS vs Control | Disminución de ON (%) con respecto al LPS |
|---------------------------------------|---------------------|------------------|-------------------------|--|
| Control | 0.0708 | 1.9 | 11.9 | 88.1 |
| LPS [5 μg/mL] | 0.1690 | 16.0 | 100 | 0 |
| MES [800 μg/mL]+ LPS [5 μg/mL] | 0.0865 | 4.2 | 26.0 | 74 |

La actividad pro inflamatoria del LPS fue ideal al aumentar la concentración de ON en un 88.1%, mientras que la actividad antiinflamatoria quedo demostrada al disminuir en un 74% en comparación con el grupo de LPS.

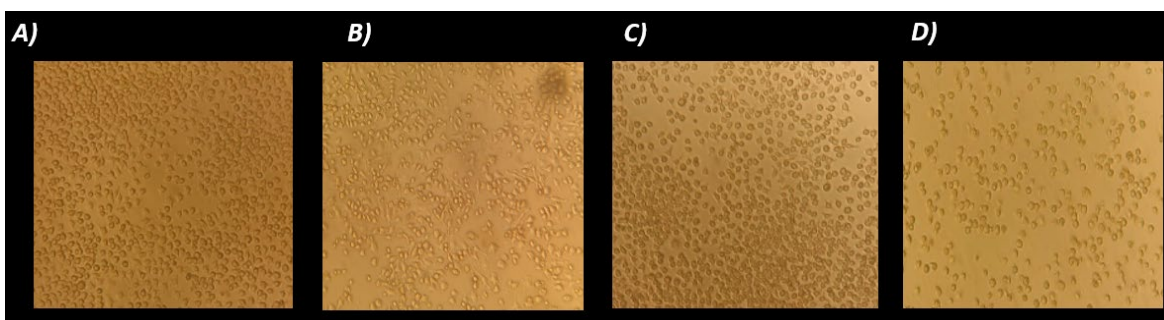


Figura 3. En A se observan macrófagos J774A.1 si ningún estímulo (control) con una morfología circular, mientras que en B se muestra macrófagos estimulados con LPS (5µg/mL) con una morfología alargada y formación de filopodios, en C se muestran macrófagos con Diclofenaco (31 µM)+LPS (5 µg/mL) la morfología es circular sin embargo muy pocos tienen formación de filopodios y D) macrófagos estimulados con MES (800 µg/mL)+ LPS (5µg/mL) con una morfología parecida al grupo control.

El experimento de óxido nítrico se repitió en macrófagos RAW 264.7 estimulados con 1µg/mL de LPS; sin embargo, se observó una disminución menor que en macrófagos J774A.1, siendo estas de 42.7% y 23.2% como se muestra en las tablas 4-5.

Tabla 4. Experimento 1 de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7.

| | ABS promedio | [ON] (µM) | % LPS vs Control | Disminución de ON (%) con respecto al LPS |
|---|---------------------|------------------|-------------------------|--|
| Control | 0.0985 | 3.8 | 4.8 | 95.2 |
| LPS [1µg/mL] | 0.5940 | 70.8 | 100 | 0 |
| Diclofenaco [31 µM]+LPS [1µg/mL] | 0.5040 | 58.6 | 82.7 | 17.3 |
| MES [800µg/mL]+ LPS [1µg/mL] | 0.4730 | 54.4 | 76.8 | 23.2 |

La actividad pro inflamatoria aumentó la concentración de ON en un 95.2 % con respecto al grupo control, por otro lado, la actividad antiinflamatoria de las MES se ve representada con una disminución de 23.2 %, la cual es mayor a la disminución del antiinflamatorio comercial.

Tabla 5. Experimento 2 de óxido nítrico en macrófagos RAW 264.7.

| | ABS promedio | [ON] (μM) | % LPS vs Control | Disminución de ON (%) con respecto al LPS |
|--|--------------|------------------------|------------------|---|
| Control | 0.0950 | 3.8 | 5.8 | 94.2 |
| LPS [1$\mu\text{g}/\text{mL}$] | 0.6167 | 66 | 100 | 0 |
| Diclofenaco [31 μM]+LPS [1$\mu\text{g}/\text{mL}$] | 0.4373 | 46.8 | 70.9 | 29.1 |
| MES [800 $\mu\text{g}/\text{mL}$]+ LPS [1$\mu\text{g}/\text{mL}$] | 0.3933 | 37.8 | 57.3 | 42.7 |

La actividad antiinflamatoria de las MES fue del 42.7 % siendo mejor que la del antiinflamatorio comercial, por otra parte, la actividad pro inflamatoria del LPS fue optimo al incrementar en un 94.2 % en comparación con el grupo control.

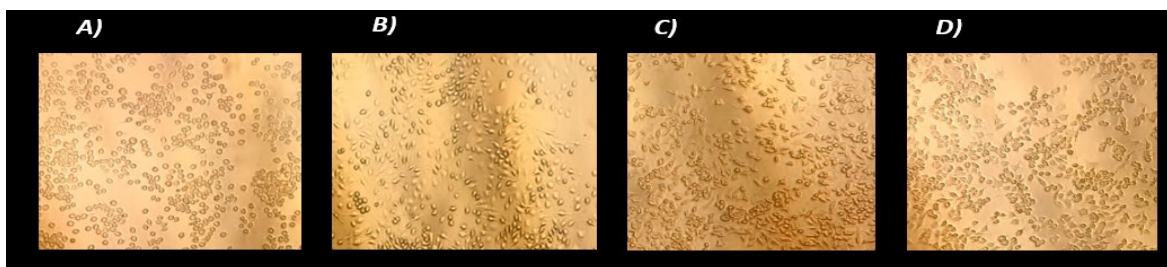


Figura 4. En A se muestran macrófagos RAW 264.7 sin ningún estímulo (control) con una morfología circular, B muestra macrófagos estimulados con LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con una forma alargada y con formación de filopodios, en C se observan macrófagos con Diclofenaco (31 μM) +LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con una morfología alargada y con formación de filopodios, sin embargo, algunos son circulares y D muestra macrófagos estimulados con MES (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con una morfología similar al grupo de Diclofenaco +LPS.

La disminución de ON de los macrófagos como resultado de la exposición a las MES de *C. marginatum* puede estar relacionado con lo descrito por Rolot y Dewals (2018), Steinfeldt y col.(2016) y Shi y col. (2022) , estos señalan que los helmintos producen una respuesta inmune tipo 2 caracterizada por la producción de citocinas como interleucina-(IL-) 4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que inhiben la producción de citocinas proinflamatorias, causando una activación alternativa de macrófagos M2 (respuesta anti-inflamatoria) y una reducción en la producción de óxido nítrico sintasa antimicrobiana (iNOS) encargada de producir ON. Asimismo, De Abreu Cabral y col. (2018) han reportado que la infección por *Toxoplasma gondii* inhibe la producción de ON en macrófagos J774-A1 y RAW 264.7 activados por la vía clásica o M1 (respuesta proinflamatoria), por otro lado Bao y col (2022) describen que la infección por *Echinococcus granulosus* revirtió la expresión de ON

al disminuir los macrófagos activados M1, Su y col (2018) informaron que la infección por *Heligmosomoides polygyrus* disminuye los niveles de expresión de la citocina proinflamatoria, TNF- α y ON.

La actividad antiinflamatoria también se pudo ver en la morfología de los macrófagos ya que de ambas líneas celulares en su grupo de control tenían una forma redonda características de macrófagos M0 (células similares a M2), los grupos con LPS tenían una forma más alargada, aplanada y con formación de filopodios (M1), mientras que los grupos con el antiinflamatorio y las MES muestran una morfología similar a las del grupo control (M2) esto coincide con lo descrito por Milyy colaboradores en 2020. La razón por la que se ve una disminución mayor de ON en macrófagos J774A.1 que en RAW 264.7 se puede relacionar con lo reportado por De Abreu Cabral y col. (2018) donde encontraron que los macrófagos J774-A1 no infectados por el pasito *T. gondii* mostraban niveles de iNOS bajas, sin embargo después de la infección, hubo más células negativas para iNOS durante las primeras 24 h, este comportamiento no fue igual para RAW 264.7 ya que la intensidad de la señal de la expresión de iNOS fue mucho mayor y después de la infección no se observaron diferencias en la expresión de iNOS entre macrófagos infectados y no infectados a las 24h. También Lina y col. (1999) observaron que los macrófagos RAW 264.7 liberan PGE₂ con mayor extensión que los macrófagos J774 en respuesta al LPS, la prostaglandina E₂ es en parte responsable de la activación y liberación de una isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (iNOS) por ende de ON (Ilari et al.,2020), al abolir la liberación de PGE₂ inducida por LPS existió una inhibición mayor de la liberación de NO de células J774 con respecto a la células RAW 264.7, esto explica por qué los macrófagos RAW 264.7 tuvieron una mayor concentración de ON en comparación a los J774A.1; sin embargo, la inhibición de las MES y el antiinflamatorio fueron menores.

CONCLUSION

Se lograron cultivar macrófagos y estandarizar los modelos *in vitro* con RAW 264.7 y J774A.1, además se demostró la actividad antiinflamatoria de las moléculas excreción- secreción de *Clinostomum marginatum* en macrófagos J774A.1 mediante la disminución de ON y la morfología de los macrófagos, también se demostró que las MES no afecta la viabilidad celular en J774A.1 hasta una concentración de 1569 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en RAW 264.7 el IC₅₀ fue de 6851.8 $\mu\text{g/mL}$. La actividad antiinflamatoria de las MES a 800 $\mu\text{g/ml}$ fue mejor que la del antiinflamatorio comercial (diclofenaco [31 μM]), concluyendo así que las MES de *Clinostomum marginatum* son una buena alternativa para la inflamación; sin embargo, se recomienda seguirlas estudiando en estudios relacionados con Elisás y PCR.

BIBLIOGRAFIA

- Abou-El-Naga, I. F., & Mogahed, N. M. (2022). Potential roles of *Toxocara canis* larval excretory secretory molecules in immunomodulation and immune evasion. *Acta Tropica*, 106784.
- Akinsanya, B., & Hassan, A. A. (2021). Excystment of the metacercaria of the trematode *Clinostomum marginatum*. *Bioscience Research Journal*, 14(4).
- Arai, T., & Lopes, F. (2022). Potential of human helminth therapy for resolution of inflammatory bowel disease: The future ahead. *Experimental Parasitology*, 232, 108189.
- Benesh, D. P., Parker, G., & Chubb, J. C. (2021). Life-cycle complexity in helminths: What are the benefits? *Evolution*, 75(8), 1936-1952.
- Bravo, L. E., Matta, A. J., & Restrepo-Avenia, J. M. (2020). Respuesta inmune Th1/Th2 en pacientes co-infectados con *Helicobacter pylori* y helmintos. *Revista chilena de pediatría*, 91(3), 363-370.
- Calhoun, D. M., Leslie, K. L., Riepe, T. B., Achatz, T. J., McDevitt-Galles, T., Tkach, V. V., & Johnson, P. T. J. (2020). Patterns of *Clinostomum marginatum* infection in fishes and amphibians: integration of field, genetic, and experimental approaches. *Journal of helminthology*, 94, e44.
- Chantree, P., Tarasuk, M., Prathaphan, P., Ruangtong, J., Jamklang, M., Chumkiew, S., & Martviset, P. (2023). Type I Cystatin Derived from *Fasciola gigantica* Suppresses Macrophage-Mediated Inflammatory Responses. *Pathogens*, 12(3), 395.
- Cortés, A., Toledo, R., & Cantacessi, C. (2018). Classic models for new perspectives: delving into helminth–microbiota–immune system interactions. *Trends in parasitology*, 34(8), 640-654.
- Cox, FEG (2022). Los protozoos parásitos y los gusanos helmintos. En *infección, resistencia e inmunidad, segunda edición* (págs. 349-377). Rutledge.
- Dai, M., Yang, X., Yu, Y., & Pan, W. (2022). Helminth and Host Crosstalk: New Insight Into Treatment of Obesity and Its Associated Metabolic Syndromes. *Frontiers in Immunology*, 13.
- De Souza, DC, De Souza, LF, Coelho, TA y Corrêa, LL (2020). Interacción huésped-parásito entre trematodo, *Clinostomum marginatum* (Clinostomidae) y bagre acorazado, *Pterygoplichthys pardalis* (Loricariidae) de la Amazonía brasileña. *Anales de Parasitología*, 66 (2).
- Domínguez-Castanedo, O., Valdesalici, S., & Rosales-Torres, A. M. (2018). Reproductive biology of annual killifishes and its relationship with embryonic survival during diapause: *Millerichthys robustus* (Cyprinodontiformes: Cynolebiidae) as an integrative model. *Journal of Applied Ichthyology*, 34(4), 793-800.
- Douglas, B., Oyesola, O., Cooper, M. M., Posey, A., Tait Wojno, E., Giacomini, P. R., & Herbert, D. B. R. (2021). Immune system investigation using parasitic helminths. *Annual review of immunology*, 39, 639-665.
- Drurey, C., Coakley, G., & Maizels, R. M. (2020). Extracellular vesicles: new targets for vaccines against helminth parasites. *International Journal for Parasitology*, 50(9), 623-633.
- Feito, M. J., Casarrubios, L., Oñaderra, M., Gómez-Duro, M., Arribas, P., Polo-Montalvo, A., ... & Portolés, M. T. (2021). Response of RAW 264.7 and J774A. 1 macrophages to particles and nanoparticles of a mesoporous bioactive glass: A comparative study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112110.
- Froelick, S., Gramolini, L., & Benesh, D. P. (2021). Comparative analysis of helminth infectivity: growth in intermediate hosts increases establishment rates in the next host. *Proceedings of the Royal Society B*, 288(1947), 20210142.
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., ... & Slavich, G. M. (2019). Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nature medicine*, 25(12), 1822-1832.
- Gazzinelli-Guimaraes, P. H., & Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research*, 7.
- Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of inflammation. *Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols*, 57-79.
- González-Costa, M., & González, A. A. P. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-44.
- Hewitson, J. P., Harcus, Y. M., Curwen, R. S., Dowle, A. A., Atmadja, A. K., Ashton, P. D., ... & Maizels, R. M. (2008). The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory–secretory products. *Molecular and biochemical parasitology*, 160(1), 8-21.
- Holzmüller, P., Geiger, A., Nzoumbou-Boko, R., Pissarra, J., Hamrouni, S., Rodrigues, V., ... & Bras-Gonçalves, R. (2018). Trypanosomatid infections: How do parasites and their excreted–secreted factors modulate the inducible metabolism of l-Arginine in macrophages? *Frontiers in Immunology*, 9, 778.
- Ilari, S., Dagostino, C., Malafoglia, V., Lauro, F., Giancotti, LA, Spila, A., ... & Muscoli, C. (2020). Efecto protector de los antioxidantes en la interacción óxido nítrico/COX-2 durante el dolor inflamatorio: el papel de la nitración. *Antioxidantes*, 9 (12), 1284.
- Kahl, J., Brattig, N., & Liebau, E. (2018). The untapped pharmacopeic potential of helminths. *Trends in parasitology*, 34(10), 828-842.

- Lat, E. (2020). Tremátodos: características, especies, contagio, síntomas.
- Lina, W. W., Chen, B. C., Hsu, Y. W., Lee, C. M., & Shyue, S. K. (1999). Modulation of inducible nitric oxide synthase induction by prostaglandin E2 in macrophages: distinct susceptibility in murine J774 and RAW 264.7 macrophages. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 58(2-4), 87-101.
- Martínez-Saucedo, D., Ruíz-Rosado, J. D. D., Terrazas, C., Callejas, B. E., Satoskar, A. R., Partida-Sánchez, S., & Terrazas, L. I. (2019). *Taenia crassiceps*-excreted/secreted products induce a defined microRNA profile that modulates inflammatory properties of macrophages. *Journal of immunology research*, 2019.
- Mily, A., Kalsum, S., Loreti, M. G., Rekha, R. S., Muvva, J. R., Lourda, M., & Brighenti, S. (2020). Polarization of M1 and M2 human monocyte-derived cells and analysis with flow cytometry upon Mycobacterium tuberculosis infection. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (163), e61807.
- Moon, S. M., Lee, S. A., Hong, J. H., Kim, J. S., Kim, D. K., & Kim, C. S. (2018). Oleamide suppresses inflammatory responses in LPS-induced RAW264. 7 murine macrophages and alleviates paw edema in a carrageenan-induced inflammatory rat model. *International immunopharmacology*, 56, 179-185.
- Morais, A. M., Varella, A. M. B., Fernandes, B. M., & Malta, J. C. D. O. (2011). Clinostomum Marginatum (Braun, 1899) and Austrodiplostomum Compactum (Lutz, 1928) Metacercariae with Zoonotic potential of Pygocentrus Nattereri (Kner, 1858)(Characiformes: Serrasalminidae) from Central Amazon, Brazil.
- Morimoto, M., Azuma, N., Kadowaki, H., Abe, T., & Suto, Y. (2016). Regulation of type 2 diabetes by helminth-induced Th2 immune response. *Journal of Veterinary Medical Science*, 16-0183.
- Mosqueda-Cabrera, M. Á., Labastida-Valerio, J. Á., Sotelo-Viveros, A. M., Becerra-García, R. E., & Jiménez-García, M. I. (2019). Helmintos del pez anual *Millerichthys robustus* (Teleostei: Rivulidae), una especie endémica de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90.
- Oishi, Y., & Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International immunology*, 30(11), 511-528.
- Park, C. W., Kim, J. S., Joo, H. S., & Kim, J. (2009). A human case of *Clinostomum complanatum* infection in Korea. *The Korean journal of parasitology*, 47(4), 401.
- Parker, G. A., Chubb, J. C., Ball, M. A., & Roberts, G. N. (2003). Evolution of complex life cycles in helminth parasites. *Nature*, 425(6957), 480-484.
- Pérez, S., & Rius-Pérez, S. (2022). Macrophage polarization and reprogramming in acute inflammation: a redox perspective. *Antioxidants*, 11(7), 1394.
- Prat, H., Araos, P., & Michea, L. (2021). La inflamación en la hipertensión arterial, mecanismos de producción e implicancias terapéuticas. *Revista médica de Chile*, 149(2), 255-262.
- Rajamanickam, A., Munisankar, S., Dolla, C., Menon, P. A., Thiruvengadam, K., Nutman, T. B., & Babu, S. (2020).
- Ren, J., Su, D., Li, L., Cai, H., Zhang, M., Zhai, J., ... & Hu, K. (2020). Anti-inflammatory effects of Aureusidin in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages via suppressing NF-κB and activating ROS-and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 387, 114846.
- Rooney, J., Northcote, H. M., Williams, T. L., Cortés, A., Cantacessi, C., & Morpew, R. M. (2022). Parasitic helminths and the host microbiome—a missing ‘extracellular vesicle-sized’ link?. *Trends in Parasitology*.
- Ross, E. A., Devitt, A., & Johnson, J. R. (2021). Macrophages: the good, the bad, and the gluttony. *Frontiers in immunology*, 12, 708186.
- Rosser, T. G., Baumgartner, W. A., Alberson, N. R., Noto, T. W., Woodyard, E. T., Tommy King, D., ... & Griffin, M. J. (2018). *Clinostomum poteae* n. sp.(Digenea: Clinostomidae), in the trachea of a double-crested cormorant *Phalacrocorax auritus* Lesson, 1831 and molecular data linking the life-cycle stages of *Clinostomum album* Rosser, Alberson, Woodyard, Cunningham, Pote & Griffin, 2017 in Mississippi, USA. *Systematic Parasitology*, 95, 543-566.
- Ryan, S., Shiels, J., Taggart, C. C., Dalton, J. P., & Weldon, S. (2020). *Fasciola hepatica*-derived molecules as regulators of the host immune response. *Frontiers in immunology*, 11, 2182.
- Secretaría de agricultura y desarrollo rural. (2020). La importancia de la pesca en México y en la alimentación.
- Shi, W., Xu, N., Wang, X., Vallée, I., Liu, M., & Liu, X. (2022). Helminth therapy for immune-mediated inflammatory diseases: current and future perspectives. *Journal of Inflammation Research*, 475-491.
- Solís-Suárez, D. L., Pérez-Martínez, I. O., & García-Hernández, A. L. (2020). Mecanismos inflamatorios en la destrucción periodontal. *Revista Odontológica Mexicana*, 23(3), 159-172.
- Tansey, M. G., Wallings, R. L., Houser, M. C., Herrick, M. K., Keating, C. E., & Joers, V. (2022). Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Immunology*, 22(11), 657-673.
- Tavares-Dias, M., Silva, L. M. A., & Florentino, A. C. (2023). Metacercariae of *Clinostomum Leidy*, 1856 (Digenea: Clinostomidae) infecting freshwater fishes throughout Brazil: infection patterns, parasite–host interactions, and geographic distribution. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 58(1), 116-129.
- Wang, J., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2020). The relationship between gut microbiota and inflammatory diseases: the role of macrophages. *Frontiers in microbiology*, 11, 1065.

Wang, Z., Hao, C., Zhuang, Q., Zhan, B., Sun, X., Huang, J., ... & Zhu, X. (2020). Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms attenuated DSS-induced colitis in mice by driving PD-1-mediated M2 macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, *11*, 563784.

Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., & Budinger, G. S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of clinical investigation*, *129*(7), 2619-2628.