



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
Ciencias e Ingeniería

“Evaluación del efecto del antígeno de cisticerco de *Taenia solium* en la polarización de la línea celular de macrófagos Raw 264.7”

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

AUTOR

Ana Claudia Palacios Ochoa

ASESOR

Manuela Renee Verastegui Pimentel

CO-ASESOR

Guillermo Cesar Fernandez

LIMA-PERÚ
2026

JURADO CALIFICADOR

Presidenta: Dra. Monica Jehnny Pajuelo Travezaño

Secretaria: Dra. Nancy Chile Andrade

Vocal: Dr. Holger Maita Malpartida

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	Palacios Ochoa Ana Claudia

(Agregar filas adicionales si hay más autores)

Pertenecientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **"Evaluación del efecto del antígeno de cisticerco de *Taenia solium* en la polarización de la línea celular de macrófagos Raw 264.7"** el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	Verastegui Pimentel Manuela Renee	FACI	ASESORA
2.	Cesar Fernandez Guillermo	FACI	CO-ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **12%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3637545502**; fecha de entrega: **31/08/2026**)
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 01 de septiembre de 2026**



Firma del asesor
Nº DNI: 08604175
ORCID: 0000-0002-7500-1353



Firma del Co-asesor
Nº DNI: 005748316,
ORCID: 0000-0002-3582-9877

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Neurocisticercosis.....	3
1.1.1. Definición de la Neurocisticercosis y ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	3
1.1.2. La Neurocisticercosis y su impacto en la salud	3
1.2. Polarización de los macrófagos	4
1.2.1. Polarización de macrófagos en infecciones parasitarias.....	5
1.3. Respuesta inmune en Neurocisticercosis.....	7
1.3.1. Polarización de macrófagos en NCC.....	8
II. Planteamiento del problema	9
III. Justificación de la investigación	11
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
V. HIPÓTESIS.....	12
VI. OBJETIVO GENERAL	12
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	13
8.1. Tipo de estudio	13
8.2. Información de Bioseguridad	13
8.2.1. Agente biológico	13
8.2.2. Lugar donde se realizaron los procedimientos	13
8.2.3. Equipo de Protección Personal (EPP)	13
8.2.4. Descontaminación, desinfección y esterilización.....	13
8.3. Obtención de los antígenos del cisticerco de <i>T. solium</i>	13
8.4. Concentración y cuantificación de los antígenos	14

8.5.	Cultivo celular de la línea celular RAW 264.7	14
8.6.	Tratamiento de la línea celular RAW 264.7 con los antígenos y posteriores ensayos.....	15
8.7.	Cuantificación de la expresión de iNOS (M1) y Arg-I en células RAW 264.7 incubadas con diferentes concentraciones de antígeno total y ES de cisticerco de <i>T. solium</i>	15
8.7.1.	Ensayo de Western-blot	15
8.7.2.	Ensayo de Inmunofluorescencia.....	16
8.8.	Evaluación de la capacidad de los antígenos de cisticercos de <i>T. solium</i> para inhibir el incremento en iNOS inducido por LPS en células RAW 264.7.	18
8.8.1.	Ensayo de Western-Blot	18
8.9.	Obtención y cuantificación de datos.....	20
8.10.	Análisis estadístico	21
IX.	RESULTADOS.....	21
9.1.	El antígeno ES aumenta la expresión del marcador proinflamatorio iNOS en macrófagos.....	21
9.2.	Evaluación de la intensidad de expresión de iNOS.....	23
9.3.	Evaluación de la expresión de Arg-I.....	26
9.4.	Evaluación de la capacidad del Ag total de inhibir el fenotipo M1 generado por la incubación de células RAW 264.7 con LPS.	28
X.	DISCUSIÓN.....	30
XI.	LIMITACIONES	33
XII.	CONCLUSIONES.....	34
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS.....	40

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una infección que afecta al sistema nervioso central (SNC) y es causada por el estadio larval del parásito helminto *Taenia solium*. En la NCC se ha encontrado una asociación entre el grado de respuesta inmune y la sintomatología presentada, que podría estar relacionada a la modulación del sistema inmune por los parásitos helmintos. Los macrófagos son una de las células involucradas en una primera respuesta inmune en infecciones parasitarias y su polarización ha sido estudiada en diferentes parásitos. Sin embargo, el estudio de su participación en la infección por *T. solium* ha sido poco explorado. Por esta razón, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del antígeno total (AgT) y excretorio-secretorio (ES) de cisticerco de *T. solium* en marcadores de polarización de la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Se evaluó la expresión de las proteínas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y Arg-I mediante Western-blot e inmunofluorescencia en cultivos de macrófagos expuestos a diferentes concentraciones de los antígenos. Se encontró que el antígeno ES induce una mayor expresión tanto del marcador proinflamatorio iNOS, como así también del marcador antiinflamatorio Arg-I comparado con el control. Asimismo, se encontró que el antígeno total no redujo la expresión de iNOS inducida por LPS. En conclusión, los resultados de este estudio proveen nuevos alcances sobre la respuesta inmune de los macrófagos frente a los antígenos del cisticerco de *T. solium*.

Palabras clave: neurocisticercosis, *Taenia solium*, macrófagos, sistema inmunológico, polarización

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is an infection that affects the central nervous system (CNS) and is caused by the larval stage of the helminth parasite *Taenia solium*. In NCC, an association has been found between the degree of immune response and the symptoms presented, which could be related to the modulation of the immune system by helminth parasites. Macrophages are one of the cells that carry out the initial immune response in parasitic infections, and their polarization has been studied in different parasites; however, there are few studies on *T. solium*. Therefore, this study aims to evaluate the effect of the total (AgT) and excretory-secretory (ES) antigen of *T. solium* cysticerci on the polarization of the RAW 264.7 macrophage cell line. The expression of the iNOS and Arg-I markers was evaluated by Western-blot and immunofluorescence in macrophage cultures with different concentrations of the antigens. It was found that ES antigen induces greater expression of both the proinflammatory marker iNOS and the anti-inflammatory marker Arg-I compared to the control. Likewise, it was found that the total antigen does not reduce the expression of iNOS in macrophages exposed to LPS. In conclusion, the results of this study provide new insights into the immune response of macrophages to *T. solium* cysticerci antigens.

Keywords: Neurocysticercosis, *Taenia solium*, macrophages, Immune system, polarization

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Neurocisticercosis

1.1.1. Definición de la Neurocisticercosis y ciclo de vida de *Taenia solium*

La Neurocisticercosis es una infección que afecta al Sistema Nervioso Central (SNC) y es causada por el estadio larval del parásito helminto *Taenia solium* (1). El ciclo de vida del parásito incluye un hospedero intermediario, el cerdo; y el definitivo, el humano (1–3). En áreas endémicas que cuentan con sanidad inadecuada, los cerdos pueden estar en contacto con heces que contienen huevos de *T. solium* de humanos infectados (2,3). Si los cerdos consumen las heces, el embrión es liberado y activado por los jugos gástricos del hospedero, y es capaz de adherirse a la mucosa intestinal, atravesarla e ingresar al torrente sanguíneo (3). Una vez en circulación, las oncosferas se establecen en diferentes tejidos del cerdo y se desarrollan en cisticerco (estadio larval) (3). El ser humano al ingerir carne de cerdo infectado, aloja al parásito en su sistema digestivo, donde se desarrolla hasta la etapa de adultez. Eventualmente, los huevos del parásito pueden ser expulsados en las heces y se repite el ciclo (2,3). Sin embargo, el ser humano también puede ser el hospedero intermediario cuando, accidentalmente, ingiere huevos del parásito por la vía fecal-oral de portadores de tenias (1,2). Al igual que en el cerdo, las oncosferas invaden el torrente sanguíneo y llegan a diferentes tejidos del cuerpo donde maduran a cisticercos. Cuando el cisticerco se sitúa en el SNC, se conoce a la patología como neurocisticercosis (1). En el tejido del parénquima cerebral, los cisticercos o quistes pueden pasar por los siguientes estados de viabilidad: fase vesicular, que se caracteriza por la presencia de quistes viables; fase coloidal, caracterizado por inflamación alrededor del quiste; fase nódulo granular, hay presencia de tejido fibrótico y ruptura de la pared del quiste; y fase de calcificación, que se caracteriza por la entrada de calcio sobre el tejido fibrótico del parásito (4).

1.1.2. La Neurocisticercosis y su impacto en la salud

La Neurocisticercosis (NCC) es considerada una infección endémica en la mayoría de los países de Latinoamérica, África Subsahariana y el suroeste de Asia (1–3). Se ha reportado que la NCC es la principal causa de epilepsia adquirida en

regiones endémicas. En estas regiones cerca del 70-75 % de pacientes con NCC presentan convulsiones (1–3). Otras manifestaciones clínicas incluyen dolores de cabeza, hipertensión intracraneal, alteraciones cognitivas y psiquiátricas (1-3). En el Perú, la NCC es la parasitosis más frecuente que afecta el SNC, además es una enfermedad endémica que incluye toda la sierra, la costa norte y la selva alta (4,5). En promedio, entre el 0.5% y 1 % de los pobladores de zonas endémicas del Perú presentan teniasis (6). Sin embargo, no se tienen datos sobre la prevalencia de NCC en el Perú (7). Por otro lado, se ha reportado que entre el 30-50% de los pacientes que tienen NCC presentan epilepsia, sin embargo, se debe tener en cuenta que muchas personas no son diagnosticadas por la falta de disponibilidad de técnicas de imágenes en diferentes regiones del país (4,7). Asimismo, muchas de las personas no reciben el tratamiento adecuado, lo que hace de la NCC una enfermedad desatendida en el Perú (7).

1.2. Polarización de los macrófagos

Los macrófagos son componentes centrales del sistema inmune innato, que participan en diferentes procesos como el mantenimiento de la homeostasis tisular, la regulación de la respuesta inflamatoria, así como la reparación de tejidos mediante la polarización (8). La polarización de los macrófagos se conoce al proceso por el cual estas células tienen la capacidad de adquirir distintos fenotipos y funciones mediante la exposición a señales microambientales (8,9). Cuando ocurre daño en los tejidos, los macrófagos reciben ciertas señales que pueden ser citoquinas, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y residuos de células necróticas que modulan la polarización de los macrófagos en el tiempo y en el espacio (8). Esta capacidad les permite a los macrófagos regular la respuesta inflamatoria y el reparo del daño del tejido mediante la liberación de citoquinas, proteasas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y quimioquinas (8). Este proceso es bien regulado por diversas vías de señalización que incluyen receptores de tipo Toll (TLRs), JAK/STAT, TGF- β /Smad, etc (8). Tradicionalmente, se ha categorizado la polarización de los macrófagos en un fenotipo M1 o proinflamatorio y M2 o antiinflamatorio, que simula el balance de la respuesta inmune Th1/Th2 (9–13). La polarización a un fenotipo proinflamatorio o M1 es inducida típicamente por la estimulación con lipopolisacáridos (LPS), citoquinas de la respuesta Th1 e IFN- γ

(9–13). Estos se caracterizan por la expresión de ROS, óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-12, que contribuye a la eliminación del patógeno (8). Mientras que la polarización a un fenotipo M2 son activados, principalmente, por citoquinas como la IL-4 e IL-13 que promueven la expresión de arginasa-1 (Arg-I) e IL-10 que tienen funciones antiinflamatorias como la reparación de tejidos, angiogénesis e inmunoregulación (8).

Las vías moleculares que participan en la polarización de los macrófagos tienen la función de mantener el balance entre el fenotipo M1 proinflamatorio y el M2 antiinflamatorio (8). En el caso del fenotipo M1, los PAMPs pueden activar la vía dependiente de MyD88 mediante los TLRs, que van a activar NF- κ B y, por consiguiente, la expresión de citoquinas proinflamatorias (8). También, el IFN- γ activa el fenotipo M1 al unirse a los receptores IFNGR que activan la vía JAK/STAT1 que promueve la expresión de moléculas como iNOS y ROS (8). En el caso del fenotipo M2, iniciado por las citoquinas IL-4 e IL-13, se activa la vía de señalización STAT6 que induce la expresión de genes antiinflamatorios como Arg-1 (8).

Tanto iNOS como Arg-I compiten por un mismo sustrato, L-arginina, sin embargo, a comparación de iNOS que produce óxido nítrico, Arg-I produce ornitina (14). En resumen, los macrófagos M1 cumplen una función importante en la eliminación de los patógenos, por su alta capacidad fagocítica e inflamatoria. En cambio, los macrófagos M2 tienen una función de reparación de tejidos y de supresión de la respuesta inflamatoria (9–12).

1.2.1. Polarización de macrófagos en infecciones parasitarias

Se denomina inflamación a la respuesta fisiológica frente a una infección. Los macrófagos cumplen diversas funciones en dicha respuesta. Frente a la exposición a patógenos, los macrófagos desencadenan la respuesta inflamatoria, que inicia por vías de señalización activadas por receptores de citoquinas y TLRs. Luego de su activación, los macrófagos producen citoquinas proinflamatorias y migran al lugar de infección para la eliminación del patógeno. Posteriormente, los macrófagos regulan la inflamación para mantener la homeostasis y evitar el daño al tejido (7). En infecciones parasitarias, conocer sobre la polarización de los

macrófagos nos permite entender la respuesta inmune del hospedero, así como, la posible modulación de dicha respuesta por los parásitos. Se ha reportado que muchos parásitos tienen la habilidad de modular el sistema inmune del hospedero y, de este modo, favorecer su supervivencia dentro de este. Por ejemplo, *Leishmania* es un parásito intracelular que invade a los macrófagos (9). La polarización de los macrófagos infectados con *Leishmania* hacia un fenotipo M1 produce la eliminación del parásito; por el contrario, el fenotipo M2 causa la supervivencia de este (9). Los helmintos también tienen la capacidad de modular el sistema inmune y lo hacen mediante la liberación de diversas moléculas, conocidas como producto excretor-secretor (ES), que incluyen también vesículas extracelulares (VE), que son excretadas a través del tegumento del parásito (15,16). Se ha reportado que las proteínas y glicanos secretados por los helmintos tienen la capacidad de modificar la polarización de los macrófagos (17). En *Fasciola hepatica* se ha encontrado que, durante la invasión del parásito, los macrófagos bloquean la producción de citoquinas proinflamatorias (17). En este parásito se han reportado diversas moléculas que podrían modular la respuesta del sistema inmune del hospedero, como la proteína del ES Fh12 que induce la activación a un fenotipo M2 en macrófagos, bloquea su activación inducida por LPS, y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias en un modelo de shock séptico en ratones (15,18–20). Además, la proteína de defensa de *F. hepatica*, FhHDM-1, internalizada por los macrófagos, impide el procesamiento del antígeno, la activación del inflammasoma NLRP3 y la secreción de la IL-1 β en los macrófagos (18). Asimismo, las vesículas extracelulares del parásito *Heligmosomoides polygyrus*, tienen como efecto suprimir la polarización de los macrófagos tanto a M1 como a M2, cuando se les trata previamente tanto con LPS como con IL-4 e IL-13, respectivamente (18,21). Otros estudios han demostrado la capacidad antiinflamatoria de las moléculas liberadas por los parásitos, las cuales incluso han sido utilizadas como tratamiento para controlar la inflamación en otras enfermedades. Existen diferentes estudios sobre el efecto del ES de diferentes parásitos en la atenuación de la inflamación en enfermedades inflamatorias intestinales (22). Por ejemplo, el tratamiento con antígeno ES del gusano adulto de *Trichinella spiralis* aumentó la expresión de Arg-I y CD206, marcadores del fenotipo antiinflamatorio M2 en macrófagos y se vio una disminución en la severidad de colitis en ratones (23). Además, también se han

reportado tratamientos contra la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo-1 y lupus eritematoso sistémico (22).

Se ha observado que la respuesta inmune frente a infecciones parasitarias es de tipo Th2 (24), sin embargo, estos pueden causar una respuesta variada que va a depender del parásito, su etapa de desarrollo, así como de las características propias del hospedador. En el caso de los cestodos, clase a la que pertenece *T. solium*, se ha reportado que la administración de ES de *Taenia crassiceps* en ratones causa una polarización a M2 en enfermedades autoinmunes como colitis ulcerativa, diabetes tipo-1 y encefalomielitis (25–29). Por otro lado, en ratones infectados con *T. crassiceps*, se ha visto que inicialmente se desarrolla una respuesta inmune de tipo Th1, que luego cambia a una respuesta de tipo Th2 cuando la infección se vuelve crónica (29).

1.3. Respuesta inmune en Neurocisticercosis

La presentación de los síntomas en los pacientes con NCC es muy variada, incluso es muy común que la mayoría de ellos no presente síntomas (30). Esto va a depender tanto de las características de la infección como la localización de los quistes, número y viabilidad del parásito, así como, de las características del hospedero como la genética, que van a influir en su respuesta inmune (30). Debido a que la mayoría de los pacientes son asintomáticos, se ha propuesto que el parásito, así como otros helmintos, modula el sistema inmune del hospedador al evitar la activación de la respuesta proinflamatoria que podría dañarlo (30). Cuando el parásito empieza a degenerarse o morir, se pierde la capacidad de regular el sistema inmune y, por lo tanto, la respuesta inflamatoria se exagera (5). Esto se relaciona a la baja respuesta inflamatoria encontrada frente a cisticercos viables, en comparación a una respuesta inmune mayor frente a cisticercos degenerados o coloidales (30,31). Sin embargo, hasta el momento hay estudios con resultados heterogéneos sobre la respuesta inmune en NCC. Se ha visto en pacientes asintomáticos que presentan cisticercos calcificados, un perfil de respuesta inmune tipo Th2, con la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-13, IL-4 e IL-5 (32). También hay estudios en tejido cerebral de cerdos y humanos infectados, que muestran por inmunohistoquímica, un infiltrado inflamatorio en distintos grados de lesión y grado de viabilidad del cisticerco

(33,34). En cerdos, aquellos que presentan quistes viables exhiben una respuesta tipo regulatoria, mientras aquellos que tienen quistes degenerados presentan una respuesta tipo Th1, y aquellos con quistes calcificados presentan una respuesta mixta Th1 y Th2 (31). En humanos, se encontró que las células que componen los granulomas, que se relacionan con la degeneración del parásito, exhiben un perfil de citoquinas tanto Th1 como Th2 (35). Por otro lado, en el estudio realizado por *Carmen-Orozco et al* (2021) se reportó tanto la expresión de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , and IL-1) como antiinflamatorias (TGF- β , ARG-1) en tejido adyacente a cisticercos viables en un modelo murino de NCC (36). Por eso, para entender la interacción entre el hospedador y el cisticerco de *T. solium*, así como su modulación del sistema inmune es necesario investigar el efecto que causa el parásito en macrófagos, que son la primera línea de defensa frente a patógenos.

1.3.1. Polarización de macrófagos en NCC

Se ha reportado en diferentes estudios la infiltración de macrófagos en NCC. Restrepo *et al* (1998), reportó el infiltrado de macrófagos en un estado activado entre el cisticerco y el parénquima cerebral en pacientes con NCC (33). Asimismo, en necropsias de pacientes con NCC se encontró que las células involucradas con la inflamación en el SNC son los macrófagos, así como se observó la presencia de citoquinas proinflamatorias (IFN γ , IL6 and IL18) y citoquinas antiinflamatorias (IL10 and TGF- β) (37). También, en un modelo de rata de NCC, se observaron numerosos macrófagos alrededor del cisticerco al comparar cerebros infectados con cerebros no infectados (38). Asimismo, en modelos porcinos de NCC se han descrito la presencia de población de macrófagos en diferentes etapas de la infección (34,39).

En el caso de la polarización de los macrófagos, en el estudio realizado por Villacorta (2024) (40), en el que se evaluó la respuesta inflamatoria de acuerdo con el infiltrado celular y la formación del tejido fibrótico en diferentes tiempos post-infección en un modelo de neurocisticercosis, se encontró la presencia de macrófagos con un fenotipo ameboideo, el cual se relaciona con el fenotipo M1, en una etapa temprana de la infección y a partir de los tres meses post-infección se reporta la presencia de microglías/macrófagos con una morfología hipertrófica/distrófica, característica del fenotipo M2, con presencia de tejido

fibrótico (40). Se ha mencionado la importancia de los macrófagos en la formación de fibrosis, ciertos estudios asocian los macrófagos M1 a la ausencia de tejido fibrótico, mientras que a los macrófagos M2 con la presencia de fibrosis (41). La formación de fibrosis es una de las características de la patología de NCC y está relacionada a la presencia de macrófagos y daño del tejido nervioso en pacientes con NCC (40). Por otro lado, en un modelo murino de NCC se reportó que los macrófagos/microglía encontrados en el cerebro eran macrófagos activados alternativamente (AAM), es decir antiinflamatorios, y que estos podrían haber sido inducidos por señales derivadas de patógeno, diferentes a la vía clásica activada por IL-13 e IL-4, y que estas células tienen un rol protector en el SNC, pues contribuyen a la fibrosis y a la reparación en tejidos dañados (42).

II. Planteamiento del problema

La NCC es una infección parasitaria que afecta al SNC y es causado por el estadio larval del parásito *T. solium*. La NCC es endémica en la mayoría de los países de Latinoamérica, así como África Subsahariana y algunas regiones de Asia (1). Se ha reportado que la NCC es la principal causa de la epilepsia adquirida en las regiones endémicas y que está presente en el 70% de los individuos (1,3,43). A parte de que la NCC es considerada una de las principales causas de la epilepsia, también causa diferentes síntomas neurológicos como dolores de cabeza crónicos, ceguera, hidrocefalia, meningitis, demencia y hasta puede causar la muerte (44). En el Perú, la NCC es la enfermedad parasitaria más frecuente que afecta el SNC, además es una enfermedad endémica que incluye toda la sierra, la costa norte y la selva alta, sin embargo, se presentan casos minoritarios en el resto del país (6,45). De acuerdo con los estudios serológicos y de imágenes en personas con epilepsia en las zonas endémicas, el 30 y 50% de los casos de epilepsia están relacionados con NCC (6).

Cuando una persona se infecta con el estadio larval de *T. solium* o cisticerco, pasan meses o años para que la persona infectada presente los primeros síntomas clínicos y en algunos casos no llegan a desarrollar síntomas, la pregunta es qué hace el parásito para evadir la respuesta inmune del hospedero o si al igual que otros helmintos el parásito secreta antígenos que modulan la respuesta inmune del hospedero (30). Por lo general los síntomas clínicos se asocian al proceso de

degeneración del cisticerco, ya sea por acción de una droga antiparasitaria o por la respuesta inmune del hospedero (5,30,31). Usando un modelo murino de NCC, se ha observado que el parásito viable secreta antígenos que difunden en el tejido que rodea al parásito (46), lo cual nos hace pensar que el antígeno que secreta el parásito estaría modulando la respuesta inmune del hospedero, y cuando el parásito empieza a degenerar perdería esta capacidad de modulación. En la actualidad hay escasos estudios que demuestren como el antígeno del cisticerco estaría modulando la respuesta inmune del hospedero.

Por otro lado, los macrófagos son la primera línea de defensa frente a diferentes infecciones y tienen un rol esencial en la definición de la respuesta inmune frente a diferentes patógenos. Los macrófagos cumplen este rol al reconocer diferentes moléculas de los patógenos como los DAMPs y PAMPs a través de receptores como los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), y estos pueden exhibir funciones tanto patogénicas como protectoras en los diferentes estadios de la infección (7). Una de las características de los macrófagos es su capacidad de adquirir diferentes fenotipos de acuerdo con el microambiente al que estén expuestos, este proceso se conoce como polarización (7). Los macrófagos se pueden polarizar, principalmente, en dos subtipos de fenotipos: “activación clásica” o M1 y “activación alternativa” o M2 (7). La interrogante es si el antígeno ES del cisticerco es capaz de modular la polaridad de los macrófagos. Se ha reportado el rol de los productos derivados de helmintos como los productos del ES en la polarización de los macrófagos (7), como es el caso de *T. crassiceps*, en el que se reportó que el ES redujo la producción de citoquinas proinflamatorias, así como, el aumento de la liberación de IL-10 en macrófagos derivados de la médula ósea (28). A pesar de que los macrófagos son las células predominantes en el infiltrado inmune tanto en la NCC humana como murina, hasta el momento no se conoce sus características funcionales y fenotípicas en la patología de la NCC (42). Así como si el antígeno ES del cisticerco es capaz de modular la polaridad de los macrófagos.

III. Justificación de la investigación

La NCC es la principal infección parasitaria que afecta al SNC y una de las principales causas de epilepsia adquirida en países con ingresos bajos y medios donde la infección es endémica (47). La sintomatología presente en la NCC va a depender de la localización y del número de quistes, la viabilidad del parásito, así como de la respuesta inmune del hospedero (47). La mayoría de los pacientes con NCC son asintomáticos y esto se relaciona con la viabilidad del quiste (47). Los cisticercos viables, pueden regular la inmunidad local, favoreciendo vías antiinflamatorias y reguladoras, para evitar que este sea percibido y eliminado por el sistema inmune (47). Cuando el parásito empieza a degenerarse, por la ruptura de la pared quística y la liberación de antígenos se exagera la respuesta inflamatoria con la activación de microglías, macrófagos y la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , e IL-6 (47). Este proceso se relaciona con la etapa sintomática, en la cual están presentes, las convulsiones, los dolores de cabeza y déficits neurológicos (47). Con el tiempo, las lesiones progresan a la etapa granular-nodular, en la cual el quiste es reemplazado por un granuloma fibrótico. Los síntomas en esta etapa mejoran, sin embargo, las convulsiones persisten (47). Por último, la lesión se calcifica y se vuelve inactiva, pero continúan los síntomas epilépticos (47).

En este contexto, existe un vacío de conocimiento sobre la respuesta inmune del hospedero en la NCC y cómo el parásito modula la respuesta inmune del hospedero para favorecer su supervivencia. Se ha reportado que las características principales encontradas en NCC es el infiltrado de células inmunes alrededor del quiste, principalmente, macrófagos; así como la formación de fibrosis (40). Se ha mencionado la importancia de los macrófagos en la formación de fibrosis. Los estudios asocian los macrófagos M1 a la ausencia de tejido fibrótico, los macrófagos M2 con la presencia de fibrosis, mientras otros estudios mencionan la participación de ambos tipos de fenotipos en el desarrollo de la fibrosis (40). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado la respuesta inmune frente a los diferentes antígenos de *T. solium*, así como, los fenotipos de los macrófagos relacionados a estos.

En la presente investigación se busca evaluar el efecto de los antígenos de *T. solium* en la polarización de los macrófagos a través de marcadores de polarización M1 y M2 en una línea celular murina de macrófagos. A través de este estudio se busca conocer las características y funciones de los macrófagos frente a los antígenos del parásito *T. solium*, lo cual va a permitir comprender la respuesta inmune del hospedero y la patogénesis de la NCC.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de los productos de ES y del antígeno total del cisticerco de *T. solium* en la polarización de la línea celular de macrófagos RAW 264.7?

V. HIPÓTESIS

El antígeno excretorio-secretorio (ES) de *T. solium* aumenta la expresión del marcador antiinflamatorio Arg-1, mientras que el antígeno total aumenta la expresión del marcador proinflamatorio iNOS en la línea celular de macrófagos RAW 264.7

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del antígeno total y ES de cisticerco de *T. solium* en la polarización de la línea celular de macrófagos RAW 264.7 mediante la expresión de marcadores M1 y M2

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cuantificar la expresión de iNOS (M1) y Arg-1 (M2) en células RAW 264.7 incubadas con diferentes concentraciones de antígeno total y ES de cisticercos de *T. solium*

Evaluar la capacidad de los antígenos de cisticercos de *T. solium* para inhibir el incremento en iNOS inducida por LPS en células RAW 264.7.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental. De acuerdo con el tipo de investigación es un estudio *in vitro*, pues se llevará a cabo en condiciones controladas de laboratorio y fuera de un organismo vivo.

8.2. Información de Bioseguridad

8.2.1. Agente biológico

Taenia solium: el cual pertenece al grupo de riesgo 3 (48)

8.2.2. Lugar donde se realizaron los procedimientos

Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. De acuerdo con el grupo de riesgo del agente biológico corresponde un Laboratorio con nivel de bioseguridad 2 porque se trabajaron con antígenos del parásito, los cuales no representan un riesgo de infección activa.

8.2.3. Equipo de Protección Personal (EPP)

Mandil y guantes de nitrilo para las distintas técnicas utilizadas.

8.2.4. Descontaminación, desinfección y esterilización

Uso de alcohol al 70% para la desinfección de la cabina de flujo laminar. Para el descarte de soluciones que contenían células o restos del antígeno se usó hipoclorito de sodio al 1%. La esterilización de los materiales se realizó por calor húmedo y para la validación de este proceso se usó la cinta de autoclavado.

8.3. Obtención de los antígenos del cisticerco de *T. solium*

Los antígenos se obtuvieron del estadio larval cisticerco del parásito *T. solium*, los cuales se extrajeron de los músculos de un cerdo infectado. Los cisticercos fueron donados por el Laboratorio de Investigación de

Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para la obtención del antígeno ES, los cisticercos extraídos en condiciones estériles se cultivaron en el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con 10% de antibióticos (penicilina 1000 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL, gentamicina 1 µg/mL y anfotericina B 20 µg/mL). El medio de cultivo fue recolectado por 6 días cada 24 h, y se reemplazó por uno nuevo. Esta recolección se inició luego de las 18 h de extracción de los cisticercos. Tras cada recolección, el medio fue reemplazado por medio fresco. El medio recolectado se centrifugó a 2500 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante, que contiene las proteínas ES del parásito, se recolectó y almacenó a -80°C hasta su uso. Por otro lado, para la obtención del antígeno total, se homogenizaron mecánicamente los cisticercos que habían sido almacenados con Buffer Fosfato Salino (PBS) suplementado con antibióticos a -80°C. Posteriormente, se sonó en intervalos de 60 segundos por 3 minutos a 33 watts y se centrifugó la muestra a 2500 rpm por 40 min a 4°C (49). El sobrenadante se separó en alícuotas de 20 µl, que se almacenaron a -80°C para ser utilizadas posteriormente.

8.4. Concentración y cuantificación de los antígenos

Los antígenos se concentraron mediante centrifugación a 500 rpm por 40 min a 4°C empleando un filtro Amicon Ultra con límite de exclusión molecular de 3 kDa. Las proteínas retenidas en la membrana fueron colectadas en un volumen 10 veces menor al original para luego ser filtradas en un filtro esterilizante de 0.22 µm y almacenadas a -80°C. Una vez que se iban a utilizar se procedió a cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford.

8.5. Cultivo celular de la línea celular RAW 264.7

RAW 264.7 es una línea celular de macrófagos de origen murino. Como medio de crecimiento se utilizó el Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con bicarbonato de sodio (3.7 g/L) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% antibióticos (penicilina/estreptomicina

10,000 U/mL). Para el crecimiento y mantenimiento de las células se utilizó una estufa de cultivo con temperatura de 37°C y 5% de CO₂. Se realizaron subcultivos de dos a tres veces por semana y se cambió el medio de cultivo cada dos días (50) (ver Anexo 1)

8.6. Tratamiento de la línea celular RAW 264.7 con los antígenos y posteriores ensayos

Los cultivos celulares recibieron el tratamiento correspondiente de acuerdo con los objetivos planteados anteriormente.

8.7. Cuantificación de la expresión de iNOS (M1) y Arg-I en células RAW 264.7 incubadas con diferentes concentraciones de antígeno total y ES de cisticerco de *T. solium*

Para este objetivo, se sembraron 190×10^3 células/pozo en una placa de 24 pozos con el medio de crecimiento correspondiente. A las 24 h del plaqueo, se colocó el tratamiento en el medio de las células con una reducción del SFB al 1%. Se utilizaron tres concentraciones de antígeno ES y total: 10, 20 y 40 µg/mL. Se utilizaron estas concentraciones de acuerdo con los resultados de un estudio no publicado realizado en cultivos neuronales en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Como control positivo proinflamatorio se utilizó LPS (1 µg/mL) y como control negativo se utilizó solo el medio de crecimiento de las células. Luego de 24 h se lisaron las células en frío con el buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas (Pefabloc 1/100, LEUPEPTIN 1/1000 y PEPSTATIN 1/1000). Se cuantificó la concentración proteica de las muestras con el kit BCA y, posteriormente, se almacenaron las muestras a -4 °C para su próximo uso (ver figura 1 y Anexo 2)

8.7.1. Ensayo de Western-blot

Para identificar el marcador de polarización M1 iNOS se utilizó la técnica de Western-Blot.

SDS-PAGE

Se prepararon geles al 10% de concentración. Por pozo se colocaron 20

µg de proteína. Cada muestra se preparó con sample buffer Laemmli y se hirvió por 5 min. En la corrida electroforética se utilizó Buffer de corrida (Tris 250 mM, glicina 1.92 M y SDS 1%). La preparación de los reactivos como el SDS, bis-acrilamida, así como el uso del TEMED y el sample buffer Laemmli se realizaron en una campana de extracción química. En todos los ensayos de Western-blot se sembró la misma muestra estándar la cual sirvió para poder comparar los resultados entre geles. La muestra estándar se obtuvo de la lisis del cultivo de la línea celular RAW 264.7 con LPS (1 µg/mL) por 24 h en una placa Petri de 35 mm.

Blotting

La transferencia se hizo overnight a 25 V constantes a 4°C con buffer Towbin (Tris Base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%). La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se verificó mediante la tinción rojo Ponceau S. El bloqueo se hizo en leche descremada al 5% en TBS tween 0.05% por 1 h a temperatura ambiente (TA). La incubación de todos los anticuerpos se realizó en leche 1% en TBS tween 0.05% por 1 h a 4°C toda la noche. La dilución del anticuerpo primario anti-iNOS (0.613 mg/mL) y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH (1 mg/mL) fue de 1/1000 y la dilución del anticuerpo secundario (anti-Rabbit IgG peroxidasa de 1 mg) fue 1/5000. Para revelar se utilizó 100 µL de 3,3-Diaminobenzidine (DAB), 1 µL H₂O₂ para 10 mL de PBS (Anexo 3).

8.7.2. Ensayo de Inmunofluorescencia

Se cultivaron 50x10³ células/mL de RAW 264.7 por pozo en una placa de 24 pozos, previamente se colocaron los cubreobjetos. Luego de 24 h se añadió el tratamiento en medio con SFB al 1%. Se decidió usar la mayor concentración de cada antígeno (40 µg/mL) debido a los resultados previos obtenidos mediante Western-blot, en el cual no se vio diferencia significativa entre las concentraciones utilizadas. Asimismo, se usó LPS (1 µg/mL) como control positivo y medio de crecimiento como control negativo. El experimento se realizó por duplicado. A las 24 h, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% por 10 min a TA y se lavó 3 veces

con PBS 1X. Se permeabilizó con PBS Triton x-100 al 0.2% por 5 min. El bloqueo se hizo con 1% de BSA y 5% suero de burro en PBS 1X por 1 h a TA. La dilución de los anticuerpos anti-iNOS (0.613 mg/mL) y anti-Arg-I (200 µg/mL) que se utilizó fue de 1/50, con 1% de BSA y 5% de suero de burro en PBS 1X por 1 h a TA. Como anticuerpo secundario se utilizó donkey anti-rabbit 488 (2 mg/mL) con una dilución de 1/400 junto con DAPI diluido 1/1000 en 1% de BSA y 5% de suero de burro en PBS 1X por 1 h a TA. Para el montaje se usó Mowiol. El experimento se realizó tres veces en días diferentes (Anexo 4).

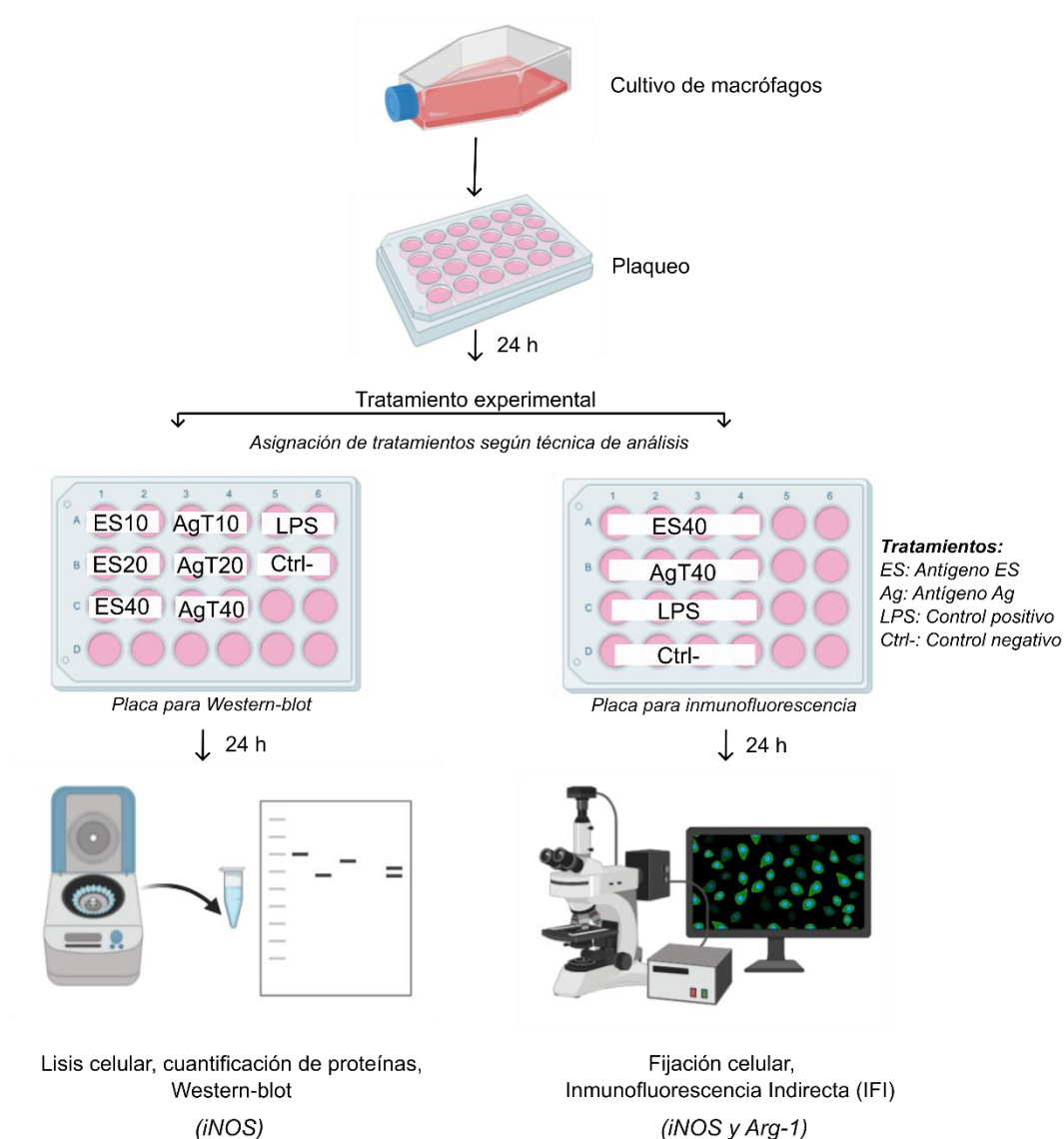


Figura 1. Esquema de la metodología del primer objetivo.

Fuente: modificado de BioRender (<https://www.biorender.com/>)

8.8. Evaluación de la capacidad de los antígenos de cisticercos de *T. solium* para inhibir el incremento en iNOS inducido por LPS en células RAW 264.7.

Para el segundo objetivo, se sembraron 850×10^3 células/pozo (RAW 264.7) en una placa de 6 pozos con medio de crecimiento. En este experimento se realizaron dos incubaciones. La primera a las 24 h del plaqueo en el cual se colocaron los tratamientos a los cultivos en el medio de las células con una reducción del SFB al 1%. Se utilizaron tres concentraciones de antígeno total: 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo proinflamatorio se utilizó LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), como control positivo antiinflamatorio se utilizó DMSO (1%) y como control negativo se usó solo el medio de crecimiento de las células. La segunda incubación se hizo luego de 1 h de la primera incubación, aquí se añadió a cada pozo LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) salvo en el control negativo. Después de 24 h, se lisaron las células en frío con el buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas (Pefabloc 1/100, LEUPEPTIN 1/1000 y PEPSTATIN 1/1000). Se cuantificó la concentración proteica de las muestras con el kit BCA y, posteriormente, se almacenaron las muestras a -4°C para su próximo uso. (Figura 2).

8.8.1. Ensayo de Western-Blot

Para identificar el marcador de polarización M1 iNOS se utilizó la técnica de Western-Blot. Se aplicaron las mismas condiciones de la metodología del primer objetivo. Para el SDS-PAGE se utilizaron geles al 10% de concentración y se colocaron 20 μg de proteína. También se sembró la misma muestra estándar en cada repetición. La transferencia se hizo overnight a 25 V constantes a 4°C con buffer Towbin. La incubación de todos los anticuerpos fue en leche 1% en TBS tween 0.05% por 1h a 4°C toda la noche. La dilución del anticuerpo primario anti-iNOS (0.613 mg/mL) y Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH (1 mg/mL) fue de 1/1000 y la dilución del anticuerpo secundario anti-Rabbit

IGg peroxidasa (1mg/ml) fue 1/5000. Se realizaron 3 repeticiones del experimento en momentos diferentes (figura 2).

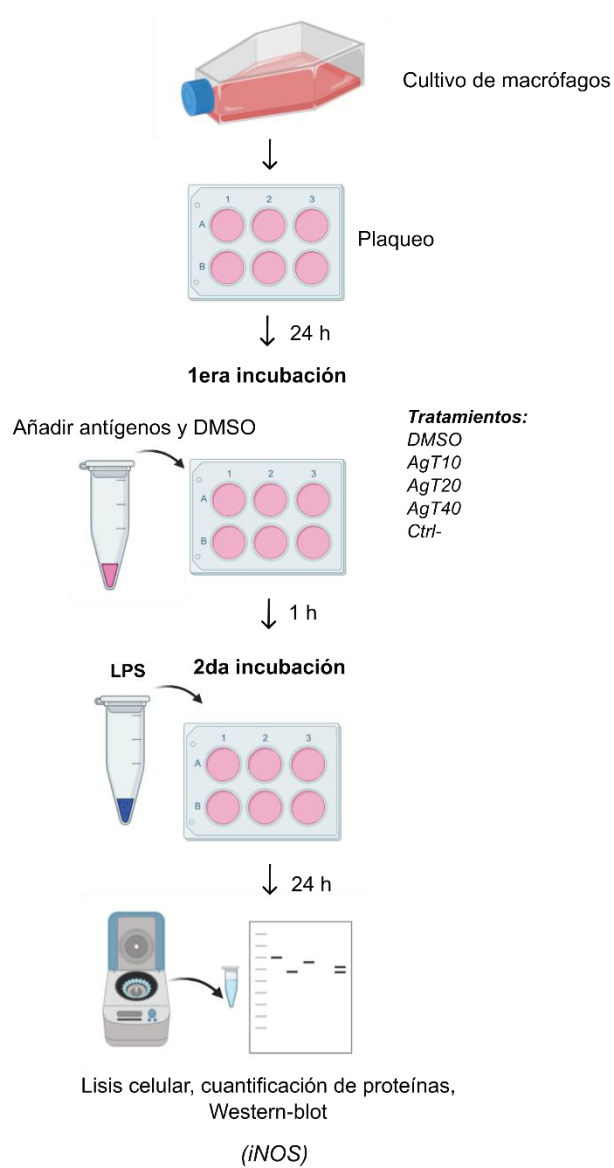


Figura 2. Esquema de metodología del segundo objetivo.

Fuente: BioRad (<https://www.biorender.com/>)

8.9. Obtención y cuantificación de datos

La cuantificación de las imágenes de Western blot se hizo con el software FIJI (54) de acuerdo con el protocolo publicado por Luke Miller (55). Se utilizó el plug-in Gels para obtener el valor numérico de la cantidad de proteína en las bandas. Se cuantificaron la densidad de las bandas de iNOS como de GAPDH. Posteriormente con esos datos se realizaron las cuantificaciones correspondientes. Los valores de iNOS y de GAPDH de cada muestra problema se dividieron entre los valores de las mismas proteínas de la muestra estándar. Posteriormente se dividieron los valores de iNOS entre los valores de GAPDH para cada muestra. Esto con el fin de estandarizar los datos entre geles y poder compararlos.

La adquisición de las imágenes de fluorescencia se realizó en el microscopio Zeiss AxioLab con el objetivo 20X y con la cámara Ac2040. Para calcular la intensidad de la fluorescencia se utilizó el software FIJI (51). En primer lugar, se obtuvo una pila de imágenes (stack) de iNOS o Arg-1 según corresponda. La creación de la pila de imágenes se realizó para poder aplicar el mismo umbral de intensidad a todas las fotos para la cuantificación. Una vez obtenida la pila de imágenes, se sustrajo el background y se aplicó un umbral con el algoritmo “Triangle”. Dicho umbral se definió entre los valores de 48 a 65525 tanto como para iNOS como Arg-I. Posteriormente, se delimitó cada célula mediante la creación de una selección y se cuantificó la densidad integrada bruta (Raw Integrated Density), que es la suma de todos los valores de los píxeles de la región de interés que se seleccionó. Asimismo, se cuantificó la cantidad de células positivas a cada marcador, se utilizó el promedio de la densidad integrada bruta del control negativo más el doble de la desviación estándar como umbral para seleccionar la positividad de la célula. Si la densidad integrada bruta de la célula evaluada era mayor al umbral, la célula se contó como positiva al marcador analizado, de lo contrario como negativa. Es importante mencionar que se analizaron múltiples campos microscópicos para cada condición, que se obtuvieron de dos experimentos independientes.

8.10. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Rstudio (52). Para el primer objetivo, para los experimentos de Western-blot se hicieron 3 repeticiones (3 experimentos distintos). Para evaluar el efecto de los antígenos sobre la expresión de las proteínas de interés, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, pues los datos no cumplían con el supuesto de normalidad (Shapiro Wilk, $W = 0.896$, $p = 0.018$). En caso de efecto significativo del factor, las diferencias entre los tratamientos se evaluaron utilizando la prueba a posteriori Dunn. Por otro lado, para la prueba de inmunofluorescencia se utilizó la prueba Kruskal-Wallis y la prueba de Dunn a posteriori. Asimismo, para comparar los resultados de células positivas al marcador se utilizó la prueba chi-cuadrado dado que las variables eran categóricas y como prueba a posteriori la prueba de comparaciones múltiples por pares. Para el segundo objetivo, en el que se usó la técnica de Western-blot, se aplicó Kruskal Wallis y como prueba a posteriori se usó la prueba de Dunn.

IX. RESULTADOS

9.1. El antígeno ES aumenta la expresión del marcador proinflamatorio iNOS en macrófagos

Se evaluaron diferentes condiciones experimentales (AgT10, AgT20, AgT40, ES10, ES20, ES40, Control y LPS), cada una con tres réplicas independientes ($n = 3$). Se calcularon medidas de tendencia central (media, mediana) y dispersión (desviación estándar e IQR)

El grupo del AgT presentó los valores más bajos de expresión de iNOS (0.0214, 0.0149 y 0.0143) y se observa una ligera disminución a medida que aumenta la concentración del antígeno. Por otro lado, el grupo de ES presentó mayores niveles de expresión de iNOS comparado con el AgT (0.4658, 0.4796 y 0.4836) y se observa una tendencia de aumento a medida que aumenta la concentración del antígeno. Los valores de expresión de iNOS del AgT fueron muy parecidos al control negativo, lo que podría sugerir que el AgT no genera un efecto notable. El control positivo LPS fue el que más estimuló la expresión de iNOS (0.7982) y fue el grupo que presentó mayor variabilidad de los datos (Tabla 1).

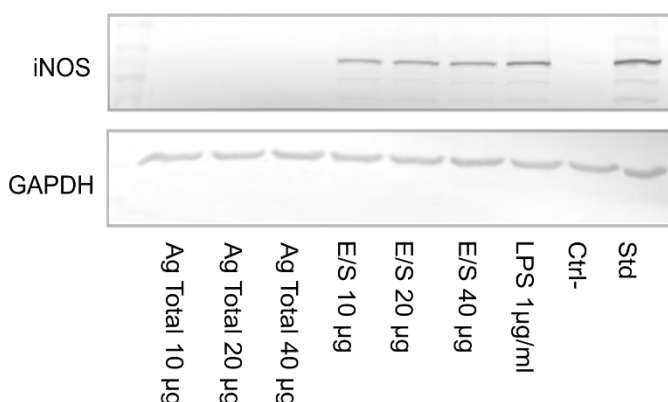
El análisis estadístico mostró un efecto significativo del tratamiento (Kruskal-Wallis, $H = 19.187$, $df = 7$, $p < 0.01$). Sin embargo, la prueba de Dunn con corrección de Holm no evidenció estas diferencias entre los pares de grupos. (Figura 3). A pesar de que no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos evaluados, se puede observar un aumento en la expresión de iNOS en los tratamientos con ES y LPS.

Tabla 1. Estadística descriptiva de la expresión de iNOS frente a los diferentes tratamientos mediante Western-blot

Condición	n	Media	SD	Mediana	IQR	Q1	Q3
AgT10	3	0.0214	0.0242	0.0102	0.0221	0.00755	0.0297
AgT20	3	0.0149	0.0117	0.0164	0.0117	0.00947	0.0211
AgT40	3	0.0143	0.0057	0.0153	0.0056	0.0118	0.0174
ES10	3	0.4658	0.1196	0.4156	0.1114	0.398	0.509
ES20	3	0.4796	0.1361	0.4604	0.1351	0.407	0.542
ES40	3	0.4836	0.0983	0.4795	0.0982	0.433	0.532
Control	3	0.0207	0.0093	0.0195	0.0092	0.0158	0.0250
LPS	3	0.7982	0.2359	0.7031	0.2211	0.664	0.885

Nota. Para cada condición se hicieron 3 replicados. SD significa desviación estándar

A



B

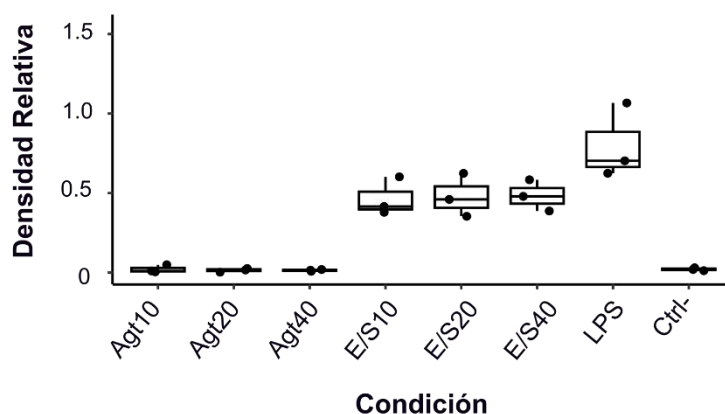


Figura 3. Patrón de expresión de la proteína iNOS en las células RAW 264.7 expuestas a diferentes concentraciones del antígeno total y E/S de *T. solium*.

(A) Análisis de Western blot. Para control negativo se trató a las células solo con medio de crecimiento. Como control positivo, las células fueron tratadas con LPS (1 µg/mL). Se utilizó GAPDH como control de carga. Imagen representativa de un total de 3 experimentos. (B) Análisis de la densidad relativa de iNOS. Los datos se normalizaron con relación a la intensidad de la proteína GAPDH. No se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos.

9.2. Evaluación de la intensidad de expresión de iNOS

También se evaluó la expresión del marcador proinflamatorio iNOS mediante inmunofluorescencia, en la cual se utilizó la mayor concentración de antígeno total y ES (40 µg/mL).

De acuerdo con la estadística descriptiva, el AgT presentó los valores más bajos de expresión de iNOS (89705.8633). Por otro lado, el grupo de ES presentó el mayor nivel de expresión de iNOS comparado con el AgT (162902.625). El nivel de expresión de iNOS del AgT fue muy parecido al control negativo, lo que podría sugerir que el AgT no genera un efecto notable. El control positivo LPS fue el que más estimuló la expresión de iNOS (574981.585) y fue el grupo que presentó mayor variabilidad de los datos (Tabla 2).

Se evaluó la intensidad de fluorescencia de iNOS; así como, la cantidad de células positivas a iNOS. En cuanto al análisis de la intensidad de fluorescencia se observó un efecto significativo del tratamiento (Kruskal Wallis: $H = 914.6$, $df = 3$, $p \leq 0.0001$) (Figura 4).

La intensidad de iNOS fue significativamente mayor en los tratamientos con ES comparado con el control, ES40 vs control (Test de Dunn: $p < 0.0001$). Asimismo, la expresión de iNOS fue significativamente mayor en el tratamiento con AgT comparado con el control, Ag40 vs control (Test de Dunn: $p < 0.0001$). Sin embargo, la expresión de iNOS en el ES fue significativamente mayor comparado con el AgT (Test de Dunn: $p < 0.0001$) (Figura 4).

Por otro lado, en cuanto al análisis de la cantidad de células positivas a iNOS se observó un efecto significativo del tratamiento (Test Chi-cuadrado: $\chi^2 = 477.14$, $df = 3$, $p < 0.0001$). La cantidad de células +iNOS fue significativamente mayor

en el tratamiento con ES comparado con el control, 41 vs 28 células, respectivamente (Test Pairwise Nominal Independence: $p < 0.05$). Se encontraron diferencias significativas entre el AgT y el control negativo, 7 vs 28, respectivamente (Test Pairwise Nominal Independence: $p < 0.001$). La cantidad de células +iNOS fue significativamente mayor en los tratamientos con ES comparado con el AgT, 41 vs 7 células, respectivamente (Test Pairwise Nominal Independence: $p < 0.0001$). El tratamiento con LPS obtuvo la mayor cantidad de células +iNOS (235 células), que fue significativamente mayor comparado con el AgT, Ctrl y ES (Test Pairwise Nominal Independence: $p < 0.0001$) (Tabla 3)

Tabla 2. Estadística descriptiva de la intensidad de fluorescencia de iNOS frente a los diferentes tratamientos mediante inmunofluorescencia

Condición	n	Media	SD	Mediana	IQR	Q1	Q3
AgT	600	89705.8633	85507.2283	52687	97148.3	29364	126512
ES	533	162902.625	302505.843	81917	117753	51470	169223
Control	600	82868.2417	149085.132	32933	26576.3	24612	51188
LPS	600	574981.585	997325.294	293394	381576	152104	533679

Nota. SD significa desviación estándar. Se utilizó 40 µg/ml de E/S y de antígeno total

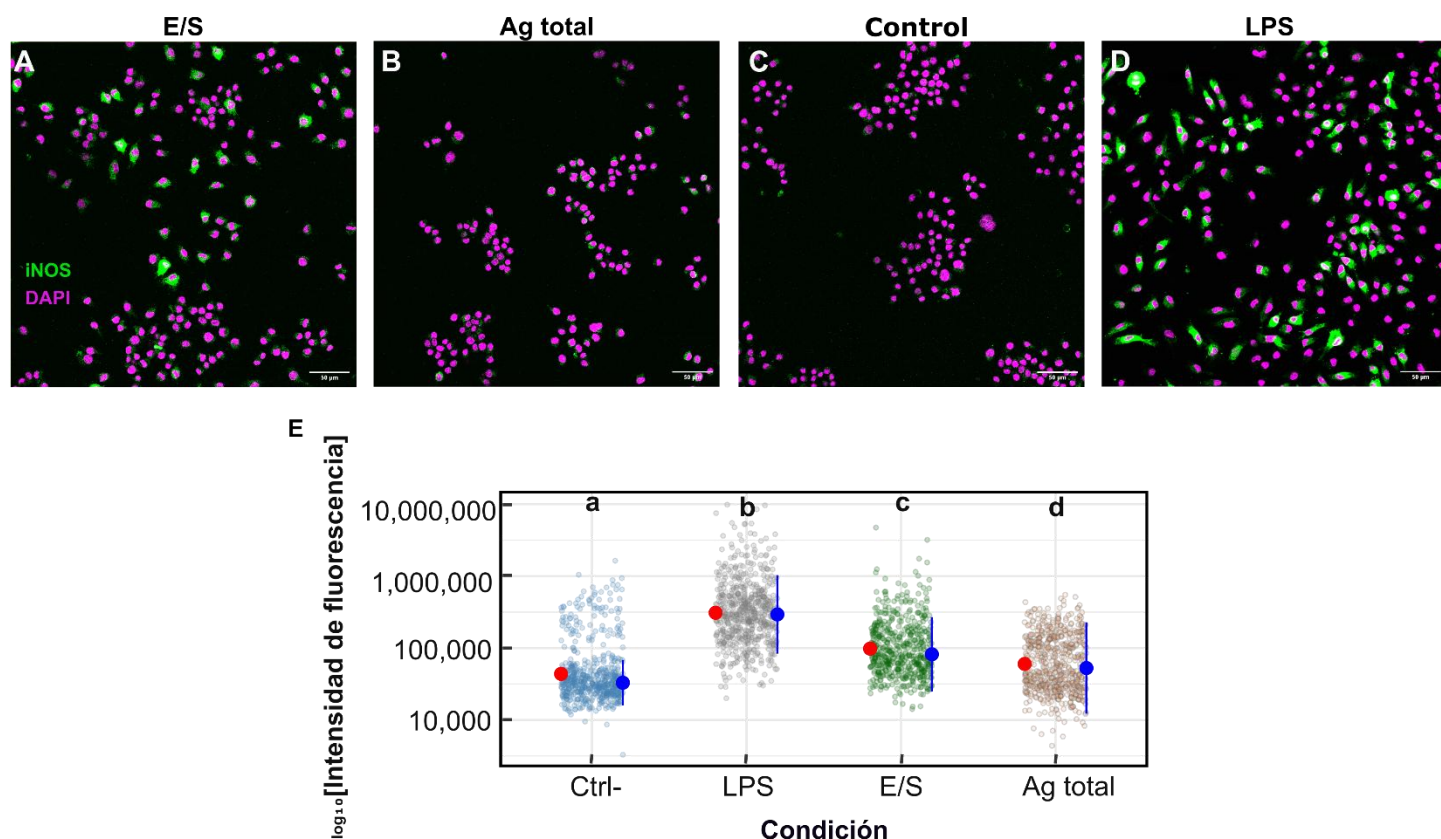


Figura 4. Expresión de iNOS observada por microscopía confocal.

Células RAW 264.7 tratadas con: (A) ES 40 μg/mL, (B) antígeno total 40 μg/mL, (C) Control y (D) LPS 1 μg/mL. Barra de escala = 50 μm. (E) Intensidad de fluorescencia en base a los datos: Intensidad Integrada Bruta. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p \leq 0.0001$). Los puntos rojos hacen referencia a la media, mientras que los puntos azules a la mediana y las líneas azules al rango intercuartílico.

Tabla 3. Distribución de células +iNOS según la condición experimental

	Reactividad a iNOS				Total	chi2 (p-valor)
	Positivas		Negativas			
	Número de conteo	%	Número de con- teo	%		
Control	28	4.67	572	95.33	600	477.14 (<0.0001)
LPS	235	39.2	365	60.83	600	
ES	41	7.69	492	92.31	533	

9.3. Evaluación de la expresión de Arg-I

Para conocer la respuesta inmune de los macrófagos frente a los antígenos del cisticerco de *T. solium*, también se evaluó la expresión del marcador antiinflamatorio Arg-I mediante inmunofluorescencia; así como, la cantidad de células positivas a Arg-I (+Arg-I).

De acuerdo con la estadística descriptiva, el AgT presentó los valores más bajos de expresión de Arg-I (302905.0568). Por otro lado, el grupo de ES presentó el mayor nivel de expresión de Arg-I comparado con el AgT (422890.3946). El nivel de expresión de Arg-I del AgT fue muy parecido al control negativo, lo que podría sugerir que el AgT no genera un efecto notable. El LPS fue el que más estimuló la expresión de Arg-I (555392.8378) y fue el grupo que presentó mayor variabilidad de los datos (Tabla 4).

El análisis estadístico mostró un efecto significativo del tratamiento (Kruskal Wallis: $H = 81.491$, $df = 3$, $p < 0.0001$). El tratamiento con el antígeno ES fue significativamente mayor que el control, ES40 vs control (Test de Dunn: $p < 0.001$). El tratamiento con AgT no mostró diferencias significativas con el control (Test de Dunn, $p = 0.7211$). Por otro lado, el tratamiento con LPS obtuvo la mayor intensidad de fluorescencia y fue significativamente mayor frente a los otros grupos, a pesar de que el LPS se utilizó como control positivo para el fenotipo M1 (Test de Dunn: $p < 0.001$) (Tabla 4 y Figura 5).

Al evaluar la cantidad de células +Arg-I se observó un efecto significativo del tratamiento (Test Chi-cuadrado: $\chi^2 = 84.38$, $df = 3$, $p < 0.0001$). La cantidad de células +Arg-I fue significativamente mayor con el tratamiento ES comparado con el control (57 vs 24, Test Pairwise Nominal Independence: $p < 0.001$). El tratamiento con AgT no mostró diferencias significativas con el control (Test Pairwise Nominal Independence, $p = 0.139$). Por otro lado, el tratamiento con LPS obtuvo la mayor cantidad de células +Arg-I y fue significativamente mayor frente al AgT, control y ES (Test Pairwise Nominal Independence: $p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p < 0.01$, respectivamente) (Tabla 5).

Tabla 4. Estadística descriptiva de la intensidad de fluorescencia de Arg-I frente a los diferentes tratamientos

Condición	n	Media	SD	Mediana	IQR	Q1	Q3
AgT	370	302905.0568	268757.7641	180102	303803	130875	434678
ES	370	422890.3946	392459.569	245147	516322.2	153728	670050
Control	370	301914.2027	279649.0424	202279	200908.5	130021	330929
LPS	370	555392.8378	490782.8467	371728.5	658032.5	176948	834980

Nota. SD significa desviación estándar. Se utilizó 40 µg/ml de E/S y de antígeno total

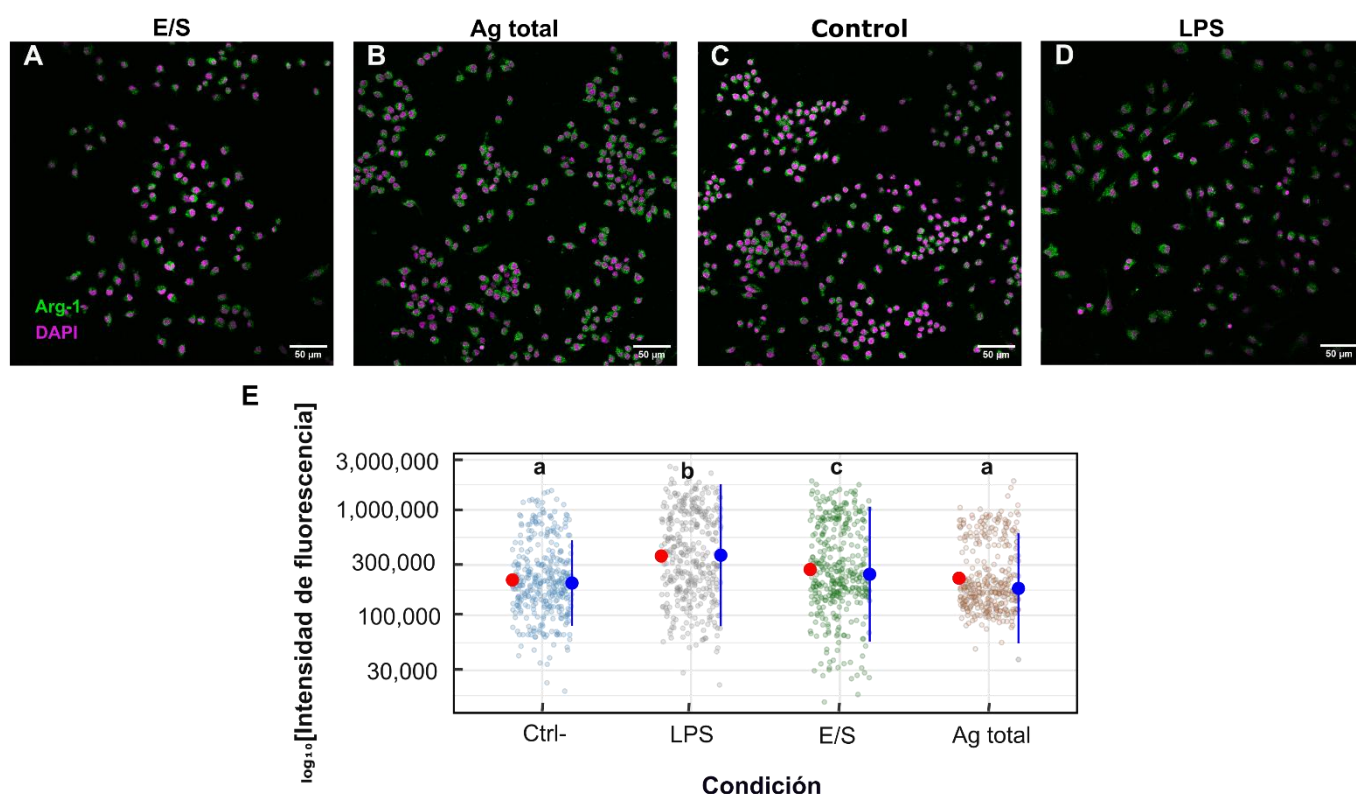


Figura 5. Expresión de Arg-I observado por microscopía confocal.

Células RAW 264.7 tratadas con (A) ES 40 µg/mL, (B) AgT 40 µg/mL, (C) Control y (D) LPS 1 µg/mL. Barra de escala = 50 µm. (E) Intensidad de fluorescencia en base a los datos de la Intensidad Integrada Bruta. Las diferentes letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p \leq 0.0001$). Los puntos rojos hacen referencia a la media, mientras que los puntos azules a la mediana y las líneas azules al rango intercuartílico.

Tabla 5. Distribución de células +Arg-I según la condición experimental

	Reactividad a Arg-I				Total	chi2 (p-valor)
	Positivas		Negativas			
	Número de conteo	%	Número de con- teo	%		
Control	24	6.49	346	93.51	370	84.38 (<0.0001)
LPS	89	24.00	281	75.95	370	
ES	57	15.4	313	84.60	370	
AgT	15	4.05	355	95.95	370	

9.4. Evaluación de la capacidad del Ag total de inhibir el fenotipo M1 generado por la incubación de células RAW 264.7 con LPS.

Por otro lado, se evaluó la posible capacidad del AgT de revertir la polarización proinflamatoria de los macrófagos, que se midió mediante la expresión de iNOS. Se utilizaron concentraciones crecientes del AgT (10 µg/mL, 20 µg/mL y 40 µg/mL) con LPS en cultivo. Se usó DMSO, como control antiinflamatorio, ya que, se ha reportado que suprime la expresión de citoquinas inflamatorias inducidas por LPS en macrófagos, también, atenúa los niveles de óxido nítrico en células RAW 246.7 pretratadas con LPS (41, 42).

De acuerdo con la estadística descriptiva, la expresión de iNOS de las diferentes concentraciones de AgT incubadas con LPS no presentaron una diferencia notable con el tratamiento solo con el LPS (0.76594145, 0.81408643, 0.67812876 vs 0.70855181). Por otro lado, el control de antiinflamación (DMSO+LPS) presentó una menor expresión comparado con los grupos incubados con LPS, pero una mayor expresión comparado con el control. los valores más bajos de expresión de Arg-I (302905.0568) (Tabla 6).

El análisis estadístico mostró un efecto significativo del tratamiento (Kruskal Wallis: $H = 11.526$, $df = 5$, $p < 0.05$). Sin embargo, la prueba de Dunn con corrección de Holm no evidenció estas diferencias entre los pares de grupos. (Figura 6). A pesar de que no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos evaluados, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de AgT+LPS y el tratamiento solo con LPS. Los tratamientos de AgT+LPS obtuvieron un mayor valor de expresión de iNOS comparado con el control (Tabla 6 y Figura 6).

Tabla 6. Estadística descriptiva de las diferentes condiciones de tratamiento para Western blot

Condición	n	Media	SD	Mediana	IQR	Q1	Q3
DMSO+LPS	3	0.45191517	0.15203556	0.38939692	0.14206834	0.365	0.507
AgT10+LPS	3	0.76594145	0.1442607	0.72089009	0.1388846	0.685	0.824
AgT20+LPS	3	0.81408643	0.17579948	0.74664988	0.16581523	0.714	0.880
AgT40+LPS	3	0.67812876	0.17802142	0.68656953	0.17787127	0.591	0.769
Control	3	0.16752607	0.14517659	0.20167293	0.14213281	0.105	0.247
LPS	3	0.70855181	0.15033121	0.70164669	0.15021222	0.632	0.782

Nota. Para cada condición se hicieron 3 replicados. SD significa desviación estándar

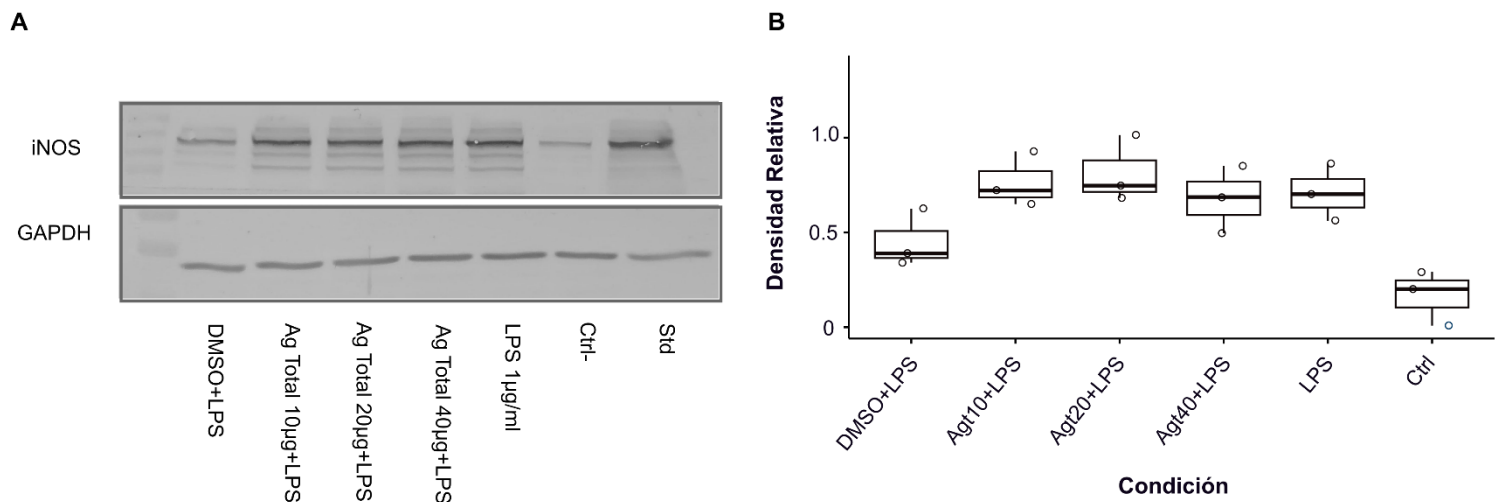


Figura 6. Patrón de expresión de la proteína iNOS en las células RAW 264.7 expuestas al antígeno total de *T. solium* con LPS para evaluar su posible efecto antiinflamatorio (A) Análisis de Western blot. Para control negativo se trató a las células solo con medio de crecimiento. Se utilizó DMSO al 1% como control antiinflamatorio y LPS (1µg/mL) como control proinflamatorio. Se utilizó GAPDH como control de carga. Imagen representativa de un total de 3 experimentos. (B) Análisis de la densidad relativa de iNOS. Los datos se normalizaron en relación con la intensidad de la proteína GAPDH. *($p \leq 0.05$), **($p \leq 0.01$).

X. DISCUSIÓN

Se ha reportado que la respuesta inflamatoria típica frente a los helmintos es de tipo Th2, así como, su capacidad de modular el sistema inmune del hospedero de diferentes formas (24). Sin embargo, en el caso de *T. solium* los estudios sobre la respuesta inmune de macrófagos son escasos y heterogéneos. En este estudio se evaluó la respuesta inmune frente a los antígenos del cisticerco del parásito, tanto el antígeno ES y el AgT en una línea celular de macrófagos. Los resultados muestran que el antígeno ES induce una mayor expresión tanto del marcador proinflamatorio iNOS y del marcador antiinflamatorio Arg-I comparado con el AgT en la línea celular murina de macrófagos RAW 264.7.

Estos resultados concuerdan con otros estudios donde se ha observado la expresión mixta de citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Según los estudios realizados por Restrepo *et al*, en tejidos cerebrales humanos con NCC se encontró una respuesta inflamatoria mayoritaria de tipo Th1 con presencia de macrófagos, células NK y citoquinas proinflamatorias en etapas tempranas de la infección, mientras una respuesta de tipo mixta Th1 y Th2 en tejidos cerebrales con granulomas, que representan una etapa tardía de la infección (33,35). También, en el estudio realizado por Arora *et al* (7) se encontró que las proteínas del ES de *T. solium* producen citoquinas de tipo Th1 y Th2 en líneas celulares de macrófagos, así como una alta expresión del marcador antiinflamatorio M2 Galectina 3. Asimismo, en el estudio realizado por Prasad *et al* (53), en el que se evaluó la respuesta inmune celular de tres tipos de antígenos del cisticerco de *T. solium*; el lisado crudo, la pared celular y el fluido del quiste, se encontró que solo el fluido del quiste provoca una respuesta inmune en PBMCs de pacientes con NCC, y esta muestra una respuesta inmune de tipo mixta Th1 y Th2.

En este estudio se utilizó el antígeno ES conformado por diversas moléculas que son secretadas por el parásito cuya liberación depende del estadio larval y el microambiente al que estén expuestos (54). Se conoce que los helmintos interactúan con el sistema inmune a través de estas moléculas secretadas, las cuales contienen propiedades inmunomoduladoras que les permiten permanecer en el hospedero por mucho tiempo sin ser identificados por el sistema inmune (41,54). Asimismo, se utilizó el AgT que incluye todos los componentes del parásito, ya que, se obtiene de la homogenización de los parásitos viables (54). Es decir, los antígenos ES son liberados activamente por el parásito durante el curso de la infección, y los antígenos totales activan la respuesta inmune después de la muerte del parásito, cuando sus componentes son liberados y, por consiguiente, expuestos (55). En este trabajo se ha visto que tanto el antígeno ES como el total producen una activación diferente en los macrófagos. Los macrófagos RAW 264.7. usados en el estudio, expresan diferencialmente tanto el marcador proinflamatorio como antiinflamatorio, iNOS y Arg-I, respectivamente, cuando son expuestos a los antígenos de *T. solium*. El antígeno ES produce una expresión mayor tanto de iNOS como Arg-I en los macrófagos comparado con el AgT. Existen estudios donde se ha observado esta diferencia en la respuesta inmune frente a los diferentes antígenos de helmintos. Así,

el estudio realizado por Andrade *et al* demostró que solo los antígenos ES, pero no los antígenos somáticos del estadio adulto y larval del parásito *Ascaris suum* activan la liberación de óxido nítrico en cultivo *in vitro* de macrófagos alveolares de ratas (56). Por otro lado, también se ha reportado la expresión de Arg-1 frente a distintos antígenos del parásito *F. hepática*. Según Flynn *et al*, los antígenos del homeogenato y del ES activaron la actividad de Arg en una línea celular de monocitos (57).

Algunos estudios han planteado que el cisticerco viable es altamente inmunogénico, lo que favorece la muerte del parásito (33). Por otro lado, otros estudios plantean que el cisticerco viable es no-inmunogénico debido a la liberación de ciertas moléculas que modulan el sistema inmune del hospedero, pero cuando el cisticerco muere empieza a liberar sus componentes que conlleva a una respuesta inflamatoria alta (30,33,35). Sin embargo, los estudios muestran una respuesta inmune heterogénea frente a los diferentes grados de viabilidad del cisticerco. En el estudio realizado por Verma *et al* (58) en pacientes con NCC epilépticos se reportó un perfil de citoquinas proinflamatorias, mientras que los pacientes con NCC asintomáticos presentaban un perfil de citoquinas predominantemente antiinflamatorias. Sin embargo, no se observó una diferencia en los grados de viabilidad del cisticerco entre los dos grupos estudiados (58). En un estudio realizado en tejido cerebral de cerdos se encontró una mayor expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 en el tejido alrededor de cisticercos viables, mientras una respuesta proinflamatoria frente a cisticercos degenerados y una respuesta de tipo mixta frente a cisticercos calcificados (31).

Por otro lado, en este estudio, el AgT no mostró capacidad antiinflamatoria, ya que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con AgT+LPS vs LPS en la expresión de iNOS. Hay estudios realizados con ES como el de Sacucedo *et al* (28) que encontró que el cultivo de ES de *T. crassiceps* + LPS (TcES+LPS) no mostró diferencias con el tratamiento con LPS en la expresión de iNOS, sin embargo, si se encontró que el tratamiento TcES+LPS reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias. Estos resultados muestran que tanto los antígenos ES y total de *T. solium* son capaces de activar el sistema inmune de diferente forma, así como la diferencia de este efecto con otros parásitos helmintos.

Los resultados sugieren que el ES está favoreciendo la expresión mixta de los marcadores de la polarización M1/M2. Esto sugiere que el parásito modula el sistema

inmune del hospedero para evitar una respuesta inflamatoria alta y, por consiguiente, mantener su supervivencia a largo plazo. Se ha visto esta respuesta mixta en etapas crónicas de la infección en tejidos cerebrales con granulomas (35), lo que sugiere que este tipo de respuesta podría ayudar a mantener la homeostasis tisular para la supervivencia prolongada del parásito.

De acuerdo con los resultados, se apoya a la hipótesis parcialmente, pues el antígeno ES incrementó la expresión tanto de iNOS como Arg-I en macrófagos RAW 264.7, mientras que el AgT, en la expresión de iNOS, mostró resultados dependientes de la técnica utilizada. No se observaron diferencias significativas en western blot tras el análisis post hoc, pero sí aumento significativo en inmunofluorescencia respecto al control negativo, aunque inferior al observado con el antígeno ES. Por otro lado, el AgT no mostró diferencias significativas en la expresión de Arg-I respecto al control negativo.

XI. LIMITACIONES

- Este estudio presentó ciertas limitaciones como el uso de una línea celular murina de macrófagos (RAW 264.7), la cual no refleja completamente el comportamiento *in vivo* de macrófagos humanos, sin embargo, una de las ventajas del uso de macrófagos murinos es el fácil reconocimiento de los fenotipos M1 y M2 mediante los marcadores utilizados (30).
- Dentro de las limitaciones técnicas del estudio se encuentran, la falta de uso de un control positivo de Arg-I, así como que, el LPS usado como control positivo del fenotipo M1, presentó una alta expresión de Arg-I. Esto podría deberse a varios factores, como el uso de una línea celular transformada derivada de macrófagos murinos, las cuales pueden presentar un perfil parcialmente “pre-activado”. Asimismo, hay estudios que reportan la expresión de Arg en la línea celular RAW 264.7 pretratada con LPS (59,60). Se ha descrito que tanto Arg-I, Arg-II e iNOS pueden ser inducidos simultáneamente por LPS en macrófagos (59). Esto se puede deber a que, tanto NOS como Arg utilizan un mismo sustrato, que es la arginina, y se ha descrito que la Arg puede reducir la producción de óxido nítrico al competir con NOS por la arginina (61). Asimismo, se ha visto que, para evitar la apoptosis inducida por óxido nítrico, los macrófagos expresan Arg I y II, lo que explicaría la expresión de Arg en macrófagos inducidos por LPS (61). Debido a

esto, es recomendable usar otra línea celular de macrófagos para próximos estudios y así consolidar este estudio.

- En el primer objetivo, el análisis de Western-blot mostró un efecto significativo del tratamiento mediante Kruskal-Wallis, sin embargo, no se pudo evidenciar las diferencias significativas entre los pares de tratamientos mediante el análisis post hoc (Test de Dunn). Esto se puede deber a que el análisis con el tamaño muestral utilizado ($n=3$), la potencia estadística de la prueba es baja. Sin embargo, la cantidad de replicas utilizadas se encuentran dentro de lo usual en experimentos de Western-blot. Sin embargo, se optó por considerar el efecto del ES y del LPS como biológicamente significativo debido a la inspección visual de los escaneos, como así, también teniendo en cuenta la estadística descriptiva que se pueden ver en las tablas.
- En este estudio se usó un único lote de antígenos. Sin embargo, una limitación que podría explicar la heterogeneidad de la respuesta inmune en NCC es la variabilidad genética, no solo de los hospederos, sino dentro de los parásitos de *T. solium*, como lo confirma el estudio realizado por Vega *et al* (67). En este estudio se reportó una variabilidad genética entre parásitos *T.solim* de Madagascar y diferentes regiones de México, incluso se encontraron diferencias dentro de una misma región de México (62).

XII. CONCLUSIONES

- Los resultados sugieren que el antígeno ES favorece un perfil mixto de expresión de iNOS y Arg-I en RAW 264.7.
- El antígeno ES induce una mayor expresión de iNOS comparado con el AgT en la línea celular de macrófagos RAW 264.7
- El efecto del antígeno total en la expresión de iNOS fue dependiente de la metodología utilizada, sin diferencias significativas en western blot tras el análisis post hoc, pero con un aumento significativo en inmunofluorescencia respecto al control negativo
- El AgT no produce una expresión diferencial de Arg-I en la línea celular de macrófagos RAW 264.7

- El AgT no redujo la expresión de iNOS inducida por LPS en los macrófagos RAW 264.7.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Del Brutto OH. Human Neurocysticercosis: An Overview. *Pathogens*. 2022;11(10).
2. Bustos J, Gonzales I, Saavedra H, Handali S, Garcia HH. Neurocysticercosis. A frequent cause of seizures, epilepsy, and other neurological morbidity in most of the world. *J Neurol Sci*. 2021;427.
3. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(3):1–23.
4. Saavedra H, Gonzales I, Alvarado MA, Porras MA, Vargas V, Cjuno RA, et al. Diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis en el Perú. Neurocysticercosis diagnosis and management in Peru. Vol. 27, *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010.
5. García HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Tsang VCW, Pretell EJ, Gonzales I, et al. Neurocysticercosis: Unraveling the nature of the single cysticercal granuloma. *Neurology*. 2010;75(7):654–8.
6. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW, et al. Epidemiology and control of cysticercosis in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010;27(4):592–7.
7. Arora N, Keshri AK, Kaur R RS, Kumar R, Mishra A et al. *Taenia solium* excretory secretory proteins (ESPs) suppresses TLR4 / AKT mediated ROS formation in human macrophages via hsa- miR-125. *PLoS Negl Trop Dis*. 2023;17(12):1–21.
8. Ji Y, Li X, Yao X, Sun J, Yi J. Macrophage polarization : molecular mechanisms , disease implications , and targeted therapeutic strategies. 2025;(December):1–36.
9. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
10. Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1).
11. Kadomoto S, Izumi K, Mizokami A. Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci*. 2022;23(1).
12. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1–14.
13. Rolot M, Dewals BG. Macrophage activation and functions during helminth infection: Recent advances from the laboratory mouse. *J Immunol Res*. 2018;2018.
14. Yang Z, Ming XF. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: Impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol*. 2014;5(OCT):1–10.
15. Ryan S, Shiels J, Taggart CC, Dalton JP, Weldon S. *Fasciola hepatica*-Derived Molecules as Regulators of the Host Immune Response. *Front Immunol*. 2020;11(September):1–9.
16. Shi Y, Yu K, Liang A, Huang Y, Ou F, Wei H, et al. Identification and Analysis of the Tegument Protein and Excretory-Secretory Products of the Carcinogenic Liver Fluke *Clonorchis sinensis*. *Front Microbiol*. 2020;11(September):1–12.
17. Tran N, Ricafrente A, To J, Lund M, Marques TM, Gama-Carvalho M, et al. *Fasciola hepatica* hijacks host macrophage miRNA machinery to modulate early innate immune

- responses. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86125-1>
18. Maizels RM, Smits HH, McSorley HJ. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity* [Internet]. 2018;49(5):801–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.016>
 19. Ramos-Benítez MJ, Ruiz-Jiménez C, Aguayo V, Espino AM. Recombinant *Fasciola hepatica* fatty acid binding protein suppresses toll-like receptor stimulation in response to multiple bacterial ligands. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.
 20. Martin I, Cabán Hernández, Kimberly Olgary Figueroa, Santiago, and Espino A. *Fasciola hepatica* Fatty Acid Binding Protein Inhibits TLR4 Activation and Suppresses the Inflammatory Cytokines Induced by Lipopolysaccharide In Vitro and In Vivo. *J Immunol Res*. 2015;176(3):139–48.
 21. Coakley G, McCaskill JL, Borger JG, Simbari F, Robertson E, Millar M, et al. Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Rep* [Internet]. 2017;19(8):1545–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.001>
 22. Smallwood TB, Giacomini PR, Loukas A, Mulvenna JP, Clark RJ, Miles JJ. Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Front Immunol*. 2017;8(APR).
 23. Wang Z, Hao C, Zhuang Q, Zhan B, Sun X, Huang J, et al. Excretory/Secretory Products From *Trichinella spiralis* Adult Worms Attenuated DSS-Induced Colitis in Mice by Driving PD-1-Mediated M2 Macrophage Polarization. *Front Immunol*. 2020;11(October):1–12.
 24. Maizels RM. Exploring the immunology of parasitism – from surface antigens to the hygiene hypothesis. *Parasitology*. 2009;136:1549–64.
 25. Peón AN, Espinoza-Jiménez A, Terrazas LI. Immunoregulation by *taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
 26. Espinoza-Jiménez A, De Haro R, Terrazas LI. *Taenia crassiceps* Antigens Control Experimental Type 1 Diabetes by Inducing Alternatively Activated Macrophages. *Mediators Inflamm*. 2017;2017.
 27. Reyes JL, Espinoza-Jiménez AF, González MI, Verdin L, Terrazas LI. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2011;267(2):77–87.
 28. Martínez-Saucedo D, De Dios Ruiz-Rosado J, Terrazas C, Callejas BE, Satoskar AR, Partida-Sánchez S, et al. *Taenia crassiceps*-excreted/secreted products induce a defined MicroRNA profile that modulates inflammatory properties of macrophages. *J Immunol Res*. 2019;2019.
 29. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*. 1998;84(1):74–81.
 30. Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcía M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *taenia solium* neurocysticercosis infection and treatment. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(4):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008005>
 31. Singh AK, Prasad KN, Prasad A, Tripathi M, Gupta RK, Husain N. Immune responses to viable and degenerative metacestodes of *Taenia solium* in naturally infected swine. *Int J Parasitol* [Internet]. 2013;43(14):1101–7. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.009>

32. Chavarría A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, et al. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 2003;5(12):1109–15.
33. Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients : central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol.* 1998;89:64–72.
34. Sikasunge CS, Johansen M V., Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol.* 2009;160(3–4):242–50.
35. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun.* 2001;69(7):4554–60.
36. Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta D, Delgado-Kamiche A, Celiz R, Trompeter G, Sutherland G, et al. Changes in inflammatory gene expression in brain tissue adjacent and distant to a viable cyst in a rat model for neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(4).
37. Sciutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis : protection and injury. 2007;(February):621–36.
38. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, et al. Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. *Am J Pathol* [Internet]. 2015;185(8):2259–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.015>
39. Londoño DP, Alvarez JI, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis : immunohistochemical analysis during various stages of infection. 2002;109:249–59.
40. Villacorta D. Evaluación de la respuesta inflamatoria en diferentes tiempos post-infección en un modelo de neurocisticercosis. 2024.
41. Loke P, Ching Lee S, Oyesola O. Effects of helminths on the human immune response and the microbiome. *Nature.* 2022;15(April).
42. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. STAT6 – / – mice exhibit decreased cells with alternatively activated macrophage phenotypes and enhanced disease severity in murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2011;232(1–2):26–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.09.029>
43. Deepika K, Chaudhary A, Sharma B. Neurocysticercosis : A Review on Global Neurological Disease. In: *Taeniasis and Cysticercosis/Neurocysticercosis - Global Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Management.* 2024. p. 1–12.
44. OMS. Teniasis y cisticercosis [Internet]. 2021 [cited 2022 May 14]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
45. Tafur V, Ch JM. Prevalencia de neurocisticercosis en el Hospital Regional Virgen de Fátima , Prevalence of neurocisticercosis in the Regional Hospital Virgen de Fátima ., 2020;3(3):22–6.
46. Bernal-Teran EG. Evaluación del estrés oxidativo y daño neuronal en un modelo experimental de ratas con neurocisticercosis que presentan epilepsia. 2024.
47. Lee D, Mantravadi HB, Puri D, Gupta AK, Sonje PD, Lakhanpal S. Neurocysticercosis

in transition : expanding clinical spectrum , evolving diagnostics , and emerging therapies. *Front Pharmacol.* 2026;(February):1–7.

48. Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP). The Approved List of Biological Agents. *Heal Saf Exec* [Internet]. 2013;1–32. Available from: <http://www.hse.gov.uk/pubns/misc208.pdf>
49. Li L, He W, Fan X, Liu M, Luo B, Yang F, et al. Proteomic analysis of *Taenia solium* cysticercus and adult stages. (2).
50. RAW 264.7. *Atcc.org* [Internet]. Available from: <https://www.atcc.org/products/tib-71>
51. Miller L. *ImageJ_gel_analysis*. 2010;(November):1–19. Available from: papers2://publication/uuid/A824F658-450A-4CB8-A1D4-0B2A115AC30E
52. Posit team. *RStudio: Integrated Development Environment for R* [Internet]. Boston; 2025. Available from: <http://www.posit.co/>
53. Amit P, Nath K, Rakesh G, Shweta T, Sanjeev J, Vimal P, et al. Experimental Parasitology Immune response to different fractions of *Taenia solium* cyst fluid antigens in patients with neurocysticercosis. *Exp Parasitol* [Internet]. 2011;127(3):687–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.006>
54. White RR, Artavanis-tsakonas K. How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells. *Landes Biosci.* 2012;3(7):668–77.
55. Halyburton E. Studies on the pathogenesis and diagnosis of infection with the equine lungworm *Dictyocaulus arnfieldi*. University of Glasgow; 1991.
56. Andrade MA, Siles-lucas MAR, López-abán J, Carranza C, Pérez-arellano JL, Muro A. Antigens from *Ascaris suum* trigger in vitro macrophage NO production. *Parasite Immunol.* 2005;27(June):235–42.
57. Flynn RJ, Irwin JA, Olivier M, Sekiya M, Dalton JP, Mulcahy G. Alternative activation of ruminant macrophages by *Fasciola hepatica*. *Vet Immunol immunopathology.* 2007;120:31–40.
58. Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med Microbiol Immunol.* 2011;200:255–61.
59. Jin Y, Liu Y NL. Extracellular Signal-regulated Kinase Mediates Expression of Arginase II but Not Inducible Nitric-oxide Synthase in Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages *. *J Biol Chem.* 2015;290.
60. Sosroseno W, Musa M, Ravichandran M, M FI, Ps B, Gj S. Arginase activity in a murine macrophage cell line lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:145–50.
61. Mori M. Regulation of Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and. *J Nutr.* 2018;3–7.
62. Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Sciutto E, Larralde C FG. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico : implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol.* 2003;33:1479–85.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolos de cultivo celular RAW 264.7

Descongelación de la línea celular RAW 264.7

- Tener listo 9 mL de medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 10% (v/v) de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina 10,000 U/mL en un tubo de 15 mL
- Descongelar el criovial en un recipiente con agua a 37°C por 2 min aproximadamente
- Mezclar lentamente 1 mL del criovial celular con 9 mL de medio de cultivo en un tubo de 15 mL
- Centrifugar la suspensión celular a 1200 rpm por 10 min a temperatura ambiente
- Desechar el sobrenadante, romper el pellet con suaves golpes al tubo y resuspender el pellet celular con 1 mL de medio de cultivo.
- Transferir el contenido a un flask de 25 cm² que contenga 4 mL del medio de cultivo.
- Mantener el flask en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂ y vigilar el crecimiento celular cada dos días. Cambio de medio cada 2 días. Al 80% a 90% de confluencia celular se procede a realizar el pasaje.

Pasaje celular

- Retirar el medio del flask, lavar la monocapa dos veces con PBS 1X
- Colocar 5 mL de nuevo medio, retirar las células con un raspador celular (cell scraper), lavar la monocapa usando una pipeta serológica y transferir el contenido a un tubo de 15 mL
- Centrifugar las células a 1200 rpm por 10 min a temperatura ambiente
- Desechar el sobrenadante utilizando una pipeta serológica
- Resuspender el pellet con 1 ml de medio de cultivo y homogenizar lentamente.

- Para hacer el pasaje a un flask de 25 cm² se diluyen las células 1:3 a 1:5 de acuerdo con la confluencia celular en un total de volumen de 5 mL de medio de cultivo
- Traspasar el contenido homogenizado a un nuevo flask y colocarlo en la incubadora

Cultivo celular en placa

- Se utilizan las células obtenidas del pasaje para hacer un cultivo en una placa de 24 pozos
- Diluir la suspensión celular con trypan blue (1:5 o 1:10)
- Pasar 10 µl de la suspensión celular a una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular por ml
- Preparar el volumen de medio que se necesita para obtener la cantidad de células necesarias en cada pozo
- Colocar el volumen de células correspondientes en un tubo que contiene el nuevo medio. Homogenizar con una pipeta serológica por, aproximadamente, 3 veces.
- Transferir el volumen necesario en cada pozo de la placa. Dejar reposar 15 min.
- Colocar la placa en la incubadora

Anexo 2. Protocolos de tratamientos con los antígenos de *T. solium*

Tratamiento celular:

- Luego de 24 h desde el cultivo en placa. Se prepara los diferentes volúmenes correspondientes de acuerdo con la concentración de antígeno que se utilice (10 µg/mL, 20µg/mL y 40µg/mL) con nuevo medio de cultivo. Además, se prepara un tubo que contenga 1 µg/mL de LPS

Nota:

- Los antígenos se deben trabajar en frío para evitar la degradación de las proteínas
- El medio de cultivo debe estar a una temperatura de 37°C
- Una vez preparadas las soluciones correspondientes, se retira cuidadosamente el medio de cada pozo y se coloca el tratamiento correspondiente para cada pozo, previamente homogenizado
- Para el segundo objetivo, se debe agregar DMSO al 1% como control antiinflamatorio y se debe esperar 1 h luego de colocar los tratamientos correspondientes para colocar 1 µg/ml de LPS en cada pozo, menos al control negativo

Anexo 3. Protocolo de Western blot

SDS-PAGE

PREPARACIÓN DE GEL

1. Limpiar los vidrios con alcohol, sin tocarlos con las manos, y limpiando cualquier resto de papel o pelusa.
2. Armar el sándwich con los vidrios gruesos y delgados con la ayuda del soporte verde, asegurarse que las bases de ambos vidrios estén al mismo nivel. Y cerrar abriendo los brazos del soporte verde.
3. Colocar el soporte verde con los vidrios en la base de plástico transparente con 1 esponja en la base. Echar agua destilada entre los vidrios para corroborar que no hay fugas (esperar 10 min), de lo contrario desarmar y volver a alinear los vidrios. Marcar 5.5 cm desde la base.
4. Enjuagar los beakers pequeños con agua MilliQ para preparar los geles.
5. Preparar el resolving gel 10%
6. Agregar 5 mL del resolving gel (aprox. 5 cm).
7. Agregar 200 µL isobutanol inmediatamente.

Nota: nivelar el gel y evitar que el oxígeno retarde la polimerización.

8. Esperar 20 minutos para que gelifique (ir preparando el stacking gel 5%, pero no agregar el APS o el Temed). Limpiar los peines con alcohol.
 9. Una vez polimerizado el resolving gel, descartar el isobutanol, y lavar una vez con alcohol 70°, y luego con agua destilada, hasta que el olor del alcohol desaparezca.
 10. Agregar el APS y el Temed a la mezcla de stacking Gel, y mezclar por 30 sec.
 11. Agregar el STACKING GEL sobre el RESOLVING GEL hasta el tope y colocar los peines, evitando formar burbujas.
- Nota: El peine debe ser del mismo grosor que los vidrios utilizados.
12. Esperar 20 minutos hasta que se gelifique.
 13. Preparar las muestras a correr: diluir las muestras con sample buffer a 1X, y calentar a 95° por 5 min.

ELETROFORESIS

1. Una vez pasado el tiempo, remover el peine y lavar los geles 3 veces con running buffer 1X.
2. Colocar los geles en la cámara electroforética.

Nota: presionar bien hacia arriba al momento de cerrar la cámara para evitar fugas del running buffer.

3. Llenar la cámara electroforética con running Buffer 1X (400 mL).
4. Esperar 10 min para verificar que no hay fugas. Sino volver a ajustar.
5. Agregar running buffer 1X (200n mL) en la parte externa de la cámara electroforética.
6. Colocar 3 μ L de marcador de peso molecular en el pocillo pequeño.
7. Añadir máximo 20 μ L de muestra a cada pozo de un peine de 12 pozos.

Nota: todos los pozos deben tener el mismo volumen (excepto el marcador de peso molecular).

8. Colocar la tapa de la cámara y conectarla a la fuente de poder

Nota: Cada electrodo tiene un color (rojo y negro). Conectar los cables con el electrodo del mismo color.

9. Llevar la cámara electroforética a la refrigeradora a 4°C.

10. Enchufar y encender la fuente de poder

a) Elegir Voltage constante.

b) Seleccionar 60 V

c) Presionar el botón de inicio.

11. Dejar corriendo hasta que el frente de corrida se alinee al inicio del resolving gel (tiempo estimado 5-10 minutos).

12. Pausar la corrida y cambiar las condiciones:

a) Seleccionar Voltage constante

b) Ingresar 110 V a 120 V

c) Reiniciar

13. Dejar corriendo por aproximadamente 40-45 minutos hasta que el frente de corrida llegue al final del resolving gel.

14. Detener la corrida.

TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

1. Retirar el gel de los vidrios con cuidado, eliminar el stacking gel y lavar el gel con agua destilada.

2. Colocar el gel en una bandeja para equilibrarlo con buffer de transferencia por 10 min

3. Dejar la nitrocelulosa con agua destilada por 2 min.

4. Agregar la membrana de transferencia (6.0 cm x 8.4 cm) y los papeles filtro (6.1 x 8.5), humedecer el último

5. Hacer un sándwich (cassette de transferencia) en el siguiente orden (de abajo hacia arriba):
 - Lado rojo (lado aniónico-)
 - Esponja
 - Papel filtro
 - Papel filtro
 - Membrana
 - Gel
 - Papel filtro
 - Esponja
 - Lado negro (lado catiónico+)
6. Llenar la cámara de transferencia con buffer de transferencia 1X (800 ml) que contenga un icepad del lado rojo para evitar calentamiento
7. Colocar la tapa de la cámara y conectar la cámara a la fuente de poder
8. Llevar la cámara al freezer a 4°
9. Encender la fuente de poder y colocar las condiciones de corrida:
 - Voltage constante
 - 25 V toda la noche
10. Remover la membrana del cassette de transferencia.
11. Lavar con TBS Tween-20 al 0.05% (TBST)
12. Confirmar la transferencia con colorante Rojo Ponceau
13. Lavar la membrana con agua destilada hasta eliminar el colorante
14. Bloquear con leche al 5% por 1h
15. Incubar con anticuerpo primario diluido en TBST 1% leche toda la noche
16. Lavar 4 veces con TBST por 10 min cada uno

17. Incubar con anticuerpo secundario diluido en TBST 1% leche por 2 h
18. Lavar 2 veces con TBST por 10 min cada uno, luego lavar con TBS 1X por 10 min y finalmente, lavar con PBS 1X por 10 min
19. Incubar con 100 mL DAB (50 mg/ml) y 1 μ L H₂O₂ (30%) en 10 ml de PBS y dejarlo homogenizar en el rocket plate por 2 min
20. Lavar la membrana con PBS 1X y dejarla secar a temperatura ambiente

Anexo 4. Protocolo de inmunofluorescencia

FIJACIÓN:

- Quitar el medio de los pozos
- Lavar dos veces los pozos de la placa con 500 μ L de PBS 1x
- Quitar el PBS 1x y colocar 500 μ L de paraformaldehído al 4% en cada pozo y e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Retirar el paraformaldehído al 4% de los pozos y añadir 1 mL de PBS a cada pozo. Llevar a 4°C, hasta su posterior uso.

PERMEABILIZACIÓN:

Colocar 70 μ L PBS Triton X-100 al 0, 2% por 5 minutos.

BLOQUEO:

- Lavar 2 veces con 70 μ L de PBS 1X pH 7.4
- Colocar 70 μ L de PBS 1X + BSA 1% + 5% Suero de burro sobre la monocapa fijada en el pozo y dejar incubando a TA durante 1 hora.
- Lavar con 70 μ L PBS 1X pH 7.4 por 5 min. Luego descartar el sobrenadante y repetir el procedimiento por 3 veces

ANTICUERPO PRIMARIO:

- Colocar 70 μ L de PBS 1X+ 1% BSA + 5% Suero de burro + Anticuerpo primario y dejar incubando 1 h a TA.

ANTICUERPO SECUNDARIO:

- Lavar con 70 μ L de PBS 1X pH 7.4 por 5 min. Luego descartar (repetir este proceso 4 veces).

- Colocar 70 μ l de PBS 1x +1% BSA + 5% Suero de burro + Ab 2° (Donkey Anti-Rb 488, 1/400) + 1/1000 de DAPI sobre la monocapa en pozo e incubar a 37 °C durante 1 hora.
- Lavar usando el rotor con 70 μ l de PBS 1X pH 7.4 por 5 min. Luego descartar (repetir este proceso por 4 veces).
- Usar 10 μ L de solución de montaje en el cover. Luego, en un ángulo de 45° colocar el cover en la lámina porta objeto
- Colocar esmalte de uña en los bordes para lograr que el cover se pegue a la lámina
- Se puede mantener la lámina a 4°C hasta su posterior uso