

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES.

TEMA:

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *NOS2/Arg1* EN
MACRÓFAGOS ALVEOLARES DURANTE LA INFECCIÓN CON
Strongyloides venezuelensis Y POR EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE
INULINA 5 % (p/v) EN *Rattus norvegicus*.**

AUTOR:

ANDRÉS SEBASTIÁN MENA PACHECO

TUTORA:

GERMANIA MARGARITA KAROLYS GUTIÉRREZ

Quito, Octubre, 2018

Cesión de derechos de autor

Yo, Andrés Sebastián Mena Pacheco, con documento de identificación N° 171968106-4, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: Análisis de la expresión de los genes *NOS2/Arg1* en macrófagos alveolares durante la infección con *Strongyloides venezuelensis* y por el efecto de la administración de Inulina 5 % (p/v) en *Rattus norvegicus*, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Andrés Sebastián Mena Pacheco
171968106-4
Octubre, 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutora

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, Análisis de la expresión de los genes *NOS2/Arg1* en macrófagos alveolares durante la infección con *Strongyloides venezuelensis* y por el efecto de la administración de Inulina 5 % (p/v) en *Rattus norvegicus*, realizado por Andrés Sebastián Mena Pacheco, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Octubre del 2018.



MSc. Germania Margarita Karolys Gutiérrez

TUTORA

C.I. 1708492499

Dedicatoria

A Dios que siempre estuvo a mi lado.

Dedico a mi familia que me apoyo durante todo este camino.

A todo el equipo PROPAD-INSPI LIP que me brindó la oportunidad de desarrollar mi tesis, y que estuvo ayudándome constantemente ante todas las dificultades que pasé.

A mis abuelitos, los cuales son mi mayor motivación para seguir investigando y adentrarme en el mundo de la ciencia.

A mi hermana que la quiero mucho.

A mi mamá que me ha apoyado siempre.

Agradecimientos

Un enorme agradecimiento a la Dra. Ana Lucia Ruano, que me brindó la oportunidad de desarrollar mi tesis, en el cual me motivé para plantear mi tema de titulación y de igual forma a la Dra. Thelvia Ramos.

A la Ing. Jackie Salazar, quien fue la primera en abrirme las puertas en PROPAD-INSPI LIP, a MSc. Cosme Hidalgo quien fue mi primer tutor y por aconsejarme durante todo el camino. Y sin olvidar al equipo de PROPAD “Ciclos Biológicos” Jairo Tobar, Dianita Escobar, Daniel Ramos, que me brindaron sus conocimientos, en mis primeros pasos durante el desarrollo de la tesis, en especial a Jairo Tobar, del cual aprendí mucho.

También al equipo de “Pruebas Moleculares” Fabián Aguilar, Meli Rodríguez, quienes supieron guiarme con sus conocimientos y experiencias. También a Cristina Paredes que fue más que una compañera de tesis, una amiga con la cual superamos este reto.

Un especial agradecimiento a MSc. Germania Karolys, de la cual aprendí mucho en su materia “Genética Molecular”, y en especial en “Genética Mendeliana” adentrándome en el maravilloso mundo de la Genómica, Transcriptómica, Proteómica en los seres vivos.

Un agradecimiento al profe Christian Larenas, por ayudarme en el análisis de los datos.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1. Marco Conceptual	4
1.1.Estrongiloidiasis	4
1.1.1 Taxonomía de <i>Strongyloididae</i> y Ciclo de Vida.....	4
1.1.2 Epidemiología.	7
1.1.3 Diagnóstico Clínico.....	8
1.1.4 Tratamiento.	9
1.2.Rol de los Macrófagos frente a Parásitos Gastrointestinales.	12
1.2.1 Macrófagos residente de tejidos.	12
1.2.2 Macrófagos derivados de Monocitos.....	13
1.2.3 Activación de Macrófagos mediante la Vía Clásica.....	16
1.2.4 Activación de Macrófagos mediante la Vía Alternativa.....	20
Capítulo 2. Metodología	24
2.1 Localización.	24
2.2. Animales	24
2.2.1 Administración de inulina a ratas Wistar.....	25
2.3 Obtención del parásito y técnicas parasitológicas.	26
2.3.1 Obtención de los huevos de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	26
2.3.2 Obtención de larva infectiva en estadio tres por el método Baerman modificado.	27

2.4 Aislamiento y Cultivo celular de Macrófagos alveolares.....	27
2.4.1 Aislamiento de Macrófagos alveolares.....	27
2.4.2 Cultivo Primario de Macrófagos Alveolares.	28
2.5 Metodología para el análisis molecular de NOS2/Arg1.....	29
2.5.1 Extracción de ARN Total.	29
2.5.2 Cuantificación de ARN total.....	30
2.5.3 Retrotranscripción – Síntesis de la cadena de ADN complementario	31
2.5.4 PCR Tiempo Real	31
2.6 Análisis Estadístico.....	33
Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	34
3.1 Administración de inulina 5 %.	34
3.2 Efecto de la inulina en la respuesta inmune frente a <i>Strongyloides venezuelensis</i>.	35
3.2.1 Efecto durante la fase inflamatoria.....	35
3.2.2 Efecto durante la fase post inflamatoria.....	36
3.3 Expresión de NOS2/Arg1 en macrófagos alveolares	40
Conclusiones	45
Recomendaciones	46
Bibliografía	47
Anexos	66

Índice de Tablas

Tabla 1. Identificación molecular del género <i>Strongyloides</i>	5
Tabla 2. Distribución celular de las Isoformas de NOS.....	18
Tabla 3. Diseño Experimental.....	25
Tabla 4. Secuencia de los primers utilizados y tamaño del amplicón.....	32

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Strongyloides stercoralis</i>	7
Figura 2. Mapa global de la infección con <i>Strongyloides stercoralis</i>	8
Figura 3. Estructura de la Inulina.....	11
Figura 4. Diferenciación de monocitos.....	15
Figura 5. Linaje de células mononucleares.....	16
Figura 6. Polarización de macrófagos.....	19
Figura 7. Participación de la respuesta Th2 frente a helmintos.....	21
Figura 8. Metabolismo de L-Arginina.....	23
Figura 9. Comparación entre grupos:.....	34
Figura 10. Conteo de Macrófagos alveolares.....	38
Figura 11. Relación Número de larvas y Formación del granuloma.....	40
Figura 12. Amplificación <i>NOS2</i>	42
Figura 13. Amplificación <i>Arg1</i>	43

Índice de Anexos

Anexo 1. Cuidado y Bienestar animal.....	66
Anexo 2. Técnicas de Coprocultivo.....	72
Anexo 3. Cultivo Celular – Cultivo Primario de Macrófagos alveolares.....	75
Anexo 4. Técnicas Moleculares para el análisis de la expresión de los genes <i>NOS2/Arg1</i> en macrófagos alveolares aislados durante una infección con <i>Strongyloides venezuelensis</i>	82

Resumen

Estrongiloidiasis es una enfermedad asintomática causada por el helminto *Strongyloides stercoralis*, pero se evidencia cuando el paciente padece de insuficiencia gástrica y respiratoria. Se ha reportado en la mayoría de las veces, en poblaciones vulnerables como: infantes, mujeres embarazadas, adultos mayores e inmunosuprimidos, con ausencia de la participación de interleucinas y células colaboradoras de la fase Th2. Diversos estudios han propuesto, el uso de inmunomoduladores para combatir la parasitosis al detener la migración de la larva y activar las células fagocíticas y linfocitos.

En el presente estudio, se evaluó el efecto inmunomodulador por parte de la inulina en los macrófagos alveolares por medio de la detección en PCR Tiempo Real de los genes *NOS2/Arg1* en ratas Wistar infectadas con *Strongyloides venezuelensis*.

Los resultados ponen en evidencia que la administración de Inulina al 5 % (p/v) protege al hospedero frente a la infección del parásito, al detectar mediante PCR tiempo real de la expresión de *Arg1* en los macrófagos alveolares, poniendo en evidencia que la respuesta inmunológica Th2 se encuentra activada, disminuyendo la inflamación en el compartimiento pulmonar, generando homeostasis en las señales celulares para las respuestas M1/M2 y favoreciendo la expulsión del parásito.

Palabras clave: *Estrongiloidiasis, inulina, macrófagos alveolares, NOS2, Arg1.*

Abstract

Strongyloidiasis is an asymptomatic disease caused by one helminth called *Strongyloides stercoralis*. It's evident in patients as gastric and respiratory insufficiency. It has been reported in something cases in vulnerable population as: childrens, pregnant women, elderly and immunosuppressed patients, as absence of participation of interleukins, T helper cells (Th2). Several studies have been proposed to use an immunomodulators against parasitic, although larvae migration detection and activation of phagocytic cells and lymphocytes.

In the present study, it was evaluated immunomodulator effect of inulin in gene expression of *NOS2/Arg1* in alveolar macrophages although Real Time PCR in Wistar rats infected by *Strongyloides venezuelensis*.

It demonstrated that inulin 5 % (w/v) administration in the host, it protected against parasite infection because of alveolar macrophages to detected *Arg1* trough Real Time PCR, it has been showed the response Th2 activation, decrease arbitrary scores of inflammation in lung compartment to generate a homeostasis in cell to cell signal to M1/M2 immune response and contributed to helminth expulsion.

Key words: *Strongyloidiasis, inulin, alveolar macrophages, NOS2, Arg1*

Introducción

El parasitismo, es una relación antagónica entre dos organismos (huésped- hospedero) y una de las más antiguas presentes en la naturaleza (Reinhard, 2017 y Rodríguez, 2014). Se lo considera una interacción negativa, debido a que el parásito no puede cumplir sus funciones vitales de forma independiente, como lo hacen los organismos superiores y necesitan de un hospedero para sobrevivir. Esto le permite adaptarse al huésped, consiguiendo las condiciones óptimas de desarrollo, crecimiento, alimentación, entre otros (Cholewiński, Derda, & Hadaś, 2015).

Los geohelminths, son organismos pluricelulares también conocidos como parásitos intestinales. Son causantes de la mayor prevalencia de infecciones por helmintiasis en humanos, teniendo altos índices de morbilidad y mortalidad (Steppek, Buttle, Duce, & Behnke, 2006), la mayoría de estos nemátodos son de importancia médica, donde se incluye a *Strongyloides stercoralis* (Dada & Aruwa, 2015), causante de la enfermedad conocida como Estrongiloidiasis, reportándose una cifra de alrededor de 30 millones de personas contagiadas, especialmente en los países ubicados en las zonas tropicales y subtropicales, incluyendo a Ecuador, presentando síntomas inespecíficos como: dolor abdominal, vómito, diarrea, náuseas, insuficiencia respiratoria, sepsis, malabsorción intestinal, especialmente en poblaciones vulnerables como: infantes, mujeres embarazadas, inmunosuprimidos y adultos mayores (Makker, 2015; Puthiyakunnon, 2014; Bava, 2013; Buonfrate, 2013 y Ramanathan, 2008).

En la actualidad son pocos los estudios de la respuesta innata frente a una infección causada por *Strongyloides* spp (Makker *et al.*, 2015), debido a que el hospedero no presenta ninguna sintomatología en los primeros cuadros de esta enfermedad, pero la mayoría de los casos se han reportado en pacientes inmunosuprimido (Silveira *et al.*,

2002), donde los mecanismos moleculares del sistema inmune, evita que actúen las células de linaje mieloide (eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas) y progenitores linfoides (células T y B) actúen en conjunto ante la infección parasitaria (Gasteiger & Rudensky, 2014). Reportes sugieren un camuflaje del parásito dentro del hospedero (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003), evitando la participación de los macrófagos mediante la activación clásica (M1) relacionada con la inflamación ante patógenos externos y la activación alternativa (M2) propia de la respuesta ante helmintos (Webb & Tait Wojno, 2017 y Bouchery, 2015).

En búsqueda de nuevas alternativas para combatir este tipo de infecciones se ha propuesto el uso de inmunomoduladores, entre ellos la inulina, que son coadyuvantes de la respuesta innata de un organismo, para el reconocimiento y eliminación de patógenos sea de tipo bacteriano, protozario, viral, fúngico o nemátodo (Mensink, Frijlink, Van Der Voort Maarschalk, & Hinrichs, 2015), su rol se centra en potencializar la respuesta inmune innata de reconocimiento del patógeno Th1 y en conjunto con las células colaboradoras e intermediarias de la respuesta alternativa Th2 ante infecciones por agentes externos (Siilva, Cooper, & Petrovsky, 2004).

La inulina también regula en macrófagos su citotoxicidad, al estimular en estos, mediadores inflamatorios y proinflamatorios (Óxido Nítrico, Arginasa), donde el Óxido Nítrico (ON) tiene un rol muy importante en la respuesta innata, considerándose un inmunomodulador frente a una infección parasitaria por helmintos (Ruano, 2008). Esto se ha confirmado en estudios realizados en ratas Wistar y ratones BALB/c, reportándose altos niveles de (ON) en las zonas peritoneales y alveolares, donde adquirieron una resistencia natural frente a la parasitosis (Zhao *et al.*, 2013). De igual forma la Arginasa tipo I (Arg1), es una molécula antagónica a la inflamación (Martinez & Gordon, 2014) que se expresa, en la respuesta M2 en los macrófagos, participando

en conjunto con las demás células de la defensa innata en el hospedero (Du, Liu, Zhang, & Li, 2013). Esto se ha demostrado en estudios realizados con *S. venezuelensis* y *Trichuris muris*, donde reportaron la participación de los macrófagos en la respuesta Th2 frente a helmintos (Reece, Siracusa, & Scott, 2006) y su importancia en la presentación del antígeno a los receptores CD4+ de las células T (Klose & Artis, 2016).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto inmunomodulador por parte de la inulina en los macrófagos alveolares por medio de la cuantificación de la expresión de los genes *NOS2/Arg1* frente a una parasitosis causada por el helminto *Strongyloides venezuelensis* en ratas Wistar.

Capítulo 1

Marco Conceptual

1.1 Estrongiloidiasis.

La Estrongiloidiasis, es causada por el geohelminto de vida libre *Strongyloides stercoralis*, que se encuentra presente en los suelos con un alto porcentaje de humedad de las regiones tropicales y subtropicales. Infecta al hospedero por medio de la penetración cutánea en estado larvario filariforme o mejor conocido como (iL3) (Prieto-Pérez *et al.*, 2016).

Fue identificada la primera vez en Gran Bretaña en el año 1949, en los prisioneros Japoneses que fueron tomados de rehenes en la Segunda Guerra Mundial y soldados Británicos que retornaron del sureste de Asia (Gill & Bell, 1979).

1.1.1 Taxonomía de *Strongyloididae* y Ciclo de Vida.

Mediante análisis filogenético y los últimos avances en secuenciación de genomas para identificar especies de nemátodos, utilizado el marcador molecular 18S rRNA para *Strongyloides* spp (Hasegawa & Hayashida, 2009), se lo ha clasificación dentro del *Phylum: Nematoda*, que incluye a todos los parásitos de vida libre pertenecientes al Orden: *Rhabditata*, del grupo de parásitos de vertebrados obligados, dentro del Género: *Strongyloides* (Hunt *et al.*, 2016).

Siendo *Strongyloides stercoralis* y *Strongyloides fuelleborni* los que tienen como hospedero al humano como lo indica la Tabla (1). Los casos de estudios donde se han reportado infecciones a causa de *S. fuelleborni*, ocurre en diferentes zonas de África, donde la infección la comparte en conjunto con primates, a diferencia de *S. stercoralis*, siendo un parásito cosmopolita de zonas tropicales y subtropicales (Viney, 2007).

Tabla 1.**Identificación molecular del género *Strongyloides*.**

Taxón (Nombre científico)	Hospedero – mantenimiento del ciclo en animales de estudio	Tamaño 18S rRNA (pb)	Código de acceso en GenBank
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Humano	1,200	AF279916
<i>Strongyloides cebus</i>	Primates de Sudamérica	330	AJ417025
<i>Strongyloides fuellebornikelleyi</i>	Humanos	330	AJ417029
<i>Strongyloides fuellebornifuelleborni</i>	Primates de África	332	AJ417030
<i>Strongyloides venezuelensis</i>	Ratas y ratones	329	AJ417026
<i>Strongyloides westeri</i>	Caballos	330	AJ417032
<i>Strongyloides suis</i>	Cerdos	330	AJ417028
<i>Strongyloides papillosus</i>	Conejos	330	AJ417027
<i>Strongyloides ratti</i>	Rata	1,200	AF036605
<i>Strongyloides vituli</i>	Ganado	466	EU885229
<i>Strongyloides robustus</i>	Ardillas	1,500	AB272233
<i>Strongyloides ophidiae</i>	Falsa coral	332	EU287935
<i>Strongyloides sp. ex snake</i>	Cobra	332	AJ417031

Nota: Los datos de obtuvieron de los siguientes autores: (Solórzano, 2017; Hunt, 2016; Lok, 2014; Dos Santos, 2010; Nemetschke, 2010; Eberhardt, 2008; Marra, 2007 y Sato, 2007).

El ciclo de vida libre de *S. stercoralis*, comienza cuando la larva infectiva filariforme en estadio tres (iL3) se siente atraída por el ácido urocánico de la piel. Una vez infectado el hospedero, iL3 migran a través del tejido conjuntivo subcutáneo, ingresando en los capilares venosos en dirección hacia los pulmones en las primeras cuatro horas post infección (Marra *et al.*, 2011), atravesando la cavidad pleural donde se encuentran los alveolos de 48 a 72 horas post infección, para subir por el árbol bronquial, en dirección a la tráquea, laringe, faringe, ingresando de esta forma en el sistema gastrointestinal a partir del día cinco post infección, mudando por último a estadio adulto conocido como hembra partenogénica, que se ubica en los primeros 15 cm del duodeno y en la primera porción del yeyuno del intestino delgado (Cruz, Vincenzi & Ketzer, 2010).

Las hembras partenogénicas son transparentes y miden 2mm, producen los huevos que eclosionan a larvas L1 rabadiforme, las cuales son secretados por vía rectal al medio externo, donde presentando las condiciones adecuadas de temperatura y humedad en el suelo, se convertirán en hembras y machos L1 de vida libre, los cuales mudaran a iL3 para infectar a un nuevo hospedero, en este estadio miden alrededor de 1mm y presentan espículas y su extremo posterior curvo (Marra *et al.*, 2011), como lo indica la Fig. 1.

En una autoinfección durante el mismo recorrido, las larvas L1 rabadiforme que son expulsadas por el intestino, mudando a larvas iL3 filariformes al ingresar nuevamente a los capilares venosos, previamente penetrando la mucosa de la cavidad peritoneal (Viney & KIikuchi,2016).

A diferencia de otras especies cercanas como *S. venezuelensis* y *S. ratti*, no expulsan L1, lo que no facilita un ciclo de autoinfección dentro del hospedero, sino a partir del día cinco post infección en animales de estudio como *Rattus norvegicus* (ratas Wistar), *Mus musculus* (BALB/cJ, C57BL/6, entre otros) expulsan huevos, pero a diferencia con *S. stercoralis*, se ha evidenciado que esta especie, secreta glicoproteínas para la interacción con el epitelio del intestino (Nagayasu, Ogura, Itoh, Yoshida, & Chakraborty, 2013), permitiendo la adhesión en el intestino del hospedero y no ser expulsado por el mismo mediante vía rectal, por tal razón, mediante la técnica coprológicas como Kato Katz permite tener un seguimiento del ciclo del parásito dentro del hospedero, por medio del conteo de huevos hallados en las heces de los animales de estudio (Chávez & Marcillo, 2016).

Ciclo de Vida de *Strongyloides stercoralis*.

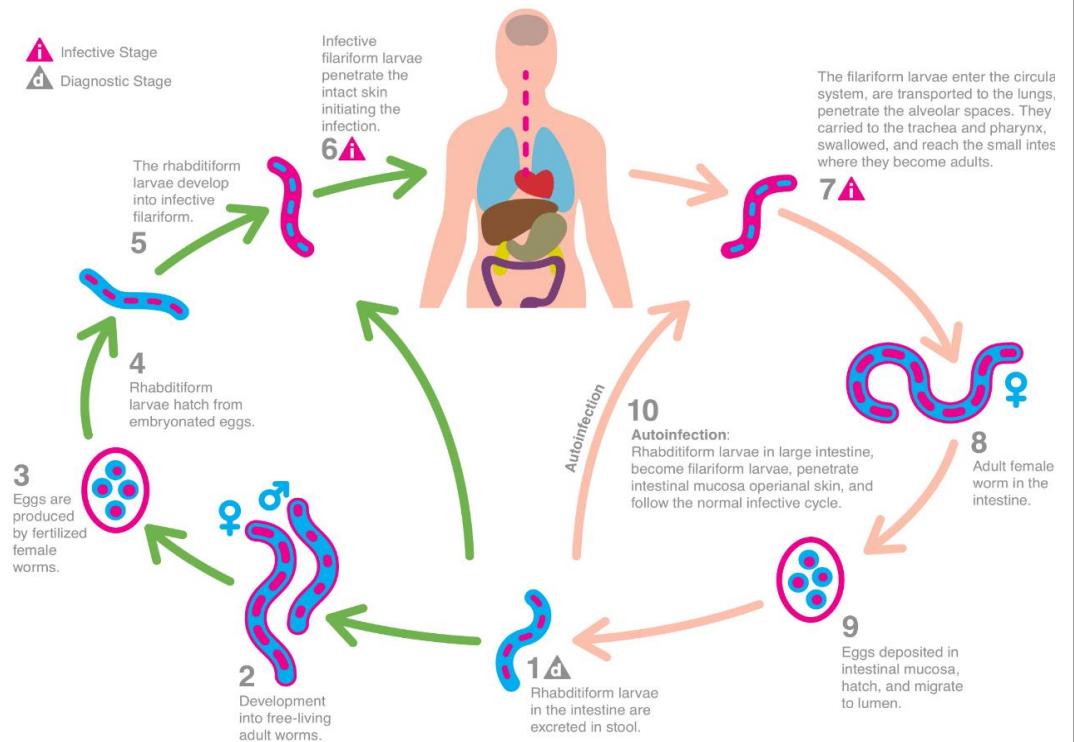


Figura 1. Ciclo de vida de *Strongyloides stercoralis*. Larva rhabditiforme L1 es secretada por vía rectal al medio externo (1), completando su ciclo de vida libre (2), las hembras fértiles producirán huevos (3), que más tarde se desarrollara nuevamente en estado L1(4), que mudaran a larva filariforme en estado infectivo conocido como iL3 (5), iL3 penetrara la piel del hospedero ingresando en sus capilares venosos (6), a las 48 horas de infección donde ingresara en la cavidad pleural, continuando por la tráquea y esófago (7), hasta llegar al yeyuno del intestino delgado, donde mudará a estado adulto o mejor conocido como hembra partenogénica (8), a partir del séptimo día de infección depositara los huevos dentro del intestino, los cuales eclosionaran, expulsados nuevamente por vía rectal al medio externo como larvas L1. (10) Durante una autoinfección, L1 penetrará el epitelio de la mucosa intestinal, ingresando a los capilares venosos, mudando a iL3 e ingresando nuevamente en la zona alveolar.

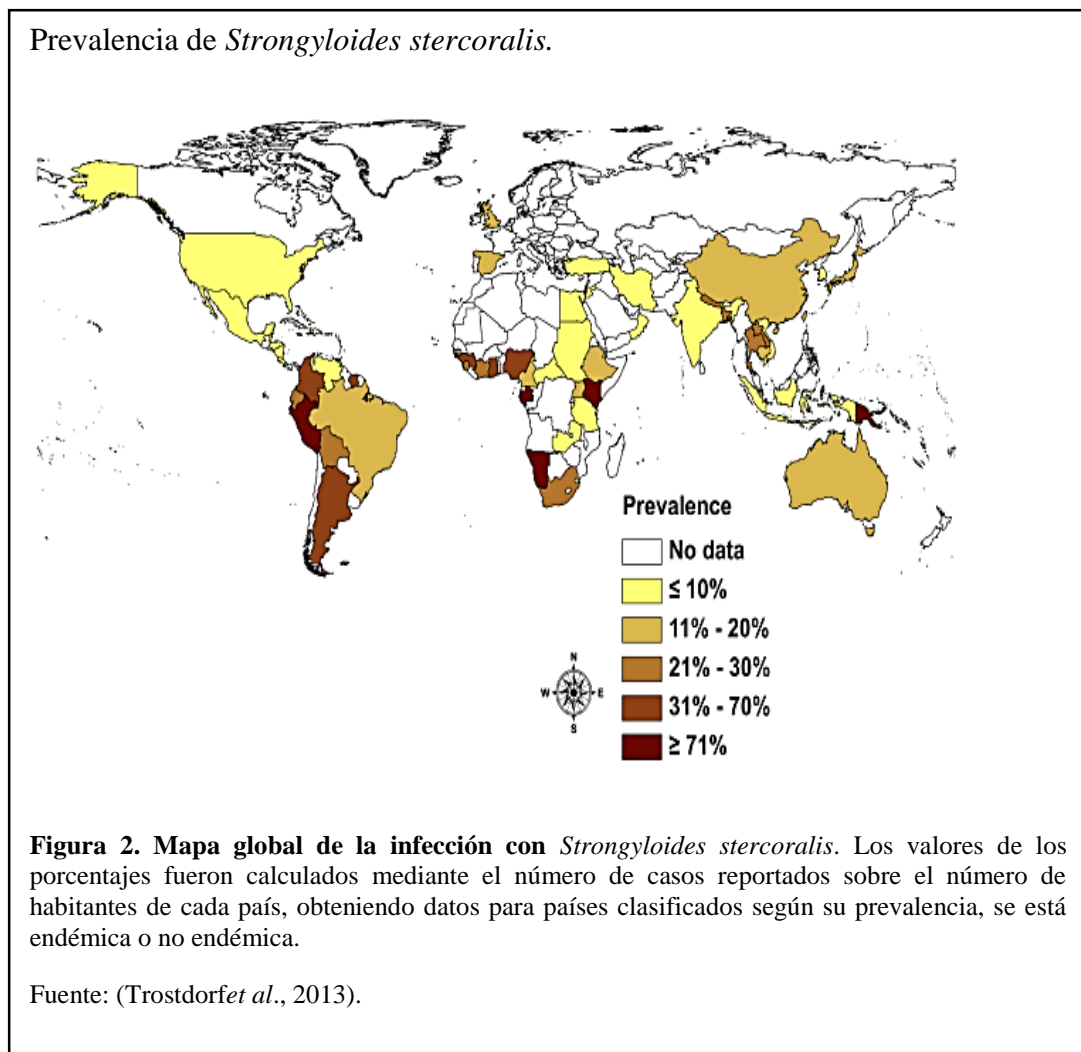
Fuente: (Trostdorf *et al.*, 2013).

1.1.2 Epidemiología.

Las zonas más prevalentes de contagio son las zonas tropicales y subtropicales del sureste de Asia, norte y sur de África, centro y sur de América, estimando alrededor de 100 a 200 millones de personas infectadas por *S. stercoralis* (Puthiyakunnon *et al.*, 2014). Se lo ha clasificado de dos formas:

1.1.2.1 Endémica: Su prevalencia está alrededor del 5 % de la población, de los países que se encuentran en los trópicos, donde está incluido Ecuador (Keiser & Nutman, 2004).

1.1.2.2 Esporádica: La prevalencia es del 1 % y se debe a inmigrantes de países donde la prevalencia es endémica, que son atendidos en países que están fuera de los trópicos (Keiser & Nutman, 2004).



1.1.3 Diagnóstico Clínico.

Una vez infectado por *S. stercoralis*, la mayoría de pacientes, no presentan ningún cuadro de sintomatología. El diagnóstico de Estrongiloidiasis se lo realiza

comúnmente en fases avanzadas, donde el paciente presenta problemas gastrointestinales severos e insuficiencia respiratoria (Makker *et al.*, 2015).

1.1.3.1 Autoinfección.

En el cuadro clínico agudo, las manifestaciones están asociadas a la migración de la larva desde el contagio por medio de la dermis hasta el intestino delgado, existiendo irritación dérmica y de la tráquea y por último, síntomas gastrointestinales como: diarrea, vómito, dolores abdominales, entre otros. En estos casos, se realiza exámenes coprológicos y la administración de ivermectina, con una dosis de (200 ug/kg) durante dos días (Makker *et al.*, 2015).

1.1.3.2. Hiperinfección.

En el cuadro clínico crónico, las manifestaciones sintomáticas son similares a la autoinfección. La diferencia se debe, a que está asociado a infecciones bacterianas o víricas previas o posteriores a la infección con *Strongyloides stercoralis* (Puthiyakunnon *et al.*, 2014).

En estos casos, se realiza exámenes coprológicos, identificado larvas L1 de machos adultos característicos del género *S. stercoralis*. También está relacionado con eosinofilia, debido a que estas células, son las encargadas de la respuesta inmune frente a helmintos (Buonfrate *et al.*, 2013).

1.1.4 Tratamiento.

Diversidad de fármacos se ha utilizado a través del tiempo, desde el uso de plantas medicinales, hasta el uso de parasiticidas con gran espectro de acción donde se incluye a la ivermectina, albendazol como fármacos tradicionales más usados en cuadros de padecimientos con Estrongiloidiasis (Anselmi *et al.*, 2015).

1.1.4.1 Uso de Fármacos e Inmunomoduladores Anti helmintos.

1.1.4.1.1 Ivermectina.

El primer fármaco descrito fue thiabendazol, pertenecientes al grupo de Benzimidazoles en los cual también pertenecen la ivermectina y albendazol. Fue usado frente a la parasitosis causada por el geohelminto *S. stercolaris* (Henriquez-Camacho *et al.*, 2016), a una dosis óptima de 200 ug/kg/día para atacar a los receptores de cloro de la hembra partenogenética, con un tiempo de acción de 48 horas, reduciendo en un 80 % de los casos tratados (Kearns *et al.*, 2015).

Se administra en pacientes con estrogiloidiasis diagnosticados con hiperinfección inmunodeprimidos, donde la acción por parte de interleucinas (IL-33, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10) propias de la respuesta Th2 de las células inmune, son bajas, disminuyendo la cantidad de larvas L1 en los pacientes (Salles *et al.*, 2013).

1.1.4.2 Nuevas Terapias Alternativas.

1.1.4.2.1 Inulina.

La inulina es un oligosacárido de tipo fructano, su composición química es β -D-(2 \rightarrow 1) fructosil fructosa unida α -D-glucosa, que se encuentra en la mayoría de plantas como: cebolla, ajo, espárragos, alcachofas, pero la mayor concentración de este oligosacárido, se encuentra en las raíces de anchicoria (*Cichorium intybus*) (Franck, 2002).

También es considerado un prebiótico para uso terapéutico, en especial en enfermedades gastrointestinales (Kelly-Quagliana, Nelson, & Buddington, 2003), debido a que muchos de estos patógenos, poseen receptores para las cadenas de polisacáridos y monosacáridos en su membrana, lo que permite su colonización en la

microbioma del intestino, pero mediante la ingesta de inulina, disminuye la población de *E.coli* y *Salmonella* sp en el microambiente gastrointestinal, al no poseer adherencia al sustrato en relación con bacterias lácticas y bifidobacterias (Watson *et al.*, 2013), esto se sustentó mediante un estudio de pirosecuenciación de 16S ARNr y análisis de datos metagenómicos, reportándose un alto porcentaje de Bifidobacteriaceae y Lactobacillaceae (Garcia-Mazcorro, Barcenas-Walls, Suchodolski, & Steiner, 2017).

Estructura química de la Inulina.

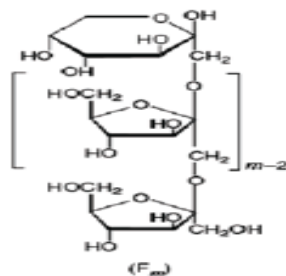


Figura 3. Estructura de la Inulina. La Inulina es un oligosacárido de tipo fructano, su composición química es β -D-(2 \rightarrow 1) fructosil fructosa unido a la cadena α -D-glucosa.

Fuente: (Muñoz, Molina, & Sepúlveda, 2012).

Su efecto inmunomodulador, es mediante la regulación de la participación de los macrófagos en la defensa del organismo (María de los Ángeles, 2013), al disminuir la actividad fagocítica de especies reactivas como (ROS y NO) y citocinas como: IL-1B, IL-6, TFG- β propias de la activación clásica de macrófagos (Schepetkin & Quinn, 2006), debido a que este liposacárido no tiene afinidad por los receptores TLR4, CD14, CD11b/CD18, que activan a estos genes encargados de la respuesta Th1 en el hospedero (Skwarczynski, 2017), favoreciendo la formación de granulocito/macrófago para la expulsión de helmintos en la mucosa intestinal (Paturi, *et al.*, 2015).

1.2 Rol de los Macrófagos frente a Parásitos Gastrointestinales.

Los macrófagos son conocidos por su rol en la respuesta inmune como células mononucleares con una alta actividad metabólica, conteniendo organelos como aparato de Golgi, mitocondrias con actividad peroxidasa, receptores Fc del complemento tipo I y II (MSHI –MSH II), lisozimas, fagosomas que poseen actividad quimiotaxis en presencia de factores extraños al organismo, siendo la principal acción para la fagocitosis (Martínez & Gordon, 2014). También son responsables del efecto inflamatorio local en tejidos, órganos dianas de algunos microorganismos, nematodos, helmintos en su ruta de infección (Vida *et al.*, 2017).

1.2.1 Macrófagos residente de tejidos.

Los macrófagos residen de forma libre en los tejidos broncoalveolares, la cavidad peritoneal, en la epidermis en conjunto con células de langerhans, en el tejido nervioso en conjunto con las células de la microglía y en órganos como el bazo, páncreas, riñón y el sistema cardiovascular (Swirski, Robbins, & Nahrendorf, 2017). En estos tejidos, las dos poblaciones de macrófagos (originarios del saco vitelino, como los derivados de monocitos) proliferaran, maduraran, circulan y se mantienen hasta la edad adulta (Okabe & Medzhitov, 2016 y Varol, Mildner, & Jung, 2015). A partir del tercer día de nacimiento, los macrófagos derivados de monocitos colonizan el tejido embrionario y difieren con el desarrollo de los procedentes del saco vitelino, mediante señales de diferenciación conocidas como: Unidades Formadoras de Colonias (M-CFU) (Lavin *et al.*, 2014), para que las dos poblaciones adopten un fenotipo estable ante la respuesta de interleucinas, factores de crecimiento, mediadores químicos y agentes extracelulares (Schneider *et al.*, 2014), que polarizan a los macrófagos y modulan su expresión génica dependiente del microambiente (Guilliams *et al.*, 2013), generando

una identidad específica para cada macrófago residente en cada tejido (Gosselin *et al.*, 2014). Cumple con su actividad fagocítica, permitiendo una retroalimentación negativa a los procesos inflamatorios y de infección generado por agentes extracelulares como bacterias, helmintos, virus, protozoos y agentes externos (Perdiguero & Geissmann, 2015).

Por su alto potencial de proliferación, los macrófagos, que se encuentran en la zona dérmica, corteza cerebral, zona pleural y cavidad peritoneal, remplazan a los macrófagos residentes por procesos naturales de envejecimiento celular (Bain *et al.*, 2016).

Durante una respuesta inflamatoria aguda, los macrófagos derivados de monocitos y macrófagos residentes, actúan a la par, manteniendo la homeostasis celular en la zona de infección. De igual forma, la respuesta frente a una infección causada por helmintos, los macrófagos son reclutados a la zona pleural y cavidad peritoneal, respondiendo a la fase Th2, por la acción de citoquinas reguladoras de la inflamación como IL-4 e IL-13, previo a su acción de fagocitosis mediada por citoquinas inflamatorias como IFN γ , TNF y IL-2 (Jenkins *et al.*, 2013).

1.2.2 Macrófagos derivados de Monocitos.

Los macrófagos derivados de monocitos, son reclutados durante una inflamación local y se encuentran en gran número en los tejidos lesionados de la cavidad peritoneal y zona pleural durante una infección aguda causada por agentes externos (Davies *et al.*, 2014). Estudios realizados con ratones BALB/c inducidos por LPS/CD14, ratones transgénicos que bloquearon el receptor CD18/CD11b y ratones KO IL-10, llegaron a la conclusión que la mayoría de esta población de macrófagos que se encuentran durante una infección aguda, son reclutados mediante la activación de macrófagos

residentes presentes en estos tejidos y por medio de interleucinas como: IFN α /IL-4/IL-13 y otros componentes celulares como: neutrófilos y mastocitos, que libran especialmente IL-10 como mediador proinflamatorio (Ajuebor *et al.*, 2017). Esto se comprobó, debido a que en ratones como en humanos, los monocitos presentan dos tipos de receptores característicos que son: CD11b y un receptor para quimiocinas de clase dos CCR2 y también se caracterizan por sus altos niveles de expresión del gen *ly6c*, característico de diferenciación de monocitos a macrófagos. De esta forma representan del 2 % al 5 % de monocitos que circulan en el torrente sanguíneo y son reclutados al sitio de infección (Serbina, Jia, Hohl, & Pamer, 2008).

De igual forma un estudio reciente examinó el modelo de diferenciación en monocitos, para extrapolar los datos a test en humanos, utilizaron los factores de transcripción MafB y IRF4, determinaron que, mediante el receptor Hidrocarburo de Aro (AHR) presente en los monocitos y citoquinas presentes en el microambiente de la inflamación como: IL-4, TNF α , indujo la expresión de IRF4 + MafB, siendo los dos son requeridos para la diferenciación en macrófagos derivados de monocitos y células dendríticas (Dc) (Goudot *et al.*, 2017).

Diferenciación de monocitos.

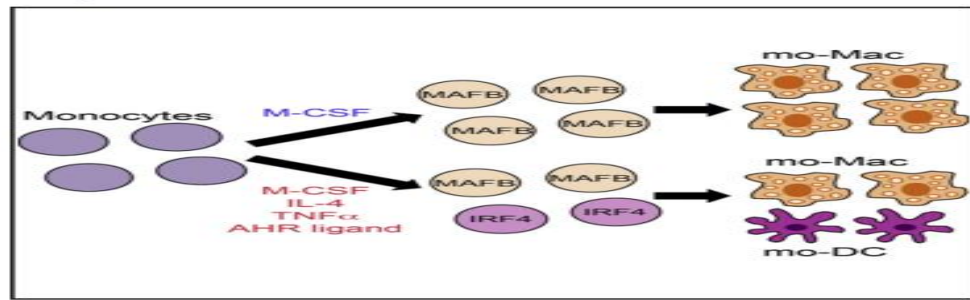


Figura 4. Diferenciación de monocitos. Los monocitos que circulan en el torrente sanguíneo, mediante la estimulación de factores de transcripción, factores de crecimiento, interleucinas, polarizan sus membranas, para diferenciación y maduración de células dendríticas (Dc) o macrófagos (M).

Tomado de: (Goudtet *et al.*, 2017).

Un estudio realizado con *Toxoplasma gondii*, utilizando ratones deficientes del receptor CCR2/CCL2, se vio reducida la actividad de LY6C, fundamental en la expresión de varias células mieloides, al contrario de los ratones normales, en los cuales, se activó la ruta clásica en macrófagos derivados de monocitos parte LY6C, al ser reclutados en la cavidad peritoneal, donde se aloja el protozooario, produciendo TNF α y la expresión de iNOS, al polarizar su membrana para la actividad de fagocitosis. Demostrando que el reclutamiento de macrófagos derivados de monocitos durante una infección, es dependiente de los receptores CCR2/CCL2 (Shi & Pamer, 2014).

Linaje de células fagocítica mononucleares.

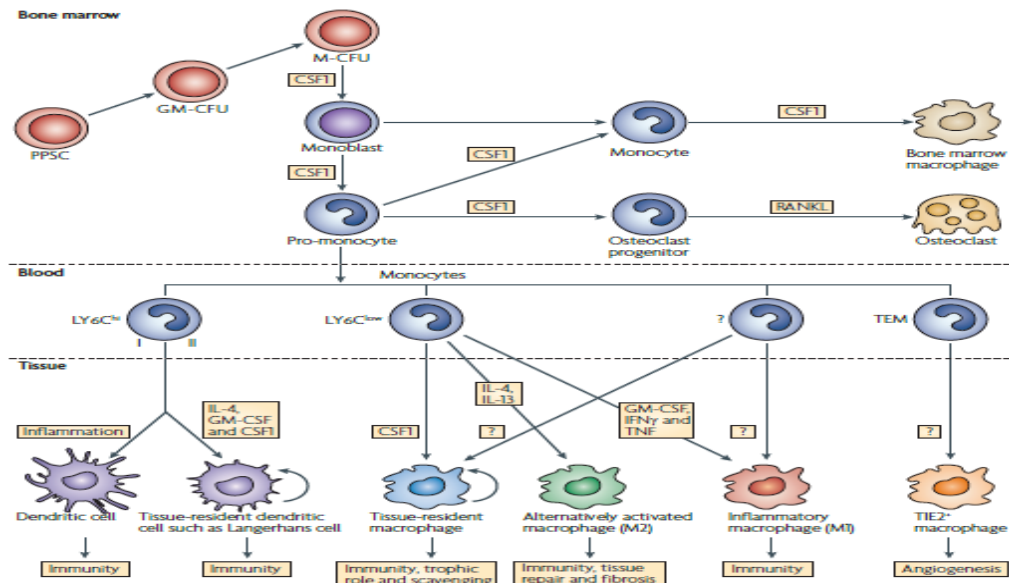


Figura 5. Linaje de células mononucleares. Las células fagocíticas mononucleares (MPS) comienzan su desarrollo en la médula ósea, convirtiéndose en células pluripotentes (PPSc), seguido por la estimulación de factores como: Las unidades formadoras de colonias de granulocito/macrófago (GM-CFU) que convierte las células adiferenciadas derivadas de las células madre en monoblastos. Mediante el factor estimulante de colonias (CSF-1), llega a desarrollarse como pro-monocito y monocito, convirtiéndose al final en macrófagos derivados de la médula ósea, los cuales se diferencian de los osteoclastos por factores de transcripción y el receptor para el factor NFκB. Los monocitos circundantes en el torrente sanguíneo, en estudios *ex vivo*, han comprobado, mediante el uso de marcadores como LY6C+, que activa los receptores para las quimiocinas denominado CXCR2, los cuales lo diferencian en células dendríticas (Dc) o macrófagos (M1-M2) dependiendo de factores de transcripción, factores de crecimiento e interleucinas como: (IFNγ – TNFα- IL-4/IL-13), las cuales activan a los macrófagos para los diferentes procesos como: inflamación, lesión de tejidos, reparación celular, inmunidad y fibrosis.

Fuente: (Pollard, 2009).

1.2.3 Activación de Macrófagos mediante la Vía Clásica.

La activación clásica, también denominada como (M1), es propia de infecciones bacterianas y agentes víricos (Goudot *et al.*, 2017), activando a las células linfoblásticas residentes en los tejidos a secretar citocinas inflamatorias para la respuesta Th1 en el hospedero (Davies & Taylor, 2015). Siendo las principales: IFNγ, que es secretado por las células Natural Killer (Gasteiger & Rudensky, 2014) y TNFα por neutrófilos (Kolaczowska & Kubes, 2013), los cuales polarizan las membranas de los macrófagos, activándoles para participar como la primera línea de defensa frente

a agentes extraños, produciendo interleucinas como: IL-1B – IL-6 y mediadores químicos como óxido nítrico ON que juegan un papel importante frente a la infección causada por patógenos (Ando, Oku, & Tsuji, 2016).

1.2.3.1 Biosíntesis de Óxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS)

El Óxido Nítrico (ON), es un compuesto bioquímico característico de la participación de los macrófagos en fase M1, en acción frente al cualquier patógeno externo (Vida *et al.*, 2017). La enzima encargada de la producción es la Óxido Nítrico Sintetasa, conocido por sus siglas en inglés como (NOS), se clasifican en tres grupos, como lo describe en Tabla. 2. El óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), que a diferencia de sus análogos óxido nítrico endotelial (eNOS) y óxido nítrico neuronal (nNOS), no depende de la regulación de Calmodulina ni Ca^{++} citosólico (Ulrich & Sessa, 2012), este comprenden de 82 a 508 residuos, contiene un complejo catalítico con dominio protoporfirina IX de Hierro (HEM), nucleótidos flavínicos (FMN) y dinucleótidos Flavínicos (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH) (Fischmann *et al.*, 1999).

La detención de ONS en el hospedero, se lo realiza a nivel molecular, mediante técnicas de confirmación como: Reacción de Griess, para detección de nitritos en la sangre o macrófagos en medio de cultivo, Microscopía de Fluorescencia *in situ*, Western Blot o análisis de la expresión del gen *NOS2* mediante PCR Tiempo Real (Ruano, 2008).

Tabla 2.

Distribución celular de las Isoformas de NOS.

Isoformas del gen	Tipo de Expresión y Células que lo expresan
NOS	<i>Neuronal Óxido Nítrico Sintetasa/ Dependiente de Ca⁺⁺ y Calmodulina</i>
<i>NOS1</i>	Neuronas, Cardiomiocitos, Queratinocitos, Neutrófilos, Hepatocitos, Células del músculo Esquelético.
	<i>Inducible Óxido Nítrico Sintetasa/ Expresión inducible</i>
<i>NOS2</i>	Macrófagos, Macrófagos Alveolares, Células Endoteliales, Células de Kupffer, Neutrófilos, Células del Músculo Liso, Mastocitos
	<i>Endotelial Óxido Nítrico Sintetasa/ Dependiente de Calmodulina</i>
<i>NOS3</i>	Células Endoteliales, Células Epiteliales Bronquiales, Eosinófilos, Fibroblastos, Mucosa Gastrointestinal, Hepatocitos, Linfocitos, Neutrófilos.

Nota: Los información se obtuvo del trabajo realizado por Ulrich F & Sessa W (2012).

La biosíntesis de Óxido Nítrico (ON) es regulado a través de receptores de membrana que actúan en conjunto en la respuesta inflamatoria por parte de los macrófagos, los cuales son: Toll-Like, CD14, Lipopolisacárido (Mancek-Keber *et al.*, 2015). La regulación transcripcional más estudiada, es a través de la familia de proteínas STAT, encargada de activar la respuesta clásica de macrófagos durante una infección (M1), incrementando la actividad citotóxica en ellos. Esta respuesta es promovida por IFN γ , el cual activa la ruta JACK-STAT (*Janus Kinase signal trasducer*) (Kandasamy *et al.*, 2016), que dimeriza STAT1, consecuentemente una cascada de reacciones generan los factores de transcripción para la expresión del gen *NOS2* (Lawrence & Natoli, 2011). Tal como lo indica la Fig.6.

Transducción de señales para las rutas M1 y M2 en la polarización de macrófagos.

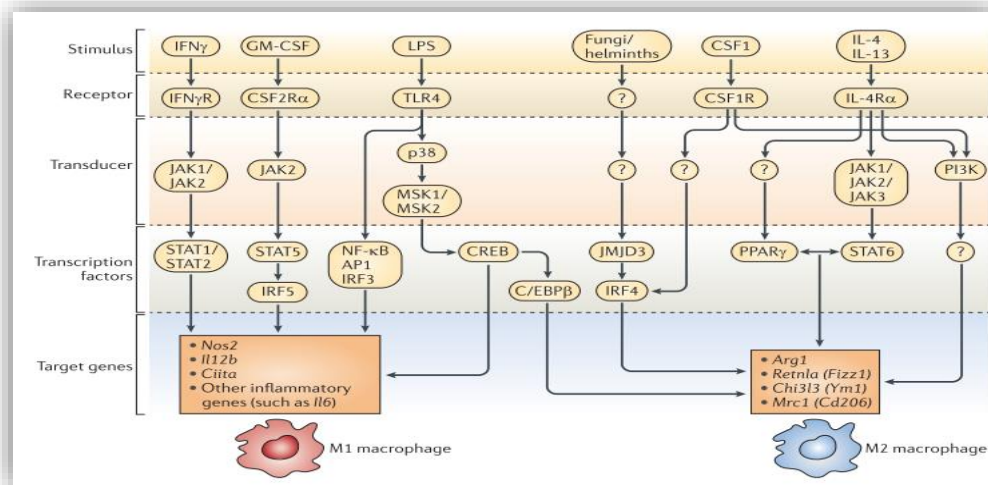


Figura 6. Polarización de macrófagos. Los macrófagos son estimulados por diferentes factores como: agentes externos, productos bacterianos, infecciones, interleucinas y unidades formadores de colonias. Poseen receptores, que activan su respuesta clásica (M1) y alternativa (M2). La primera es dependiente de IFN γ , GM-CSF, LPS/CD14+, TNF α , involucrado en procesos de inflamación y lesión tisular, se caracteriza por la expresión de biomoléculas como *NOS2* e interleucinas como: IL-6, IL-1B, IL-12. La activación alternativa se diferencia en respuesta a (IL-4/IL13, CSF1, infección fúngica y de helmintos) está involucrado en procesos de respuesta a infecciones parasitarias, alergias y reparación celular, se caracteriza por la expresión de genes como *Arg1*, *Fizz1*, *Ym1*, *Mrc1*.

Fuente: (Lawrence & Natoli, 2011).

1.2.3.2 Óxido Nítrico frente a infecciones parasitarias.

Existen varios estudios donde está implicado el óxido nítrico en infecciones parasitarias. Su acción va a depender de la especie de nemátodo en estudio, su ruta de transmisión en el hospedero y el microambiente en donde se desarrollará y se reproduce (Diefenbach *et al.*, 2016).

Estudios realizados en *Toxoplasma gondii*, han detectado la presencia de óxido nítrico como mediador de la inflamación y potenciador de la respuesta innata frente a infecciones parasitarias (Zhao *et al.*, 2013). Un estudio donde utilizaron ratones C57BL/6 deficientes de (IFN γ -/-), producción de (iNOS -/-), examinaron la severidad de la infección mediante examinación histopatológica, y observaron la presencia de

cestodos en el tejido cerebral, debido a que su respuesta frente a la inflamación aguda, fue escasa, al reducirse la actividad fagocítica de los macrófagos, tampoco hubo la presencia de citoquinas como: IL-1B, IL-6, TNF α y especies reactivas de oxígeno citotóxicas del hospedero (Brunet, 2001).

1.2.4 Activación de Macrófagos mediante la Vía Alternativa.

La activación alternativa, también conocida como (M2), a diferencia de la activación clásica, es un campo abierto para ciencias como la transcriptómica y proteómica (Novoselov, Sazonova, Ivanova, & Orekhov, 2015), también para estudios de la respuesta innata, regulada por citoquinas antiinflamatorias como IL-4/IL-13, debido a que estas interleucinas, está relacionada para el reconocimiento del antígeno y la respuesta del hospedero ante alérgenos, obesidad, helmintos, reparación celular, cáncer (Salgame, Yap & Gause, 2016), homeostasis de tejidos durante una inflamaciones producidas durante una infección con agentes externos (Klose & Artis, 2016).

1.2.4.1 Regulación por Citoquinas en la Fase Th2.

Otra interleucina que participa en la fase Th2 de la respuesta innata es IL-10, esta se caracteriza por su efecto indirecto en la activación alternativa en los macrófagos, debido que su acción se centra en las dos fases M1/M2, en la primera regulando el proceso inflamatorio y en la segunda, participando en la diferenciación de las células T reguladoras, que secretan interleucinas como IL-4 e IL-13 que polarizan la membrana en los macrófagos, activando su respuesta alternativa (Anuradha *et al.*, 2015) inhibiendo la expresión de los genes involucrados en los procesos inflamatorios como IL-1B e IL-6, relacionados al receptor LPS/CD14 (Campana *et al.*, 2018).

Participación de la respuesta Th2 frente a helmintos.

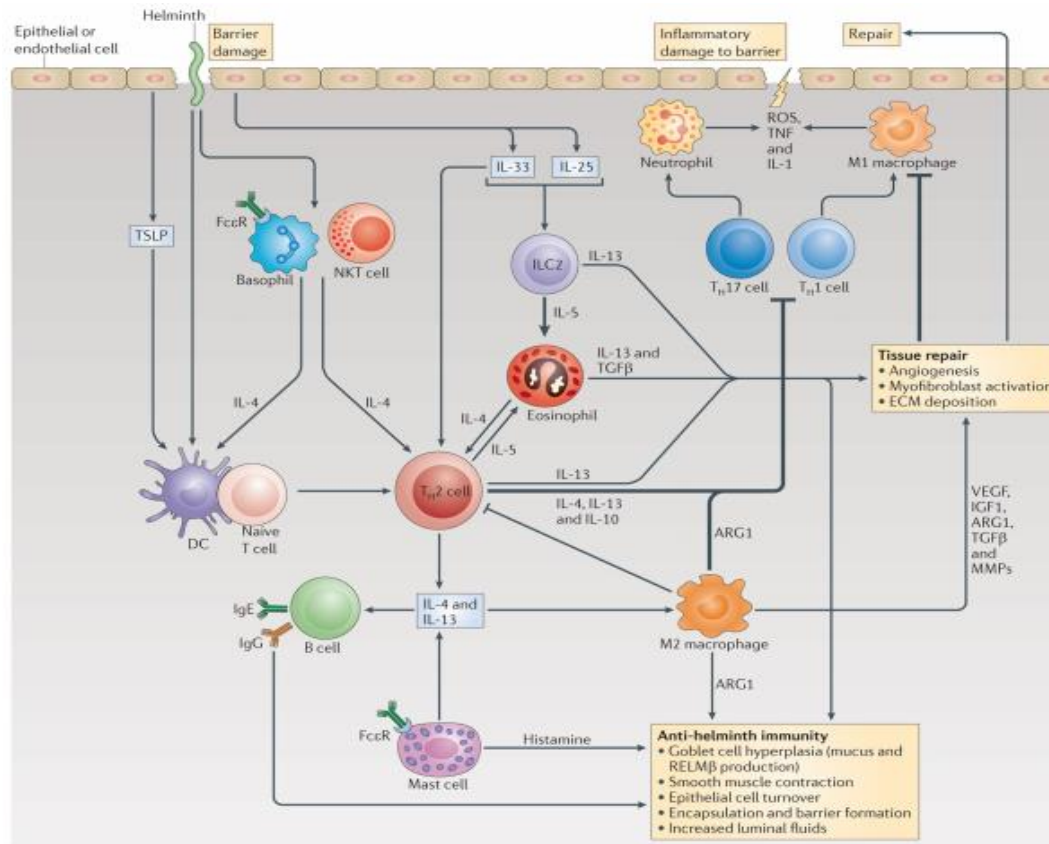


Figura 7. Participación de la respuesta Th2 frente a helmintos. En esta figura se menciona los factores de transcripción, linaje celular, citoquinas cruciales para el desarrollo de la respuesta inmune en contra de helmintos y los mecanismos involucrados para la interacción de la respuesta innata con la adaptativa. Los helmintos al infectar el hospedero, causan daño a la barrera epitelial y endotelial del músculo liso la cual induce a dos respuestas claves: reparación celular y expulsión del parásito mediante la participación de las células colaboradoras mediada por la acción de interleucinas como (IL-4, IL-13, IL-5), las cuales son esenciales para la activación alternativa de macrófagos, en conjunto con la presentación del antígeno a las células B en conjunto con la participación de eosinófilos, basófilos, mastocitos los cuales regulan las citoquinas ya mencionadas.

Fuente:(Allen & Wynn, 2011).

IL-13 e IL-4, comparten el mismo receptor IL-4R α , que activa las señales de fosforilación JACK1/JACK2/JACK3 del factor de transcripción STAT6, permitiendo la diferenciación de las células T reguladoras (Osorio *et al.*, 2012) y el balance entre Th1/Th2 en conjunto con las células T CD4+ (Bouchery *et al.*, 2015) y neutrófilos en activación alternativa (N2) (Mantovani, Cassatella, & Costantini, 2011). Estudios realizados con ratones BALB/c infectados *N. brasiliensis*, donde detectaron la

presencia de genes involucrados en la activación alternativa de macrófagos alveolares como *ym1*, *Arg1*, *fizz1* y *mrc1*, al segundo día post infección y son regulados por los linfocitos T CD4+ e IL-4/IL-13, donde los modelos de estudio adquiriendo una respuesta rápida para la expulsión del parásito (Reece, Siracusa, & Scott, 2006). Un estudio actual en ratones deficientes de *stat6* (-/-), infectados con *Nippostrongylus brasiliensi*, reportaron que macrófagos alveolares (M2), trabajan en conjunto con ILC2 y células TCD4+, generando inmunidad, dependientes de IL-13/IL-4, para expulsión del parásito y procesos post inflamatorios (Bouchery *et al.*, 2015).

1.2.4.2 Síntesis y Metabolismo de Arginasa.

IL-4 e IL-13 regulan la síntesis del gen *Arg1*, a través del mecanismo de competición por el sustrato dependiente de STAT6, esto permite una homeostasis en la activación de los macrófagos durante una infección, al incrementar la producción de Arginasa 1, un inhibidor de iNOS a medida que la infección aguda progresa, favoreciendo la supervivencia del huésped al regular la inflamación en el hospedero, mediante el metabolismo del aminoácido semi-esencial en mamíferos que es L-Arginina (Rath *et al.*, 2014). El cuál es catabolizado en L-Ornitina, consecuentemente en L-Prolina y Poliaminas, las cuales son responsables de la producción de colágeno y proliferación celular (Rodríguez, Maza, Colombet, Fresno, & Poveda, 2018). Tal como lo indica en la Fig. 8.

Metabolismo de L-Arginina.

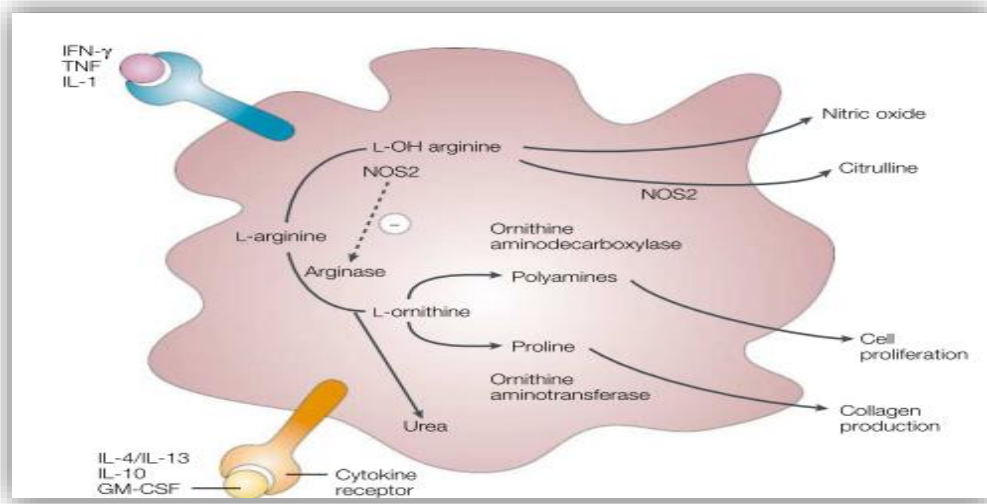


Figura 8. Metabolismo de L-Arginina. L-Arginina es un aminoácido semi-esencial, el cual es metabolizado por dos enzimas: Óxido Nítrico Sintetasa Inducible (iNOS) y Arginasa tipo 1 (Arg1), la primera, por acción de interleucinas de la respuesta inflamatoria, se obtiene L-OH arginina, por medio de la enzima arginina quinasa, convirtiéndose al final en productos metabólicos como: Citrulina y Óxido Nítrico. En el segundo proceso se obtiene L-Ornitina la cual por acción de Ornitinaaminotransferasa se obtiene Prolina y Poliaminas las cuales participan en procesos de proliferación celular y producción de colágeno para la reparación celular.

Fuente: (Martinez & Gordon, 2014).

El otro rol, es la disminución de la inflamación en los tejidos y la reparación celular después de un proceso inflamatorio, esto se ha observado en ratones KO deficientes de RNAmi-R155(-/-), el cuál regula la expresión de *NOS2* y la producción de ON, permitiendo la activación de los macrófagos a la fase (M2) y expresar poliaminas, que facilitan la proliferación celular (Jablonski, Gaudet, Amici, & Popovich, 2016).

Capítulo 2

Marco Metodológico

2.1 Localización.

Este estudio se realizó en los laboratorios de PROPAD-INSPI LIP Zonal 9 (*Programa Nacional para el abordaje Multidisciplinario de las Parasitosis Desatendida en el Ecuador*). Ubicado en la ciudad de Quito (2850 m.s.n.m, 717 hPa) en la dirección: Iquinque N14-e285 y Yaguachi, sector el Dorado.

2.2. Animales.

Se utilizó 20 ratas Wistar machos (200 a 240 g; Charles River Laboratory; UK) cada una de 8 semanas de nacimiento, las cuales fueron obtenidas del bioterio del Proyecto I “Mantenimiento de Ciclos Biológicos” - Programa PROPAD –INSPI LIP.

El procedimiento fue aprobado por el comité de ética animal INSPI LIP, mediante el documento de experimentación animal N° 0-001, aplicando las 3R y seguido por los protocolos y normas establecidas en el bioterio. Los animales se mantuvieron en jaulas estándar de polipropileno con malla metálica para el suministro de agua y comida, que se realizó cada 6 horas, con una cantidad de 30 mL de agua potabilizada y 8 ± 2 g x individuo. Se mantuvo las condiciones de temperatura de 32 °C, luminosidad: 12 horas luz y 12 horas oscuridad con humedad relativa de 34 %.

Los animales de estudio fueron separados de forma aleatoria en cuatro grupos. Un grupo control (Grupo 1), conformado por cuatro ratas Wistar a las cuales no se administró inulina ni fueron infectadas.

El grupo dos conformado por cuatro animales de estudio a los cuales no se les administró inulina y se infectaron con 3,000 iL3 de *S. venezuelensis*. El grupo tres conformado por cuatro ratas tratadas con inulina 5 % (p/v) y sin infección y el último

grupo formado por cuatro ratas de las cuales se les administró inulina 5 % (p/v) de inulina 30 días antes de ser infectados con *S. venezuelensis*. Tal como se lo detalla en la tabla N° 3.

Tabla 3.

Número de individuos por tratamiento.

Grupos de Estudio	Tratamientos	Tratamiento	Número de Individuos
Grupo 1	Control	Sin inulina + sin infección	4
Grupo 2	Tratamiento 1	Sin inulina + infección con 3,000 iL3 de <i>S. venezuelensis</i>	4
Grupo 3	Tratamiento 2	5 % inulina + sin infección	4
Grupo 4	Tratamiento 3	5 % inulina + infección con 3, 000 iL3 de <i>S. venezuelensis</i>	4

Nota: Elaborado por (El autor, 2018)

Además se utilizaron cuatro ratas Wistar para la evaluación del efecto inmunomodulador por parte de la inulina en la respuesta Th1/Th2 de macrófagos alveolares durante 30 días, antes de una infección con *Strongyloides venezuelensis*, estableciendo como indicadores fenotípicos (edad, peso, sexo) para la regulación de la expresión génica en las células inmune.

2.2.1 Administración de inulina a ratas Wistar.

La administración se la realizó 30 días previos a la infección con el parásito de estudio, fue preparado como previamente lo describen Chávez & Marcillo, (2016). Se disolvió 20,80 g de inulina en un volumen de 500 mL de agua estéril autoclavada, agitándose durante 3 minutos en posición vertical y 15 minutos en el agitador magnético a 460

rpm, se incubó a temperatura ambiente durante 6 horas. Luego se añadió en los bebederos de los grupos de ensayo 139 mL de inulina para un volumen final de 625 mL.

2.3 Obtención del parásito y técnicas parasitológicas.

La cepa homogónica de *Strongyloides venezuelensis*, fue obtenida del Departamento de Parasitología de la Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Brasil, la cual se ha mantenido en pasajes sucesivos en ratas Wistar, para el mantenimiento del ciclo biológico del parásito en las instalaciones de PROPAD-INSPI LIP desde el 2016.

Larvas filariforme en estadio L3 de *S. venezuelensis*, se obtuvieron al tercer día mediante coprocultivo de vermiculita de heces de ratas Wistar previamente contagiadas, seguido por la técnica de Baerman modificado, lavándose varias veces con PBS 1X hasta obtener un caldo parasitario limpio. La motilidad de iL3 se observó usando microscopio electrónico a 10X, confirmándose en un 99 % de viabilidad, en cambio el conteo larval se ajustó a una concentración de 3,000 iL3/ mL, siendo el número total de larvas que se infectó en los modelos de estudio mediante inyección subcutánea en la cara interna del muslo (Silva, 2017 y Speich, 2014).

2.3.1 Obtención de los huevos de *Strongyloides venezuelensis*.

Se colocó dos grupos de tres ratas Wistar cada uno previamente infectadas con *Strongyloides venezuelensis* al quinto día post infección en una jaula de polipropileno que contiene una malla metálica en su superficie, lo que facilita la separación y recolección de las heces de los animales. Se ubicó dos tiras de 20 cm de papel filtro humedecido con 200 mL de agua destilada debajo de la malla metálica. Después de 24 horas, se recolecto las heces con una espátula y se colocó en un vaso plástico y a su

vez se homogenizó con una varilla de agitación con vermiculita de proporción (1:1) hasta obtener una superficie sólida. Se incubó a temperatura de 28 °C durante 96 horas.

2.3.2 Obtención de larva infectiva en estadio tres por el método Baerman modificado.

Se recolectó dos capas de gasa estéril de 10 cm² cada una, luego se colocó el coprocultivo con vermiculita en cada una de las gasas, se envolvieron y se colocaron sobre una copa cónica. Posteriormente, se llenó con agua a temperatura de 44 °C y se dejó incubando durante 60 minutos. Luego del tiempo transcurrido, se eliminó las $\frac{3}{4}$ partes de agua y se colocó el sedimento en un tubo de ensayo de 10 mL se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante con una micropipeta y se tomó 25 uL del pellet lavado previamente con PBS 1X para ser colocado en un portaobjetos y observar en el microscopio óptico a 10X y realizar el respectivo conteo y motilidad de larvas L3 para la infección en los grupos de estudio.

2.4 Aislamiento y Cultivo celular de Macrófagos alveolares.

Se siguió los protocolos descritos por (Zhang, 2015 y Farnworth, 2013), aumentando el número de lavados broncoalveolares y modificando la concentración de la tripsina a una concentración de 0,25 % (m/v) para la disgregación celular.

2.4.1 Aislamiento de Macrófagos alveolares.

Un animal de estudio procedente de cada grupo experimental y uno del grupo control, fueron sacrificados los días 1, 3, 7, 10 post infección, mediante inyección intraperitoneal con un volumen total de 3 mL que contenía una sobredosis de los anestésicos acepromacina 10 mg/mL + Kentamina 10 mg/mL (Florentin *et al.*, 2018), causándoles el menor daño y estrés posible.

Posteriormente, se colocó las muestras biológicas pertenecientes a cada tratamiento en la mesa de disección en posición anatómica, se desinfectó con alcohol 70 % y con tijeras de disección, se cortó en dirección perpendicular desde la mandíbula hacia la cavidad torácica y con ayuda de un bisturí, se retiró el tejido cutáneo y subcutáneo. Se realizó un corte vertical en esta zona, para aislar la tráquea e introducir un catéter N° 18 unido a una jeringuilla de 5 mL en la zona de revestimiento traqueal, previamente se realizó un nudo alrededor de los cartílagos traqueales utilizando hilo de sutura de seda 1.0 mm para sujetar el catéter introducido. Se inyectó en el interior 5 mL de PBS 1X libre de Ca^{++} y Mg^{++} con 06mM EDTA a pH= 7, 40 y temperatura de 4 °C y se aspiró con la misma jeringuilla hasta obtener el líquido broncoalveolar, se colocó en un tubo Falcón de 15 mL, previamente pasando por una fina capa de gasa estéril 20x20 mm. Se inyectó 40 mL de la solución salina, mediante 8 lavados respectivamente, rotular y colocar en agua con hielo que se debe mantener a una temperatura a 4 °C.

2.4.2 Cultivo Primario de Macrófagos Alveolares.

Una vez aislados los macrófagos mediante lavados broncoalveolares (LBA). Se centrifugó durante 10 minutos a temperatura de 4 °C y 500 xg, se desechó el sobrenadante y al pellet celular formado se le adicionó 3 mL de medio de cultivo modificado con RPMI-1640 (0,3 g/L de L-glutamina con Bicarbonato de sodio) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 10 uL/mL (1.000 U Penicilina, 1 mg Estreptomicina), 0,3 uL/mL de Fluconazol. Para el conteo y viabilidad celular, se tomó una alícuota de cada muestra y se mezcló con de azul de tritan (0,4 %) en relación (1:10) para el conteo de células totales y (1:5) para el conteo de macrófagos alveolares, colocando 10 uL sobre la cámara de Neubauer y se observó mediante el microscopio electrónico a 10X. Alrededor de 500,000 células/mL fueron suspendidas en una placa

de cultivo de 24 pocillos (Área de 1,93 cm² de superficie/pocillo, volumen de 3,5 mL) y se incubó durante 2 horas a temperatura de 37 °C al 5 % de CO₂ y 20 % de aire.

Posteriormente, se realizaron 4 lavados, cada uno de 1 mL de PBS 1X calentado, para la remoción de células no adherentes, sin tocar el fondo del pocillo de la placa. Para el último lavado, se añadió 500 mL de PBS 1X libre Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ a pH= 7, 6 y temperatura de 25 °C + Tripsina 1X 0,25 % (m/v) (Hartley, 2016 y Anton, 2014) y se incubó la placa a temperatura de 37 °C por 2 minutos (Ruano *et al.*,2012). Luego de sacar la placa, se agitó suavemente para que los macrófagos adheridos se suspendan en el medio con tripsina. Se aspiró y se suspendió en un tubo falcón de plástico, graduado de 15 mL estéril con un volumen de 3 mL de medio de cultivo RPM1 1640 (L-glutamina, Bicarbonato de sodio) suplementado con 10 % de suero fetal bovino, para inactivar a la tripsina (Verneret *et al.*, 2014). Se tomó una alícuota de 2 uL para determinar la viabilidad celular, mediante el uso del microscopio electrónico a 10X. La solución formada se centrifugó a 1200 xg por 5 minutos a temperatura de 4 °C y se desechó el sobrenadante dejando un volumen de 0,2 mL de pellet formado para ser suspendido en un tubo eppendorf de 1,5 mL para la respectiva extracción de ARN (Phelan & May, 2017).

Para los controles de expresión *NOS2* y *Arg1*, se añadió al medio de cultivo modificado 10 ug/mL y 1 ug/mL de lipopolisacárido de *Escherichia coli* serotipo O55:B5 (LPS) y se dejó incubar por 24 horas y 4 horas, respectivamente.

2.5 Metodología para el análisis molecular de *NOS2/Arg1*.

2.5.1 Extracción de ARN Total.

Se utilizó el kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen, USA), siguiendo el protocolo de los fabricantes.

Se adicionó 800 uL de TRIzol y 160 uL de cloroformo, con sus respectivas incubaciones previas, se centrifugo las muestras durante 15 minutos a temperatura de 4 °C y 12,000 x g, se recolectó la fase acuosa que contiene (ARN) y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf adicionando un volumen etanol 70 % de grado molecular, mezclando la solución en proporción (1:1).

Se transfirió un volumen alrededor de 700 uL del precipitado formado en la columna spin, adicionándole 700 uL de Buffer de Lavado I y dos veces 500 uL de Buffer de lavado II con las condiciones de centrifugación descritas en el insertó del Kit. Y por último, se eluyó el ARN extraído con 25 uL de agua libre de ARNasas, incubando durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó, este procedimiento se realizó durante dos veces para aumentar la concentración del ARN. Por último, se almacenó a temperatura de – 80 °C para evitar su degradación.

2.5.2 Cuantificación de ARN total

Se cuantificó la concentración de ARN (ng/uL), densidad óptima (OD) a 230nm - 260nm– 280nm y las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{230}/A_{260} mediante el uso del el equipo NanoDrop *Spectrophotometer 2000c* ThermoFisher, siguiendo los protocolos descritos por los autores (Ogura, 2015; Sellin, 2014 y Simbolo, 2013). Los cuales cuantificaron el ARN Total extraído de macrófagos mediante el uso de TRIzol el cual detallan un valor de $1,6 \pm 2$ para la relación de la absorbancia A_{260}/A_{280} y obtuvieron buenos resultados en las curvas de amplificación de sus muestras.

Se adicionó un volumen de 2 uL de agua libre de ARNasas como “blanco” calibrando el equipo con la concentración de ARN Total. Una vez obtenido la medición anterior, se dispensó en el lente óptico del equipo 2 uL de ARN Total extraído de cada muestra y se procedió a su respectiva medición. El software del equipo automáticamente

calculó la concentración de la muestra de ARN (ng/uL) y sus determinadas absorbancias. Se realizó la cuantificación con tres repeticiones, el promedio de las tres se utilizó para el análisis estadístico.

2.5.3 Retrotranscripción – Síntesis de la cadena de ADN complementario

Se utilizó el kit: Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche, USA), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

En tubo de PCR de 0,2 mL, se desnaturalizó la muestra al adicionar 10 ng/uL de ARN Total + 1uL de oligos (dT₁₈) + 2 uL de hexameros de primers + 1uL de Agua grado PCR durante 10 minutos a 65 °C y 1 minuto a 4 °C. Posteriormente, se adicionó el mix que contiene: 4 uL del Buffer de la transcriptasa, 0,5 uL del inhibidor de ARNasas, 2 uL de Mix de deoxynucleotidos 10mM, 0,5 uL de transcriptasa, se centrifugó brevemente el tubo con la mezcla y se procedió a la transcripción bajo las siguientes condiciones: 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 55 °C y para inactivar la Transcriptasa inversa a una temperatura de 85 °C durante 5 minutos y 4 °C durante 1 minuto. El cDNA se conservó a una temperatura de -20 °C.

2.5.4 PCR Tiempo Real

Las muestras de cDNA que se obtuvieron de los animales de cada grupo de estudio, se amplificaron mediante PCR Tiempo Real, utilizando para la detección SYBR Green I supermix (Bio-Rad, USA) en el equipo CFX96 Touch REAL-Time Detection System (Bio-Rad). Las secuencias y el tamaño del amplicón cada gen de interés se detalla en la tabla 4.

Utilizando el software libre Oligo Analyzer tools, se colocó las secuencias de cada primers para analizar formación dímeros de primers al momento de realizar la PCR en Tiempo Real, Mediante el programa de Nucleotide BLAST Tools, se confirmó la

homología con un valor 100 % de identidad al modelo animal de estudio (*Rattus norvegicus*).

Tabla 4.

Secuencia de los primers utilizados y tamaño del amplicón

Gen	Secuencia Forward- Reverse	Amplicón (pb)	Autor
<i>NOS2</i>	F: 5'-CTGCAGGTCTTTGACGCTCGG-3' R: 5'-GTGGAACACAGGGGTGATGCT-3'	90	(Fenget <i>et al.</i> , 2013)
<i>Arg1</i>	F: 5'- AAAGCCCATAGAGATTATCGGAGGG-3' R: 5'-AGACAAGGTCAACGGCACTGCC-3'	100	(Klasen <i>et al.</i> , 2001)
<i>β-Actin</i>	F: 5'-TGTTGTCCCTGTATGCCTCT-3' R: 5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3'	222	(Elshazly <i>et al.</i> , 2013)

Nota: Elaborado por (El Autor, 2017)

Se estandarizó siguiendo las consideraciones detalladas en los lineamientos de experimentos en PCR en tiempo real (Burns *et al.*, 2005), se utilizó el gen de la *β-Actin* como control interno, esto para determinar si la expresión génica no es afectada en cada tratamiento.

Se paneo las muestras obtenidas de cada ensayo en conjunto con las muestras obtenidas para cada control de expresión, donde se adicionaron las concentraciones respectivas de LPS anteriormente al medio de cultivo. El volumen total de reacción fue de 20 uL, seguido por los siguientes componentes: 5 ng/uL de cDNA, 10 uL SYBR Green I 2X, 0,8 uL de cada cebador 5uM, 3,4 uL de agua grado molecular. Las condiciones de PCR Tiempo Real, se modificaron previo a los autores señalados para cada primer, siendo la desnaturalización inicial con una temperatura de 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 45 segundos a una temperatura de 94 °C, con un gradiente de temperatura de (55 a 58) °C durante 30 segundos, 72 °C por 1 minutos y 4 °C de temperatura de mantenimiento.

2.6 Análisis Estadístico

En este estudio, se planteó tres hipótesis alternativas. La primera, H_{a1} : La administración de inulina 5 % (p/v) altera el metabolismo de los animales de estudio. H_{a2} : La administración de inulina al 5 % (p/v) reduce el efecto inflamatorio causado por una infección parasitaria. H_{a3} : El efecto de la inulina al 5 % (p/v) post infección provoca cambios en expresión de los genes *NOS2* y *Arg1* durante la respuesta innata del hospedero.

Para analizar la distribución normal de los datos se utilizó el test de Normalidad: (*Shapiro-Wilk test -kolmogorov-Smirnov test*) con $*p < 0,05$; $*p < 0,01$ y $** p < 0,001$.

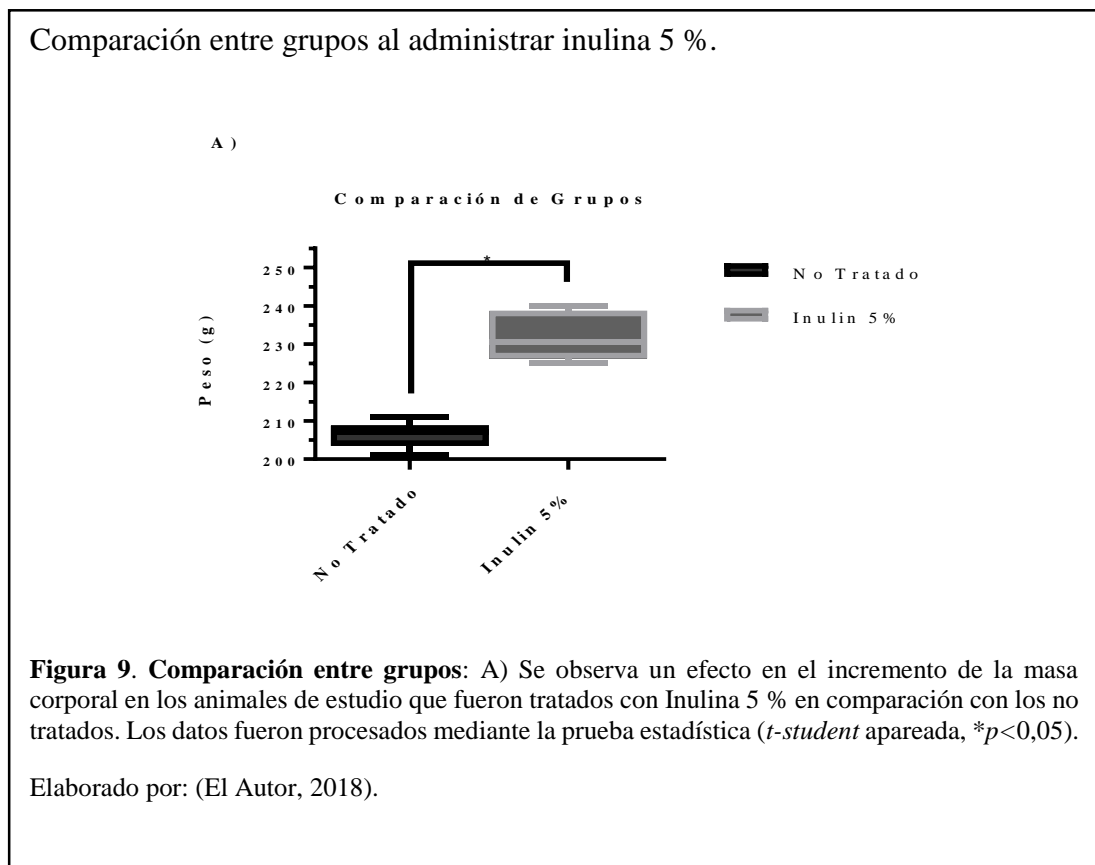
En aquellos casos donde se comparaban dos grupos de estudio y su varianza era similar se aplicó la prueba (*t-student*) (Krzywinski & Altman, 2013). Además, para analizar los datos no paramétricos, se utilizó la prueba estadística del *Chi-cuadrado*, X^2 (Wilcoxon, 2014). Se consideró la diferencia significativa, con el valor de $*p < 0,05$ (Vaux, 2012). Los datos se procesaron mediante (GraphPadPrism versión 7,04 para Windows, GraphPad software, San Diego CA-USA) con licencia de activación, serial número: ACTGP-B7A85F43-DF5EA5E0-34FE3ADF-0C2A5A5C

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1 Administración de inulina 5 %.

Durante las primeras dos semanas de evaluación, no se observó ningún cambio en el incremento de la masa corporal de los animales de estudio, pero a partir de la cuarta semana, los animales pertenecientes al tratamiento dos y tres comparado con el tratamiento uno y el grupo control aumentaron de peso, sin embargo no existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al peso ($p < 0,005$) (Fig. 9), el peso de los dos grupos no superó el límite de 240 g.



Similares resultados se obtuvieron en el estudio realizado por Samuelsson *et al.* (2016), al observar a partir del catorceavo día de tratamiento, un incremento en su porcentaje de masa corporal y según Million *et al.* (2012), donde mencionan que durante las cinco semanas de tratamiento, los modelos murinos de estudio no fueron diagnosticados con obesidad por el efecto prebiótico de la inulina al ser estimulados con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. De igual forma, los animales de estudio no presentaron variación de incremento de masa corporal durante los 30 días previo a la infección con el parásito de estudio.

3.2 Efecto de la inulina en la respuesta inmune frente a *Strongyloides venezuelensis*.

3.2.1 Efecto durante la fase inflamatoria.

Para el estudio de la respuesta innata en los animales de estudio, mediante lavado broncoalveolar (Fig.10), el tratamiento uno presentó un mayor incremento de macrófagos alveolares reclutados en la región pulmonar, con un valor de (172,500) comparado con el tratamiento tres (16,2500) donde se administró inulina previamente. También se evidenció que el tratamiento dos (62,500), superó al grupo control (52,500) en el conteo de macrófagos, debido a que estos últimos no fueron expuestos a una infección con *Strongyloides venezuelensis*, por lo cual la respuesta inmune innata no fue activada. Pero al evaluar los tratamientos dos y tres donde se inmunizó previamente con inulina 5 % se evidenció macrófagos residentes de tejidos como lo indica el estudio realizado por Kelly-Quagliana *et al.* (2003), donde reportaron una mayor actividad de macrófagos residentes de tejidos que macrófagos derivados de monocitos, de igual forma evidenciaron un incremento de poblaciones celulares de la defensa innata en órganos diana que están implicados en procesos de infección

causados por agentes externos. Por esta razón en nuestro estudio la población de macrófagos en el tratamiento uno fue más uniforme que en el tratamiento tres, debido a que los animales de estudio al primer día de infección la defensa innata Th1 se estaban activando tempranamente en el tratamiento uno con la infiltración de monocitos al lugar de infección, a diferencia del tratamiento tres en el cual, debido a la regulación de señales de activación de la defensa innata, permitió al hospedero reaccionar la respuesta Th1 en conjunto con otras células del sistema inmune, esto lo corroboramos al compararlo con el tratamiento dos donde se observó la presencia de células blancas en la región pulmonar, permitiendo al hospedero estar alerta frente a un procesos infeccioso, tal como lo indica en el estudio realizado por Vandeputte *et al.* (2017), donde asociaron la inmunoestimulación con inulina con una mejor respuesta innata, permitiendo una homeostasis de la respuesta Th1/Th2 en cada célula implicada en procesos infecciosos.

Por tal razón en nuestro estudio en el tratamiento dos y tres, a pesar de obtener un menor contaje celular, la inmunomodulación con inulina 5 %, permite activar a todo el complejo celular para una mejor partición de la respuesta innata frente a una parasitemia, lo que no se evidencio en el tratamiento uno.

3.2.2 Efecto durante la fase post inflamatoria.

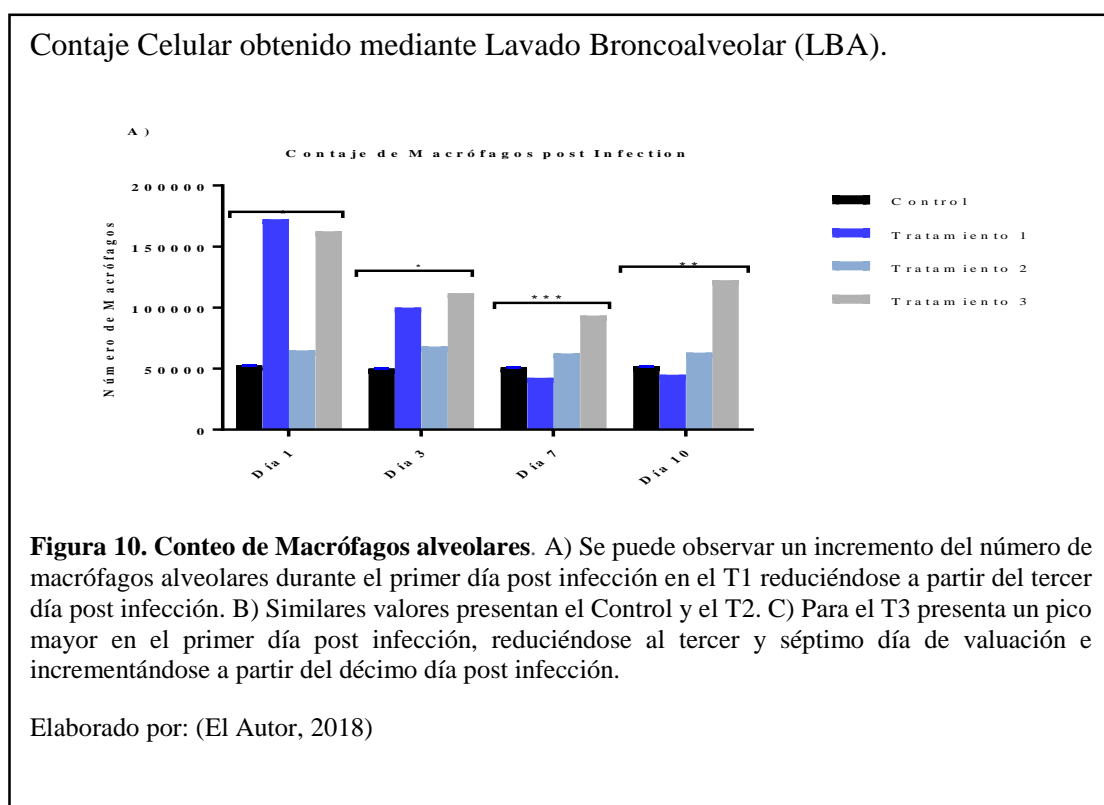
Por parte de la respuesta de los macrófagos alveolares, mediante el conteo de macrófagos, el tratamiento dos y el grupo control obtuvieron valores similares al día uno de evaluación, a diferencia de los tratamientos uno y tres, donde el tratamiento uno presento una disminución de (172,500 a 100,000), en comparación con el tratamiento tres (162,500 a 111.850) al tercer día de infección (Fig. 10), donde evidenciamos la participación de células colaboradoras del sistema innato en el

tratamiento tres, pero no el tratamiento uno. Estas observaciones lo corroboramos con el estudio realizado por Mahalakshmi *et al.* (2014), donde reportaron que la estimulación con inulina, estimula la respuesta Th2 en todas células del sistema innato, lo que favorece la reducción de larvas en el hospedero. También el estudio realizado por Finlay *et al.* (2016) obtuvieron excelentes resultados al exponer a las células de la respuesta innata, incluido a los macrófagos frente antígenos parasitarios, reportando la participación de la respuesta Th2 y la formación del granuloma/macrófago para la temprana expulsión del parásito en el hospedero. Pero en nuestro estudio, al tercer día post infección, evidenciamos la formación del granuloma *in vitro*, al exponer las células reclutadas con las larvas L3 de *S. venezuelensis* al tercer día post infección, que fueron recuperadas mediante lavado bronco alveolar, obteniendo un número mayor para el tratamiento uno (14 L3) al compararlo con el tratamiento tres (9 L3) (Fig.11 A), el tratamiento dos y el grupo control no presento ningún número de larvas aisladas, debido que no fue expuesto a ninguna infección.

Consecuentemente, se observó *in vitro* la inmovilización de la larva L3 de *S. venezuelensis*, obteniendo una mayor respuesta en al tratamiento tres (7) en comparación con el tratamiento uno (5) en el número de granulomas formados, con un valor estadístico de ($p < 0,05$) (Fig.11-B). Por otro lado en el trabajo realizado por Obieglo *et al.* (2016) reportaron que la ausencia de la formación del granuloma en una infección parasitaria causa un cuadro de infección crónica en los animales de estudio ante una infección parasitaria, al no reclutar células colaboradoras Th2 al sitio de infección, otro estudio similar realizado por Ruano *et al.* (2015), menciona que la presencia temprana de especies reactivas en la fase inflamatoria, resulta tóxico para L3 de *S. venezuelensis*, pero no la inmoviliza a la larva L3 de *S. venezuelensis* en su ruta de infección, siendo necesaria la activación alternativa de la respuesta innata Th2.

En nuestro estudio, los resultados obtenidos en la formación del granuloma en el tratamiento tres favorecieron la repuesta alternativa previa administración con inulina a la infección en una proporción (0,8:1) al número de larvas observadas, reduciendo el número de L3 *S. venezuelensis* en el hospedero en su ruta de infección.

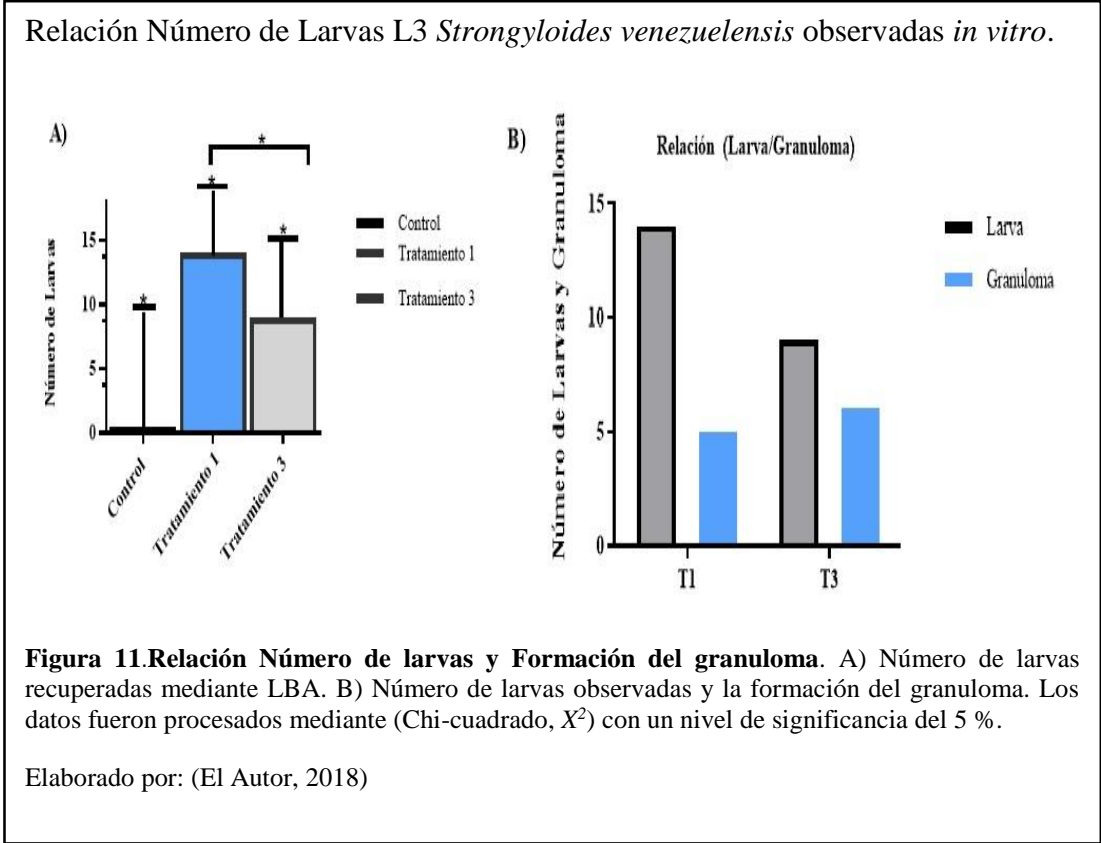
Estos resultados demuestran que la participación de la inulina al tercer día post infección detiene la ruta de infección de la larva L3 *S. venezuelensis* en el hospedero, al evidenciar la formación del granuloma/macrófago *in vitro*, permitiendo una expulsión temprana del parasito de estudio.



En el séptimo día de evaluación, se evidenció una reducción en la zona pleural en los tratamientos uno y tres, obteniendo (42,500) macrófagos alveolares en el tratamiento uno y (53,500) en el tratamiento tres, mientras que el tratamiento dos (62,500) y el grupo control (51,000) mantuvieron similitud en el contaje a los anteriores días (Fig. 10). Similares estudios reportan una disminución de macrófagos alveolares en el área

pulmonar, donde el estudio realizado por Paturi *et al.* (2015) menciona que luego de la formación del granuloma, la respuesta inflamatoria disminuye, con esto también se reduce el número de células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos en el sitio de infección. Otro estudio similar realizado por Gonçalves *et al.* (2008), reportaron que la inactivación de señales para la fagocitosis, reduce la participación de las células de la respuesta innata, permitiendo una mejor recuperación del tejido local inflamado. Pero en nuestro estudio, la reducción de macrófagos alveolares, lo relacionamos con la ausencia de L3 *S. venezuelensis* en el sitio de infección y la muda a hembra partenogénica al final de la ruta de infección en el hospedero, lo que favorece otras señales de regulación para respuesta innata frente al parásito de estudio, con similares resultados al estudio realizado por Shariati *et al.* (2010).

Al décimo día de evaluación, el tratamiento tres, se evidenció un incremento de macrófagos alveolares a partir del séptimo día de infección de (53,500 a 82,500) a diferencia del tratamiento uno, que mantuvo el mismo conteo del séptimo día (45,000), considerándose menor al tratamiento dos (63,100) y el grupo control (52,000) mismos que durante los días de evaluación, no se observó ninguna variación en el conteo de macrófagos aislados (Fig.10). Esto lo corroboramos con el estudio realizado por Esser-von *et al.* (2015) que reportaron la presencia de citoquinas post inflamatorias que regulan la actividad de los macrófagos derivados de monocitos, disminuyéndolos a estos en la zona donde hubo infección parasitaria. Por esta razón en el tratamiento uno no hubo una recuperación celular luego del proceso inflamatorio, que al contrario del tratamiento tres la regulación de todas las señales en el compartimiento pulmonar favoreció la respuesta inmunitaria al incrementarse macrófagos en la zona pulmonar como en el trabajo realizado por Shariati *et al.* (2010).



3.3 Expresión de *NOS2/Arg1* en macrófagos alveolares

3.3.1 Controles positivos.

En las muestras utilizadas como controles positivos (LPS en el medio de cultivo), los macrófagos respondieron con un incremento y activación de la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios, lo que demuestra que la técnica utilizada para estimular la expresión génica en los controles positivos fue exitosa.

Du *et al.* (2013) potencializaron la expresión de mediadores químicos como óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno al adicionar 10 ng/uL de LPS. En el experimento realizado para uno de los controles positivos, se detectó una mayor expresión de *NOS2*, al estimular a los macrófagos alveolares durante 24 horas de incubación con la misma concentración de LPS.

Pero a una concentración 1ng/uL de LPS, se detectó la presencia de *Arg1* durante las primeras 4 horas de estimulación, similar a lo encontrado en el trabajo realizado por Gundra *et al.* (2017), donde los macrófagos en la cavidad peritoneal expresaron mayoritariamente *Arg1*, de igual forma un trabajo realizado por Cui, Banerjee, Guo, Xie, & Liu (2018), los macrófagos expresaron genes involucrados en los procesos proinflamatorios, relacionados con la activación alternativa (M2).

3.3.2. Expresión de *NOS2* durante la respuesta inflamatoria.

La expresión de *NOS2* fue detectada los días uno y tres de evaluación posterior a la infección con el parásito de estudio, en los tratamientos uno y tres (Fig. 12). Diefenbach *et al.* (2016), detectaron la expresión de *NOS2* en macrófagos durante las primeras 24 horas post infección, permitiéndole al hospedero reaccionar frente al parásito de estudio mediante la activación clásica (M1), similar resultados se presentaron en este estudio, al detectar la expresión de *NOS2*, en los tratamientos uno y tres, tempranamente en el tratamiento uno, con un valor de (Ct=25,77) en comparación con el tratamiento tres (Ct=26,34), esto se debe a que el tratamiento tres al ser inmunomodulado con inulina previamente, favorece a la respuesta innata de la fase Th2 en el hospedero como lo resalta el estudio realizado por Shokryazdan, Faseleh Jahromi, Navidshad, & Liang (2017) con similar efecto en el tratamiento dos el cual no se detectó la expresión de *NOS2* en los macrófagos alveolares. Pero la primera respuesta frente a una parasitemia es la fase Th1 lo menciona el estudio realizado por Esser-von *et al.* (2015), que a diferencia en nuestro estudio, atribuimos una regulación de la respuesta innata de Th2 a Th1 para combatir al parásito de estudio en el tratamiento tres a diferencia en el tratamiento uno, el cual se activó tempranamente.

Amplificación de Óxido Nítrico Sintetasa inducible.

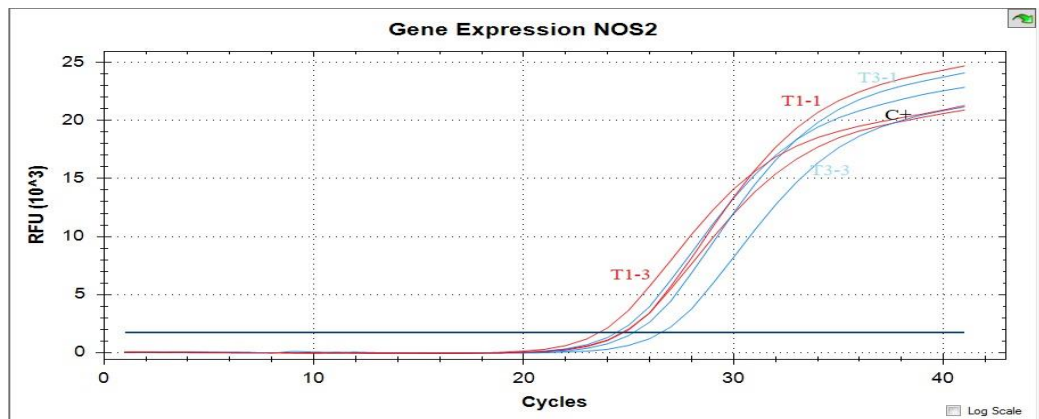


Figura 12. Amplificación NOS2. Ct generados durante el primer y tercer día post infección, siendo los valores: T1-1 (25,77), T3-1 (26,34); T1-3 (25,98) y T3-3 (25,98), no se expresó en controles ni en el T2, el control positivo se utilizó LPS 10 ng/uL (Ct=25) y control negativo LPS 1 ng/uL (Ct=0).

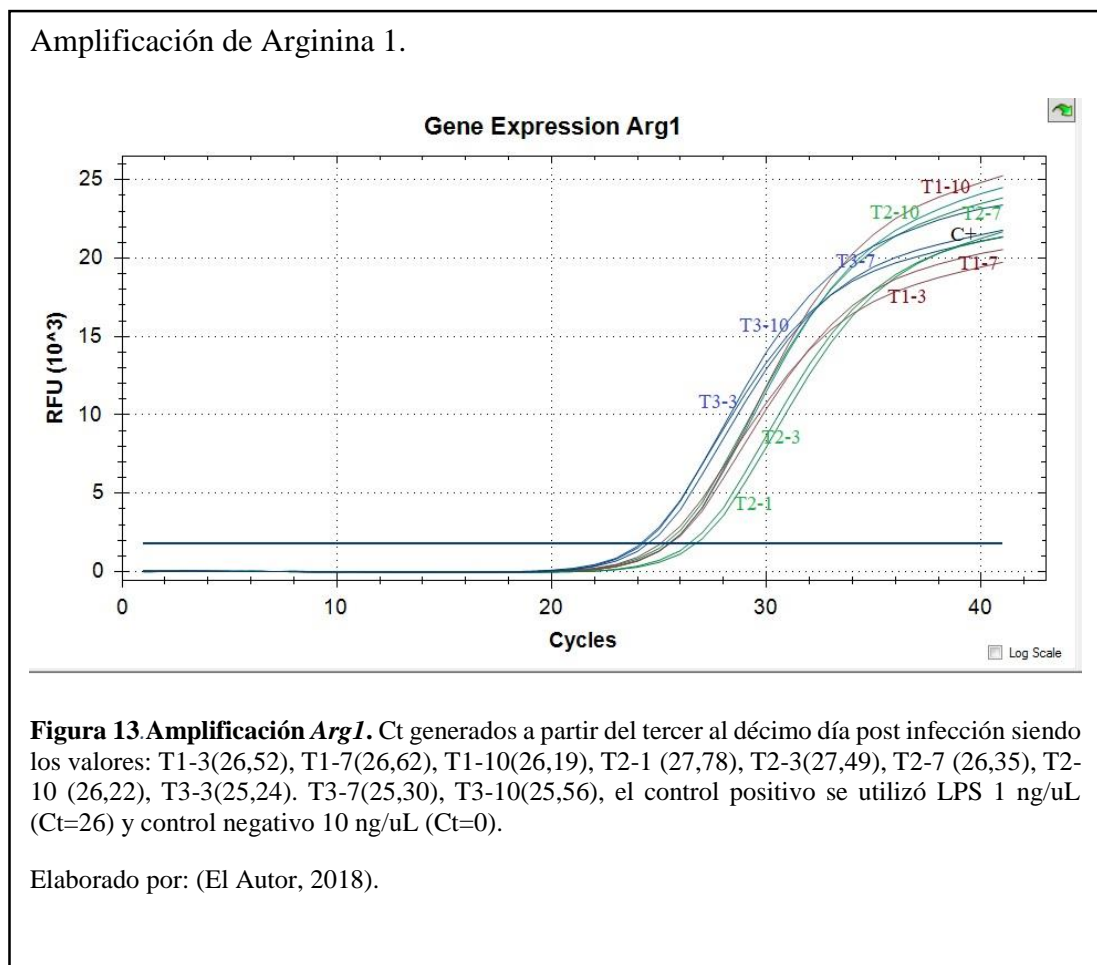
Elaborado por: (ElAutor, 2018).

3.2.3. Expresión de *Arg1* durante la respuesta inflamatoria.

Durante el primer día post infección, no se detectó la expresión de *Arg1*, resultado similar al trabajo realizado por Huang *et al.* (2014), donde demostraron que la producción de ON permite la infiltración de neutrófilos y eosinófilos al compartimiento pulmonar, favoreciendo la respuesta innata Th2 a partir de las 60 horas post infección, por esta razón en nuestro estudio se amplificó *Arg1* al tercer día post infección con una detección temprana para el tratamiento tres (Ct = 25,24) comparando con el tratamiento uno (Ct = 26,52) y el tratamiento dos (Ct = 27,49). Con estos resultados evidenciamos la participación alternativa de los macrófagos alveolares durante los procesos de infección con el parásito de estudio *S. venezuelensis*.

La expresión de *Arg1* a partir del tercer día hasta el décimo post infección, se debe al proceso post inflamatorio en la región pulmonar del hospedero como lo establece el estudio realizado por Chen *et al.* (2012) reportando el aumento de interleucinas de la respuesta innata Th2 como: IL-4/IL-13 a partir del cuarto día post infección,

relacionadas en desactivar la acción fagocitaria de los macrófagos y considerarse factores de transcripción para *Arg1*, que en nuestro estudio se detectó tempranamente en el tratamiento tres (Ct = 25,30) a comparación con el tratamiento uno (Ct = 26,72) y el tratamiento dos (Ct = 27,49), considerándose la inulina como activador temprano de la respuesta alternativa en macrófagos alveolares (M2) frente a la larva L3 del parásito de estudio.



De igual forma el estudio realizado por Machado *et al.* (2017), detectaron la presencia de la interleucina IL-13 al séptimo día de infección, activando macrófagos residentes de tejidos en el sitio donde hubo la infección, obteniendo resultados similares al estudio realizado por Monin *et al.* (2015), donde reportaron que a partir del cuarto al doceavo día de infección parasitaria tarda el proceso post inflamatorio y lo

comprobamos en nuestro estudio al detectar en los macrófagos alveolares la amplificación de *Arg1*, siendo mayoritario para el tratamiento tres (Ct = 25,56) que para el tratamiento uno (Ct = 26,19) y tratamiento dos (Ct = 26,22), los cuales lo atribuimos a la reducción de macrófagos derivados de monocitos presentes en la zona pulmonar. Los resultados de este estudio permiten comprobar que la inmunomodulación de la inulina en el hospedero confiere una resistencia natural frente al parasito de estudio, como lo indica el estudio realizado por Rodri, *et al.* (2018), donde reportaron que la expresión temprana de *NOS2* y consecuentemente *Arg1* permite al hospedero combatir la parasitemia.

Conclusiones

Se evidencio un cambio en la expresión de los macrófagos alveolares, detectando la presencia de *NOS2* durante las primeras 72 horas post infección y relacionarlo con la activación clásica (M1) en el tratamiento tres donde previamente se administró inulina 5 %.

Se evidenció la participación de macrófagos en conjunto con otras células T colaboradoras, para la formación del granuloma e inmovilizar al parásito durante su ruta de infección, ejerciendo una mejor respuesta en el tratamiento tres.

Se observó, un aumento de células inmune en el compartimiento pulmonar al décimo día post-infección en el tratamiento tres, reduciendo el efecto inflamatorio causado por la infección parasitaria, a partir del séptimo día, por esta razón, el efecto inmunomodulador de parte de la inulina, puede ser utilizada para pacientes con autoinfección de *S. stercoralis*, al evitar nuevamente el paso de la larva infectiva filariforme (iL3) por los pulmones.

Se observaron cambios a nivel molecular en el hospedero al infectar e inmunomodular, amplificándose mayoritariamente *Arg1* en los macrófagos alveolares en el T3, a diferencia del T1, pero fue necesario primero la participación clásica (M1) previa a la alternativa (M2) para conferirle una resistencia natural, inmovilización de la larva, reducción de la inflamación y expulsión temprana del parásito.

Recomendaciones

Utilizar otros biomarcadores de expresión para identificar la participación alternativa frente al parásito de estudio, donde se identifique genes como *mrc1*, *ym1*, *fzz1*, si están involucrados en la formación del granuloma, adhesión a los receptores de la larva filariforme (iL3) de *Strongyloides venezuelensis*.

Realizar un estudio donde involucre del cuarto al séptimo día post infección, para identificar la participación de otras células inmune, especialmente de neutrófilos y eosinófilos, para identificar otras señales moleculares que estén afectando en la regulación génica en macrófagos alveolares frente a una parasitosis.

Utilizar técnicas como Citometria de Flujo, utilizando marcadores como (CD4+) para cuantificar todas las subpoblaciones de linfocitos en el hospedero, identificando las diferentes anomalías en la interacción del sistema innato con el adaptativo a través de la presentación del antígeno por parte de macrófagos como de las células dendríticas. Para el seguimiento de la formación del granuloma/macrófago mediante el uso de anti (CD4 %/CD44 %) obteniendo una muestra de la sangre periférica del hospedero.

Bibliografía

- Ajuebor, M. N., Das, A. M., Virag, L., Flower, R. J., Szabo, C., & Perretti, M. (2017). Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: Evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *The Journal of Experimental Medicine*, *162*(1), 1685–1691.
- Allen, J. E., & Wynn, T. A. (2011). Evolution of Th2 immunity: A rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathogens*, *7*(5), 5–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002003>
- Ando, Y., Oku, T., & Tsuji, T. (2016). Platelet supernatant suppresses LPS-induced nitric oxide production from macrophages accompanied by inhibition of NFκB signaling and increased *arginase-1* expression. *PLoS ONE*, *11*(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162208>
- Anselmi, M., Buonfrate, D., Guevara Espinoza, A., Prandi, R., Marquez, M., Gobbo, M., Bisoffi, Z. (2015). Mass Administration of Ivermectin for the elimination of Onchocerciasis significantly reduced and maintained low the prevalence of *Strongyloides stercoralis* in Esmeraldas-Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004150>
- Anuradha, R., Munisankar, S., Dolla, C., Kumaran, P., Nutman, T. B., & Babu, S. (2015). Parasite Antigen-Specific regulation of Th1, Th2, and Th17 responses in *Strongyloides stercoralis* infection. *The Journal of Immunology*, *195*(5), 2241–2250. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500745>
- Bain, C. C., Hawley, C. A., Garner, H., Scott, C. L., Schridde, A., Steers, N. J., ... Jenkins, S. J. (2016). Long-lived self-renewing bone marrow-derived

- macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nature Communications*, 7(11852), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms11852>
- Bava, B. A. J., Cecilia, D., & Alcides, T. (2013). Adult female of *Strongyloides stercoralis* in respiratory secretions. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(4), 311–315. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60069-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60069-6)
- Bouchery, T., Kyle, R., Camberis, M., Shepherd, A., Filbey, K., Smith, A., Le Gros, G. (2015). ILC2s and T cells cooperate to ensure maintenance of M2 macrophages for lung immunity against hookworms. *Nature Communications*, 6(6970), 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms7970>
- Brunet, L. R. (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology*, 1(8), 1457–1467. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00090-X)
- Buonfrate, D., Requena-Mendez, A., Angheben, A., Muñoz, J., Gobbi, F., Van Den Ende, J., & Bisoffi, Z. (2013). Severe strongyloidiasis: A systematic review of case reports. *BMC Infectious Diseases*, 13(78), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-78>
- Burns, M., Nixon, G., Foy, C., Harris, N., Artlett, C., Dito, C., Keer, J. (2005). Standardisation of data from Real-Time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnology*, 5(31), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-31>
- Campana, L., Starkey Lewis, P. J., Pellicoro, A., Aucott, R. L., Man, J., O’Duibhir, E., Iredale, J. P. (2018). The STAT3–IL-10–IL-6 pathway is a novel regulator of macrophage efferocytosis and phenotypic conversion in sterile liver injury. *The Journal of Immunology*, 200(3), 1169–1187.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701247>

Chávez K, & Marcillo F. (2016). Evaluación del efecto modulador de la Inulina en un modelo de ratones CD1 infectados con *Strongyloides venezuelensis* mediante técnicas moleculares (Tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE(Sangolqui-Ecuador).

Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., Gause, W. C. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature Medicine*, 18(2), 260–266. <https://doi.org/10.1038/nm.2628>

Cholewiński, M., Derda, M., & Hadaś, E. (2015). Review articles Parasitic diseases in humans transmitted by vectors, 61(3), 137–157. <https://doi.org/10.17420/ap6103.01>

Cruz, R. J., Vincenzi, R., & Ketzer, B. M. (2010). Duodenal obstruction - an unusual presentation of *Strongyloides stercoralis* enteritis: a case report. *World Journal of Emergency Surgery*, 5(23), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1749-7922-5-23>

Cui, H., Banerjee, S., Guo, S., Xie, N., & Liu, G. (2018). IFN Regulatory Factor 2 inhibits expression of glycolytic genes and lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses in macrophages. *The Journal of Immunology*, 201(3), 1–14. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1701571>

Dada, E. O., & Aruwa, C. E. (2015). Prevalence of human intestinal helminth parasites among undergraduate students at the off campus (North Gate Area), Federal University of Technology, Akure (Futa), Nigeria. *OALib*, 02(03), 1–6. <https://doi.org/10.4236/oalib.1101399>

Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2014). Tissue-resident

macrophages. *Nature Immunology*, 14(10), 986–995.
<https://doi.org/10.1038/ni.2705>.Tissue-resident

Davies, L. C., & Taylor, P. R. (2015). Tissue-resident macrophages: Then and now. *Immunology*, 144(4), 541–548. <https://doi.org/10.1111/imm.12451>

Diefenbach, A., Schindler, H., Röllinghoff, M., Yokoyama, W. M., Bogdan, C.,
Diefenbach, A.,Bogdan, C. (2016). Requirement for Type 2 NO Synthase for IL-
12 *Science*, 284(5416), 951–955.

Dos Santos, K. R., Carlos, B. C., Paduan, K. S., Kadri, S. M., Barrella, T. H.,
Amarante, M. R. V., ... Da Silva, R. J. (2010). Morphological and Molecular
characterization of *Strongyloides ophidiae* (Nematoda, *Strongyloididae*). *Journal
of Helminthology*, 84(2), 136–142. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09990381>

Du, Z., Liu, H., Zhang, Z., & Li, P. (2013). Antioxidant and Anti-inflammatory
activities of radix isatidis polysaccharide in murine alveolar macrophages.
International Journal of Biological Macromolecules, 58, 329–335.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.037>

Eberhardt, A. G., Mayer, W. E., Bonfoh, B., & Streit, A. (2008). The *Strongyloides*
(Nematoda) of sheep and the predominant *Strongyloides* of cattle form at least
two different, genetically isolated populations. *Veterinary Parasitology*, 157(1–
2), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.019>

Elshazly, S. M., Abd, D. M., Motteleb, E., & Nassar, N. N. (2013). The selective 5-
LOX inhibitor 11-keto- β -boswellic acid protects against myocardial ischemia
reperfusion injury in rats : involvement of redox and inflammatory cascades. *Arch
Pharmacol*, (Ammon 1996). <https://doi.org/10.1007/s00210-013-0885-9>

Esser-von Bieren, J., Volpe, B., Kulagin, M., Sutherland, D. B., Guiet, R., Seitz, A.,

- ... Harris, N. L. (2015). Antibody-Mediated trapping of helminth larvae requires CD11b and Fc γ Receptor I. *The Journal of Immunology*, 194(3), 1154–1163. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401645>
- Feng A, Zhou G, Huang X, Zhang Z, & T, Z. (2013). Inhibitory effect of baicalin on iNOS and NO expression in intestinal mucosa of rats with acute endotoxemia. *PLoS ONE*, 8(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080997>
- Finlay, C. M., Stefanska, A. M., Walsh, K. P., Kelly, P. J., Boon, L., Lavelle, E. C., ... Mills, K. H. G. (2016). Helminth products protect against autoimmunity via innate type 2 cytokines IL-5 and IL-33, Which Promote Eosinophilia. *The Journal of Immunology*, 196(2), 703–714. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501820>
- Fischmann, T. O., Hruza, a, Niu, X. D., Fossetta, J. D., Lunn, C. a, Dolphin, E., ... Weber, P. C. (1999). Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nature Structural Biology*, 6(3), 233–242. <https://doi.org/10.1038/6675>
- Florentin, J., Coppin, E., Vasamsetti, S. B., Zhao, J., Tai, Y.-Y., Tang, Y., Dutta, P. (2018). Inflammatory macrophage expansion in pulmonary hypertension depends upon mobilization of blood-borne monocytes. *The Journal of Immunology*, 2–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701287>
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S287. <https://doi.org/10.1079/BJN/2002550>
- Garcia-Mazcorro, J. F., Barcenas-Walls, J. R., Suchodolski, J. S., & Steiner, J. M. (2017). Molecular assessment of the fecal microbiota in healthy cats and dogs before and during supplementation with fructo-oligosaccharides (FOS) and inulin

using high-throughput 454-pyrosequencing. *PeerJ*, 5, 1–26.
<https://doi.org/10.7717/peerj.3184>

Gasteiger, G., & Rudensky, A. Y. (2014). Interactions between innate and adaptive lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 14(9), 631–639.
<https://doi.org/10.1038/nri3726>

Gill, G. V., & Bell, D. R. (1979). *Strongyloides stercoralis* infection in former Far East prisoners of war. *British Medical Journal*, 2(1), 572–574.

Gonçalves, A. L. R., Rodrigues, R. M., Silva, N. M., Gonçalves, F. A., Cardoso, C. R., Beletti, M. E., ... Costa-Cruz, J. M. (2008). Immunolocalization and pathological alterations following *Strongyloides venezuelensis* infection in the lungs and the intestine of MHC class I or II deficient mice. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.023>

Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., ... Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*, 159(6), 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>

Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., ... Segura, E. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte differentiation into dendritic cells versus macrophages. *Immunity*, 47(3), 582–596.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.016>

Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., ... Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 1977–1992.

<https://doi.org/10.1084/jem.20131199>

- Gundra, U. M., Girgis, N. M., Gonzalez, M. A., Tang, M. S., Zande, H. J. P. Van Der, Lin, J., ... Loke, P. (2017). Vitamin A mediates conversion of monocyte-derived macrophages into tissue-resident macrophages during alternative activation. *Nature Immunology*, *134*(11), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ni.3734>
- Hartley, G., Faulhaber, E., Caldwell, A., Coy, J., Kurihara, J., Guth, A., ... Dow, S. (2016). Immune regulation of canine tumour and macrophage PD-L1 expression. *Veterinary Medicine International*, 1–16. <https://doi.org/10.1111/vco.12197>
- Hasegawa, H., & Hayashida, S. (2009). Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp . as markers for species-specific diagnosis. *Parasitology Research*, *4*(104), 869–874. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1269-9>
- Henriquez-Camacho, C., Gotuzzo, E., Echevarria, J., Clinton White, A., Terashima, A., Samalvides, F., Plana, M. N. (2016). Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. Cochrane Database of Systematic Reviews. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007745.pub3>
- Huang, L., Gebreselassie, N. G., Gagliardo, L. F., Ruyechan, M. C., Lee, N. A., Lee, J. J., & Appleton, J. A. (2014). Eosinophil-Derived IL-10 supports chronic nematode infection. *The Journal of Immunology*, *193*(8), 4178–4187. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400852>
- Hunt, V. L., Tsai, I. J., Coghlan, A., Reid, A. J., Holroyd, N., Foth, B. J., Berriman, M. (2016). The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of Nematodes. *Nature Genetics*, *48*(3), 299–307. <https://doi.org/10.1038/ng.3495>
- Jablonski, K. A., Gaudet, A. D., Amici, S. A., & Popovich, P. G. (2016). Control of the inflammatory macrophage transcriptional signature by miR-155, *1*, 1–21.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159724>

Jenkins, S. J., Ruckerl, D., Thomas, G. D., Hewitson, J. P., Duncan, S., Brombacher, F., Allen, J. E. (2013). IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(11), 2477–2491. <https://doi.org/10.1084/jem.20121999>

Kandasamy, R. K., Vladimer, G. I., Snijder, B., Müller, A. C., Rebsamen, M., Bigenzahn, J. W., Superti-furga, G. (2016). A time-resolved molecular map of the macrophage response to VSV infection. *Nature Publishing Group*, 2(August), 1–12. <https://doi.org/10.1038/npjsba.2016.27>

Kearns, T. M., Speare, R., Cheng, A. C., McCarthy, J., Carapetis, J. R., Holt, D. C., ... Andrews, R. M. (2015). Impact of an Ivermectin mass drug administration on scabies prevalence in a remote Australian Aboriginal Community. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004151>

Keiser, P. B., & Nutman, T. B. (2004). *Strongyloides stercoralis* in the Immunocompromised Population. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 208–217. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>

Kelly-Quagliana, K. A., Nelson, P. D., & Buddington, R. K. (2003). Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutrition Research*, 23(2), 257–267. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00516-X](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00516-X)

Klasen, S., Hammermann, R., Fuhrmann, M., Lindemann, D., Beck, K.-F., Pfeilschifter, J., & Racké, K. (2001). Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced up-regulation of arginase in rat alveolar macrophages. *British Journal of*

Pharmacology, 132(6), 1349–1357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703951>

Klose, C. S. N., & Artis, D. (2016). Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nature Immunology*, 17(7), 765–74. <https://doi.org/10.1038/ni.3489>

Kolaczkowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>

Krzywinski, M., & Altman, N. (2013). Significance , P values and t -tests. *Nature Publishing Group*, 10(11), 1041–1042. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2698>

Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., ... Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, 159(6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>

Lawrence, T., & Natoli, G. (2011). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology*, 11, 750–761. <https://doi.org/10.1038/nri3088>

Li, Z., Zhao, Z.-J., Zhu, X.-Q., Ren, Q.-S., Nie, F.-F., Gao, J.-M., ... Lun, Z.-R. (2012). Differences in iNOS and Arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035834>

Lok, J. B. (2014). *Strongyloides stercoralis* and Relatives: Recent advances in general and Molecular Biology. *Applied Health Economics and Health Policy*, 1(4), 194–206. <https://doi.org/10.1007/s40475-014-0033-8>

- Machado, E. R., Ueta, M. T., Lourenço, E. V, Anibal, F. F., Sorgi, C. A., Soares, E. G., Faccioli, H. (2017). Leukotrienes Play a Role in the Control of Parasite Burden in Murine Strongyloidiasis. *Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.6.3892>
- Mahalakshmi N, Aparnaa R, & Kaliraj P. (2014). Evaluation of immune response elicited by Inulin as an adjuvant with filarial antigens in mice model. *Scandinavian Journal of Immunology*, 80(4), 261–270. <https://doi.org/10.1111/sji.12208>
- Maizels, R. M., & Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune Regulation by helminth parasites: Cellular and Molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 733–744. <https://doi.org/10.1038/nri1183>
- Makker, J., Balar, B., Niazi, M., & Daniel, M. (2015). Strongyloidiasis: A case with acute pancreatitis and a literature review. *World Journal of Gastroenterology*, 21(11), 3367–3375. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i11.3367>
- Mancek-Keber, M., Frank-Bertoncelj, M., Hafner-Bratkovic, I., Smole, A., Zorko, M., Pirher, N., ... Jerala, R. (2015). Toll-like receptor 4 senses oxidative stress mediated by the oxidation of phospholipids in extracellular vesicles. *Sci Signal*, 8(381), ra60. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005860>
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., & Costantini, C. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Publishing Group*, 11(8), 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>
- María de los Ángeles Resendez-Jasso, A. M. R.-G. I. (2013). Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa. *Elsevier*, 12(54), 187–192.
- Marra, N. M., Amarante, A. F. T., & Amarante, M. R. V. (2007). Genetic basis of the

resistance to *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda, *Rhabdiasidae*) infection in mice (*Mus musculus*). *Genetics and Molecular Biology*, 30(1), 60–64.

Marra, N. M., Chiuso-Minicucci, F., Machado, G. C., Zorzella-Pezavento, S. F. G., França, T. G. D., Ishikawa, L. L. W., Amarante, M. R. V. (2011). Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in Lewis rats: Comparison of histological analyses and PCR. *Experimental Parasitology*, 127(2), 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.08.006>

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, 6(March), 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>

Mensink, M. A., Frijlink, H. W., Van Der Voort Maarschalk, K., & Hinrichs, W. L. J. (2015). Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*, 134, 418–428. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.022>

Million, M., Angelakis, E., Paul, M., Armougom, F., Leibovici, L., & Raoult, D. (2012). Comparative Meta-Analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microbial Pathogenesis*, 53(2), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2012.05.007>

Monin, L., Griffiths, K. L., Lam, W. Y., Gopal, R., Kang, D. D., Ahmed, M., ... Khader, S. A. (2015). Helminth-induced *arginase-1* exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, 125(12), 4699–4713. <https://doi.org/10.1172/JCI77378>

Muñoz Ohmen, S. Á., Restrepo Molina, D. A., & Sepúlveda Valencia, J. U. (2012). Revisión : Inulina en algunos derivados cárnicos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*,

65(2), 6789–6798. <https://doi.org/0304-2847>

- Nagayasu, E., Ogura, Y., Itoh, T., Yoshida, A., & Chakraborty, G. (2013). Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology International*, 62(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.09.006>
- Nemetschke, L., Eberhardt, A. G., Viney, M. E., & Streit, A. (2010). A genetic map of the animal-parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 169(2), 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.10.008>
- Novoselov, V. V., Sazonova, M. A., Ivanova, E. A., & Orekhov, A. N. (2015). Study of the activated macrophage transcriptome. *Experimental and Molecular Pathology*, 99(3), 575–580. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.09.014>
- Obieglo, K., Feng, X., Bollampalli, V. P., Dellacasa-Lindberg, I., Classon, C., Österblad, M., ... Nylén, S. (2016). Chronic Gastrointestinal Nematode infection mutes immune responses to *Mycobacterial* Infection Distal to the Gut. *The Journal of Immunology*, 196(5), 2262–2271. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500970>
- Okabe, Y., & Medzhitov, R. (2016). Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology*, 17(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/ni.3320>
- Osorio, E. Y., Zhao, W., Espitia, C., Saldarriaga, O., Hawel, L., Byus, C. V., ... Melby, P. C. (2012). Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host *arginase 1* expression. *PLoS Pathogens*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002417>
- Paturi, G., Butts, C. A., Bentley-Hewitt, K. L., Hedderley, D., Stoklosinski, H., &

- Ansell, J. (2015). Differential effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on gut microbiota and gene expression in rats. *Journal of Functional Foods*, *13*, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.034>
- Perdiguero, E. G., & Geissmann, F. (2015). The development and maintenance of resident macrophages. *Nature Immunology*, *17*(1), 2–8. <https://doi.org/10.1038/ni.3341>
- Phelan, K., & May, K. M. (2017). Mammalian cell tissue culture techniques. *Current Protocols in Molecular Biology*, *2017*(January), 1–23. <https://doi.org/10.1002/cpmb.31>
- Pollard, J. W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nature Reviews Immunology*, *9*(4), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nri2528>
- Prieto-Pérez, L., Pérez-Tanoira, R., Cabello-Úbeda, A., Petkova-Saiz, E., & Górgolas-Hernández-Mora, M. (2016). Geohelminths. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.002>
- Puthiyakunnon, S., Boddu, S., Li, Y., Zhou, X., Wang, C., Li, J., & Chen, X. (2014). Strongyloidiasis-An insight into its global prevalence and management. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003018>
- Ramanathan, R., & Nutman, T. B. (2008). *Strongyloides stercoralis* infection in the immunocompromised host. *Curr Inf Dis Rep*, *10*(2), 105–110.
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs E, & Munder M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Reece, J. J., Siracusa, M. C., & Scott, A. L. (2006). Innate immune responses to lung-

- stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, 74(9), 4970–4981. <https://doi.org/10.1128/IAI.00687-06>
- Reinhard, K. (2017). Reestablishing rigor in archaeological parasitology. *International Journal of Paleopathology*, (June), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2017.06.002>
- Rodrı, O., Maza, C., Colombet, D., Fresno, M., & Poveda, C. (2018). L-arginine supplementation reduces mortality and improves disease outcome in mice infected with *Trypanosoma cruzi*, 1, 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006179>
- Ruano, A. L., López-Abán, J., Fernández-Soto, P., de Melo, A. L., & Muro, A. (2015). Treatment with nitric oxide donors diminishes hyperinfection by *Strongyloides venezuelensis* in mice treated with dexamethasone. *Acta Tropica*, 152, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.019>
- Ruano, A. L., López-Abán, J., Gajate, C., Mollinedo, F., De Melo, A. L., & Muro, A. (2012). Apoptotic mechanisms are involved in the death of *Strongyloides venezuelensis* after triggering of nitric oxide. *Parasite Immunology*, 34(12), 570–580. <https://doi.org/10.1111/pim.12004>
- Ruano A. (2008). Óxido Nítrico como modulador de la Estrongiloidosis (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca (Salamanca-España).
- Salgame, P., Yap, G. S., & Gause, W. C. (2016). Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Review Nature Immunology*, 14(11), 1118–1126. <https://doi.org/10.1038/ni.2736.Effect>
- Salles, F., Bacellar, A., Amorim, M., Orge, G., Sundberg, M., Lima, M., Carvalho, E. (2013). Treatment of Strongyloidiasis in HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*

coinfected patients is associated with increased TNF α and decreased soluble IL2 receptor levels. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107, 526–529. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt052>

Samuelsson, L. M., Young, W., Fraser, K., Tannock, G. W., Lee, J., & Roy, N. C. (2016). Digestive-resistant carbohydrates affect lipid metabolism in rats. *Metabolomics*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1016-7>

Sato, H., Torii, H., Une, Y., & Ooi, H.-K. (2007). A new *rhabditoid* Nematode species in Asian sciurids, distinct from *Strongyloides robustus* in North American sciurids. *Journal of Parasitology*, 93(6), 1476–1486. <https://doi.org/10.1645/GE-1106.1>

Schepetkin, I. A., & Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, 6(3), 317–333. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.10.005>

Schneider, C., Nobs, S. P., Kurrer, M., Rehrauer, H., Thiele, C., & Kopf, M. (2014). Induction of the nuclear receptor PPAR- γ 3 by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nature Immunology*, 15(11), 1026–1037. <https://doi.org/10.1038/ni.3005>

Sellin Jeffries, M. K., Kiss, A. J., Smith, A. W., & Oris, J. T. (2014). A comparison of commercially-available automated and manual extraction kits for the isolation of total RNA from small tissue samples. *BMC Biotechnology*, 14(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s12896-014-0094-8>

Serbina, N. V, Jia, T., Hohl, T. M., & Pamer, E. G. (2008). Monocyte mediated defense against microbial pathogens. *Annual Review of Immunology*, 26, 421–453.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>

- Shariati, F., Pérez-Arellano, J. L., López-Abán, J., El Behairy, A. M., & Muro, A. (2010). Role of angiogenic factors in acute experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. *Parasite Immunology*, 32(6), 430–439. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01202.x>
- Shi, C., & Pamer, E. G. (2014). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 11(11), 762–774. <https://doi.org/10.1038/nri3070>.Monocyte
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Navidshad, B., & Liang, J. B. (2017). Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Medical Microbiology and Immunology*, 206(1). <https://doi.org/10.1007/s00430-016-0481-y>
- Siilva Diego, Peter Cooper, & Nikolai Petrovsky. (2004). Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunology and Cell Biology*, 82(6), 611–616. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01290.x>
- Silva L, Ferraz C, Aguiar A, Araújo J, Ribeiro S, D Rossi, Braga F. (2017). Viability of *Strongyloides venezuelensis* eggs and larvae in vermiculite containing the fungus *duddingtonia flagrans*. *Parasitology Research*, 116(7), 2047–2051. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5502-2>
- Silveira, M. R., Nunes, P., Cara, D. C., Souza, D. G., Corre, A., Teixeira, M. M., & Negra, D. (2002). Infection with *Strongyloides venezuelensis* Induces transient airway Eosinophilic inflammation, an increase in Immunoglobulin E , and hyperresponsiveness in Wistar Rats, 70(11), 6263–6272. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6263>
- Skwarczynski, M. (2017). Inulin: A new adjuvant with unknown mode of action.

EBioMedicine, 15, 8–9. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.019>

Solórzano-García, B., & Pérez-Ponce de León, G. (2017). Helminth parasites of howler and spider monkeys in Mexico: Insights into molecular diagnostic methods and their importance for zoonotic diseases and host conservation. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.04.001>

Steppek, G., Buttle, D. J., Duce, I. R., & Behnke, J. M. (2006). Human gastrointestinal nematode infections: Are new control methods required. *International Journal of Experimental Pathology*, 87, 325–341. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00495.x>

Swirski, F., Robbins, C., & Nahrendorf, M. (2017). Development and Function of Arterial and Cardiac Macrophages. *Trends Immunol*, 37(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.11.004>.Development

Trostdorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., & Odermatt, P. (2013). *Strongyloides stercoralis*: Global distribution and risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

Ulrich F, & Sessa W. (2012). Nitric oxide synthases: Regulation and Function. *European Heart Journal*, 33, 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>

Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Sailer, M., Theis, S., Raes, J. (2017). Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut*, [gutjnl-2016-313271](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313271). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313271>

Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology* (Vol. 33).

<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>

- Vaux, D. L. (2012). Know when your numbers are significant. *Nature Publishing Group*, 492(180), 8–9.
- Verneret, M., Tacnet-Delorme, P., Osman, R., Awad, R., Grichine, A., Kleman, J. P., & Frachet, P. (2014). Relative contribution of C1q and apoptotic cell-surface calreticulin to macrophage phagocytosis. *Journal of Innate Immunity*, 6(4), 426–434. <https://doi.org/10.1159/000358834>
- Vida, C., de Toda, I. M., Cruces, J., Garrido, A., Gonzalez-Sanchez, M., & De la Fuente, M. (2017). Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biology*, 12(December 2016), 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.005>
- Viney, M. (2007). *Strongyloides* spp. *WormBook*, 1–15. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.141.1>
- Viney, M., & Kikuchi, T. (2016). *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* – rodent models of *Strongyloides* infection. *Parasitology*, (May), 1–10. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000020>
- Watson, D., O’Connell Motherway, M., Schoterman, M. H. C., van Neerven, R. J. J., Nauta, A., & Van Sinderen, D. (2013). Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacter. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1132–1146. <https://doi.org/10.1111/jam.12105>
- Webb, L. M., & Tait W. (2017). The role of rare innate immune cells in Type 2 immune activation against parasitic helminths. *Parasitology*, 144(10), 1288–1301. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000488>

- Wilcoxon, T. (2014). Nonparametric tests. *Nature Publishing Group*, 11(5), 467–469.
- Zhang, Q., Kong, L., Zhang, Y., Chen, H., An, R., Wang, W., Zhang, Q. (2015). Genotype-associated *Arginase 1* Expression in Rat Peritoneal Macrophages induced by *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 15, 1–18.
- Zhao, Z. J., Zhang, J., Wei, J., Li, Z., Wang, T., Yi, S. Q., ... Lun, Z. R. (2013). Lower expression of inducible Nitric Oxide Synthase and Higher Expression of Arginase in rat alveolar macrophages are linked to their susceptibility to *Toxoplasma gondii* Infection. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063650>

Anexos

Anexo 1. Cuidado y Bienestar animal

Anexo 1 a.



Nota: Bienestar animal. Cuidados respectivos a los grupos de estudio, siguiendo la Norma Bioética.
Capturado por El Autor, 2018.

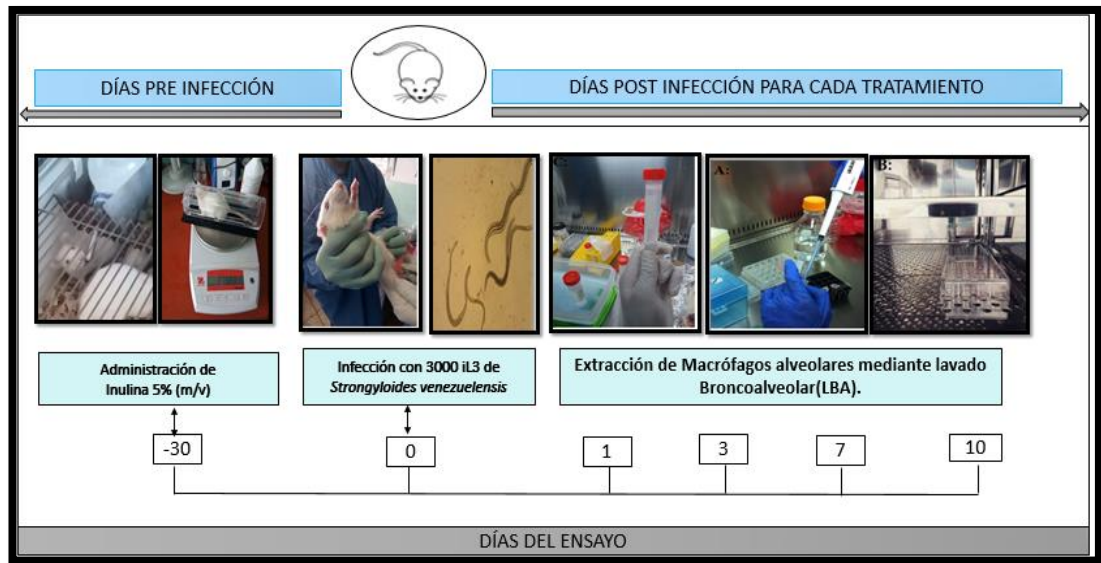
Anexo 1 b.



Nota: Establecimiento de los grupos de estudio

Capturado por El Autor, 2018.

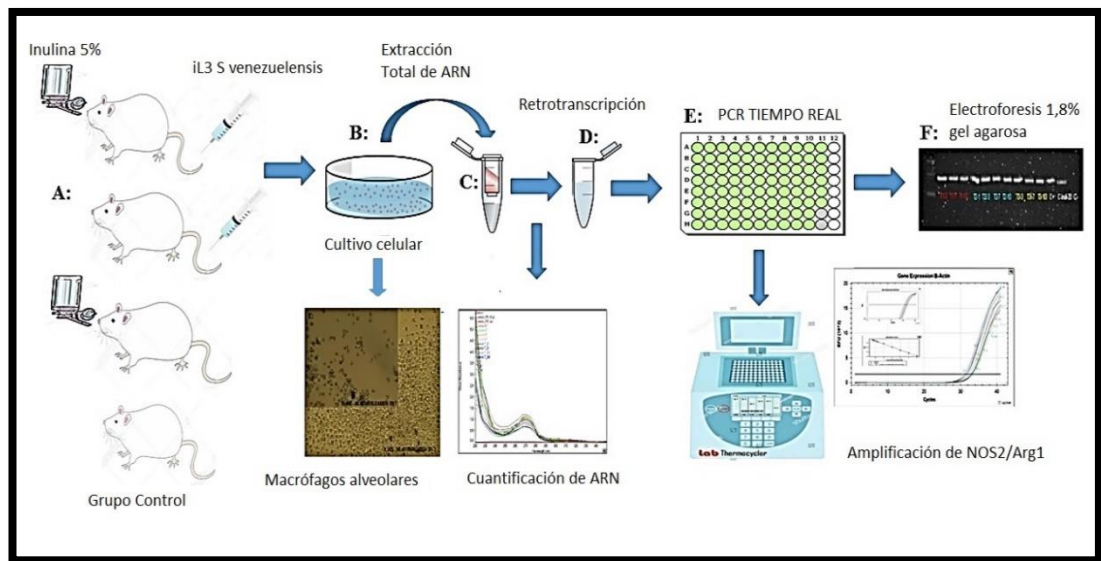
Anexo 1 c.



Nota: Diseño del estudio. Inulina 5 % fue administrada a los grupos de estudio 30 días pre infección. Una vez infectado con 3,000 iL3 de *Strongyloides venezuelensis*, los días 1, 3, 7, 10 post infección se realizó las respectivas disecciones a los grupos control y a los tratamientos correspondientes.

Elaborado por: (El Autor, 2018).

Anexo 1 d.



Nota: Diseño Experimental. A) Los animales de estudio de cada tratamiento T1: Infectado – T2: Inulina 5 % - T3: Infectado + Inulina 5 % + Grupo Control B) Cultivo Primario de Macrófagos alveolares, mediante microscopía de inversión se observa a 40X. C) Extracción de ARN y Cuantificación de ARN utilizando NanoDrop. D) Retrotranscripción. E) Placas de PCR Tiempo Real utilizando el equipo CFX 96 Touch (BioRad, USA). F) Tamaño de Producto de la PCR mediante electroforesis de 1,8 % de gel de agarosa.

Elaborado por: (El Autor, 2018).

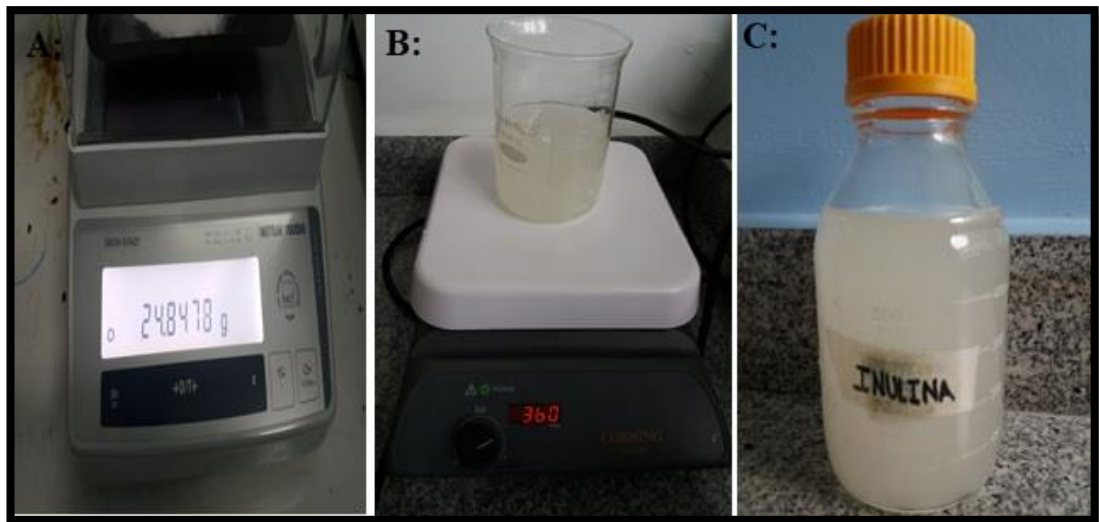
Anexo 1 e.



Nota: Condiciones de alimento y agua a los grupos de ensayo.

Capturado por El Autor, 2018.

Anexo 1 f.



Nota: Preparación de inulina al 5 %.

Capturado por El Autor, 2018.

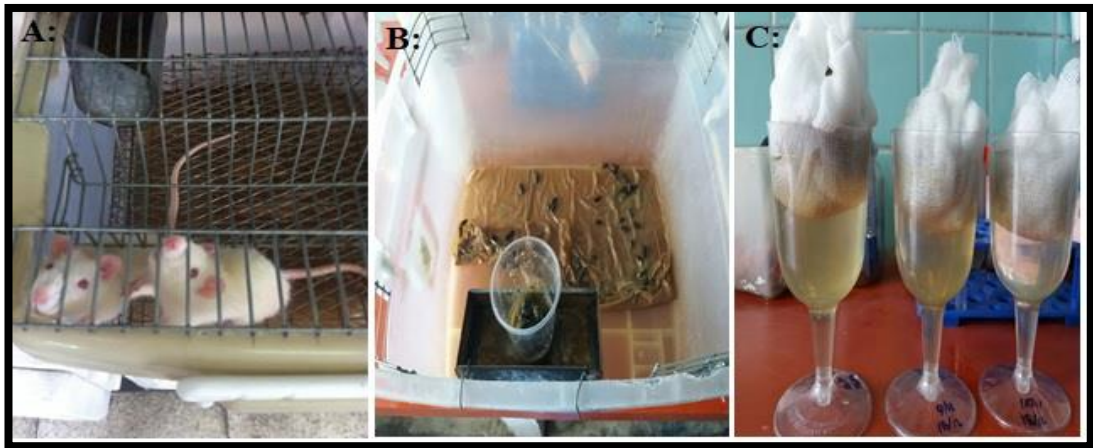
Anexo 2. Tabla de peso de los individuos

TRATAMIENTO	INDIVIDUO	PESO (g) EN SEMANA				
		1	2	3	4	5
CONTROL NT	a	86,22	109,5	154,7	185,7	203
	b	73,31	102,9	145,6	177,89	201
	c	80,22	112,1	151,2	181,6	206
	d	93,05	119,5	156,6	188,4	208
TRATAMIENTO 1	a	90,12	113,5	156,64	183,67	208
	b	103,27	138,51	182,04	196,3	205
	c	92,55	115,67	162,5	188,9	209
	d	98,21	125,98	170,44	192,7	215
TRATAMIENTO 2	a	98,25	115,04	155,78	184,6	235
	b	95,31	113,19	152,03	180,95	230
	c	102,52	122,54	161,5	192,8	239
	d	110,42	126,29	166,5	198,4	238
TRATAMIENTO 3	a	99,14	121,41	165,59	192,7	225
	b	102,3	141,71	173,24	198,9	227
	c	113,6	130,01	199,44	205,6	240
	d	108,01	117,01	196,64	201,6	230
CONTROL T	a	101,5	*	*	*	*
	b	102,5	118,6	*	*	*
	c	105,7	122,3	161,7	*	*
	d	101,6	119,3	158,4	190,2	*

Nota: Peso final de todos los animales de estudio.

Elaborado por: (El Autor, 2018).

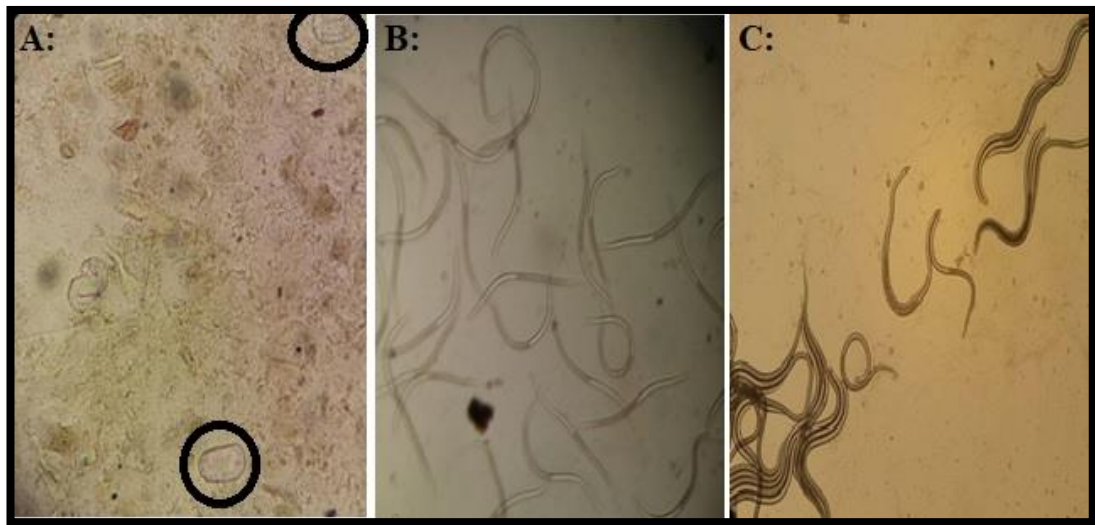
Anexo 2 a.



Nota: Técnicas Parasitológicas. A) ratas Wistar infectadas con 3,000 iL3 *S. venezuelensis*. B) Coprocultivo con Vermiculita. C) Baerman Modificado.

Capturado por El Autor, 2018.

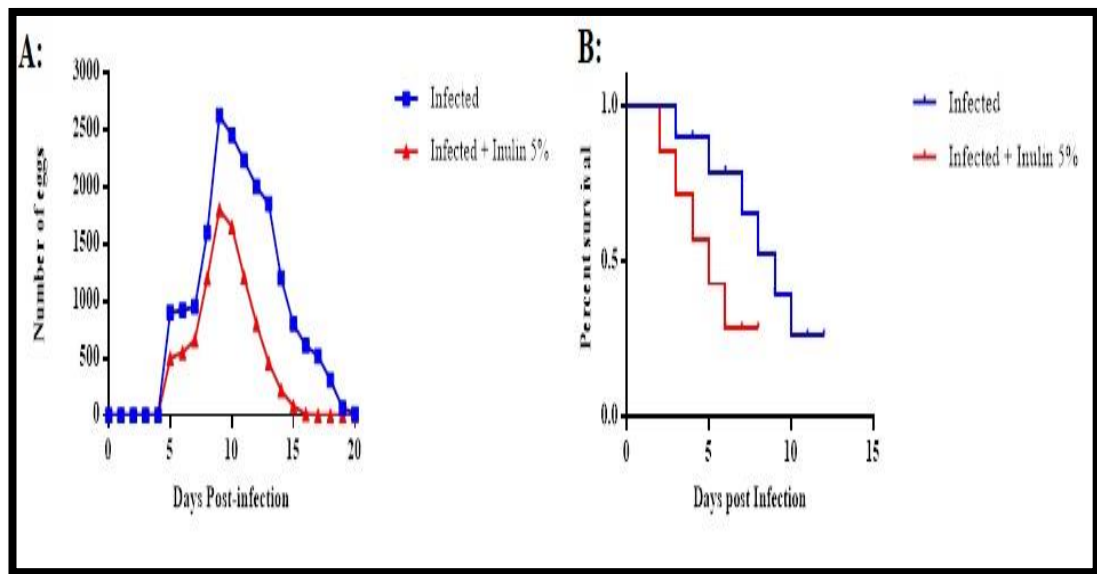
Anexo 2 b.



Nota: Técnica coproparasitarias. A) Técnica Kato-Katz para conteo de huevos de *Strongyloides venezuelensis*, observado en microscopio electrónico a 40X. B) Obtención de L1 de *S. venezuelensis* mediante 3 días de incubación con vermiculita a 40X C) obtención de L3 *S. venezuelensis* mediante Baerman Modificado a 40X.

Capturado por El Autor, 2018.

Anexo 2 c.

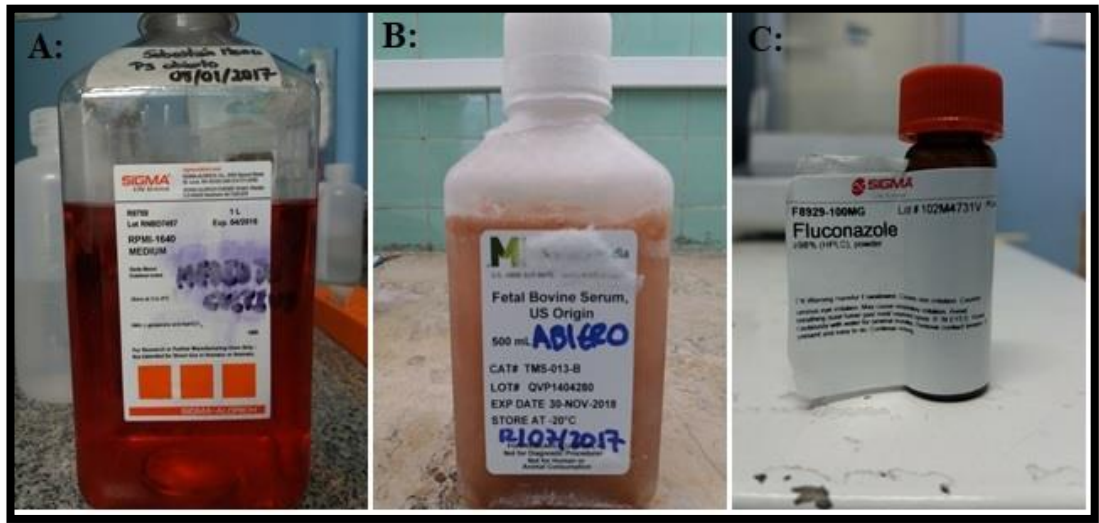


Nota: Conteo de huevos de *Strongyloides venezuelensis* mediante la Técnica de KatoKatz. A) Contaje de huevos de *Strongyloides venezuelensis* en comparación con el grupo de Infectados e Infectados + Inulina. B) Supervivencia de *S. venezuelensis* en el hospedero, mediante el test Survivor (* $p < 0,05$).

Elaborado por: (Paredes & Mena, 2018).

Anexo 2. Cultivo Celular – Cultivo Primario de Macrófagos alveolares

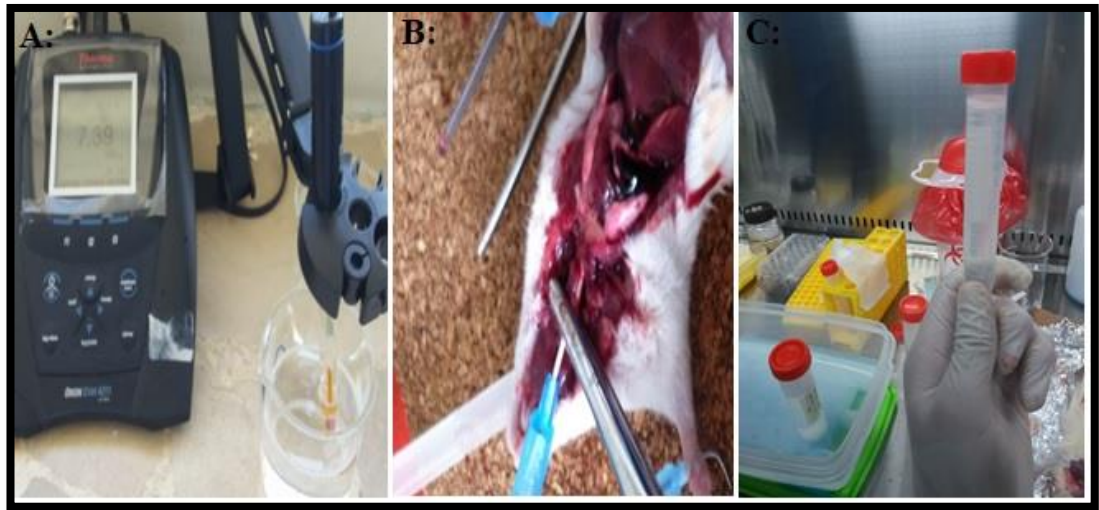
Anexo 3 a.



Nota: Reactivos para la preparación del medio de cultivo nutritivo para macrófagos alveolares. A) Medio de cultivo RPMI (L-glutamina + Bicarbonato de Calcio). B) Suero Fetal Bovino. C) Fluconazol.

Capturado por El Autor, 2018.

Anexo 3 b.



Nota: Obtención de macrófagos alveolares mediante Lavado Broncoalveolar (LBA). A) medición del pH de PBS 1X. B) Disección a los animales de estudio. C) Obtención de células mediante LBA.

Capturado por El Autor, 2018.

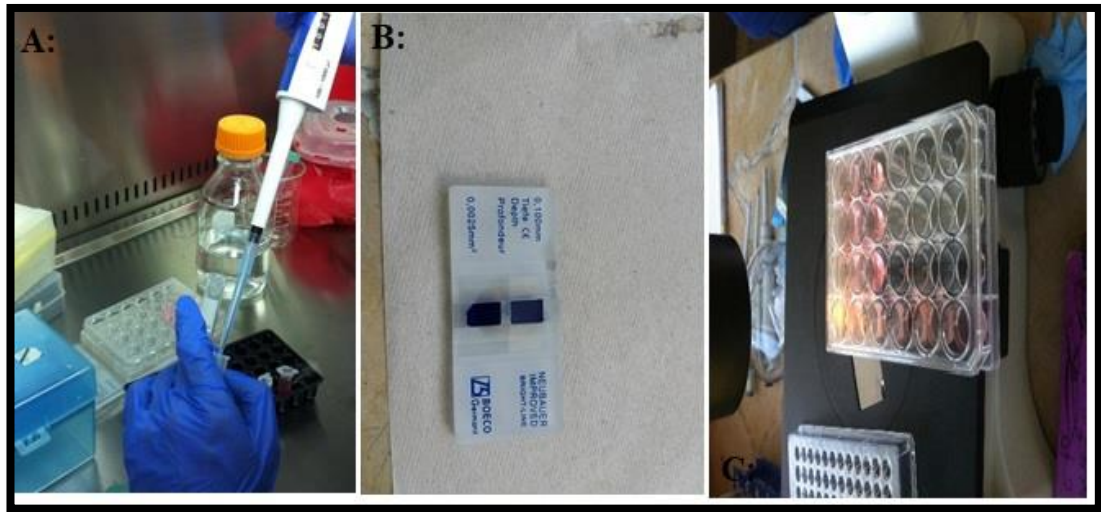
Anexo 3 c.



Nota: Aislamiento del pulmón de ratas Wistar infectadas con *Strongyloides venezuelensis*. A) Comparación colorimétrica de los grupos T1: Infectado e T3: Infectado+ Inulina. B) Pulmón obtenido al tercer día post infección del grupo Infectado. C) Pulmón obtenido al décimo día post infección del grupo T1: Infectado.

Capturado por El Autor, 2018.

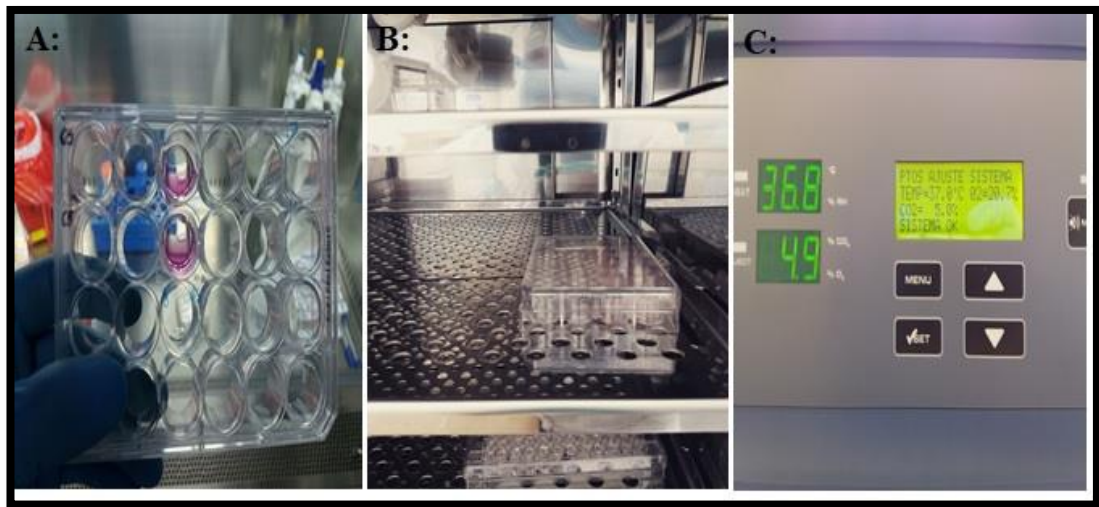
Anexo 3 d.



Nota: Viabilidad celular. A) Toma de una alícuota para el conteo celular (1:5) para macrófagos, (1:10) resto células. B) Contaje celular mediante la cámara de Neubauer. C) Seguimiento del cultivo de macrófagos alveolares mediante microscopía

Capturado por El Autor, 2018.

Anexo 3 e.



Nota: Incubación de macrófagos alveolares. A) Siembra de células obtenidas mediante LBA. B) Incubación de células obtenidas mediante LBA durante 2 horas para la adhesión de macrófagos a la placa de cultivo. C) Condiciones de la incubación a una temperatura de 37 °C, 5 % de CO₂ y 20 % de flujo de aire.

Capturado por El Autor, 2018.

Anexo 3.f

TRATAMIENTO	DÍA POST INFECCIÓN			
	1	3	7	10
Control	52500	50100	51000	52000
T1: Infectado	172500	100000	42500	45000
T2: Inulina 5 %	65000	68100	62500	63100
T3: Infectado + Inulina 5 %	162500	111850	53500	82250

Nota: Resultado de conteo de macrófagos alveolares.

Elaborado por: (El Autor, 2018).

Anexo 3. Tabla de valores de ARN (ng/uL) obtenido de cada grupo evaluado.

Sample ID	NucleicAcid (ng/uL)	Absorbancia A260/280
Blanco	0,1	0,18
Control NT	19,5	1,4
Control NT	19,2	1,38
Control NT	19,7	1,35
Control NT	18,8	1,45
Control T	16,4	1,32
Control T	17,2	1,31
Control T	17,5	1,32
Control T	18,9	1,41
Control LPS 10ul	34,5	1,45
Control LPS 1ul	32,6	1,42
Tratamiento 1_I	25,2	1,32
Tratamiento 1_III	19,8	1,39
Tratamiento 1_VII	15,8	1,42
Tratamiento 1_X	19,8	1,45
Tratamiento 2_I	28,7	1,37
Tratamiento 2_III	29,7	1,4
Tratamiento 2_VII	33,7	1,38
Tratamiento 2_X	36,7	1,39
Tratamiento 3_I	18,7	1,35
Tratamiento 3_III	25,5	1,32
Tratamiento 3_VII	19,2	1,39
Tratamiento 3_X	25,7	1,34

Nota: Tabla de valores de ARN (ng/uL) obtenido de cada grupo evaluado.

Elaborado por: (El Autor. 2018).