

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



*“Caracterización funcional del péptido beta-amiloide
en neurocisticercosis porcina”*

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Renzo Marcelo Gutiérrez Loli

LIMA – PERÚ

2016

Agradecimientos

A mi familia,
por su apoyo y cariño inagotable.

A Carolina, Juan, Pamela, Gabo, José,
Jessy, Aleja, María Paz, Beatriz y Aymé,
por enseñarme a no perder la alegría en el trabajo.

A la Dra. Cristina Guerra,
MSc. Carla Cangalaya, BSc. Miguel A. Orrego y Dr. Jaeson Calla,
por enseñarme a no olvidar el trabajo entre tanta alegría.

La revisión bibliográfica para la construcción de los antecedentes y la discusión de este trabajo, no habría sido posible sin el esfuerzo abnegado de Alexandra Elbakyan, el recuerdo de Aaron H. Swartz y de todos los que luchan diariamente en la liberar el conocimiento y ponerlo a disposición de todos los estudiantes.

Este trabajo también es de ustedes.

Resumen

La neurocisticercosis, hiperdémica en el Perú, es la infección cerebral causada por el estadio larval (quiste) de *Taenia solium*, cuya manifestación clínica más frecuente son las crisis epilépticas. Esta enfermedad ha sido clínicamente bien documentada, pero la compleja relación hospedero-parásito y la inflamación resultante que es un factor principal en la severidad de los síntomas aun no son completamente comprendidas.

Entre la gran diversidad de marcadores inflamatorios, los péptidos beta amiloides han sido asociados con procesos neuropatológicos incluyendo activación glial, disfunción sináptica y apoptosis neuronal. Sin embargo, el rol del beta amiloide en la neuropatología de la neurocisticercosis aún no ha sido explorado y el efecto del tratamiento antihelmíntico sobre esta molécula es también desconocido.

En este trabajo se usaron secciones de tejido cerebral de ocho cerdos naturalmente infectados con quistes de *Taenia solium*. Cinco animales recibieron una dosis única de praziquantel, que ha demostrado inducir inflamación, y tres cerdos sirvieron como controles (UT). Del primer grupo, tres cerdos fueron sacrificados a los dos días de haber recibido el tratamiento (T48) y dos después de 5 días (T120). Previo al sacrificio, todos los animales fueron sedados y perfundidos con el colorante Azul de Evans para indicar visualmente el compromiso de la barrera hematoencefálica, hecho que ha sido correlacionado con la inflamación. La presencia de beta amiloide se evaluó por inmunohistoquímica en 82 cápsulas y la expresión de gen de la proteína precursora de amiloide (*app*) en 20.

Tras el análisis se observó que el praziquantel induce tanto la presencia del péptido beta amiloide como la expresión de *app*. Este fenómeno fue más evidente en cápsulas que presentaron aumento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Los resultados de inmunohistoquímica mostraron valores similares para T48 y T120, ambos grupos con mayor inmunorreactividad en comparación a UT mientras que la expresión de *app* fue significativamente mayor en T48 en comparación a UT, lo que sugiere la participación de mecanismos post transcripcionales que modulan su expresión. Paralelamente, se observó menos

beta amiloide en quistes degenerados, lo que sugiere la participación de un proceso de regeneración posterior a la fase inflamatoria aguda. En conjunto estos hallazgos sugieren que beta amiloide es un componente de la respuesta inflamatoria aguda en neurocisticercosis y su expresión es regulada en algún punto del proceso de degeneración del parásito.

Abstract

Neurocysticercosis, hyperendemic in Peru, is the brain infection with the larval stage (cyst) of *Taenia solium*; a main frequent clinical manifestation are seizures. This disease has been well documented clinically, but the complex host-parasite interaction and the resulting inflammation, a main factor of the severity of the symptoms, are not completely understood.

Among many inflammatory markers, amyloid-beta peptides have been associated with neuropathological processes including glial activation, synaptic dysfunction and neuronal apoptosis. However, the role of A β in the neuropathology of neurocysticercosis has not been explored yet the effect of anthelmintics on this molecule is unknown.

We used brain sections of eight pigs naturally infected with *Taenia solium* cysts. Five animals received a single dose of 100 mg/kg praziquantel, which is demonstrated to trigger inflammation, and three untreated pigs served as controls (UT). Three pigs were sacrificed after two days of treatment (T48) and two after five days (T120). Two hours before sacrifice, all animals were sedated and injected with Evans Blue to delineate increased permeability of the blood-brain barrier, shown to correlate with inflammation. Eighty-two cyst capsules were examined to evaluate the presence of A β in host tissue by immunohistochemistry. The relative expression of the amyloid precursor protein gene (*app*) was analyzed by quantitative real time PCR in 20 capsules.

We found that PZQ induced both the presence of A β and *app* expression, this was more evident when the blood-brain barrier had been affected. Immunohistochemistry results showed similar values for T48 and T120, both being significantly higher than UT, but *app* expression was clearly higher for T48 than UT and T120, indicating post-transcriptional regulation. Besides, we observed less A β in degenerated cysts, which suggests the possibility of a regeneration process that follows the acute inflammatory phase. Together, these findings suggest that

amyloid-beta is a component of the acute inflammatory response in neurocysticercosis and that its expression is regulated at some point of the cyst degeneration.

Contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	6
I. Introducción.....	12
1.1 <i>Taenia solium</i>	12
1.2 Neurocisticercosis	13
1.2.1 Epidemiología.....	16
1.3 Respuesta inmune en el sistema nervioso central.....	19
1.3.1 Barrera hematoencefálica y comunicación neuro-inmune.....	19
1.3.2 Neuroinflamación.....	21
1.4 Respuesta inmune en NCC	23
1.4.1 Interacción parásito-hospedero.....	23
1.4.2 Respuesta inmune post-tratamiento en NCC	25
1.5 Proteína β -Amiloide (A β).....	29
1.5.1 Generalidades.....	29
1.5.2 A β en la respuesta inmune en el SNC.....	31
1.5.3 A β en NCC.....	32
II. Hipótesis	33
III. Objetivos	33
3.1 Objetivo general.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
IV. Materiales y métodos.....	34
4.1 Flujograma de trabajo.....	34
4.2 Muestras	34
4.3 Evaluación histopatológica de A β	35
4.3.1 Inmunohistoquímica (IHC)	35
4.3.2 Caracterización histológica de la inflamación	37
4.3.3 Interpretación de la reacción positiva por IHC: Score de Intensidad	37
4.3.4 Evaluación de la expresión de A β por localización de la cápsula en el cerebro	38
4.4 Evaluación de la expresión del gen de la proteína precursora de amiloide (<i>app</i>)	38
4.4.1 Extracción de RNA.....	38

4.4.2	Generación de cDNA por transcriptasa reversa (RT-PCR)	39
4.4.3	PCR en tiempo real (qPCR).....	39
4.5	Análisis estadístico.....	40
V.	Resultados.....	40
5.1	Distribución de la muestra.....	40
5.2	Presencia de A β en tejido cerebral de cerdo infectado por <i>T. solium</i>	41
5.3	Expresión de A β por estadio inflamatorio.....	41
5.4	Expresión de A β por grupo de tratamiento.....	45
5.5	Expresión de A β e integridad de la BHE	45
5.6	Expresión de A β y localización de la cápsula en el cerebro.....	45
VI.	Discusión	47
6.1	Dinámica de la expresión de A β en NCC	48
6.2	Cambios en la permeabilidad de la BHE tiene efecto en la producción de A β	50
6.3	Modulación de la expresión de <i>app</i> por agentes proinflamatorios, inmunoregulatorios y de regeneración tisular.....	52
6.4	Efecto de la localización del quiste en la producción de A β	55
6.5	La generación de A β en NCC no es un proceso neurodegenerativo.....	55
6.6	A β en NCC: ¿Inflamación vs Regeneración?	56
VII.	Conclusiones.....	57
VIII.	Anexos	59
IX.	Bibliografía.....	60

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de muestras según tratamiento y color de cápsula.	40
Tabla 2. Distribución de A β según estadio inflamatorio.....	41
Tabla 3. Evaluación del efecto de la localización en la presencia de A β	46

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	14
Figura 2. Estadios del ciclo de vida de <i>T. solium</i>	14
Figura 3. Imagen obtenida por resonancia magnética para el diagnóstico de neurocisticercosis	15
Figura 4. Regiones y naciones con alta prevalencia de cisticercosis/neurocisticercosis ..	18
Figura 5. Principales regiones endémicas para teniasis/cisticercosis en el Perú.....	18
Figura 6. Comparación entre un capilar sanguíneo periférico y en el cerebro	20
Figura 7. Representación esquemática de los factores que estimulan la célula glial en el SNC	23
Figura 8. Cambios en la permeabilidad de la BHE en cerebros de cerdos infectados por <i>T. solium</i>	26
Figura 9. Caracterización de regiones con infiltrado de Azul de Evans (REBI) en cisticercos de <i>T. solium</i>	28
Figura 10. La inflamación en cápsulas azules incrementa con exposición a PZQ.....	28
Figura 11. Evaluación histológica de un quiste conticomeningeo	29
Figura 12. Esquema de la síntesis de A β a partir de APP	30
Figura 13. Depósitos A β inducen neuroinflamación por activación de células gliales y aumento en la expresión de mediadores inflamatorios	32
Figura 14. Esquema del diseño experimental para la evaluación histopatológica y molecular de A β	34

Figura 15. A β está presente en tejido cerebral de cerdo infectado por <i>T. solium</i>	42
Figura 16. La distribución de A β es mayor en tejido con alto grado de inflamación.....	43
Figura 17. La expresión de A β es estimulada por el tratamiento antihelmíntico con PZQ. 44	
Figura 18. A β se produce más en regiones con aumento de la permeabilidad de la BHE 44	
Figura 19. Presencia de A β es muy leve en cisticercos degenerados.....	46
Figura 20. El gen app incrementa su expresión en cápsulas azules.	49
Figura 21. Comportamiento de A β en cerebros de cerdos infectados por <i>T. solium</i> tratados con PZQ.	50
Figura 22. Mecanismo propuesto de expresión y regulación de A β en NCC.....	54

Índice de anexos

Anexo 1. Detalle de los criterios de observación para establecer los grados de intensidad y fórmula para el cálculo de SC de intensidad (INT-SC).	59
Anexo 2. Características de las sondas empleadas en el ensayo expresión por qPCR. ..	59

I. Introducción

1.1 *Taenia solium*

Taenia solium es un platelminto de la clase Eucestoda¹ y es una de las 3 especies del género *Taenia* que tienen capacidad de parasitar al hombre.² Presenta un ciclo de vida complejo donde los humanos son los únicos hospederos definitivos, mientras que, tanto los cerdos como los humanos pueden actuar como hospederos intermediarios.³ (Figura 1)

El parásito adulto está compuesto por una pseudocabeza (escólex) armada con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos en el rostelo retráctil (Figura 2C); un cuello angosto y un cuerpo elongado que consta de varios cientos de proglótidos cada uno con ambos órganos sexuales funcionales.⁴ En su forma adulta, *T. solium* habita el intestino delgado del hombre, principalmente el yeyuno, adherido por el escólex a las paredes intestinales. Cuando los proglótidos están maduros, estos se fecundan y se desprenden del extremo distal del gusano, luego son expulsados al ambiente junto a las materias fecales.⁵

Cada proglótido contiene miles de huevecillos (Figura 2A) que son liberados en el suelo donde ya tienen carácter infectante sin necesidad de embrionar y pueden permanecer viables durante largos intervalos. Cada huevecillo contiene un embrión hexacanto que al ser ingerido por animales, normalmente cerdos que actúan como hospederos intermediarios, se liberan hacia la luz del intestino delgado, penetran la pared de este y entran a la circulación a partir de donde son transportados a los diversos tejidos del cerdo, principalmente músculos estriados y otros órganos.

En dichos tejidos los hexacantos evolucionan y se transforman en cisticercos, metacéstodes o también llamados quistes (Figura 2B). Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida o contaminada por cisticercos, estos alcanzan el intestino donde, si alguno evagina, podrá convertirse en el gusano adulto, completando de esta manera el ciclo.⁶ La infección con el

platelminto adulto intestinal o teniasis no debe confundirse con la cisticercosis, en la que el hombre actúa como huésped intermediario.^{7,8}

La cisticercosis humana se desarrolla a través de la ingesta de huevecillos de *T. solium* por contaminación fecal por vía oral. Estos entran al torrente sanguíneo y son distribuidos a los tejidos como se ha descrito para el cerdo.⁹ Las fuentes principales de contagio humano son alimentos y líquidos contaminados con huevecillos; es frecuente también la autoinfección en individuos teniásicos.^{8,9}

1.2 Neurocisticercosis

La infestación en la teniasis cursa de forma prácticamente asintomática o produce compromisos digestivos muy leves e inespecíficos en el ser humano.⁶ Sin embargo, en la cisticercosis, las oncosferas se establecerán y enquistarán en diversos tejidos donde alcanzarán su tamaño definitivo (aproximadamente 1 cm) en 2-3 meses desencadenando diversos compromisos de acuerdo a la región.¹⁰ Los cisticercos se alojan principalmente de manera subcutánea e intramuscular y también en el cerebro y ojos.¹¹ Algunas regiones menos frecuentes de infección son el corazón¹², hígado, pulmones, cavidades abdominales¹³ y muy rara vez la médula espinal.^{14,15}

Cuando la infección alcanza el sistema nervioso central (SNC), específicamente el cerebro, condiciona una enfermedad pleomórfica denominada neurocisticercosis (NCC). Una vez en el cerebro, el cisticercos viable provoca muy poca inflamación en los tejidos que lo rodean, permaneciendo indetectable para el sistema inmune del hospedero.^{16,17} Esto debido, probablemente, por estar protegido por la barrera hematoencefálica (BHE) y mecanismos de evasión inmune propios del parásito.¹⁸

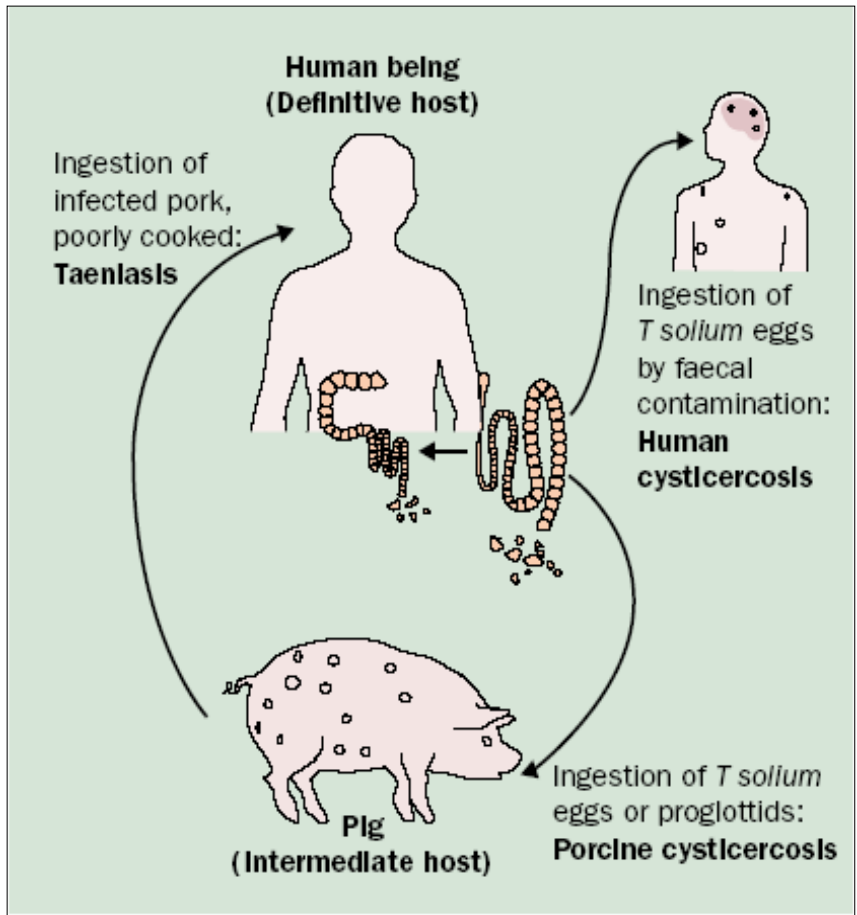


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (García HH, 2013)

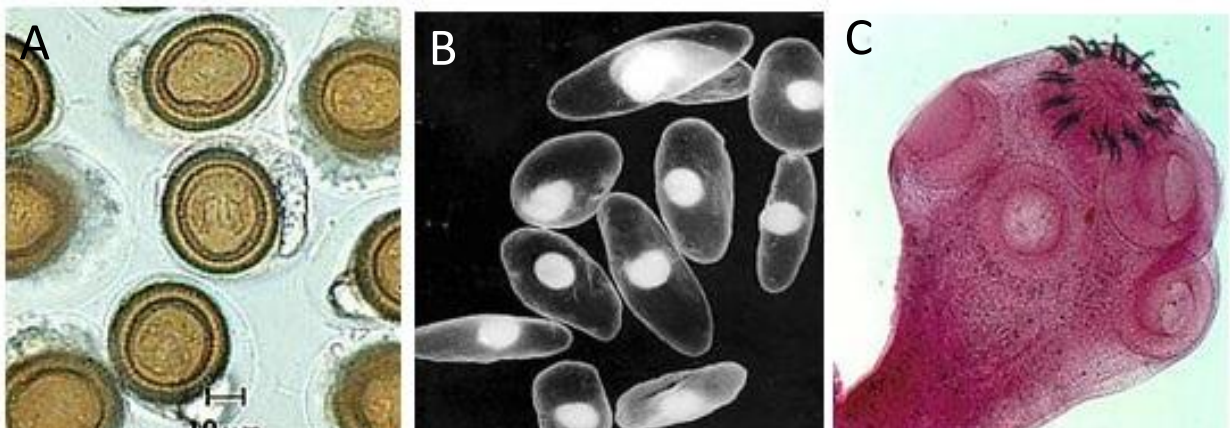


Figura 2. Estadios del ciclo de vida de *T. solium*. De izquierda a derecha: (A) huevecillos, (B) metacésto o cisticerco y (C) escólex de individuo adulto.

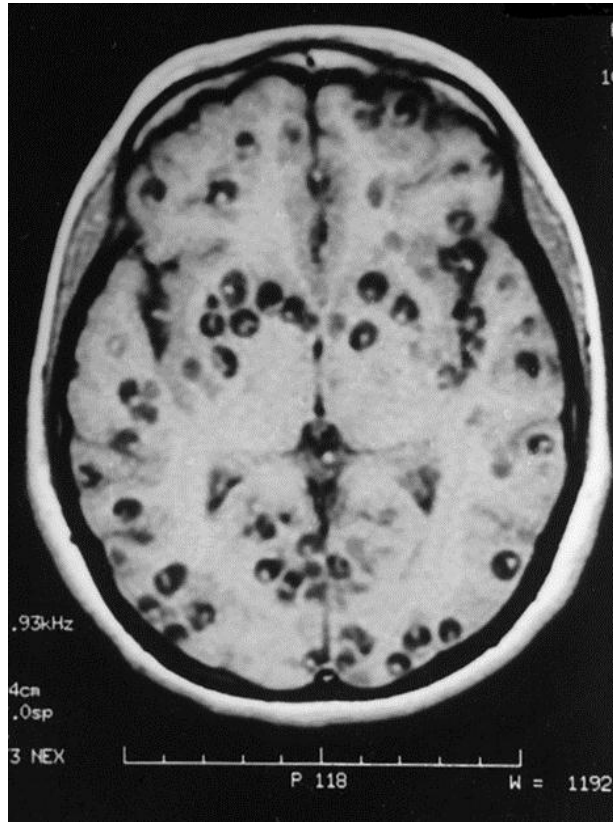


Figura 3. Imagen obtenida por resonancia magnética para el diagnóstico de neurocisticercosis. (García HH, 2013)

Después de un periodo desconocido y presumiblemente largo¹⁹ el parásito degenera, lo que desencadena una reacción inflamatoria en el hospedero.²⁰

La NCC tiene manifestaciones clínicas muy variadas, llegándose a presentar como casi cualquier síntoma neurológico, como el aumento de la presión intracraneal, hidrocefalia y crisis epilépticas, esta última la más frecuente.^{9,21} Tanto el efecto de masa del quiste como el bloqueo de la circulación cerebroespinal influyen en la sintomatología de NCC, sin embargo la mayoría de síntomas son resultado directo del número de quistes, su localización en el cerebro y de la gravedad del proceso inflamatorio en el tejido adyacente al parásito.²²

El diagnóstico continúa siendo un reto en NCC. La identificación involucra convencionalmente compatibilidad en la historia clínica, serología positiva y monitoreo por tomografía computarizada o resonancia magnética.²³ (Figura 3) Si bien los estudios epidemiológicos han contribuido en la identificación de

factores y poblaciones de riesgo, la baja sensibilidad y especificidad de los métodos serológicos^{24,25} y la limitada implementación de equipos de procesamiento de imágenes en comunidades rurales²⁶ continúan siendo los principales obstáculos para la adecuada identificación de esta enfermedad.

Por otro lado, el tratamiento para NCC exige terapias personalizadas debido a la gran variedad en la sintomatología. El tratamiento con drogas antihelmínticas, en esencia Albendazol o Praziquantel (PZQ), acelera la degeneración y eventualmente produce la muerte del parásito²⁷⁻²⁹; sin embargo también exacerba la respuesta inflamatoria por lo que la terapia podría ser innecesaria o estar contraindicada en algunos casos.³⁰⁻³² Generalmente el tratamiento simultáneo con antiinflamatorios corticosteroides, disminuye las complicaciones del tratamiento antihelmíntico.^{33,34}

La investigación en NCC es un problema complejo. El ciclo de vida de *T. solium* es prácticamente imposible de reproducir en el laboratorio y se requiere grandes esfuerzos en logística para mantener experimentalmente *in vivo* los estadios del parásito.

1.2.1 Epidemiología

La NCC es la causa principal de epilepsia adquirida en adultos a nivel mundial y una de las parasitosis más frecuentes del SNC con alta morbilidad y mortalidad en naciones en vías de desarrollo.^{35,36} El reporte más reciente (2015) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que 50 millones de personas padecen epilepsia a nivel mundial, de las cuales el 30% está asociada a NCC en regiones endémicas y el 3% en el resto del mundo.³⁷ Asimismo, se calcula que la NCC es responsable de aproximadamente 0.5 millones de años de vida potencialmente perdidos (*disability-adjusted life year*, DALY) cada año a nivel mundial³⁸, lo que convierte a esta enfermedad en un serio problema de salud pública.

NCC tiene una distribución global aunque las principales regiones endémicas corresponden a los países más pobres donde no existe un adecuado sistema de saneamiento y alcantarillado.³⁶ En estos lugares se practica la crianza informal de cerdos con bajos parámetros de inspección, lo que aumenta el riesgo de ingesta de heces humanas y por consiguiente contribuye a la alta prevalencia de esta parasitosis.³⁹ (Figura 4)

No obstante, los casos de NCC en naciones desarrolladas como los Estados Unidos de América y Australia se encuentran en aumento.⁴⁰ Factores como la intensificación de la industria de productos de origen animal, el incremento en el comercio de animales vivos y al gran fenómeno migratorio de mano de obra agrícola y ganadera, así como los movimientos de refugiados y turistas internacionales, han contribuido en perpetuar el ciclo de vida del parásito y extender su distribución.⁴¹

Al igual que en otras enfermedades tropicales, el diagnóstico y detección de NCC es aún bastante impreciso y posee cobertura limitada.^{39,42} Por esta razón, los datos sobre la distribución real de esta zoonosis son aún fragmentados. Sin embargo, se han ejecutado iniciativas para controlar esta enfermedad en regiones endémicas y la incidencia de epilepsia asociada a NCC ha sido clínicamente bien documentada.⁴³

De esta manera, se sabe que la NCC ha sido durante décadas un serio problema en América Latina con focos de alta prevalencia en Venezuela, norte de Brasil, Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Perú, Bolivia y recientemente en naciones con pocos reportes como Haití y República Dominicana; representado en conjunto entre 0.45-1.35 millones de casos en esta región.⁴⁴⁻⁴⁷ En el caso particular de Perú, se ha estimado que aproximadamente 30 000 personas padecen de NCC sintomática, convirtiéndola en una zoonosis de alta prevalencia.⁴⁸ (Figura 5)

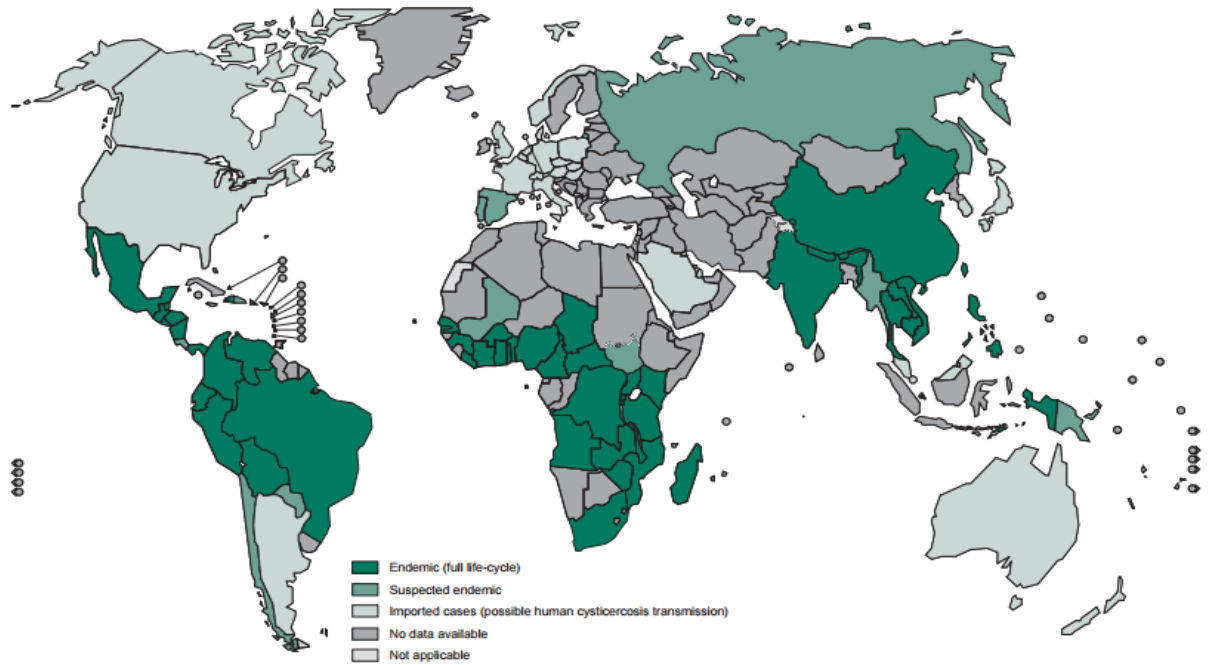


Figura 4. Regiones y naciones con alta prevalencia de cisticercosis/neurocisticercosis. (World Health Organization, 2015)



Figura 5. Principales regiones endémicas para teniasis/cisticercosis en el Perú. (García HH, 2010)

En Asia, destaca la India, donde se atribuye a NCC el 50% de los casos de epilepsia, y otras naciones como Indonesia, Nepal, Bután también con elevada morbilidad.⁴⁹ La infección por *T. solium* se ha reportado también en todas las provincias de China, estimando entre 3-7 millones de personas infectadas y entre 0.3-0.7 millones de casos de epilepsia asociada a NCC.⁵⁰

Finalmente, en el continente africano, específicamente en la región subsahariana, se reporta también alta prevalencia para esta zoonosis, con excepción de las naciones islámicas.^{51,52} Debido a la escasez de herramientas de diagnóstico en esta región no se conocen datos precisos de la prevalencia en otras naciones. Sin embargo, encuestas en comunidades reportan alta incidencia de teniasis/cisticercosis en varios países⁵³⁻⁵⁵ donde se ha demostrado también la alta prevalencia de epilepsia asociada a NCC que alcanza cifras de 0.31-4.6 millones de casos.⁵⁶

1.3 Respuesta inmune en el sistema nervioso central

1.3.1 Barrera hematoencefálica y comunicación neuro-inmune

El sistema inmune está presente en todo el organismo, encargándose de la defensa frente a agentes potencialmente infecciosos, reparación de tejido y mantenimiento de la homeostasis.⁵⁷ Tradicionalmente se ha aceptado que el SNC se separa del resto del organismo por la barrera hematoencefálica (BHE), una estructura vascular selectivamente permeable que, controlada por eventos de señalización,^{58,59} facilita el libre tránsito de solo ciertas moléculas por vía sanguínea y limita el infiltrado de células inmunes de la periferia.^{60,61} Anatómicamente, la BHE está conformada por células endoteliales que difieren de las del resto del cuerpo por la ausencia de fenestraciones en sus paredes, la abundancia de uniones estrechas (*tight junctions*) entre ellas y por el escaso transporte de vesículas por pinocitosis.⁶² (Figura 6)

De acuerdo a esto, una de las características tradicionalmente atribuidas al SNC es la ausencia de un sistema de drenaje linfático. Ciertamente, en condiciones normales, no se detectan células inmunes periféricas en el

parénquima del SNC⁶³ y en los primeros experimentos sobre la respuesta inmune en este nivel se demostró que tejidos injertados en el SNC provocan una respuesta inmune retardada.^{64,65} Estas observaciones respaldaron el concepto de 'privilegio inmune' para el SNC, señalando que el cerebro estaba aislado de la vigilancia inmune normal.

La naturaleza de la interacción neuroinmune es controversial por la existencia de factores como la BHE y las observaciones de los efectos patológicos de la inflamación en el SNC⁶⁶; contribuyendo a la noción de que la acción de la inmunidad periférica sería perjudicial para el SNC y que no respalda necesariamente su correcto funcionamiento.

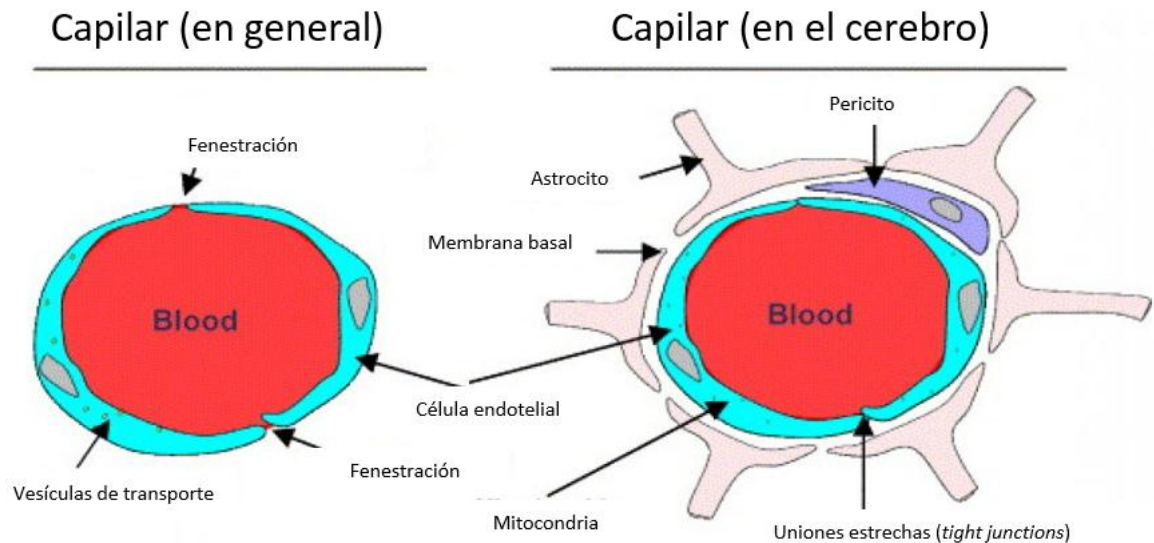


Figura 6. Comparación entre un capilar sanguíneo periférico y en el cerebro (BHE). (Adaptado de Brocks & Cole, 2001)

Sin embargo, estudios recientes han cambiado el paradigma de esta interacción y se ha aceptado que la inmunidad periférica sí participa en distintos procesos del mantenimiento de la homeostasis de las funciones cerebrales, entre ellas la movilización de antígenos desde el SNC hacia los nódulos linfoides externos por conductos perivasculares en el espacio subaracnoideo⁶⁷, el tráfico de linfocitos T desde el cerebro hacia nódulos linfoides cervicales a través de la lámina cribosa y la mucosa nasal⁶⁸, y el reclutamiento de leucocitos a regiones afectadas del cerebro, donde se da

una fina regulación a nivel celular que asegura el ingreso correcto de estas especies periféricas.⁶⁹

Finalmente, el hallazgo reciente de un sistema funcional de vasos linfáticos en el SNC⁷⁰ ha reforzado las observaciones previas del sinergismo con la inmunidad periférica y ha motivado una reevaluación de los supuestos clásicos de la neuroinmunología, además de generar nuevas perspectivas en torno a la etiología de enfermedades neurodegenerativas o donde existe inflamación cerebral.

1.3.2 Neuroinflamación

La reacción inflamatoria frente al daño por patógenos, toxinas, trauma o envejecimiento es un proceso finamente regulado por la inmunidad innata y adaptativa. Sin embargo, la inflamación en el SNC difiere sustancialmente del proceso descrito en otros tejidos.

En primer lugar, el parénquima del SNC no posee células dendríticas (DC) residentes. En su lugar están macrófagos perivascuales⁷¹ y pericitos vasculares⁷² que toman las funciones de las DC. Segundo, la microglia⁷³, los astrocitos y, en algunas regiones del parénquima, los mastocitos⁷⁴, conforman la inmunidad innata del SNC, todos ellos inactivados en condiciones no patológicas. Por último, la permeabilidad de los capilares en el SNC para células periféricas es muy limitada en contraste al resto del cuerpo por la presencia de la BHE.⁷⁵ De esta forma es mucho más difícil activar cascadas del complemento⁷⁶ y reclutar especies inmunes adaptativas, como leucocitos⁷⁷, dentro del parénquima cerebral.

En conjunto, estas características señalan que el sistema inmune innato del SNC no es eficiente para iniciar una respuesta inmune adaptativa como sucede en el resto del cuerpo. Por esta razón la neuroinflamación es un proceso complejo que puede traer tanto efectos beneficiosos como deletéreos.

El inicio de la neuroinflamación se produce por la activación de las células gliales, principalmente la microglia y los astrocitos. Por un lado, la activación de la microglia combina cambios morfológicos e inmunofenotípicos que la distinguen de su estado basal⁷⁸, de esta forma los estímulos proinflamatorios para activar la microglia son de naturaleza muy diversa. Incluyen lipolisacáridos (LPS)⁷⁹, pesticidas^{80,81} y proteínas (como β -amiloides (A β)⁸² y α -sinucleína⁸³). (Figura 7)

Una vez activada, la microglia puede activar células T y reclutar especies inmunes mediante la expresión de moléculas coestimuladoras y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que la hacen capaz de presentar antígenos hacia las células T de manera más eficiente que los astrocitos.⁸⁴ A su vez, los astrocitos activados cumplen diversas funciones regulatorias como reparar y formar la cicatriz glial en tejido dañado por trauma o sujeto a inflamación.⁸⁵

Las células gliales activadas producen factores citotóxicos como especies reactivas de oxígeno (ROS)⁸⁶, óxido nítrico (NO)⁸⁷, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)⁸⁸, interleuquina 1 y 6 (IL-1, IL-6), prostaglandinas⁸⁹, entre otras moléculas. Entre ellas, TNF α es uno de los mediadores centrales de inflamación en el tejido y ha sido implicado en la patogénesis de varias complicaciones neurológicas.⁹⁰ Esta citoquina ha mostrado efectos deletéreos y de protección en neuronas, y a nivel del SNC los macrófagos residentes, astrocitos y la microglia, son capaces de expresarla. Asimismo se ha podido corroborar el carácter dual de TNF α que puede actuar en el SNC como un agente proinflamatorio o inmunosupresor.⁹¹

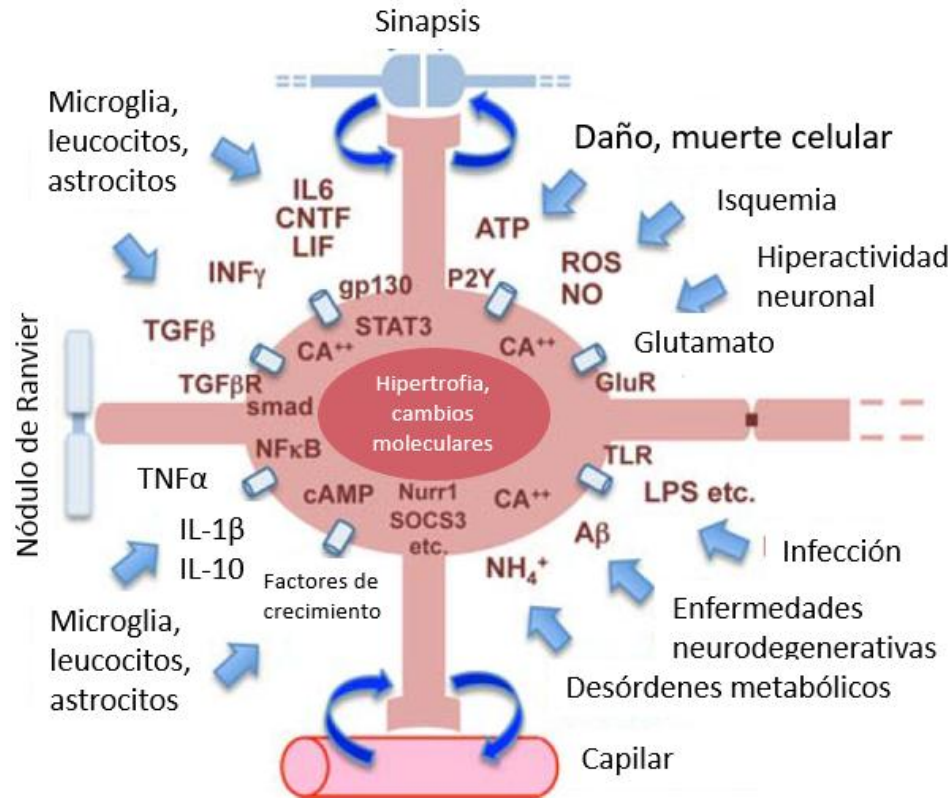


Figura 7. Representación esquemática de los factores que estimulan la célula glial en el SNC. (Adaptado de Sofrene, 2010)

1.4 Respuesta inmune en NCC

1.4.1 Interacción parásito-hospedero

Tanto en cerdos como en humanos, los cisticercos viables de *T. solium* no inducen reacción inflamatoria por parte del hospedero o esta es muy leve.^{16,92,93} Esta observación ha dado pie a diversas hipótesis sobre la capacidad del parásito para modular la respuesta inmune.

Por esta razón, se sugirió que el parásito enmascara su membrana vesicular con proteínas del hospedero como anticuerpos o factores del complemento.⁹⁴ También se propuso que el parásito era capaz de sintetizar proteínas que se asemejan estructuralmente a las del hospedero.⁹⁵ Asimismo, se ha reportado que el parásito secreta productos que podrían modular la inmunidad del hospedero como el factor metacéstodo o cistein proteasas.^{96,97}

Esta observación fue corroborada por experimentos en linfocitos cultivados los cuales sufrían apoptosis al exponerse a productos secretorios del

metacéstodo⁹⁸ y asimismo se demostró *in situ* que el cisticerco viable inducía apoptosis de linfocitos CD3+ en tejido cerebral de cerdo.⁹⁹ En el modelo murino de NCC se observó también el incremento en la expresión de receptores *toll-like* (TLR) -11, -12 y -13 en tejido cerebral infectado, señalando la participación de estos receptores en infecciones del SNC.¹⁰⁰

Estudios más recientes en el modelo murino de NCC por infección con *Mesocestoides corti* han señalado que productos secretorios del parásito regularían negativamente la expresión de precursores proinflamatorios como TNF α , IL-6 y la óxido nítrico sintasa tipo 2 (NOS2) mediante el bloqueo de regiones de reconocimiento de la RNA polimerasa.¹⁰¹ Este hecho indicaría la regulación epigenética de los componentes inmunes del hospedero por parte del parásito.

Por otro lado, los estudios sobre el papel del hospedero no son concluyentes sobre el tipo de respuesta que tiene lugar en NCC. Estudios en el modelo murino de infección peritoneal con *T. crassiceps* han señalado que se daría el cambio de una respuesta temprana proinflamatoria Th1 a una respuesta más permisiva moduladora Th2 que permitiría la permanencia prolongada del parásito.¹⁰²

Más recientemente en el modelo porcino para NCC se encontró que estas respuestas varían de acuerdo al estadio del parásito; así, se pudo asociar una fuerte respuesta inflamatoria Th1 a quistes en degeneración, una respuesta regulatoria y antiinflamatoria Th2 a quistes viables (caracterizada por aumento de IL-10 e IL-4), y una respuesta mixta Th1/Th2 en quistes calcificados.^{103,104}

Del mismo modo, en pacientes con NCC asintomática, cuya presentación se asocia con cisticercos viables, se ha observado que prevalece una respuesta Th2, caracterizada por elevados niveles de IL-4, IL-5, IL-13 e IgG4 anti-Taenia. En cambio, en los pacientes que presentan sintomatología, asociada a quistes degenerados y granulomas adyacentes, se ha observado que esta

respuesta es de tipo Th1, con incremento de IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF α y NO.^{29,105}

Sin embargo, los determinantes inmunológicos que describen los casos sintomáticos y asintomáticos en NCC aún son motivo de discusión, ya que no se han encontrado perfiles que puedan detallar el escenario en el cual la patología se resuelve o se agrava.

1.4.2 Respuesta inmune post-tratamiento en NCC

El modelo porcino ha sido usado para estudiar NCC con respaldo en que la histopatología de la respuesta inmune frente al parásito es muy similar a la enfermedad en humanos.^{9,106} Se conserva que, en la infección temprana, los cisticercos viables producen muy poca (o nula) inflamación, mientras que los parásitos en proceso de degeneración, por su desarrollo o por el tratamiento antihelmíntico, desencadenan una reacción inflamatoria crónica.¹⁰⁷

Es así que se ha aprovechado cerdos naturalmente infectados por *T. solium* para describir el curso de la enfermedad¹⁷ y para evaluar la eficacia del tratamiento.^{93,108} Sin embargo existen muy pocos estudios enfocados en caracterizar la inflamación inducida por la droga antihelmíntica. Por esta razón, el Laboratorio de Inmunopatología en NCC de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) ha realizado diversos trabajos en estos animales con el fin de caracterizar la respuesta inmune inducida por el tratamiento en NCC que puedan contribuir en el diseño de esquemas más seguros y efectivos para el control de la infección cerebral por *T. solium*.

Papel de la BHE en NCC

Se conoce que los cisticercos en vías de degeneración son rodeados por células inmunes que forman parte del infiltrado inflamatorio de la periferia.¹⁰⁹ Este proceso es por cambios en la permeabilidad de la BHE.¹¹⁰ Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento antihelmíntico en la

permeabilidad de la BHE, se diseñó en el laboratorio un plan experimental con cerdos naturalmente infectados por *T. solium* los cuales recibieron praziquantel (PZQ) y fueron perfundidos con el colorante vital Azul de Evans (AE). AE tiene la cualidad de formar un complejo estable con la albúmina¹¹¹ y al extravasarse a los tejidos por un aumento de la permeabilidad de la BHE los colorea de azul, además de emitir fluorescencia¹¹², indicando las regiones donde la BHE, que normalmente es impermeable a la albúmina, se ha modificado.¹¹³

Con este modelo, en base a una muestra de animales relativamente pequeña y heterogénea, se observó que el tratamiento estuvo asociado con una mayor permeabilidad de la BHE en las regiones de tejido del hospedero (cápsulas) que rodean a algunos quistes; precisamente aquellos en los que se demostró presencia de un mayor infiltrado inflamatorio.¹¹⁴ Esta alteración puede observarse en la figura 8, que muestra una sección de cerebro donde se indica las cápsulas claras y azules que rodean a los quistes.

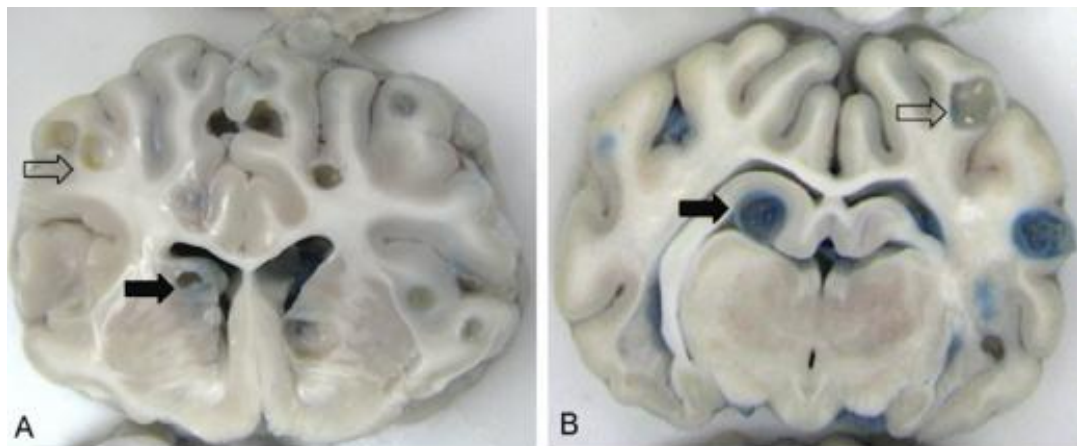


Figura 8. Cambios en la permeabilidad de la BHE en cerebros de cerdos infectados por *T. solium*. Las cápsulas azules fueron más abundantes en los grupos que recibieron tratamiento con PZQ (B), en comparación a los cerdos infectados sin tratamiento (A). (Guerra-Giraldez et al., 2013)

Pérdida focal de integridad vascular e infiltración eosinofílica en NCC

Con esta metodología, nuestro grupo de investigación pudo caracterizar, en otro trabajo, la naturaleza celular de la respuesta inflamatoria en NCC inducida por la administración de PZQ, y describir histológicamente las

regiones de la cápsula con infiltrado focal de AE (REBI, por *region of Evans blue Infiltration*) que se observan macroscópicamente como un punto azul en la superficie de algunos quistes.

El estudio corroboró mediante inmunohistoquímica la presencia de eosinófilos en las REBI (Figura 9), señalando que estas células lideran la respuesta inmune del hospedero en el proceso efectivo de ataque al parásito.¹¹⁵

Inflamación, daño al quiste y expresión de precursores inmunes

En el laboratorio se utilizan sistemas de puntuación o *scores* semicuantitativos para caracterizar histológicamente la inflamación (IS score, por *inflammatory stage score*) y el daño al parásito; estos sirven para apreciar los efectos inducidos o exacerbados por la administración de PZQ. Aunque el IS score tiene varias limitaciones, consistentemente las cápsulas azules alcanzan valores más altos que las cápsulas claras. Además, el tiempo de exposición al PZQ también se refleja en el puntaje de inflamación.¹⁰⁴ (Figura 10)

Efecto de la localización del quiste en el proceso inflamatorio

En uno trabajo más reciente desarrollado por nuestro grupo se confirmó que uno de los factores que influye en la respuesta inflamatoria es la localización del cisticercos en el tejido cerebral.¹¹⁶ Los resultados indicaron que los cisticercos parenquimales presentan niveles más altos de inflamación pericística (IS score más alto) después del tratamiento con PZQ y a su vez la permeabilidad de la BHE sufrió cambios significativos solo en tejido parenquimal. (Figura 11)

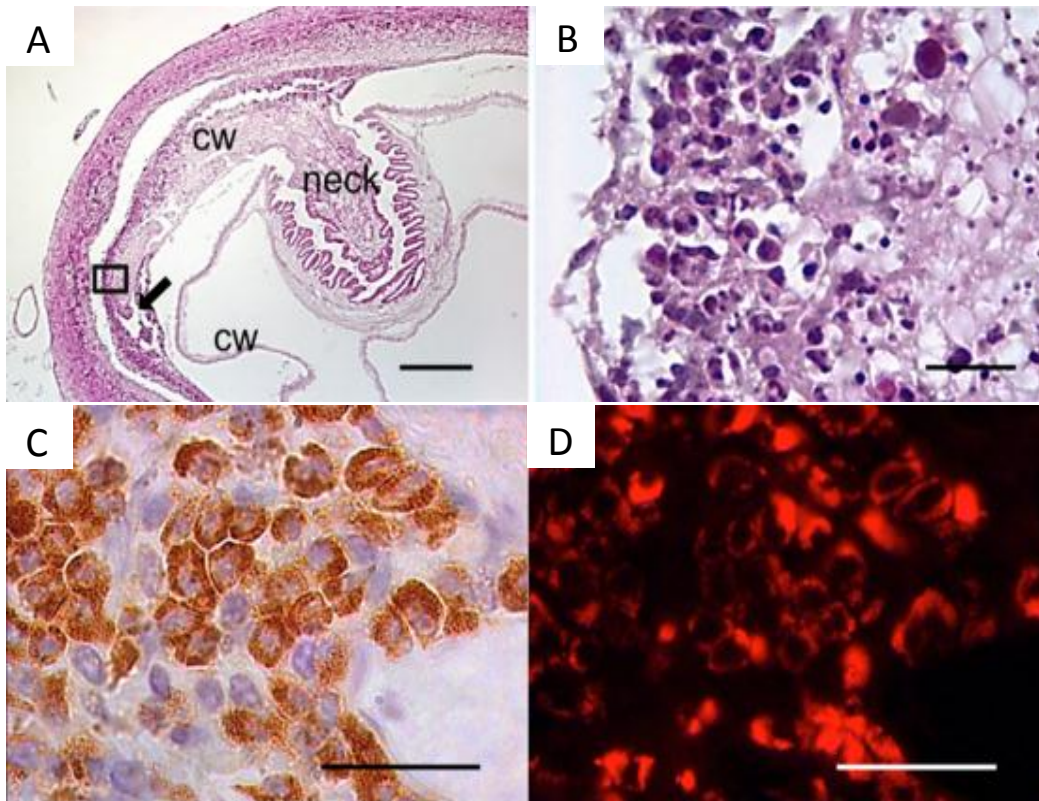


Figura 9. Caracterización de regiones con infiltrado de Azul de Evans (REBI) en cisticercos de *T. solium*. (A) Sección de cápsula coloreada con Hematoxilina Eosina donde se señala la REBI con flecha negra y el aumento (D) de una zona representativa marcada con recuadro negro. (C) Inmunolocalización de la peroxidasa de eosinófilo y (D) la misma sección vista con un filtro de rodamina para localizar Azul de Evans. (Marzal, M., Guerra-Giraldez, C. et al. 2014)

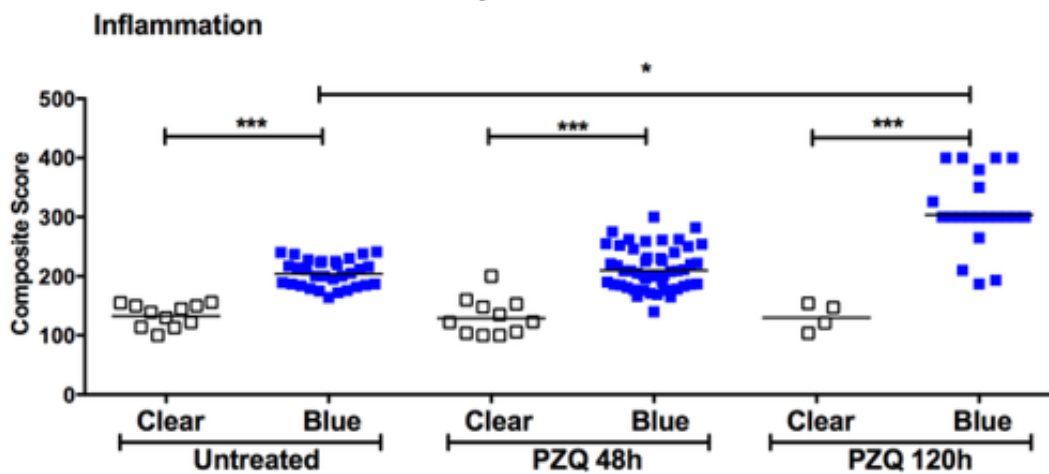


Figura 10. La Inflamación en cápsulas azules incrementa con exposición a PZQ. (Mahanty, S. et al. 2015)

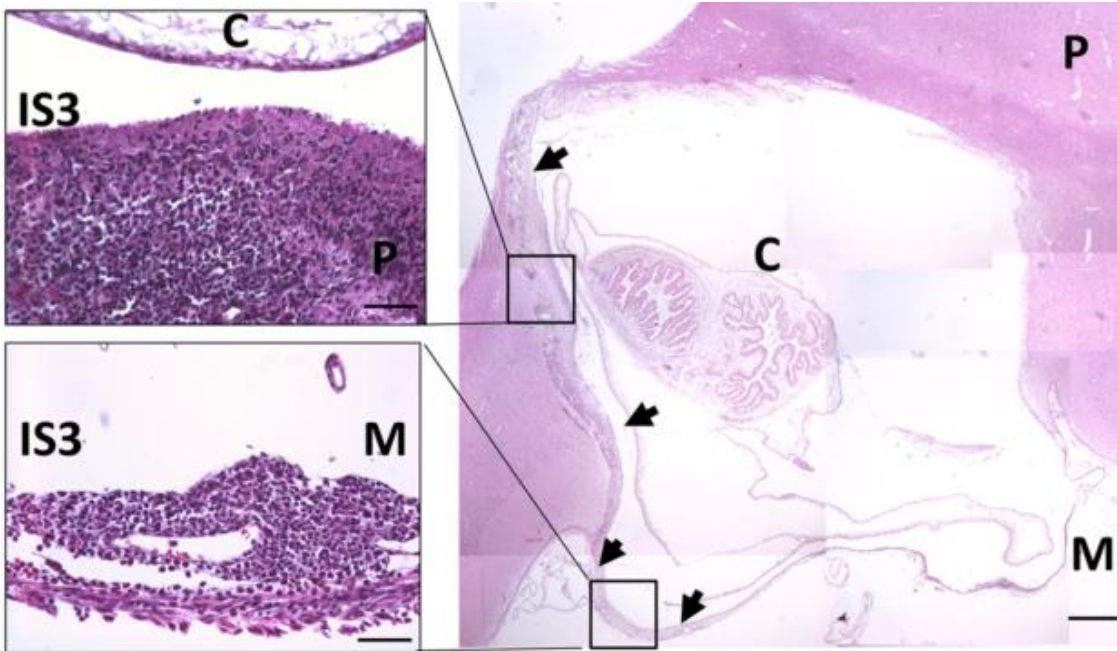


Figura 11. Evaluación histológica de un quiste conticomeningeo. La reacción inflamatoria en la región parenquimal (P) fue visualmente mayor que en la región meningeal (M). (Cangalaya, 2015)

1.5 Proteína β -Amiloide ($A\beta$)

1.5.1 Generalidades

El mal de Alzheimer (AD) y la esclerosis múltiple (MS) son otras patologías caracterizadas por la inflamación del SNC.¹¹⁷ En AD, la neurotoxicidad es mediada por unos péptidos cortos denominados beta-amiloides ($A\beta$), cuya presencia se ha relacionado a daño neurodegenerativo.¹¹⁸ A nivel extracelular los agregados en placas de estas moléculas están involucrados en varios procesos patológicos, incluyendo la activación glial, disfunción sináptica, neuroinflamación y apoptosis neuronal.¹¹⁹⁻¹²¹

Independientemente de su carácter patológico, se ha demostrado que la biosíntesis de $A\beta$ forma parte del metabolismo celular normal.¹²² Estos péptidos se forman por la proteólisis de la proteína precursora de amiloide (APP), una proteína transmembrana involucrada en la plasticidad sináptica¹²³ que es codificada por un gen del mismo nombre (*app*). (Figura 12)

La APP madura puede ser cortada por enzimas con actividad α -secretasa a nivel del residuo 83 y liberar fragmentos solubles de APP (sAPP) que son secretados hacia el espacio extracelular sin mayor impacto clínico. Se genera también un fragmento carboxiterminal alfa (α -CTF) que será subsecuentemente cortado por una γ -secretasa, produciendo un pequeño fragmento denominado p3.¹²⁴

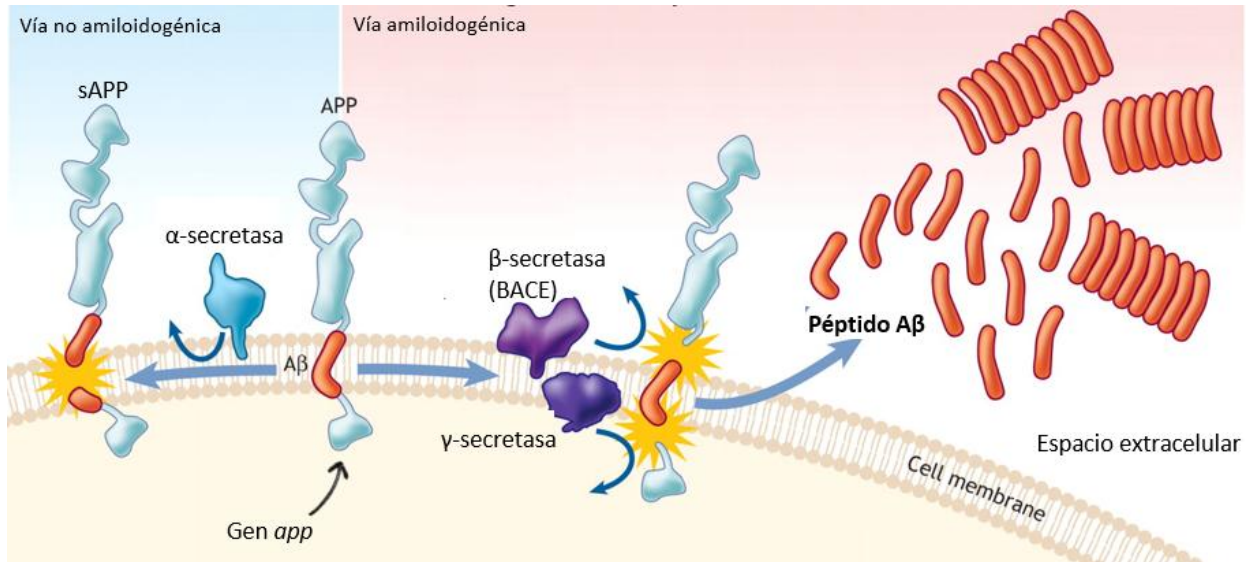


Figura 12. Esquema de la síntesis de A β a partir de APP. Vía amiloidogénica (derecha, fondo rosado) y vía no amiloidogénica (izquierda, fondo celeste). (Adaptado de Bateman, 2006)

Por otro lado, en la vía amiloidogénica, APP es retirada de la membrana por endocitosis. Una vez dentro del endosoma APP sufre un corte a nivel del aminoácido 99 por una β -secretasa denominada β -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) que da lugar también un fragmento carboxiterminal beta (β -CTF).¹²⁵ Este último producto es a su vez sustrato de la γ -secretasa para generar finalmente fragmentos peptídicos A β de entre 40 y 42 aminoácidos, entre otros.¹²⁶ Los péptidos son secretados desde el interior de vesículas y son precisamente los agregados de la isoforma A β_{42} los que se han reportado de manera predominante en placas cerebrales implicadas en cuadros de neurotoxicidad, disminución de la plasticidad sináptica y el desorden neurodegenerativo a nivel del SNC.¹²⁷⁻¹²⁹

Aunque su función no está del todo está esclarecida, se le han atribuido a A β roles potenciales como activador de enzimas quinasas¹³⁰, protector ante el estrés oxidativo¹³¹, regulador del transporte del colesterol¹³², actividad como un factor de transcripción¹³³ y también se ha señalado como agente antimicrobiano potencialmente asociado con su actividad pro inflamatoria.¹³⁴

1.5.2 A β en la respuesta inmune en el SNC

La participación de A β en la respuesta inmune se ha reportado en algunas patologías, destacando el caso de AD como agente pro inflamatorio y neurotóxico. Estudios en modelos experimentales para esta enfermedad permiten proponer la interacción de A β con diversos componentes celulares que dan lugar a procesos neuroinflamatorios.

Por ejemplo, algunos estudios han señalado que las fibras y oligómeros A β pueden unirse a varios receptores que son expresados en la microglia favoreciendo su activación. Estos incluyen CD14¹³⁵, CD36¹³⁶, CD47¹³⁷, integrina $\alpha 6\beta 1$ ¹³⁸, *class A scavenger receptor*¹³⁹, *receptor for advanced glycosylation end products (RAGE)*¹⁴⁰ y *toll-like receptors (TLR)*.¹⁴¹

Asimismo, el papel de A β en el desarrollo del proceso neuroinflamatorio ha sido motivo de discusión en varios estudios. Por ejemplo, se ha evidenciado que la unión de A β a CD36 o TLR-4 estimula la producción de citoquinas inflamatorias *in vitro*.¹⁴² Algunos estudios *in vivo* han detectado niveles altos de moléculas proinflamatorias como IL-1, IL-6 *granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)*¹⁴³, IL-12, IL23¹⁴⁴ y TNF α en el cerebro y en líquido cefalorraquídeo.¹⁴⁵ Estudios en cerdo han indicado la acumulación de A β , proteína Tau y neurofilamento posterior al trauma cerebral, indicando que el péptido A β estaría involucrado en la respuesta inflamatoria frente a una lesión.¹⁴⁶

Asimismo, en modelos murinos para el estudio de AD se ha observado la expresión de TNF α en respuesta a A β mediada por la interacción de CD40¹⁴⁷ o por la activación de TLR-4.¹⁴⁸

Entre los factores que disparan la neuroinflamación se encuentra la interleucina 1 β (IL-1 β) cuya expresión se ha visto incrementada en trastornos como AD y MS.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ También se ha comprobado que la señalización vía activación del receptor de IL-1 β en células gliales estimula la expresión de citoquinas proinflamatorias reguladas por el factor de transcripción NF- κ B, como TNF α , IL-6 e INF- γ , y agentes de reclutamiento de neutrófilos como CXCL1 y 2.¹⁵² (Figura 13)

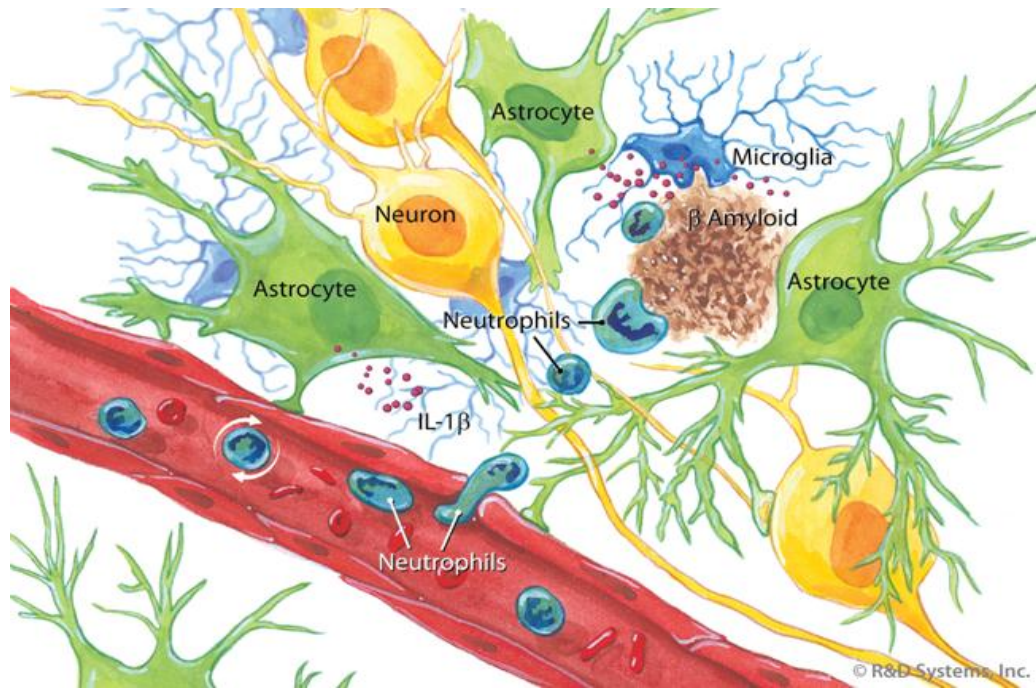


Figura 13. Depósitos A β inducen neuroinflamación por activación de células gliales y aumento en la expresión de mediadores inflamatorios. (Tomado de Moynagh et al, 2005)

Sin embargo, el papel de A β en infecciones por parásitos ha sido muy poco explorado y se desconocen los efectos de este péptido en el proceso inflamatorio derivado de una infección.

1.5.3 A β en NCC

La presencia de A β en NCC ha sido brevemente mencionada en apenas dos estudios descriptivos y de incidencia realizados en Brasil. El primero de ellos realizó una caracterización patológica de la cisticercosis humana, de casos en el corazón y cerebro, encontrando beta-fibrilosis (depósitos de A β) en torno a cisticercos en diferentes estadios.¹⁵³ El otro

estudio fue un tratado anatomopatológico de la NCC donde también se evaluaron histológicamente las características del tejido cerebral cercano a quistes, encontrando agregados A β que correspondían asimismo a zonas con inflamación.¹⁵⁴

Además de estos dos estudios, durante el presente revisión no se encontraron más reportes sobre la distribución de este péptido en NCC humana o porcina y tampoco datos a nivel molecular sobre la biosíntesis de este péptido en NCC. Por consiguiente, además de ser un mero indicador de inflamación a nivel histológico, no se ha discutido a profundidad las funciones potenciales de este péptido en la respuesta inmune asociada a esta enfermedad y asimismo, se desconoce el efecto de la terapia antihelmíntica en la homeostasis de los agregados A β .

II. Hipótesis

Puesto que A β es un marcador de inflamación, el tratamiento con PZQ incrementa tanto la presencia de la proteína A β y la expresión del gen *app* en cerebro de cerdo infectado por *T. solium*.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar a nivel histopatológico y molecular la expresión del péptido A β como respuesta a la inflamación derivada del tratamiento con PZQ en NCC porcina y discutir el papel que juega esta molécula en la respuesta inmune para esta enfermedad.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar mediante inmunohistoquímica la presencia del péptido A β en tejido cerebral de cerdo con NCC.
- Evaluar en tejido cerebral de cerdos perfundidos con AE el efecto del tratamiento con PZQ y el compromiso de la BHE en la presencia de A β .
- Evaluar el efecto de la localización del quiste en la producción de A β .

- Evaluar por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) la expresión diferencial del gen *app* en respuesta al tratamiento con PZQ y a la disrupción de la BHE.

IV. Materiales y métodos

4.1 Flujograma de trabajo

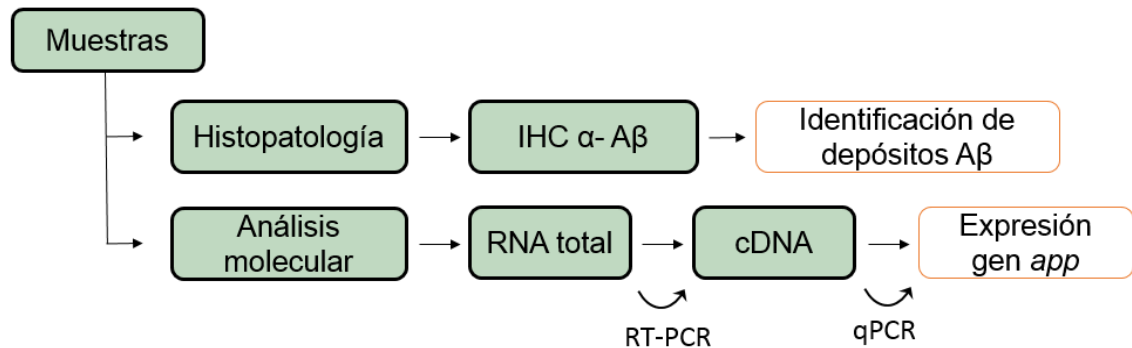


Figura 14. Esquema del diseño experimental para la evaluación histopatológica y molecular de Aβ.

4.2 Muestras

Las biopsias de tejido cerebral de cerdo, tanto para análisis histológico y molecular, provienen del proyecto "*Evaluación de la permeabilidad vascular en cerebro y músculo de cerdos naturalmente infectados con Taenia solium*" (SIDISI 57546) realizado en el laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis, Facultad de Ciencias y Filosofía de la UPCH. Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Ética para Investigación en Animales (CIEA) de la UPCH.

En este proyecto se validó un modelo para el estudio de la disrupción de la BHE en NCC y los efectos del uso de drogas antihelmínticas, basado en la extravasación del colorante AE. Para ello se utilizaron 11 cerdos naturalmente infectados con cisticercos de *T. solium*, seropositivos a ensayo por Western Blot, los cuales fueron agrupados con las siguientes consideraciones: cerdos que no recibieron tratamiento con PZQ (UT; n=4) y cerdos que recibieron una dosis única de PZQ (100 mg/kg) por vía oral 2 días (T48, n=4) y 5 días (T120, n=3) antes de la inyección intraarterial de AE al

2% (80 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis MO) en solución salina (NaCl 0.85%, Laboratorios Baxter Colombia, Baxter del Perú).

Durante este proceso, los cerdos estuvieron anestesiados con Ketamina (10mg/kg; ket-A-100, Agrovvet Market SA, Perú), Xilacina (2mg/kg; Dormixyl 2, Agrovvet Market SA, Perú) y Pentobarbital (20-25 mg/kg cada 45 min o lo necesario, hasta un máximo de 120mg/kg). Finalmente, después de 2 horas de administración de AE, los cerdos fueron sacrificados con una dosis letal de Pentobarbital y fueron perfundidos durante 20 minutos (min) con formalina helada al 10% (3.7% formaldehído en PBS, pH 7.2) con ayuda de una bomba peristáltica. Una vez terminada la perfusión, se extrajo el cerebro, el cual se cortó en secciones coronales de aproximadamente 1 cm de grosor.

Para la evaluación por histología, se colectaron biopsias semicubicas de tejido cerebral de aproximadamente 1 cm de lado. Las biopsias fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes consecutivos de aproximadamente 4 μ m con micrótomo, que fueron posteriormente fijados en láminas portaobjetos tratadas con poli L-lisina (Sigma, St. Louis, MO). De manera paralela, las biopsias destinadas al análisis por biología molecular se preservaron inmediatamente en solución caotrópica (RNA Later®, Qiagen) y se almacenaron a -70° C hasta el momento de la extracción de RNA.

4.3 Evaluación histopatológica de A β

4.3.1 Inmunohistoquímica (IHC)

La detección del péptido A β se realizó por inmunohistoquímica. Para ello las láminas con tejido fijado en formol fueron desparafinadas a 56° C, inmersas en xilol y rehidratadas por baños sucesivos en un gradiente de etanol (desde absoluto hasta 70%) hasta agua corriente. Para el rescate antigénico las láminas fueron incubadas en buffer citrato, pH 6.0 (citrato de sodio 10mM, Tween 20 0.05%) a 95° C durante 30 min. Seguidamente se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena de las secciones para lo cual se incubó las láminas en una solución de peróxido de hidrógeno al 30% – PBS pH 7.2 (1:5 v/v) a temperatura ambiente por espacio de 30 min.

Posteriormente, con el propósito de eliminar reacciones inespecíficas, las láminas fueron tratadas con una solución de bloqueo (PBS pH 7.2; Tween 20 al 0.05%; Triton X100 al 0.1 %; Suero normal de cabra al 2% y leche en polvo al 6%) por 30 min a temperatura ambiente, seguido de lavados sucesivos con PBS pH 7.2 al 0.05%, Tween 20 al 0.05% para eliminar remanentes.

Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-A β (β -amyloid antibody #2454, Cell Signaling Technology®) diluido en PBS pH 7.2 (1:150 v/v) por 30 min a 37° C en cámara húmeda y luego a 4° C hasta el día siguiente. Después de eliminar los excedentes con lavados de PBS pH 7.2, Tween 20 al 0.05%, se sometió a las láminas a incubación con anticuerpo secundario (Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG) diluido (1:250 v/v) en una solución mixta (PBS pH 7.2, Tween 20 al 0.05%, Triton 100X 0.1%, Suero Normal de Cerdo al 2% y leche en polvo al 6%) por espacio de 1 hora a 37° C en cámara húmeda y 30 min adicionales a temperatura ambiente.

Después de eliminar remanentes, el tejido fue incubado con el conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa de rabanito, HRP (Dako® Cytomation, P0397) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la adición de 3,3- diaminobenzidina (DAB Dako®, K3466) permitió la detección de A β en el tejido por la oxidación del sustrato, que generó una reacción colorimétrica marrón rojiza. Las láminas fueron lavadas con PBS pH 7.2, Tween 20 al 0.05% para detener la reacción y eliminar excedentes.

Por último, se añadió hematoxilina de Mayer (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) a cada sección como tinción de contraste por 1 min, posteriormente las láminas fueron lavadas, deshidratadas y montadas con bálsamo para microscopía (Cytoseal 60 mounting medium, Stephens Scientific®, Riverdale, NJ). Las láminas se dejaron secar hasta el día siguiente para la posterior evaluación de la distribución del marcador.

4.3.2 Caracterización histológica de la inflamación

El estadio inflamatorio del tejido fue caracterizado en una escala ascendente del 1 al 4, siguiendo el criterio previamente descrito por Alvarez¹⁵⁵ y Londoño¹⁰⁷; basado en el infiltrado celular alrededor del quiste. Este sistema de caracterización fue adoptado y estandarizado en el laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis para fines descriptivos.

De esta forma IS-1 se caracterizó por la ausencia o rara presencia de células inflamatorias, y colágeno ausente o presente solo como una delgada capa adyacente a los quistes viables. Para IS-2, el rasgo característico es la presencia de un número moderado de células inflamatorias entremezcladas entre abundantes fibras de colágeno en contacto con la pared intacta del quiste. De manera similar IS-3 se caracterizó por un infiltrado inflamatorio abundante, presencia de eosinófilos y células epitelioides en contacto con la pared del quiste (granuloma). También pueden identificarse nódulos linfoides distribuidos irregularmente en el perímetro del quiste.

4.3.3 Interpretación de la reacción positiva por IHC: Score de Intensidad

Con la finalidad de caracterizar la presencia del marcador, se empleó un score semicuantitativo adimensional que facilita la descripción del tejido (INT-SC). La intensidad de la reacción obtenida por la IHC en la detección de A β en el perímetro del quiste fue evaluada mediante la observación manual de cada quiste por microscopía para la generación de mapeos (fotografía panorámica con aumento 2X). Para esto se asignaron valores de intensidad ascendente del 0 al 3 para cada región en función a la inmunorreactividad del marcador, tal como detalla el anexo 1.

En cada mapeo se reconoció y señaló para cada quiste las distintas categorías de inflamación presentes en el tejido periférico y se calculó la representación de cada una como porcentajes de del perímetro total. Con esta modificación se normalizó el tamaño del quiste en la cuantificación de la

presencia de A β . Finalmente el INT-SC de cada quiste se obtuvo mediante la sumatoria de los productos obtenidos del porcentaje de cada categoría y el grado de intensidad, generando una escala con un valor máximo de 300. De esta forma el valor del INT-SC es un indicador de la inmunorreactividad y de la presencia de A β que permitió comparar la expresión de este péptido entre los distintos grupos. La fórmula INT-SC se puede observar también en la anexo 1.

4.3.4 Evaluación de la expresión de A β por localización del cisticerco en el cerebro

Para evaluar el efecto de la localización de la cápsula sobre la expresión de A β se utilizaron los mapeos previamente elaborados, los cuales se usaron para una segunda observación con la finalidad de caracterizar la naturaleza del tejido cerebral. De esta forma se determinó para cada cápsula el porcentaje de corteza, subcorteza y meninges que la compone.

Para fines de este trabajo, se tomaron, en la mayor proporción posible, quistes parenquimales, los cuales fueron agrupados en dos categorías de acuerdo a su localización (corteza o subcorteza). Histológicamente se señaló como corteza al tejido cerebral de apariencia lisa con abundante presencia de somas neuronales donde destacan las células piramidales. Por otro lado, la subcorteza se caracterizó como la región del parénquima donde el tejido toma apariencia esponjosa, acercándose a la zona granular del parénquima. Con estas consideraciones, se procedió a analizar la inmunorreactividad de A β para las cápsulas estratificadas según su localización.

4.4 Evaluación de la expresión del gen de la proteína precursora de amiloide (*app*)

4.4.1 Extracción de RNA

El RNA se aisló a partir del tejido homogenizado en TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante y manteniendo las muestras en frío durante todo el proceso. Se consideró una

etapa de extracción con fenol (TRIzol®) y cloroformo para la formación de fases orgánica y acuosa respectivamente, precipitación de la fase acuosa con isopropanol absoluto (0.5 mL : 1 mL de TRIzol®) y lavado del precipitado o *pellet* con etanol al 75% (1 mL : 1 mL de TRIzol®). Finalmente se resuspendió el pellet de RNA en 50 µL de agua libre de nucleasas.

La concentración de RNA obtenido se determinó por espectrofotometría a 260 nm con NanoDrop® (NanoDrop Products, Wilmington, DE) y se estimó la calidad con el ratio de absorbancias 260/280 considerando valores iguales o mayores a 1.6. Para todas las muestras, el RNA total extraído se llevó a una concentración final de 100 ng/µL y fue almacenado a -70° C para fines posteriores.

4.4.2 Generación de cDNA por transcriptasa reversa (RT-PCR)

Se generó cDNA a partir de 10 µL de RNA total (100ng/µL) mediante transcripción reversa con el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche®) adoptado por el laboratorio para procedimientos de análisis molecular.

Se utilizó para cada reacción 2 µL de *random hexamers primers* (600 pmol/µL), 1 µL de agua grado PCR, 4 µL de buffer del kit (5X), 0.5 µL de inhibidor de RNAasa (40 U/µL), 2 µL de dNTP mix (10mM por cada base) y 0.5 µL de transcriptasa reversa (20 U/µL), para un volumen final de 20 µL.

Se empleó el termociclador Hot Bonnet® PTC-150 (Mini Cycler™) siguiendo un protocolo de 10 min a 25°C, 30 min a 55°C y 5 min a 85°C.

4.4.3 PCR en tiempo real (qPCR)

El análisis de expresión se desarrolló para cada muestra por duplicado, usando el kit TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) el cual requirió para cada reacción 1 µL de cDNA (producto de RT), 5 µL de Taqman® Universal PCR Master Mix II (2X), 3 µL de agua libre de RNAasas y 1 µL de sonda Taqman hidrolizable específica para el gen *app* (Life Technologies, Ss03394824_m1) alcanzando

un volumen final de 10 µL para cada reacción. El gen ribosomal 18S (Life Technologies, 4319413E) se utilizó como control endógeno de la expresión, siguiendo los criterios previamente descritos en un trabajo previo del laboratorio.¹⁰⁴ Otros detalles de las sondas pueden verse en la anexo 2.

4.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos por el INT-SC se analizaron usando estadística no paramétrica. El test U de Mann-Whitney U para la evaluación entre dos grupos fue calculado usando el software Prism 6 (Graphpad, San Diego, CA). Este análisis se realizó para los datos obtenidos por histología y biología molecular. Diferencias con valores $p < 0.05$ fueron consideradas como estadísticamente significativas.

V. Resultados

5.1 Distribución de la muestra

Para el análisis por histopatología se consideraron 82 quistes obtenidos de 8 cerebros de cerdos infectados con *T. solium*, y para el análisis de expresión se consideraron 20 cápsulas colectadas de 6 cerdos. La tabla 1 muestra la distribución de estos quistes de acuerdo al grupo de tratamiento y al color de su cápsula.

Tabla 1. Distribución de muestras según tratamiento y color de cápsula.

Propósito	Tratamiento	Número de cerdos	Quistes		Total
			Color de Cápsula		
			Clara	Azul	
Histopatología	UT	3	10	13	23
	T48	3	16	20	36
	T120	2	8	15	23
	Total	8	34	48	82
Biología Molecular	UT	2	3	4	7
	T48	2	3	4	7
	T120	2	3	3	6
	Total	6	9	11	20

5.2 Presencia de A β en tejido cerebral de cerdo infectado por *T. solium*

La inmunolocalización de A β en secciones de tejido cerebral de cerdo con NCC (Figura 15) permitió observar la distribución de este péptido en la interfase hospedero-parásito. (Figura 15. A-B) La validación de la técnica se realizó al enfrentar el anticuerpo en tejido de cerebro humano con AD como control positivo, donde se aprecia una evidente reacción positiva. (Figura 15. C) Y asimismo se consideraron controles de contaminación de PBS e isotipo para toda la colección de láminas, demostrando la ausencia de artefactos y/o agentes contaminantes que puedan afectar con la correcta interpretación en la histopatología. (Figura 15. E-F) Paralelamente, para evaluar la especificidad del marcador en NCC, se ejecutó el sistema IHC anti- A β en tejido cerebral de cerdo sano y se observó muy baja o nula inmunorreactividad.

5.3 Expresión de A β por estadio inflamatorio

La observación histopatológica de la cápsula permitió evaluar la distribución de A β y su presencia en función al estadio inflamatorio (IS) del tejido. Se encontró que A β está asociado a regiones del tejido con IS-3 (Tabla 2). Asimismo, se pudo apreciar también que A β se presenta de manera más intensa en las cápsulas con tratamiento en comparación a las no tratadas. Se tomaron fotografías de todos los IS, las cuales muestran que A β se expresó en cantidades significativamente menores en IS-1 (Figura 16, A-B) e IS-2 (Figura 16, B-C), mientras que las zonas con IS-3 (Figura 16, E-F) mostraron inmunorreactividad más elevada.

Tabla 2. Distribución de A β según estadio inflamatorio

	INT-SC			Test U Mann Whitney (p value)		
	IS-1	IS-2	IS-3	IS-1 vs IS-2	IS-1 vs IS-3	IS-2 vs IS-3
(n)	(32)	(62)	(67)			
Media;	42.08;	81;	90.2;	0.0062	0.0001	0.3408
mediana	27.32	63.7	86.5			

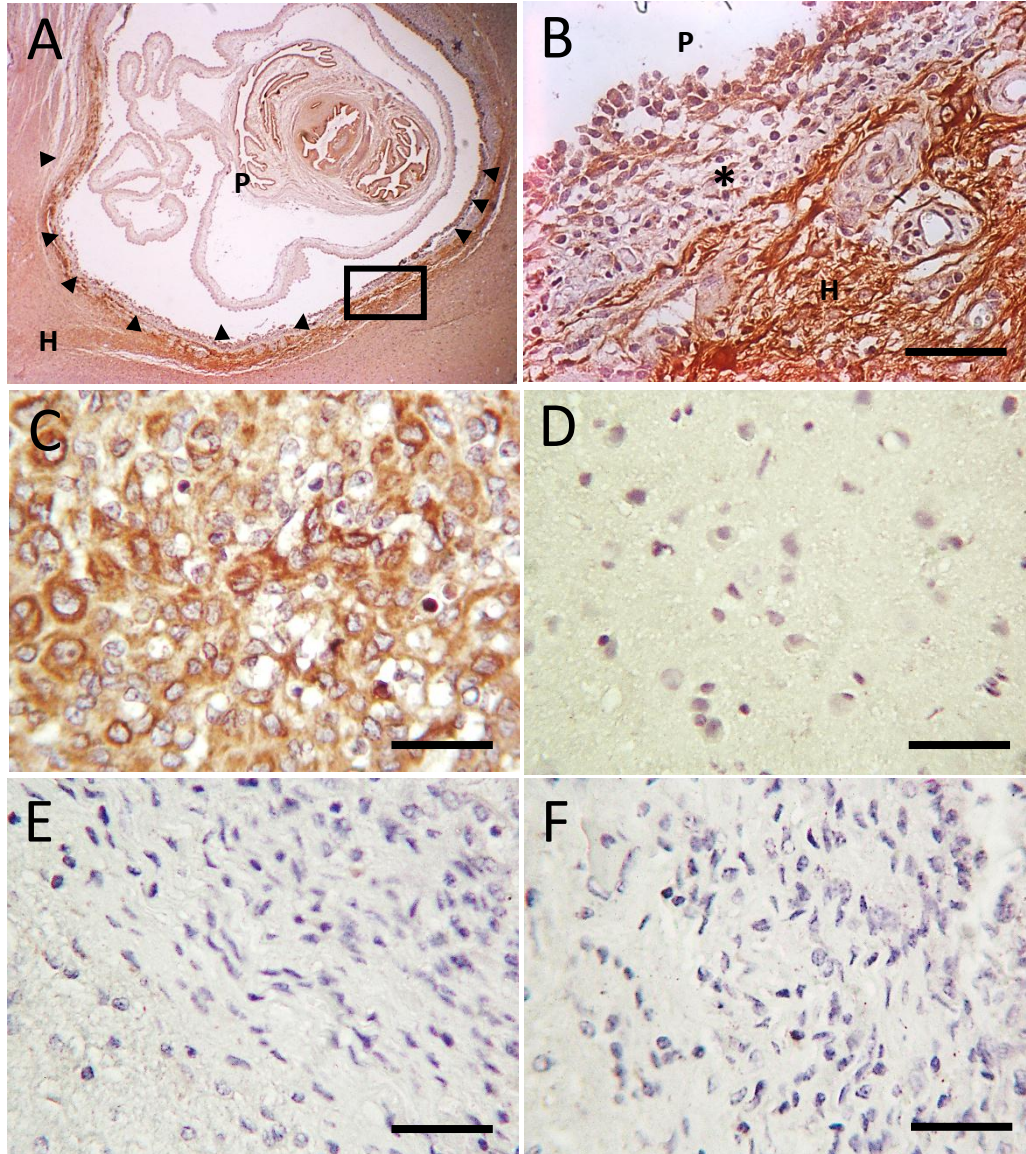


Figura 15. *Aβ* está presente en tejido cerebral de cerdo infectado por *T. soilum*. Se observa la presencia de *Aβ* en el tejido del hospedero (H) que se distribuye hacia el perímetro del parásito (P), las regiones con inmunorreactividad (se indican con cabezas de flecha). **(A)** Fotografía panorámica de una sección de tejido cerebral de cerdo que incluye un cisticercos alojado. **(B)** Aumento de una región de la fotografía anterior donde puede apreciarse la acumulación de *Aβ* por detrás del infiltrado inflamatorio (*). **(C)** Tejido cerebral humano con mal de Alzheimer que se usó como control positivo. **(D)** Tejido cerebral de cerdo sano con inmunorreactividad nula. Controles de inmunohistoquímica **(E)** PBS e **(F)** isotipo. Las barras de escala corresponden a 20 μ m. Aumento de A: 40X, B: 100X, C-F: 400X.

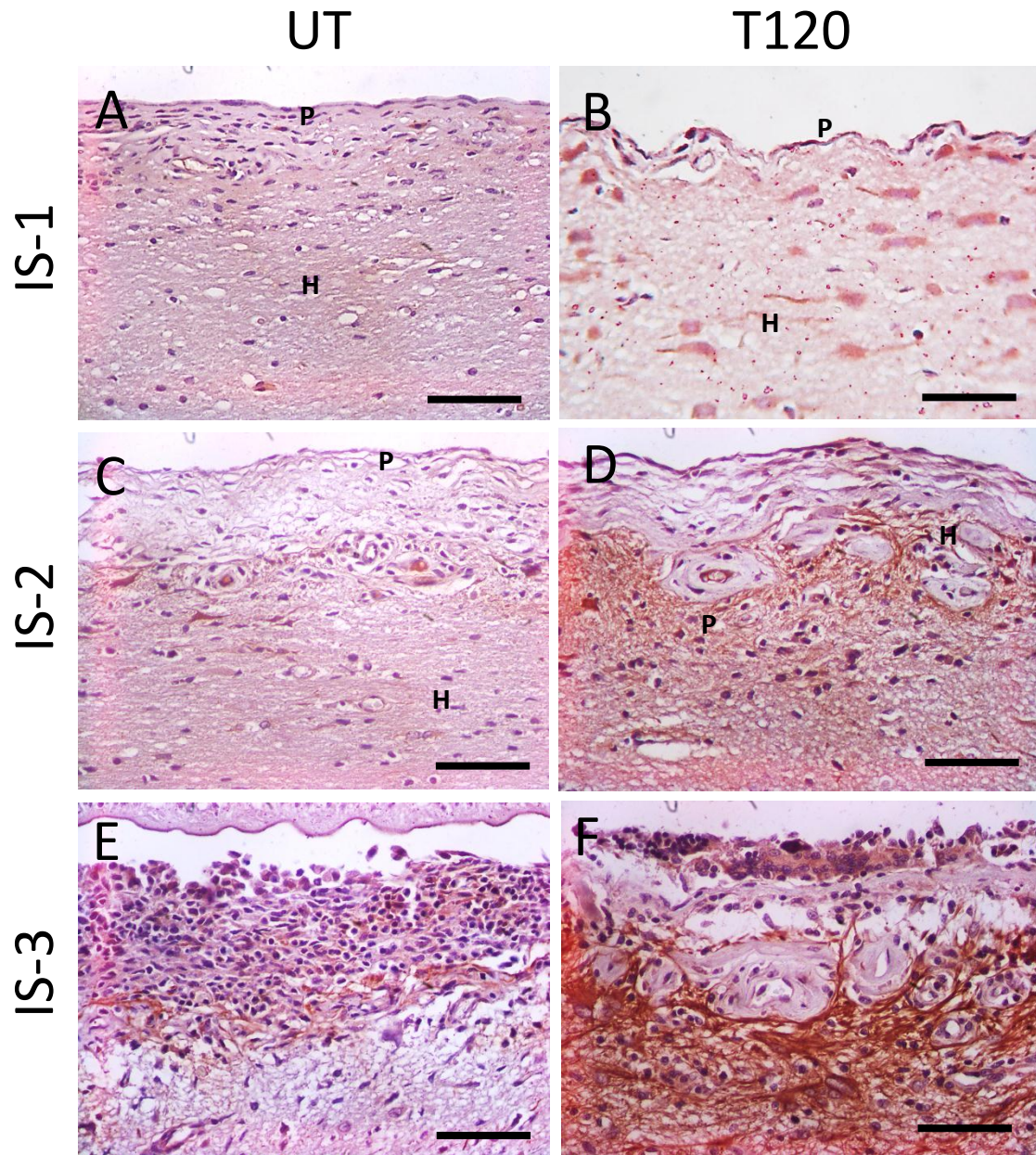


Figura 16. . La distribución de A β es mayor en tejido con alto grado de inflamación. Microfotografías de la interfase hospedero-parásito en secciones de tejido cerebral de cerdo infectado por *T. solium*. Las tomas de cápsulas con tratamiento (columna derecha) indican una mayor presencia de A β en comparación a las no tratadas (columna izquierda). Se realizaron tomas para todos los IS descritos: IS-1 (A, B), IS-2 (C, D) e IS-3 (E, F). Las barras de escala corresponden a 20 μ m.

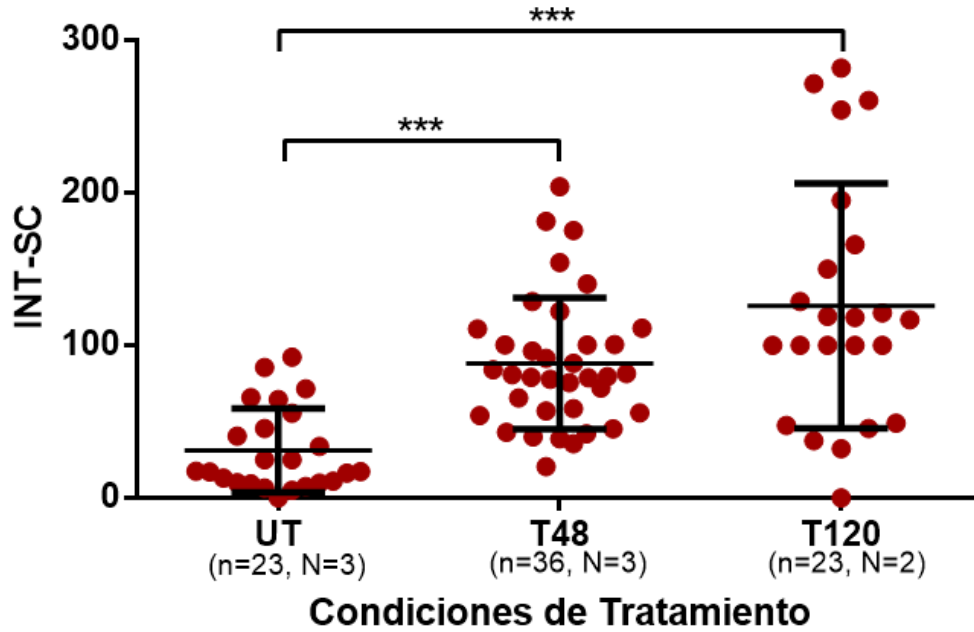


Figura 17. La expresión de A β es estimulada por el tratamiento antihelmíntico con PZQ. El INT-SC, referencial para la presencia de A β , se evaluó para cada cápsula (n) obtenidas de cada grupo de cerdos (N). De acuerdo al test U de Mann-Whitney U, los asteriscos representan el nivel de significancia: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$. Las barras corresponden a la desviación estándar y a la mediana de cada grupo.

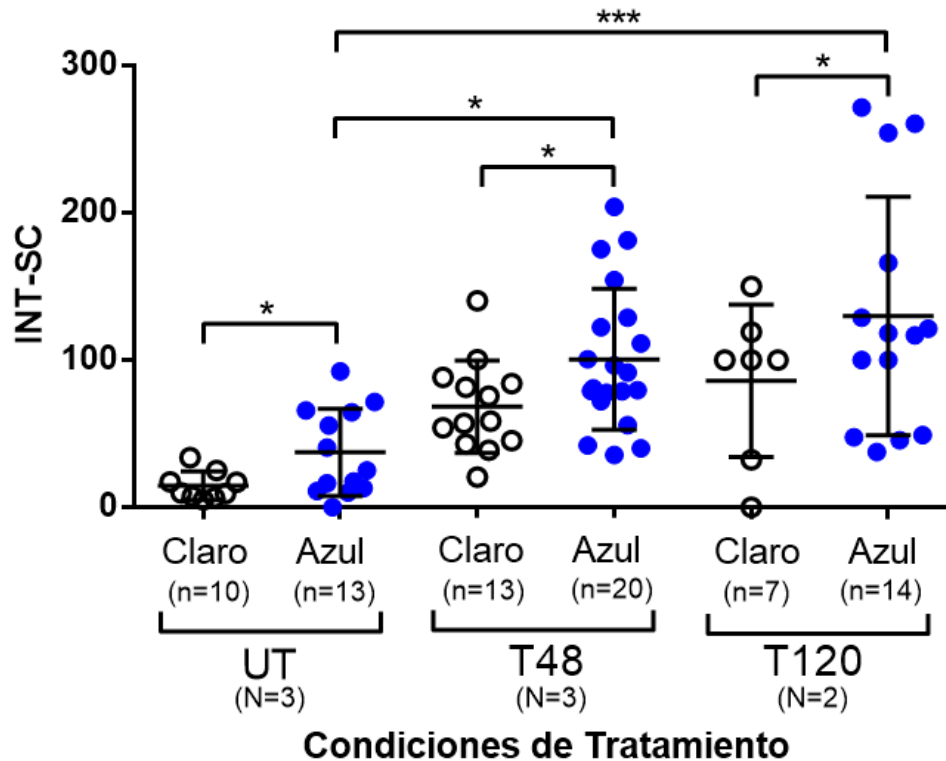


Figura 18. A β se produce más en regiones con aumento de la permeabilidad de la BHE. Para comparar la reactividad de A β según la permeabilidad de la BHE y el tratamiento, los círculos vacíos representan cada una de las cápsulas claras y los azules las cápsulas azules. De acuerdo al test U de Mann-Whitney U, los asteriscos representan el nivel de significancia: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$. Las barras corresponden a la desviación estándar y a la mediana de cada grupo. El número de cápsulas (n) y cerdos (N) de cada grupo se indican en la gráfica.

5.4 Expresión de A β por grupo de tratamiento

El INT-SC de A β se evaluó en las 82 cápsulas provenientes de cerebros con y sin tratamiento. Los mapeos permitieron caracterizar la inmunorreactividad del tejido cerebral en todo el perímetro del quiste. De esta forma, se observó una relación directa con el tiempo de exposición al PZQ, asimismo se vio que la producción de A β acompañó a la respuesta inflamatoria inducida por la droga antihelmíntica. El grupo sin tratamiento presentó menor reactividad que ambos grupos tratados, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.005$) para ambos casos. (Figura 17)

5.5 Expresión de A β e integridad de la BHE

Para evaluar el efecto de la integridad de la BHE en la expresión de A β , se separó cada grupo de tratamiento en función al color de la cápsula, siendo las cápsulas azules aquellas donde se hizo evidente, por extravasación de AE, el compromiso de la BHE y las cápsulas claras donde la BHE se mantuvo intacta.

De esta manera, se observó para todos los grupos que las cápsulas azules presentaron mayor inmunorreactividad para A β en comparación a las cápsulas claras ($p < 0.05$). Asimismo, al comparar el INT-SC de las cápsulas azules entre los grupos de tratamiento, se obtuvieron diferencias significativas al enfrentar al grupo UT con el T48 y T120 ($p < 0.05$ y $p < 0.005$ respectivamente). (Figura 18)

5.6 Expresión de A β y localización de la cápsula en el cerebro.

Después de caracterizar la localización de cada cápsula por observación histológica, se procedió a evaluar el INT-SC de cada caso. Para designar a una cápsula como cortical o subcortical se estableció un punto de corte mayor al 60% en todos los casos. Con los grupos por localización ya establecidos se calculó la mediana de cada grupo para realizar finalmente el análisis por el test U de Mann-Whitney.

Los resultados indicaron que la presencia de A β se incrementa en función a la exposición a PZQ indistintamente para los quistes en corteza como en subcorteza, ya que ambos grupos muestran una tendencia ascendente tras la comparación de sus medianas. Sin embargo, la inmunorreactividad de A β fue mayor en la subcorteza del parénquima cerebral. Asimismo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos T48 y T120. (Tabla 3)

Tabla 3. Evaluación del efecto de la localización en la presencia de A β .

Región	INT-SC			Test U Mann Whitney (p value)		
	UT	T48	T120	UT vs T48	UT vs T48	T48 vs T120
Corteza (n=41)	24 (0; 64.62)	85 (35.59; 175.4)	74 (32.39; 129)	<0.001	0.0141	0.484
Sub corteza (n=35)	36 (5.06; 92.43)	95 (20.51; 204.1)	144 (0; 281.8)	<0.001	<0.001	0.089

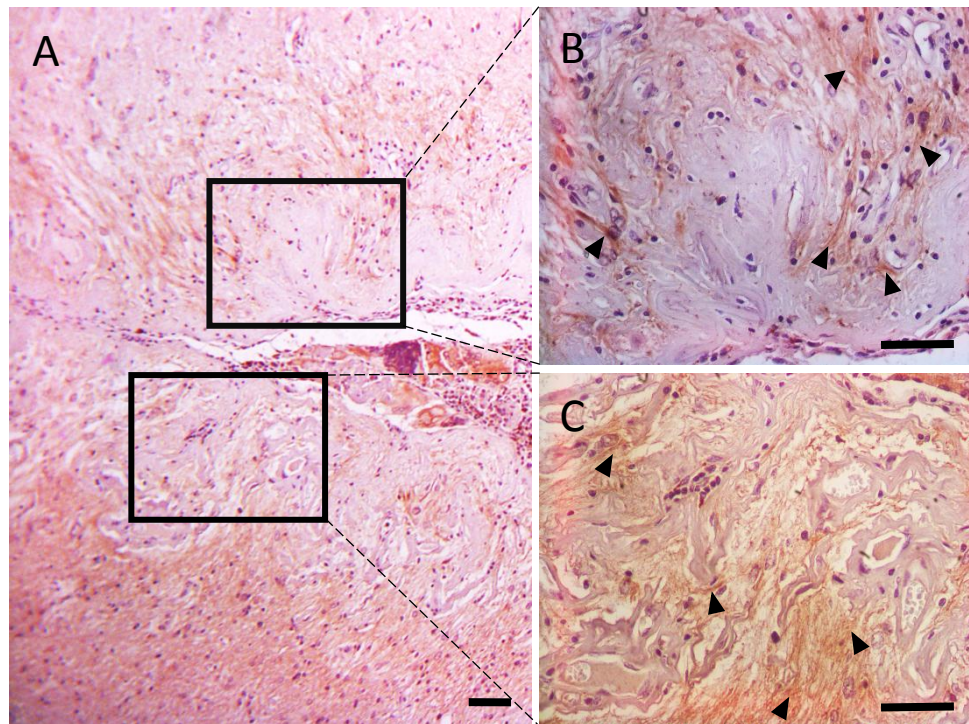


Figura 19. Presencia de A β es muy leve en cisticercos degenerados. (A) Fotografía panorámica de región con quiste degenerado. (B-C) Aumento de regiones del tejido donde se señala con cabezas de flecha la inmunolocalización para A β . Las barras de escala corresponden a 20 μ m.

5.7 Expresión relativa del gen *app*

A fin de conocer el comportamiento de los transcritos de *app*, el gen que da lugar al péptido A β en respuesta a la inflamación inducida por el tratamiento con PZQ, se extrajo RNA total de 20 cápsulas obtenidas de 6 cerdos de los 3 grupos de tratamiento (tabla 2), para usarlas en reacciones de PCR cuantitativo (qPCR). Se encontró muy poca expresión de *app* en el grupo no tratado, pero un incremento significativo en el grupo con 48 horas de haber recibido el tratamiento con PZQ. Sin embargo, en el grupo con 120 horas con PZQ, los niveles de expresión de *app* disminuyeron considerablemente.

De manera similar, al evaluar la expresión en función al compromiso de la BHE, se observó tanto para cápsulas azules como claras un máximo en la expresión en el grupo con 48 horas con PZQ, decreciendo para ambos casos a las 120 horas. El análisis estadístico permitió establecer diferencias, confirmando la mayor expresión del gen *app* en el grupo con 48 horas de tratamiento antihelmíntico. Se observa que aquellos quistes con cápsula azul mostraron una mayor expresión de este gen (UT vs T48 $p < 0.01$), indicando que cambios en la permeabilidad de la BHE estarían afectando la expresión de *app*. (Figura 20)

VI. Discusión

Este trabajo tuvo como finalidad caracterizar la presencia y expresión del péptido A β en NCC porcina. Esta es la primera aproximación funcional sobre el papel de A β en la respuesta inmune frente a NCC y también por primera vez en una enfermedad parasitaria. Se encontró que A β se comporta como un marcador de inflamación en NCC y que su expresión está ligada al aumento de la inflamación local, tal como se vio en cerebros de cerdos tratados con el antihelmíntico. Asimismo se observó mayor expresión del gen *app* tras la exposición a PZQ, lo que refuerza la hipótesis de la participación de A β en la respuesta inmune aguda en NCC.

6.1 Dinámica de la expresión de A β en NCC

Por histopatología se observó que la presencia de A β tendió a aumentar de acuerdo a la exposición al antihelmíntico y por ende al grado de inflamación, pues se observó A β en tejido con grado de inflamación IS-3 (Figura 16). Al comparar la intensidad de A β , (valores del INT-SC) en cada cápsula se halló una diferencia significativa entre el grupo UT y los grupos T48 y T120, aunque no entre estos dos últimos grupos. (Figura 17)

La asociación positiva entre la inflamación y el aumento de agregados A β se ha reportado en enfermedades no infecciosas como AD y aterosclerosis, donde el proceso inflamatorio afecta la función cerebral y vascular.^{156,157} En AD se han descrito efectos proinflamatorios y vasoactivos inducidos por A β mediados por citoquinas que actúan en neuronas, microglia, endotelio vascular, miocitos y pericitos.¹⁵⁸ Sin embargo, tanto en condiciones normales como patológicas, los péptidos A β cumplen un papel importante en la modulación de la inflamación debido principalmente a su habilidad de estimular la microglia e inducir la muerte neuronal programada.¹⁵⁹

Por otro lado, la expresión de *app* estuvo afectada por el tratamiento con PZQ. En el grupo UT, *app* se expresó en niveles bajos, pero a las 48 horas de exposición al tratamiento se vio un incremento de 25 veces. Sin embargo, a 120 horas con PZQ la expresión de *app* se redujo significativamente. (Figura 19) Es necesario precisar que, al no contar con mediciones entre ambos puntos, no se conoce en qué momento ocurrió tal disminución de la expresión, ni tampoco si los niveles vistos a las 48 horas corresponden, efectivamente, al máximo en la expresión.

El incremento inicial de la expresión de *app* visto a las 48 horas podría relacionarse con el proceso inflamatorio, en este caso inducido por PZQ. Esta relación se ha demostrado en el modelo murino de AD donde la inducción de especies inflamatorias por exposición a LPS provocó incrementos en mediadores inflamatorios como IL-1 β e IL-6 y esto se tradujo en cambios en la producción de la proteína APP.¹⁶⁰ También se ha involucrado la expresión

de *app* en la respuesta glial frente al daño cerebral, ya que aumenta incluso frente a lesiones leves.¹⁶¹

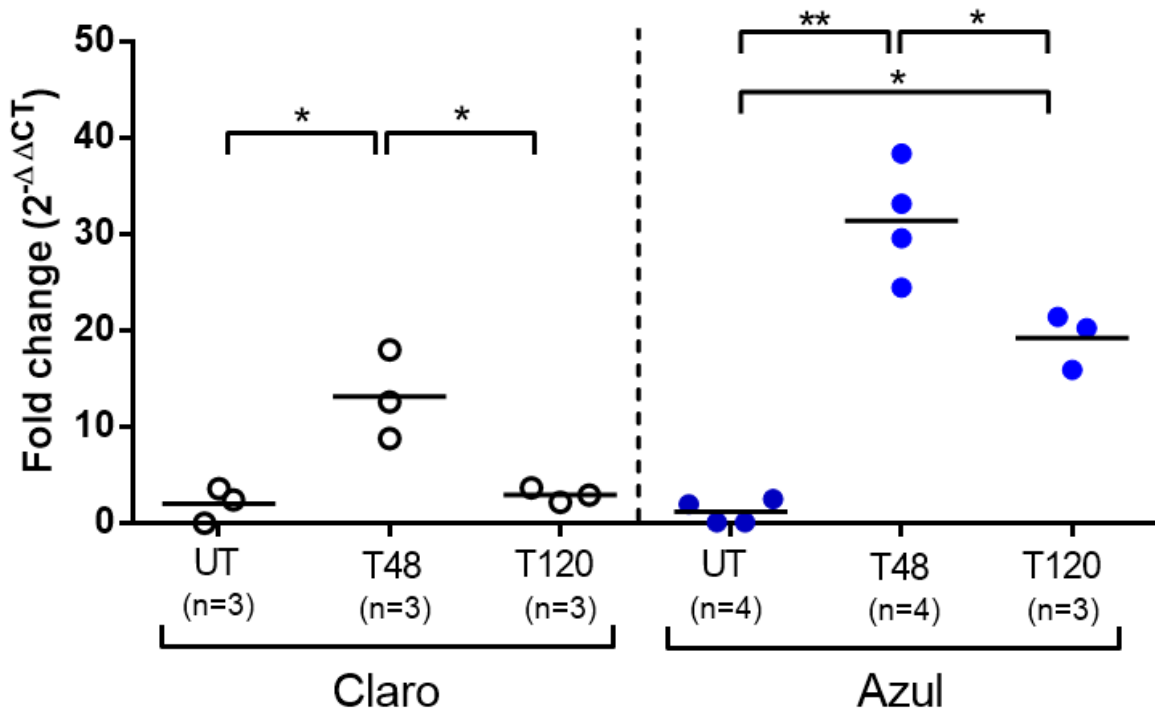


Figura 20. El gen *app* incrementa su expresión en cápsulas azules. La cuantificación relativa realizada por qPCR reveló un máximo en la expresión de *app* 48 horas luego del tratamiento con PZQ se realizó para las cápsulas (n) de cada grupo. Según el test U de Mann Whitney Los asteriscos representan el nivel de significancia: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$. Las barras horizontales corresponden a la mediana de cada grupo.

En conjunto estas observaciones refuerzan la idea de A β como un componente de la respuesta inflamatoria aguda frente a la infección por *T. solium* y que la homeostasis de este péptido estaría regulada por otros elementos inmunes.

En la figura 21, se muestran de manera simplificada los hallazgos de este trabajo donde la presencia de A β y la expresión de *app* aumentaron a las 48 horas de tratamiento con PZQ para luego decrecer a las 120 horas

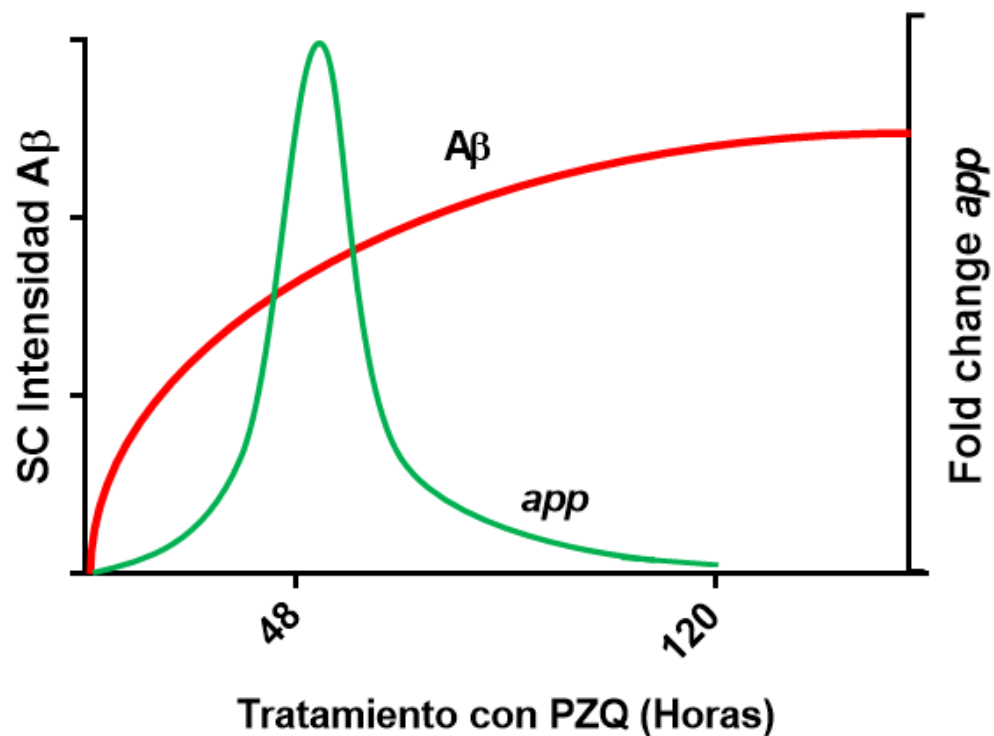


Figura 21. Comportamiento de A β en cerebros de cerdos infectados por *T. solium* tratados con PZQ. La presencia de A β es mayor en cerebros expuestos a PZQ que en cerdos no tratados. Al no encontrar diferencias entre las mediciones a 48 y 120 horas, se representa el comportamiento como una meseta. En contraparte, el gen *app* presenta un máximo de expresión en el punto de 48 horas con PZQ para luego decrecer a niveles similares a los encontrados en cerdos sin tratamiento.

6.2 Cambios en la permeabilidad de la BHE están asociados a la producción de A β

El aumento de la permeabilidad de la BHE es clave en la regulación de la neuroinflamación propia de la NCC. Esta asociación se comprueba al observar que el infiltrado inflamatorio del quiste está principalmente compuesto de linfocitos y otras células blancas periféricas que han logrado al extravasarse de los vasos sanguíneos al parásito.¹⁰⁴

En este trabajo se observó significativamente más A β ($p < 0.05$) en los quistes con cápsula azul (permeabilidad de la BHE aumentada) que en comparación a los quistes con cápsula clara, en todos los grupos (Figura 18). Asimismo, al comparar los quistes azules entre los grupos de tratamiento se encontraron diferencias significativas entre el grupo no tratado y los grupos tratados (UT

vs T48 $p < 0.05$; UT vs T120 $p < 0.005$). En contraste, el análisis de cápsulas azules no indicó diferencias entre los grupos T48 y T120.

Un estudio *in vitro* evaluó el efecto del A β sobre la permeabilidad de la BHE; se observó que concentraciones superiores a 5 μ M de este péptido alteran significativamente el tránsito a través de la BHE por acción mecánica haciéndola más permeable.¹⁶² A β también modifica la permeabilidad de la BHE induciendo la expresión de otras moléculas que promueven la inflamación y reclutamiento celular.¹⁶³ Paralelamente, algunos estudios han explorado las interacciones entre A β y factores de angiogénesis en procesos neuroinflamatorios de carácter crónico.

Por ejemplo, experimentos *in vitro* han demostrado que la exposición aguda a A β promueve la proliferación celular y la formación de capilares por activación de la vía dependiente del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF-2).¹⁶⁴ Por otro lado, en un estudio con biopsias de pacientes con AD se colocó por inmunohistoquímica al factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) con A β en las paredes de vasos sanguíneos cerebrales y placas seniles.¹⁶⁵ Asimismo, en un estudio *in vitro* con células endoteliales se evidenció el bloqueo del receptor tipo dos para VEGF (VEGFR-2) por acción antagonista de A β .¹⁶⁶

En un trabajo paralelo del laboratorio hecho con la colección de muestras empleada en este, se encontró una mayor angiogénesis (presencia de VEGF) en las cápsulas azules de todos los grupos.¹⁶⁷ Esto indicaría que los cambios en la permeabilidad de la BHE involucrarían un evento de generación vascular donde también está presente A β .

Tomando en cuenta estos reportes, el potencial efecto anti angiogénico de A β podría explicarse en la necesidad de modular el proceso neuroinflamatorio en un determinado momento cuando el daño en el tejido ha logrado resolverse y ya no es necesaria la migración celular.

6.3 Modulación de la expresión de *app* por agentes proinflamatorios, inmunoregulatorios y de regeneración tisular.

En un trabajo previo del laboratorio se ha evaluado la expresión de diversos genes de la respuesta inflamatoria frente a NCC, destacando que el tratamiento con PZQ induce la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α , IL-6 e INF- γ .¹⁰⁴

La modulación en la producción de A β por acción de TNF- α e INF- γ se ha demostrado en el modelo murino para el estudio de AD, donde la disrupción de la vía de señalización de INF- γ resulta en menor expresión de TNF- α y BACE1, disminución de la inflamación glial, y por consiguiente menor generación y deposición de A β .¹⁶⁸ Asimismo, un estudio *in vitro* reportó que la interacción de la microglia con agregados A β estimula la respuesta proinflamatoria mediada por TNF- α , y a través de esta, la generación de especies reactivas de oxígeno vía iNOS.¹⁶⁹ Paralelamente, otros ensayos demostraron el incremento en la expresión de IL-6 y TNF- α en astrocitos expuestos a A β , lo que sugiere que los astrocitos participarían en la inflamación por amiloidosis.¹⁷⁰

En el laboratorio, el modelo porcino de NCC mostró la regulación negativa de marcadores antiinflamatorios, entre ellos IL-10, y el aumento en la expresión de FoxP3, posterior al tratamiento con PZQ.¹⁰⁴ La relación de estos agentes inmunoreguladores con A β no ha sido estudiada en NCC, pero se ha reportado *in vivo* que el tratamiento con IL-10 reduce significativamente la formación de A β y decrece también la expresión de citoquinas proinflamatorias.¹⁷¹ Por otra parte, estudios más recientes en el modelo murino de AD revelaron que la ausencia de linfocitos T reguladores, caracterizados por la expresión de FoxP3, conducen a la disminución de fibras A β . Estas observaciones sugieren que la homeostasis de A β también podría ser modulada por agentes antiinflamatorios.¹⁷²

Finalmente, en el laboratorio también se ha evaluado la expresión de moléculas que participan en la formación del granuloma en NCC porcina,

entre ellas las metaloproteinasas de matriz (MMP), un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc. Se sabe que estas proteínas descomponen la matriz extracelular en condiciones fisiológicas normales y también en procesos patológicos como reacciones inflamatorias, artritis y metástasis.¹⁷³ De ellas, el gen de MMP-1 se eleva a las 48 horas de tratamiento con PZQ y se mantiene elevada en el punto de 120 horas. En contraste, el gen de MMP-9 tiene un aumento a las 48 horas con PZQ que no se mantiene a las 120 horas.¹⁰⁴

A pesar de que la expresión basal de MMP en el cerebro es baja, varios tipos de células^{174,175} regulan positivamente la expresión de MMP-2, -3 y -9 en respuesta a A β . Notablemente, se ha reportado que la degradación de A β por macrófagos es un mecanismo esencial para limitar la acumulación de A β en el parénquima cerebral y vasos sanguíneos.¹⁷⁶ Asimismo, estudios *in vitro* han señalado que A β regula la activación de macrófagos humanos induciendo en ellos la expresión de MMP-9 y MMP-2.¹⁷⁷

Esta inducción se ha visto en cultivos de microglia estimulados por A β exógeno, donde además de inducir la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias, también aumentó la de MMP-1, -3, -9, -10 y -12.¹⁷⁸ Finalmente en el modelo murino para AD, se ha demostrado que MMP-9 tiene la capacidad de degradar agregados fibrilares de A β , por lo que esta proteasa participaría de manera significativa en la homeostasis de A β .¹⁷⁹

Como se aprecia en esta breve revisión, diversos agentes inmunes podrían regular de manera activa la expresión de A β durante el proceso inflamatorio. La evaluación de nuevos marcadores podría proporcionar información más precisa sobre la participación de A β en NCC. Tomando en cuenta estos reportes, la figura 22 muestra al mecanismo de regulación de la expresión de A β propuesto por este trabajo.

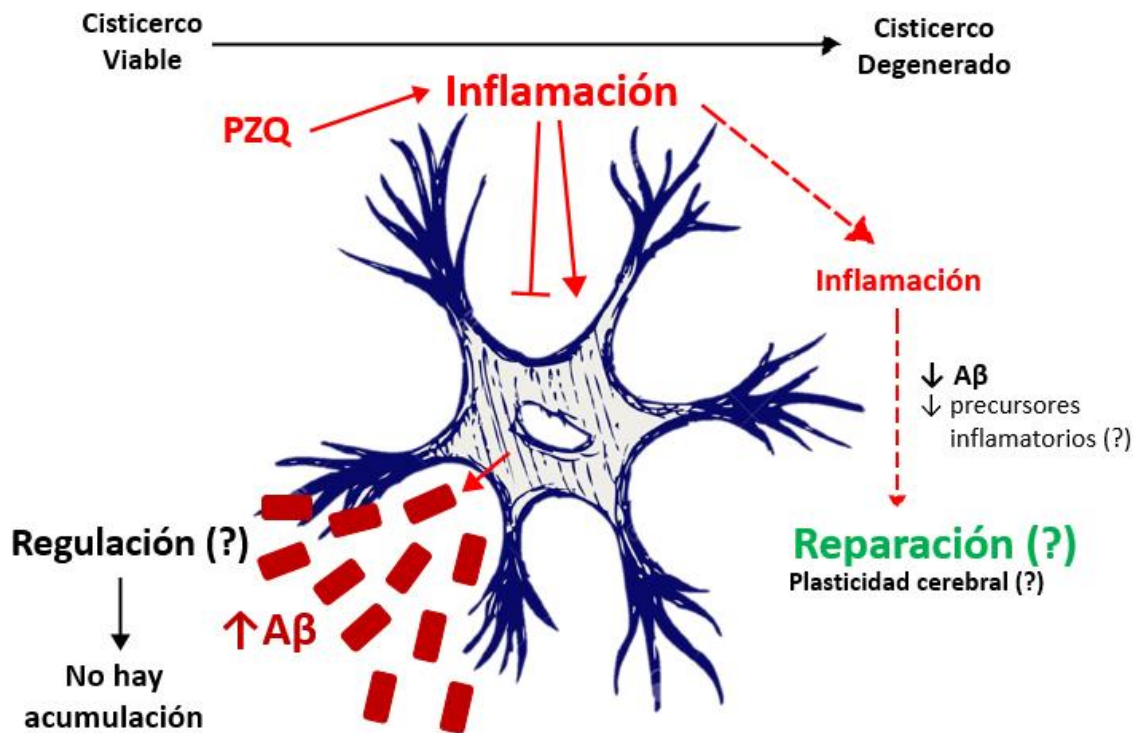


Figura 22. Mecanismo propuesto de expresión y regulación de A β en NCC. En el cisticerco viable, la inducción de la inflamación por PZQ estimula en las células gliales la expresión de marcadores proinflamatorios como TNF α , IL-6 e INF- γ para atacar parásito. Estas citoquinas regularían positivamente la expresión de A β , el cual participaría también en la fase aguda de respuesta a NCC. Asimismo, existen varios agentes que regulan la expresión de A β evitando su acumulación. Finalmente, al pasar el tiempo, en el cisticerco degenerado, el proceso inflamatorio pasaría a un segundo plano para dar lugar al proceso de reparación o regeneración tisular.

6.4 Efecto de la localización del quiste en la producción de A β .

La localización del cisticerco en el cerebro es determinante para la respuesta inflamatoria.¹¹⁶ Los resultados de este trabajo indican que la producción de A β en el parénquima es indistinta de si el cisticerco se aloja en la corteza o subcorteza, ya que en ambas localizaciones esta aumentó en función al tratamiento con PZQ. Sin embargo, las cápsulas subcorticales mostraron más A β .

Pocos estudios han tratado de describir el perfil de acumulación de A β en el parénquima cerebral. Dos reportes caracterizaron la morfología y distribución de placas seniles en cerebros con AD y concluyeron que las placas A β podían apreciarse tanto en corteza como en subcorteza de la materia gris del cerebro.^{180,181} Asimismo, la evaluación cuantitativa de la proteína Tau, A β y APP por inmunohistoquímica indicó que, a pesar de no tener una distribución definida, las neuronas corticales muestran principalmente una acumulación de Tau a nivel de cuerpo o soma, mientras que A β y APP se distribuyen hacia los axones terminales y proyecciones de estas células.¹⁸²

Estos reportes respaldan lo observado en este trabajo, donde se reconoce que la expresión de A β parece ser uniforme e independiente de la localización de la cápsula en el parénquima, aunque la mayor inmunorreactividad en la región subcortical indicaría que A β se distribuye hacia los axones y prolongaciones de células corticales que desembocan en esta región.

6.5 La generación de A β en NCC no es un proceso neurodegenerativo

Muy pocas publicaciones han explorado cambios cognitivos en el desarrollo de NCC. La mayor parte de la información sobre este punto proviene de reportes clínicos de pacientes que habrían experimentado desordenes psiquiátricos o cambios en el *status quo* mental, todos sin asociaciones concluyentes.^{183,184} El único estudio longitudinal realizado sobre los cambios cognitivos que produciría la NCC indicó leves anomalías en pacientes, y en palabra de ellos mismos, estas desaparecieron o

mostraron mejoría después del tratamiento.¹⁸⁵ De esta forma, el impacto de la lesión generada por el cisticerco en los procesos mentales es aún desconocido.

En este trabajo se observó, como un hallazgo independiente a la muestra estudiada, que quistes degenerados presentaron leve inmunorreactividad (Figura 19). A partir de esta observación y tomando en cuenta los demás resultados, puede sugerirse que en NCC no se mantiene la acumulación de A β de forma que haga pensar en una evolución a placas seniles y eventos crónicos de neurotoxicidad y disfunción cognitiva marcada, similares en trastornos neurodegenerativos como AD.

Adicionalmente, resultados preliminares del laboratorio muestran que la presencia de la proteína básica de mielina (MBP) no presenta diferencias marcadas entre los grupos UT y grupos tratados, indicando que no está siendo degradada.¹⁶⁷ Esta observación respalda la idea de que la producción de A β en NCC no desencadena necesariamente toxicidad que derivaría en un proceso neurodegenerativo.

6.6 A β en NCC: ¿Inflamación vs. regeneración?

Tal como hemos visto, la terapia antihelmíntica con PZQ exagera la respuesta inflamatoria del hospedero. Estudios previos de este y otros grupos de investigación han descrito los perfiles de la respuesta aguda frente a la infección en NCC.^{17,104,169,186} Se sabe que los quistes degenerados, o aquellos que han sido dañados por el tratamiento antihelmíntico, provocan en el hospedero una respuesta pro inflamatoria marcada.^{16,92}

En este nivel, el papel del péptido A β sigue siendo controversial. Algunos trabajos han sugerido su participación en los mecanismos de reparación frente una lesión mediante la activación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).¹⁸⁷ También se ha reconocido a A β como modulador de la plasticidad cerebral, dado que A β suprimiría selectivamente la transmisión sináptica excitatoria en neuronas que sobreexpresan proteína APP.^{188,189}

De acuerdo a esto, y aunque solo se puede especular, es posible que cuando la degeneración del cisticerco sea avanzada, el proceso inflamatorio sea modulado para dar lugar a un proceso de regeneración tisular que permita reabsorber la lesión causada por el cisticerco. En todo caso, las evidencias disponibles aún no permiten describir un probable fin del proceso inflamatorio y el inicio de la regeneración tisular. A este efecto, se están diseñando protocolos para observar, en el modelo porcino, inflamación de mayor gravedad y más prolongada; con la finalidad de asemejar lo más posible la clínica observada en humanos, en que la sintomatología se presenta luego de varios años de la infección.

Este trabajo reporta además una reactividad muy tenue y uniforme para A β en todo el entremezclado de colágeno en quistes degenerados. (Figura 19) Esta observación refuerza la idea de que en un determinado momento del proceso de degeneración del quiste, el perfil inflamatorio ha empezado a modularse, pasando a un segundo plano y limitando la expresión de componentes de la fase aguda de la inflamación; en este caso A β .

Finalmente, se recomienda la evaluación de marcadores de regeneración tisular y el estudio con cohortes que permitan apreciar el desenlace del proceso inflamatorio en el cisticerco degenerado. Estas propuestas serán de utilidad para elaborar nuevas hipótesis en torno al complejo panorama de la respuesta inmune en NCC.

VII. Conclusiones

- El péptido A β se comporta como un marcador de inflamación en la respuesta inmune aguda en NCC.
- El tratamiento con PZQ incrementa la producción de A β , por lo que está asociada al proceso inflamatorio derivado de la infección por *T. solium*.
- El aumento en la permeabilidad de la BHE favorece la formación de beta-fibrilosis tanto en la producción de A β y en la expresión de *app*.

- El cese en la producción de A β y el descenso en la expresión de *app* podrían estar regulados por diversos componentes de la inmunidad local.
- A β se expresa de manera indistinta en la corteza o sub corteza parenquimal. Sin embargo, la mayor inmunorreactividad de los quistes subcorticales sugieren que A β se distribuye hacia las terminaciones axonales.
- Los niveles bajos de inmunorreactividad de A β en quistes degenerados sugieren que en algún momento de la evolución del cisticerco, el proceso inflamatorio pasaría a un segundo plano, dando lugar a un proceso de reparación o regeneración en el tejido.

VIII. Anexos

Anexo 1. Detalle de los criterios de observación para establecer los grados de intensidad y fórmula para el cálculo de SC de intensidad (INT-SC).

Categoría	Características
I ₀	No reacción.
I ₁	Reactividad baja, detectable a observación con aumento 40X.
I ₂	Reactividad visualmente moderada, detectable a 10X.
I ₃	Reactividad muy fuerte, detectable a aumento 4X o a observación panorámica.

$$INT\ SC = [(\%I_0 \times 0) + (\%I_1 \times 1) + (\%I_2 \times 2) + (\%I_3 \times 3)]$$

Anexo 2. Características de las sondas empleadas en el ensayo expresión por qPCR.

Sonda	Marcador	Producto (pb)	Reportero/ Quencher	Gene Assay ID (*)	Referencia*
18S rRNA	Marcador endógeno	187 pb	VIC/MGB	4319413E	X03205.1
app	<i>Sus scrofa</i> amyloid beta precursor protein	101 pb	FAM/MGB	Ss03394824_m1	NM_214372.1

* Gene bank accession number

IX. Bibliografía

1. Verster, A. Redescription of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. *Zeitschrift für Parasitenkd.* **29**, 313–328 (1967).
2. Flisser, A. *et al.* Portrait of human tapeworms. *J. Parasitol.* **90**, 914–6 (2004).
3. Schantz, P. Tapeworms (cestodiasis). *Gastroenterol. Clin. North Am.* (1996).
4. Hoberg, E. Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. *Parasitol. Int.* (2006).
5. Corwin, R., Dimarco, N., McDowell, A. & Pratt, S. Internal parasites. (1986).
6. García, H. & González, A. Teniasis por *Taenia solium*. *Diagnóstico* (2000).
7. Faust, E., Russell, P. & Jung, R. Craig and Faust's Clinical Parasitology Lea & Febiger. *Philadelphia*, pp. 352â (1970).
8. Del Brutto, O. & Sotelo, J. Etiopatogenia de la Neurocisticercosis. *Rev. ecuat. neurol* (1993).
9. García, H. H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A. W. & Gilman, R. H. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet (London, England)* **362**, 547–56 (2003).
10. Flisser, A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog. Clin. Parasitol.* (1994).
11. Cardenas, F., Quiroz, H. & Plancarte, A. *Taenia solium* ocular cysticercosis: findings in 30 cases. *Ann. ...* (1992).
12. Moolani, Y., Bukhman, G. & Hotez, P. Neglected tropical diseases as hidden causes of cardiovascular disease. *PLoS Negl Trop Dis* (2012).
13. Boa, M., Kassuku, A. & Willingham, A. Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. *Vet. ...* (2002).
14. Queiroz, L. & Filho, A. P. Intramedullary cysticercosis: case report, literature review and comments on pathogenesis. *J. ...* (1975).
15. Rahalkar, M., Shetty, D. & Kelkar, A. The Many Faces of Cysticercosis: Pictorial Review. *Clin. Radiol.* (2000).
16. Evans, C. The immunology of the host-parasite relationship in *Taenia solium* cysticercosis: implications for prevention and therapy. *Taenia solium taeniasis/cysticercosis, 2nd edn. Lima ...* (1999).
17. Sikasunge, C. & Johansen, M. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood–brain barrier permeability. *Vet. ...* (2009).
18. Carpio, A. Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect. Dis.* (2002).
19. Arthur, W. Mac. Cysticercosis as seen in the British Army, with special reference to the production of epilepsy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. ...* (1934).
20. Garcia, H. & Del Brutto, O. New concepts in the diagnosis and management of

- neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Am. J. ...* (2005).
21. Nash, T. E., Mahanty, S., Loeb, J. A., Theodore, W. H., Friedman, A., Sander, J. W., ... & Fleury, A. Neurocysticercosis: a natural human model of epileptogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* (2015).
 22. Nash, T. & Neva, F. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N. Engl. J. Med.* (1984).
 23. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin. Microbiol. ...* (2002).
 24. Diwan, A. & Coker-Vann, M. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am. J. ...* (1982).
 25. Rosas, N., Sotelo, J. & Nieto, D. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* (1986).
 26. Fogang, Y. & Savadogo, A. Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. *Int. J. ...* (2015).
 27. Garcia, H. & Pretell, E. A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. ... *Engl. J. ...* (2004).
 28. Takayanagui, O. Medical management of neurocysticercosis. ... *Pharmacother.* (2011).
 29. Del Brutto, O. & García, H. Cysticercosis of the human nervous system. (2014).
 30. Bandres, J. & White, A. Extraparenchymal neurocysticercosis: report of five cases and review of management. *Clin. Infect. ...* (1992).
 31. Singh, G. & Sander, J. Anticysticercal treatment and seizures in neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* (2004).
 32. Evans, C. & Garcia, H. Controversies in the management of cysticercosis. *Emerg. Infect. ...* (1997).
 33. Marquez-Caraveo, C. Pre-treatment with corticosteroids and a single cycle of high dose albendazole for subarachnoidal cysticercosis. *J. Neurol. ...* (2004).
 34. Nash, T., Mahanty, S. & Garcia, H. Corticosteroid use in neurocysticercosis. ... *Rev. Neurother.* (2011).
 35. Organization, W. H. Report of the WHO expert consultation on foodborne trematode infections and taeniasis. (2011).
 36. Coyle, C. & Mahanty, S. Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. ... *neglected Trop. ...* (2012).
 37. Organization, W. H. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. (2015).
 38. Torgerson, P. & Macpherson, C. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet. Parasitol.* (2011).
 39. Lustigman, S. & Prichard, R. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. *PLoS Negl Trop ...* (2012).

40. Del Brutto, O. & García, H. Epidemiology of Human Cysticercosis in Non-endemic Regions and in the Traveler. *Cysticercosis Hum. Nerv. Syst.* (2014).
41. Schantz, P., Wilkins, P. & Tsang, V. Immigrants, imaging, and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. *Emerg. Infect.* (1998).
42. Mewara, A., Goyal, K. & Sehgal, R. Neurocysticercosis: a disease of neglect. *Trop. Parasitol.* (2013).
43. Ndimubanzi, P. & Carabin, H. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Negl Trop ...* (2010).
44. Flisser, A., Craig, P. & Pawlowski, Z. Epidemiological studies of taeniosis and cysticercosis in Latin America. *Proc. NATO ...* (2002).
45. Organization, W. H. *Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases.* (2010).
46. Medina, M. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch. Intern. ...* (1990).
47. Román, G. & Sotelo, J. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull. World ...* (2000).
48. Bern, C. *et al.* Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1203–9 (1999).
49. Rajshekhar, V., Joshi, D. & Doanh, N. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Trop.* (2003).
50. Yindan, C., Longqi, X. & Xiaonong, Z. Distribution and disease burden of cysticercosis in China. ... *Adrian J Trop Med Pub Heal.* (2004).
51. Mafojane, N., Appleton, C. & Krecek, R. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop.* (2003).
52. Geerts, S., Zoli, A. & Nguekam, J. The taeniasis-cysticercosis complex in West and Central Africa. *Southeast Asian J Trop ...* (2004).
53. Praet, N. & Speybroeck, N. The disease burden of *Taenia solium* cysticercosis in Cameroon. *PLoS Negl Trop ...* (2009).
54. Carabin, H. & Krecek, R. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop. Med. ...* (2006).
55. Andriantsimahavandy, A., Ravaoalimalala, V. E., Rajaonarison, P., Ravoniarimbina, P., Rakotondrazaka, M., Raharilaza, N., ... & Leutscher, P. Situation épidémiologique actuelle de la cysticercose à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar* (2003).
56. Winkler, A. & 3rd, A. W. Epilepsy and neurocysticercosis in sub-Saharan Africa. ... *Klin. Wochenschrift* (2009).
57. Abbott, N., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* (2006).
58. Liebner, S. & Corada, M. Wnt/ β -catenin signaling controls development of the

- blood–brain barrier. *J. cell ...* (2008).
59. Stenman, J., Rajagopal, J. & Carroll, T. Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. ... (2008).
 60. Broadwell, R. & Sofroniew, M. Serum proteins bypass the blood-brain fluid barriers for extracellular entry to the central nervous system. *Exp. Neurol.* (1993).
 61. Muldoon, L. & Alvarez, J. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood–brain barrier. *J. Cereb. ...* (2013).
 62. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* (2004).
 63. Shechter, R. & Schwartz, M. CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol. Med.* (2013).
 64. Medawar, P. Immunity to homologous grafted skin. III. The fate of skin homographs transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* (1948).
 65. Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D. & Ploix, C. C. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol. Rev.* **213**, 48–65 (2006).
 66. Steinman, L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* (2014).
 67. Ransohoff, R. & Engelhardt, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* (2012).
 68. Goldmann, J. & Kwidzinski, E. T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribriform plate and the nasal mucosa. *J. Leukoc. ...* (2006).
 69. Cruz-Orengo, L. & Holman, D. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J. ...* (2011).
 70. Louveau, A., Smirnov, I. & Keyes, T. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* (2015).
 71. Hickey, W. & Kimura, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* (80-). (1988).
 72. Balabanov, R. Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J. Neurosci. ...* (1999).
 73. Kettenmann, H. & Hanisch, U. Physiology of microglia. *Physiol. ...* (2011).
 74. Skaper, S., Giusti, P. & Facci, L. Microglia and mast cells: two tracks on the road to neuroinflammation. *FASEB J.* (2012).
 75. Persidsky, Y. & Ramirez, S. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune ...* (2006).
 76. Lindsberg, P. & Öhman, J. Complement activation in the central nervous system following blood–brain barrier damage in man. *Ann. ...* (1996).
 77. Ransohoff, R. & Tani, M. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-

- traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci.* (1998).
78. Kreutzberg, G. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* (1996).
 79. Pei, Z., Pang, H., Qian, L., Yang, S. & Wang, T. MAC1 mediates LPS-induced production of superoxide by microglia: The role of pattern recognition receptors in dopaminergic neurotoxicity. *Glia* (2007).
 80. Mao, H. *et al.* Induction of microglial reactive oxygen species production by the organochlorinated pesticide dieldrin. *Brain Res.* (2007).
 81. Mao, H. & Liu, B. Synergistic microglial reactive oxygen species generation induced by pesticides lindane and dieldrin. *Neuroreport* (2008).
 82. Bamberger, M. & Landreth, G. Microglial interaction with β -amyloid: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Microsc. Res. ...* (2001).
 83. Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D. & Wu, X. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* (2005).
 84. Graeber, M. & Streit, W. Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol.* (1990).
 85. Fawcett, J. W. & Asher, R. A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**, 377–91 (1999).
 86. Colton, C. & Gilbert, D. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* (1987).
 87. Moss, D. & Bates, T. Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon- γ causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur. J. Neurosci.* (2001).
 88. Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A. & Marunouchi, T. Production of tumor necrosis factor- α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* (1989).
 89. Morganti-Kossmann, M. Cytokines and neuropathology. ... *Pharmacol. Sci.* (1992).
 90. Bradley, J. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* (2008).
 91. PAN, W., ZADINA, J. & HARLAN, R. Tumor necrosis factor- α : a neuromodulator in the CNS. ... *Biobehav. Rev.* (1997).
 92. Nash, T. Human case management and treatment of cysticercosis. *Acta Trop.* (2003).
 93. Sikasunge, C. & Johansen, M. Taenia solium porcine cysticercosis: viability of cysticerci and persistency of antibodies and cysticercal antigens after treatment with oxfendazole. ... *Parasitol.* (2008).
 94. Flisser, A., Espinoza, B., Tovar, A., Plancarte, A. & Correa, D. Host--parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet. Parasitol.* **20**, 95–102 (1986).
 95. White, A. C., Tato, P. & Molinari, J. L. Host-parasite interactions in Taenia solium

- cysticercosis. *Infect. Agents Dis.* **1**, 185–93 (1992).
96. Tato, P., Castro, A. & Rodriguez, D. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol. ...* (1995).
 97. Molinari, J., Mejia, H. & White, A. *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp. ...* (2000).
 98. Solano, S., Cortés, I. & Copitin, N. Lymphocyte apoptosis in the inflammatory reaction around *Taenia solium* metacestodes in porcine cysticercosis. *Vet. ...* (2006).
 99. Sikasunge, C. & Phiri, I. Host-cell apoptosis in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. ... (2008).
 100. Mishra, B. B., Gundra, U. M. & Teale, J. M. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J. Neuroinflammation* **5**, 53 (2008).
 101. Chauhan, A., Quenum, F. & Abbas, A. Epigenetic Modulation of Microglial Inflammatory Gene Loci in Helminth-Induced Immune Suppression Implications for Immune Regulation in Neurocysticercosis. *ASN Neuro* (2015).
 102. Terrazas, L. & Bojalil, R. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* (1998).
 103. Singh, A., Prasad, K. & Prasad, A. Immune responses to viable and degenerative metacestodes of *Taenia solium* in naturally infected swine. *Int. J. ...* (2013).
 104. Mahanty, S., Orrego, M. & Mayta, H. Post-treatment vascular leakage and inflammatory responses around brain cysts in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop ...* (2015).
 105. Grewal, J. S., Kaur, S., Bhatti, G., Sawhney, I. M. S., Ganguly, N. K., Mahajan, R. C., & Malla, N. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol. Res.* (2000).
 106. Nash, T., Bartelt, L. & Korpe, P. Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation. *Am. J. ...* (2014).
 107. Londoño, D., Alvarez, J. & Trujillo, J. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet. ...* (2002).
 108. Gonzalez, A. & Bustos, J. Efficacy of diverse antiparasitic treatments for cysticercosis in the pig model. *Am. J. ...* (2012).
 109. Alvarez, J. & Teale, J. Breakdown of the blood brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS. *J. Neuroimmunol.* (2006).
 110. Nico, B. & Ribatti, D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. *Curr. Drug Metab.* (2012).
 111. Allen, T. & Orahovats, P. Combination of toluidine dye isomers with plasma

- albumin. *Am. J. Physiol.* ... (1950).
112. Saria, A. & Lundberg, J. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J. Neurosci. Methods* (1983).
 113. Kaya, M. & Ahishali, B. Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using tracers: Evans blue, sodium fluorescein, and horseradish peroxidase. *Permeability Barrier Methods Protoc.* (2011).
 114. Guerra-Giraldez, C. *et al.* Disruption of the blood-brain barrier in pigs naturally infected with *Taenia solium*, untreated and after anthelmintic treatment. *Exp. Parasitol.* **134**, 443–6 (2013).
 115. Marzal, M. *et al.* Evans Blue Staining Reveals Vascular Leakage Associated with Focal Areas of Host-Parasite Interaction in Brains of Pigs Infected with *Taenia solium*. *PLoS One* **9**, e97321 (2014).
 116. Cangalaya, C. *et al.* Inflammation Caused by Praziquantel Treatment Depends on the Location of the *Taenia solium* Cysticercus in Porcine Neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0004207 (2015).
 117. Mori, F., Rossi, S. & Sancesario, G. Cognitive and cortical plasticity deficits correlate with altered amyloid- β CSF levels in multiple sclerosis. ... (2011).
 118. Lim, Y., Maruff, P., Pietrzak, R. & Ames, D. Effect of amyloid on memory and non-memory decline from preclinical to clinical Alzheimer's disease. *Brain* (2014).
 119. Guela, C., Wu, C., Saroff, D. & Lorenzo, A. Aging renders the brain vulnerable to amyloid β -protein neurotoxicity. *Nat. Med.* (1998).
 120. Ittner, L. & Götz, J. Amyloid- β and tau—a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* (2011).
 121. Gorelick, P. Role of inflammation in cognitive impairment: results of observational epidemiological studies and clinical trials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2010).
 122. Shoji, M., Golde, T., Ghiso, J. & Cheung, T. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. ... (1992).
 123. Cirrito, J., Yamada, K., Finn, M. & Sloviter, R. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- β levels in vivo. *Neuron* (2005).
 124. Haass, C. Trafficking and proteolytic processing of APP. ... *Perspect.* ... (2012).
 125. Sathya, M., Premkumar, P. & Karthick, C. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin. Chim.* ... (2012).
 126. Haass, C. Take five—BACE and the γ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid β -peptide generation. *EMBO J.* (2004).
 127. Jarrett, J., Berger, E. & Jr, P. L. The carboxy terminus of the beta. amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* (1993).
 128. Dickson, D. The pathogenesis of senile plaques. ... *Neuropathol. Exp. Neurol.* (1997).

129. Lorenzo, A. & Yankner, B. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. ...* (1994).
130. Bogoyevitch, M. & Boehm, I. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. ... *Biophys. Acta (BBA ...* (2004).
131. Zou, K. & Gong, J. A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J. ...* (2002).
132. Yao, Z. & Papadopoulos, V. Function of β -amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J.* (2002).
133. Bailey, J., Maloney, B., Ge, Y. & Lahiri, D. Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid β -peptide interacting domain (A β ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating. *Gene* (2011).
134. Soscia, S., Kirby, J. & Washicosky, K. The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One* (2010).
135. Fassbender, K., Walter, S., Kühl, S. & Landmann, R. The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J.* (2004).
136. Khoury, J. El & Moore, K. CD36 mediates the innate host response to β -amyloid. *J. ...* (2003).
137. Bamberger, M. & Harris, M. A cell surface receptor complex for fibrillar β -amyloid mediates microglial activation. *J. ...* (2003).
138. Koenigsknecht, J. & Landreth, G. Microglial phagocytosis of fibrillar β -amyloid through a β 1 integrin-dependent mechanism. *J. Neurosci.* (2004).
139. Khoury, J. El, Hickman, S. & Thomas, C. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils. *Nature* (1996).
140. Yan, S. Du, Zhu, H. & Fu, J. Amyloid- β peptide–Receptor for Advanced Glycation Endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor: A. *Proc. ...* (1997).
141. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* (2010).
142. Stewart, C., Stuart, L. & Wilkinson, K. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. ...* (2010).
143. Patel, N. & Paris, D. Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. ...* (2005).
144. Berg, J. vom, Prokop, S., Miller, K. & Obst, J. Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat. Med.* (2012).
145. Fillit, H., Ding, W., Buee, L., Kalman, J. & Altstiel, L. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. ...* (1991).
146. Smith, D. H. *et al.* Accumulation of amyloid beta and tau and the formation of neurofilament inclusions following diffuse brain injury in the pig. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 982–92 (1999).
147. Tan, J., Town, T., Crawford, F. & Mori, T. Role of CD40 ligand in amyloidosis in

- transgenic Alzheimer's mice. *Nat. ...* (2002).
148. Jin, J., Kim, H. & Maxwell, J. Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* (2008).
 149. Griffin, W., Liu, L. & Li, Y. Interleukin-1 mediates Alzheimer and Lewy body pathologies. *J. ...* (2006).
 150. Griffin, W. & Stanley, L. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc. ...* (1989).
 151. Rothwell, N. & Luheshi, G. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* (2000).
 152. Moynagh, P. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J. Anat.* (2005).
 153. Júnior, R. & Ribeiro, P. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração humanos. *Rev. da Soc. ...* (2002).
 154. Lino-Junior, R. & Faleiros, A. Anatomopathological aspects of neurocysticercosis in autopsied patients. ... *neuro-psiquiatria* (2007).
 155. Alvarez, J., Londono, D. & Alvarez, A. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis. *J. Comp. ...* (2002).
 156. Ferreiro, J., Ansbacher, L. & Vinters, H. Stroke related to cerebral amyloid angiopathy: the significance of systemic vascular disease. *J. Neurol.* (1989).
 157. Atherosclerosis, vascular amyloidosis and brain hypoperfusion in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *Neurol. ...* (2004).
 158. Townsend, K. & Obregon, D. Proinflammatory and vasoactive effects of A β in the cerebrovasculature. ... *New York Acad. ...* (2002).
 159. Giulian, D. & Haverkamp, L. Specific domains of β -amyloid from Alzheimer plaque elicit neuron killing in human microglia. *J. ...* (1996).
 160. Brugg, B. & Dubreuil, Y. Inflammatory processes induce beta-amyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc. ...* (1995).
 161. Banati, R. & Gehrman, J. Glial expression of the β -amyloid precursor protein (APP) in global ischemia. *J. Cereb. ...* (1995).
 162. Strazielle, N. *et al.* In vitro evidence that beta-amyloid peptide 1-40 diffuses across the blood-brain barrier and affects its permeability. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 29–38 (2000).
 163. Fiala, M. *et al.* Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood--brain barrier model. *Mol. Med.* **4**, 480–9 (1998).
 164. Cantara, S. *et al.* Physiological levels of amyloid peptides stimulate the angiogenic response through FGF-2. *FASEB J.* **18**, 1943–5 (2004).
 165. Yang, S.-P. *et al.* Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **25**, 283–

- 90 (2004).
166. Patel, N. S. *et al.* Alzheimer's beta-amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2. *J. Neurochem.* **112**, 66–76 (2010).
 167. Orrego, M. Comunicación directa. (2016).
 168. Yamamoto, M., Kiyota, T. & Horiba, M. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α regulate amyloid- β plaque deposition and β -secretase expression in Swedish mutant APP transgenic mice. *Am. J. ...* (2007).
 169. Combs, C. & Karlo, J. β -Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. ...* (2001).
 170. Forloni, G., Mangiarotti, F. & Angeretti, N. β -amyloid fragment potentiates IL-6 and TNF- α secretion by LPS in astrocytes but not in microglia. *Cytokine* (1997).
 171. Szczepanik, A. M. & Ringheim, G. E. IL-10 and glucocorticoids inhibit A β (1-42)- and lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine and chemokine induction in the central nervous system. *J. Alzheimers. Dis.* **5**, 105–17 (2003).
 172. Baruch, K. *et al.* Breaking immune tolerance by targeting Foxp3(+) regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nat. Commun.* **6**, 7967 (2015).
 173. Moore, C. & Crocker, S. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am. J. Pathol.* (2012).
 174. Deb, S., Zhang, J. & Gottschall, P. Activated isoforms of MMP-2 are induced in U87 human glioma cells in response to β -amyloid peptide. *J. Neurosci. ...* (1999).
 175. Jung, S. Pathogenic A β induces the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 in human cerebrovascular smooth muscle cells. *J. ...* (2003).
 176. Miners, J., Baig, S. & Palmer, J. SYMPOSIUM: Clearance of A β from the Brain in Alzheimer's Disease: A β -Degrading Enzymes in Alzheimer's Disease. *Brain ...* (2008).
 177. Castellano, J. Amyloid- β Increases Metallo- and Cysteine Protease Activities in Human Macrophages. *J. Vasc. ...* (2013).
 178. Walker, D. & Link, J. Gene expression changes by amyloid β peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes. *J. Leukoc. ...* (2006).
 179. Yan, P., Hu, X., Song, H. & Yin, K. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid- β fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J. Biol. ...* (2006).
 180. Ikeda, S., Allsop, D. & Glenner, G. G. Morphology and distribution of plaque and related deposits in the brains of Alzheimer's disease and control cases. An immunohistochemical study using amyloid beta-protein antibody. *Lab. Invest.* **60**, 113–22 (1989).
 181. Ikeda, S., Allsop, D. & Glenner, G. G. A study of the morphology and distribution of amyloid beta protein immunoreactive plaque and related lesions in the brains of Alzheimer's disease and adult Down's syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* **317**, 313–23

(1989).

182. Shukla, C. & Bridges, L. R. Regional distribution of tau, beta-amyloid and beta-amyloid precursor protein in the Alzheimer's brain: a quantitative immunolabelling study. *Neuroreport* **10**, 3785–9 (1999).
183. Forlenza, O. Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. *J. Neurol.* ... (1997).
184. Del Brutto, O., Sotelo, J. & Roman, G. Neurocysticercosis: a clinical handbook Swets & Zeitlinger. *Lisse The Netherlands* (1998).
185. Wallin, M., Pretell, E. & Bustos, J. Cognitive changes and quality of life in neurocysticercosis: a longitudinal study. *PLoS Negl Trop* ... (2012).
186. Garcia, H. H. & Del Brutto, O. H. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet. Neurol.* **4**, 653–61 (2005).
187. Li, Q. X. *et al.* Secretion of Alzheimer's disease Aβ amyloid peptide by activated human platelets. *Lab. Invest.* **78**, 461–9 (1998).
188. Kamenetz, F. *et al.* APP processing and synaptic function. *Neuron* **37**, 925–37 (2003).
189. Esteban, J. A. Living with the enemy: a physiological role for the beta-amyloid peptide. *Trends Neurosci.* **27**, 1–3 (2004).