



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

“EFECTO DEL PRETRATAMIENTO
ANTIINFLAMATORIO EN LAS
RESPUESTAS T_h17 , T_{reg} Y APOPTOSIS EN EL
GRANULOMA DE NEUROCYSTICERCOSIS
PORCINA ”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

RENZO MARCELO GUTIÉRREZ LOLI

LIMA-PERÚ
2019

La sustentación de este trabajo se realizó el día catorce de marzo de 2019 en las instalaciones de la Escuela de Posgrado “Victor Alzamora Castro” – UPCH; en presencia de mi asesora la Dra. Cristina Guerra Giraldez y ante el jurado evaluador conformado por:

Dra. Patricia Herrera Velit (Presidenta)

Dr. Jorge Arévalo Zelada (Vocal)

Dr. Daniel Clark Leza (Secretario)

Dedicatoria

A mi familia,
por su apoyo y cariño incondicional.

Agradecimientos

A la Dra. Cristina Guerra,
por la oportunidad de ser parte de su equipo,
por guiar mi trabajo con entusiasmo
y por formarme en ética y valores científicos.

A Carolina, Juan, Pamela, David, José
por acompañarme en este viaje con su cariño y amistad.
The few, la Résistance.

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.

Este trabajo se realizó con el apoyo del Fondo de Entrenamiento NIH-Fogarty:
“Traslational Reserach Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”.
Grant number: 2D43TW007120-11A1



Índice

I. Introducción	1
1.1 <i>Taenia solium</i>	1
1.2 Neurocisticercosis (NCC)	2
1.2.1 Epidemiología	3
1.3 Respuesta inmune en NCC.....	4
1.3.1 Paradigma Th1/Th2.....	4
1.3.2 Interacción parásito-hospedero.....	5
1.3.3 Inflamación post-tratamiento antihelmíntico en NCC	6
1.4 Biología del factor de necrosis tumoral (TNF)	7
1.4.1 Generalidades: Superfamilia TNF.....	7
1.4.2 Biosíntesis y estructura del TNF α	9
1.4.3 Transducción de la señal	10
1.4.4 Importancia patológica de TNF α en NCC.....	13
1.5 Tratamiento antiinflamatorio para el control de la NCC.....	13
1.5.1 Glucocorticoides: Dexametasona (DEX)	13
1.5.2 Terapia anti-TNF α : Etanercept.....	14
1.6 Control local de la inflamación: Aclaramiento celular en el granuloma	17
1.6.1 Apoptosis en la respuesta inmune	17
1.6.2 Linfocitos T <i>helper</i> 17 (T _h 17) en el reclutamiento de células fagocíticas.....	18
1.6.3 Linfocitos T reguladores (T _{reg}) como inhibidores inflamatorios	20
II. Pregunta de Investigación	21
III. Objetivos	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
IV. Materiales y Métodos	22
4.1 Diseño general.....	22
4.2 Animales y consideraciones éticas	22
4.3 Esquema de tratamiento y muestras cerebrales	23
4.4 Demostración <i>in situ</i> de apoptosis en el granuloma de NCC	23
4.4.1 Detección de células en apoptosis por inmunofluorescencia	23
4.4.2 Evaluación de la antigüedad de las células de infiltrado inflamatorio y límites de la región de análisis.....	24

4.4.3 Procesamiento de imágenes y conteo celular automatizado.....	25
4.5 Análisis de la expresión de mensajeros apoptóticos y mensajeros de las poblaciones celulares Th17 y Treg	25
4.5.1 Extracción de RNA	25
4.5.2 Generación de cDNA por transcripción reversa.....	26
4.5.3 PCR cuantitativo en tiempo real.....	26
4.6 Análisis estadístico.....	26
V. Resultados	27
5.1 Distribución de la muestra.....	27
5.2 El tratamiento antihelmíntico con PZQ incrementa el número de células apoptóticas y aumenta la expresión de caspasa 3 en el granuloma de NCC.	27
5.3 Los pretratamientos antiinflamatorios con DEX y ETN reducen levemente la expresión de casp3 y la apoptosis inducidas por PZQ en el granuloma de NCC	28
5.4 Mensajeros de las respuestas Th17 y Treg disminuyen en respuesta al pretratamiento antiinflamatorio.....	31
VI. Discusión	35
6.1 Apoptosis en NCC: mecanismo de control intrínseco de la inflamación.....	35
6.2 Participación de citoquinas Th17 en NCC: algo más que moléculas proinflamatorias.....	36
6.3 Linfocitos Treg en el control de la inflamación en NCC	37
6.4 La terapia antiinflamatoria altera la inducción y mantenimiento de Th17 y la activación de Treg	38
VII. Conclusiones	41
VIII. Limitaciones y Recomendaciones	41
IX. Anexos	43
X. Referencias bibliográficas	46

Índice de Tablas

Tabla 1. Distribución del tamaño muestral de acuerdo al grupo de tratamiento.	27
Tabla 2. Comparación entre grupos en ensayos de expresión génica y conteo de células.	34
Tabla 3. Resumen del incremento realtivo (fold) de los ensayos de expresión génica.	34

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de las principales moléculas anti-TNF α y sus propiedades biológicas.	15
Figura 2. Esquema de la diferenciación de células inmunes efectoras	19
Figura 3. Flujograma del diseño experimental para cada objetivo.....	22
Figura 4. Células en apoptosis en el granuloma cerebral inducido por el tratamiento antihelmíntico con PZQ	30
Figura 5. Evaluación de la apoptosis en el granuloma de NCC en respuesta al pre tratamiento con antiinflamatorios.....	31
Figura 6. Análisis de expresión relativa de mensajeros asociados a las respuestas T _h 17 y Treg en el granuloma de NCC.....	33

Índice de Anexos

Anexo 1. Detalle de la función biológica de los miembros de la superfamilia TNF y sus receptores	44
Anexo 2. Esquema del fundamento de la técnica TUNEL para marcaje de células apoptóticas	45
Anexo 3. Características de las sondas empleadas en el análisis de expresión por qPCR.....	45

Resumen

La neurocisticercosis (NCC), hiperendémica en el Perú, es la infección cerebral causada por el estadio larval de *Taenia solium*. Esta enfermedad es la causa principal de epilepsia adquirida a nivel mundial y una de las parasitosis más frecuentes del sistema nervioso central. El tratamiento para NCC exige terapias personalizadas debido a la gran variedad en la sintomatología. Las drogas antihelmínticas, como praziquantel (PZQ), son efectivas para matar al parásito; sin embargo también exacerban la respuesta inflamatoria, por lo que su administración podría ser innecesaria o contraindicada en algunos casos. Pautas para el manejo de NCC sugieren el pre tratamiento con agentes antiinflamatorios, como dexametasona (DEX), para controlar las complicaciones.

Reportes clínicos humanos y modelos animales han demostrado la importancia de citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF α), en la progresión de la patología en NCC. Recientemente, nuestro grupo reportó la disminución en la expresión de genes proinflamatorios en cerdos naturalmente infectados con NCC en respuesta al pre tratamiento antiinflamatorio con DEX o Etanercept (ETN), un inhibidor de TNF α , en la inflamación causada por administración de PZQ.

Durante la última década, estudios *in vitro* e *in vivo* para enfermedades inflamatorias crónicas destacan el papel de los linfocitos T cooperadores 17 (T_h17) y T reguladores (T_{reg}) como mediadores importantes de la homeostasis inmune y la tolerancia periférica durante la neuroinflamación, así como en la eliminación de elementos apoptóticos. Sin embargo la participación de estas poblaciones celulares, así como la apoptosis, no se ha explorado en la patología de NCC y se desconoce si se modifican en respuesta el tratamiento antiinflamatorio.

En este trabajo se usaron muestras cerebrales de 12 cerdos naturalmente infectados con NCC distribuidos en 3 grupos: tratados con PZQ (n = 3) o pretratados con DEX (n = 3) o ETN (n = 3) antes de PZQ. Un grupo de animales permaneció sin tratar (n = 3), como control. Se observó que el pre tratamiento con DEX redujo la expresión de las citoquinas IL-17 e IL-23 de la respuesta T_h17, como también del factor de transcripción FoxP3 de la población T_{reg}; en comparación a la reducción obtenida por ETN. Asimismo, el conteo de células apoptóticas, así como la expresión de caspasa-3, mostró una leve disminución en respuesta a ambos antiinflamatorios en comparación con lo observado en PZQ solo.

Los resultados sugieren la participación de T_{reg} y T_h17 en la patología de la NCC y que el tratamiento antiinflamatorio previo con DEX o ETN podría afectar estas poblaciones celulares por diferentes mecanismos. Estas observaciones contribuirán a una mejor comprensión de la naturaleza de la

inflamación aguda y los objetivos de los agentes antiinflamatorios propuestos, que son fundamentales para formular nuevas medidas más simples, seguras y efectivas para el control de NCC

Palabras clave:

Taenia solium, Neurocisticercosis, Neuroinflamación, T_h17, T_{reg}, Apoptosis

Abstract

Neurocysticercosis (NCC), hyperendemic in Peru, is the brain infection with the larvae of *Taenia solium*. Treatment of NCC requires case-customized therapies due to its variety of symptoms. Anthelmintic drugs, like praziquantel (PZQ), kills the parasite causing inflammation and seizures. Current guidelines for management of NCC recommend the pretreatment with dexamethasone (DEX), a high potency corticosteroid, to control these complications.

Recently, our group reported the down-regulation of pro-inflammatory genes in naturally infected pigs with NCC after the pretreatment with etanercept (ETN), a tumor necrosis factor inhibitor, or DEX on the PZQ-induced inflammation. However, the effect of anti-inflammatory therapy over other important immune elements, such as T regulatory cells (T_{reg}) and T helper 17 cells (T_{h17}), are unexplored. Both T_{reg} and T_{h17} cells are important mediators of immune homeostasis and peripheral tolerance during neuroinflammation, as well in the clearance of unnecessary elements throughout apoptosis.

We used brain biopsies from 12 pigs infected with NCC distributed in 3 groups: treated with PZQ only (n=3) or pretreated either with DEX (n=3) or ETN (n=3) before anthelmintic. A group of animals remained untreated (n=3) as controls. As measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), DEX significantly depressed expression of T_{reg} marker Foxp3, and T_{h17} -related interleukins IL-17 and IL-23. In contrast, transcription was modestly decreased in the ETN pretreated pigs compared to PZQ alone. Moreover, a similar pattern was found after measuring of apoptosis tested both by RT-qPCR of caspase-3 and by counting apoptotic cells detected by immunofluorescence.

Together, our findings suggest the participation of T_{reg} and T_{h17} in the pathology of NCC and the pretreatment with DEX or ETN might affect these cell subsets through different mechanisms. These observations will contribute to a better understanding of the nature of acute inflammation and the targets of proposed anti-inflammatory agents, which are critical to formulate simple, safe and more effective treatment measures.

I. Introducción

1.1 *Taenia solium*

Taenia solium es un platelminto de la clase Eucestoda ¹ 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

El parásito adulto está compuesto por una pseudocabeza (escólex) armada con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos en el rostelo retráctil; un cuello angosto, y un cuerpo elongado que consta de varios cientos de proglótidos, cada uno con aparatos sexuales femeninos y masculinos 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 autofecundan y se desprenden del extremo distal del gusano, luego son expulsados al ambiente junto a la materia fecal. ⁵

Cada proglótido contiene miles de huevecillos que son liberados en el suelo donde ya tienen carácter infectante sin necesidad de embrionar y pueden permanecer viables durante largos periodos. Cada huevecillo contiene un embrión hexacanto (oncosfera) 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 los tejidos del hospedero intermediario, las oncosferas se desarrollan transformándose en cisticercos o metacéstodes, también llamados quistes. Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida contaminada por cisticercos, estos alcanzan el intestino donde, si alguno evagina, podrá convertirse en el gusano adulto, completando de esta manera el ciclo. La infección con el platelminto adulto intestinal o teniasis no debe confundirse con la cisticercosis, en la que el hombre actúa como hospedero intermediario. ⁶⁻⁸

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. ⁸ Las fuentes principales de contagio humano son alimentos y líquidos contaminados con huevecillos; es frecuente también la autoinfección en individuos teniásicos. ^{7,8}

1.2 Neurocisticercosis (NCC)

La infestación en la teniasis cursa de forma prácticamente asintomática o produce compromisos digestivos muy leves e inespecíficos en el ser humano.⁹ Sin embargo, en la cisticercosis, las oncosferas se establecen y enquistan en diversos tejidos, donde alcanzan 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 cisticerco viable provoca muy poca inflamación en los tejidos que lo rodean, permaneciendo indetectable para el sistema inmune del hospedero.^{16,17} Esto debido, probablemente, a la protección de la barrera hematoencefálica (BHE) y a mecanismos de evasión inmune propios del parásito.¹⁸ Después de un periodo desconocido y presumiblemente largo¹⁹ el parásito degenera, lo que desencadena una reacción inflamatoria en el hospedero.^{5,10}

La NCC tiene manifestaciones clínicas muy variadas, llegándose a presentar como síntomas neurológico comunes, como el aumento de la presión intracraneal, hidrocefalia y crisis epilépticas; esta última como la más frecuente.^{8,20} 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 ubicación en el cerebro y de la gravedad del proceso inflamatorio en el tejido adyacente al parásito.²¹

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.²² 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^{23,24} y la limitada implementación de equipos de procesamiento de imágenes en comunidades rurales²⁵ continúan siendo los principales obstáculos para la identificar adecuadamente esta enfermedad.

Por otro lado, el tratamiento para NCC exige terapias personalizadas debido a la gran variedad en la sintomatología. Las drogas antihelmínticas, en esencia Albendazol o

Praziquantel (PZQ), aceleran la degeneración y eventualmente producen la muerte del parásito ^{19,26,27}; aunque a la vez exacerbaban la respuesta inflamatoria, por lo que esta terapia podría ser innecesaria o estar contraindicada en algunos casos. ^{15,28,29} Generalmente el tratamiento simultáneo con corticosteroides antiinflamatorios, disminuye las complicaciones del tratamiento antihelmíntico.^{30,31}

La investigación en NCC enfrenta varias limitaciones. El ciclo de vida de *T. solium* es prácticamente imposible de reproducir en el laboratorio, los modelos animales son limitados y se requieren 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.^{32,33} El reporte más reciente (2015) de la Organización Mundial de la Salud señala que 50 millones de personas padecen epilepsia en el mundo, de las cuales el 30% se asocia a NCC en regiones endémicas y el 3% en el resto del mundo.³⁴ Asimismo, se calcula que, globalmente, la NCC es responsable de aproximadamente 0.5 millones de años de vida potencialmente perdidos (*disability-adjusted life year, DALY*) cada año ³⁵, lo que convierte a esta enfermedad en un serio problema de salud pública.

Las principales regiones donde la NCC es endémica 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 contaminación de alimentos y líquidos con heces humanas, y por consiguiente contribuye a la alta prevalencia de esta parasitosis.³⁷

No obstante, los casos de NCC en naciones desarrolladas como los Estados Unidos de América y Australia se encuentran en aumento.³⁸ Factores como la intensificación de la industria de productos de origen animal, el incremento en el comercio de animales vivos y el 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.³⁹

Al igual que en otras enfermedades tropicales desatendidas, el diagnóstico y detección de NCC es aún bastante impreciso y posee cobertura limitada.^{37,40} 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.⁴¹

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.⁴²⁻⁴⁵ 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.⁴⁶

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.⁴⁷ 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.⁴⁸

Finalmente, en Africa, específicamente en la región subsahariana, se reporta también alta prevalencia para esta zoonosis, con excepción de las naciones islámicas.^{49,50} 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 países⁵¹⁻⁵³ donde se ha demostrado también una alta prevalencia de epilepsia asociada a NCC, que alcanza cifras de 0.31-4.6 millones de casos.⁵⁴

1.3 Respuesta inmune en NCC

1.3.1 Paradigma Th1/Th2

La inmunidad adaptativa en mamíferos es un proceso finamente regulado, caracterizado por la proliferación y diferenciación de linfocitos de poblaciones específicas. En presencia de patógenos y citoquinas específicas, los linfocitos T cooperadores CD4+ (*naive*, T_h0) se diferencian en distintas poblaciones capaces de reclutar y movilizar otras especies celulares especializadas para eliminar eficazmente los patógenos invasores.⁵⁵

Por un lado, la estimulación de T_h0 por interleucina (IL) -12 favorece la diferenciación a linfocitos T_h1, que producen citoquinas inflamatorias importantes, como interferón gamma (INF- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), e inductores proliferativos como IL-2. La respuesta T_h1 se ha asociado típicamente a la defensa frente a

patógenos intracelulares a través de la activación de macrófagos, linfocitos CD8+ citotóxicos y la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas (Ig), especialmente IgG) de opsonización por células B. ⁵⁶

En contraste, la defensa frente a patógenos extracelulares es dirigida por la respuesta T_h2. IL-4 e IL-2 estimulan a los linfocitos T_h0 hacia el fenotipo T_h2, que produce citoquinas inmunomodulatorias como IL-10, IL-13 e IL-25. Estos efectores activan principalmente a células del linaje mieloide como eosinófilos y mastocitos, y favorecen también la inmunidad humoral a través del cambio de isotipo en células B para generar anticuerpos neutralizantes como IgM, IgA e IgE. ^{56,57}

Tanto para T_h1 como para T_h2, el estímulo inicial para la diferenciación es el patógeno. Sin embargo, cada población produce diferentes moléculas efectoras, cuya retroalimentación potencia la diferenciación a un determinado subconjunto. Por esta razón, la relación antagónica entre INF γ e IL-4 sugiere que el desarrollo de T_h1 y T_h2 sería mutuamente excluyente. ^{58,59}

1.3.2 Interacción parásito-hospedero

Los estudios sobre inflamación 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 T_h1 a una respuesta más permisiva moduladora T_h2 que permitiría la permanencia prolongada del parásito. ⁶⁰

Con ayuda del modelo porcino para NCC (cerdos con infección natural) se encontró que estas respuestas varían de acuerdo al estadio del parásito; así, se describió una fuerte respuesta inflamatoria T_h1 a quistes en degeneración, una respuesta regulatoria y antiinflamatoria T_h2 a quistes viables (caracterizada por aumento de IL-10 e IL-4), y una respuesta mixta T_h1/T_h2 a quistes calcificados. ^{61,62}

Del mismo modo, en pacientes con NCC asintomática, cuya presentación se asocia con cisticercos viables, se ha observado que prevalece una respuesta T_h2, 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 T_h1, con incremento de IL-12, IL-18, IFN- γ , TNF α y óxido nítrico (NO). ^{63,64}

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.

1.3.3 Inflamación post-tratamiento antihelmíntico 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.^{8,65} Se conoce 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.⁶⁶

Es así que se han aprovechado cerdos naturalmente infectados por *T. solium* para describir el curso de la enfermedad⁶⁷ y para evaluar la eficacia del tratamiento.^{68,69} Sin embargo, existen muy pocos estudios enfocados en caracterizar la inflamación inducida por los efectos de 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 cerdos con el fin de caracterizar la respuesta inmune inducida por el tratamiento contra NCC y contribuir en el diseño de esquemas más seguros y efectivos para controlar 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 proveniente de la periferia.⁷⁰ Este proceso está acompañado de un aumento en la permeabilidad de la BHE.⁷¹ Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento antihelmíntico en la permeabilidad de la BHE, se diseñó en el laboratorio una serie de experimentos con cerdos naturalmente infectados por *T. solium*, los cuales recibieron una sola dosis de praziquantel (PZQ) y a los cinco días fueron perfundidos con el colorante vital Azul de Evans (AE). AE tiene la cualidad de formar un complejo estable con la albúmina de la sangre,⁷² y al extravasarse a los tejidos por un aumento de la permeabilidad de la BHE los colorea de azul, además de emitir fluorescencia⁷³, indicando las regiones donde se ha modificado la BHE, que normalmente es impermeable a la albúmina.⁷⁴

Con este modelo, en base a una muestra de animales relativamente pequeña y heterogénea, se observó que el tratamiento estuvo asociado a una mayor permeabilidad de la

BHE en las regiones de tejido del hospedero (cápsulas) que rodean a algunos quistes; precisamente aquellas en las que se demostró presencia de un mayor infiltrado inflamatorio.⁷⁵

Pérdida focal de integridad vascular e infiltración eosinofílica en NCC. Con esta metodología, nuestro grupo de investigación caracterizó y reportó la naturaleza celular de la respuesta inflamatoria inducida por la administración de PZQ, y describió histológicamente regiones de la cápsula con infiltrado focal de AE (*region of Evans blue infiltration*, REBI), las cuales 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, señalando que estas células lideran la respuesta inmune del hospedero en el proceso efectivo de ataque al parásito.⁷⁶

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. El IS score se basa fundamentalmente en las dimensiones del infiltrado celular, y aunque tiene varias limitaciones, logra demostrar que las cápsulas azules alcanzan consistentemente valores más altos que las cápsulas claras. Además, el tiempo de exposición al PZQ también se refleja en el puntaje de inflamación.⁶²

Efecto de la localización del quiste en el proceso inflamatorio. En un trabajo más reciente, nuestro grupo confirmó que uno de los factores que influyen en la respuesta inflamatoria es en qué zona del tejido cerebral se ubican los cisticercos.⁷⁷ Los cisticercos parenquimales presentan los niveles más altos de inflamación pericística (IS score más alto) después del tratamiento con PZQ. A su vez, la permeabilidad de la BHE sufrió cambios significativos solo en tejido parenquimal.

1.4 Biología del factor de necrosis tumoral (TNF)

1.4.1 Generalidades: Superfamilia TNF

El factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF) es una citoquina proinflamatoria ampliamente estudiada que cumple papeles críticos en la activación y mantenimiento de la respuesta inmune. La caracterización de esta molécula empieza hace poco más de un siglo con las primeras descripciones de los efectos aparentes de endotoxinas bacterianas en la aparición de necrosis hemorrágicas de tumores humanos.⁷⁸ Cuando en 1962

se demostró experimentalmente que el efecto necrotizante es indirecto y ajeno a las endotoxinas, se postuló que el efecto de la endotoxina es mediado por un “factor necrotizante de tumores”.⁷⁹

La hipótesis de una respuesta antitumoral del sistema inmune *in vivo* empezó a cobrar relevancia recién en 1968, cuando se aislaron fracciones que contenían un factor citotóxico producido por linfocitos de ratón, denominado inicialmente “linfotóxina” (LT).^{80,81} En 1975 se reportó otro factor producido por macrófagos, con propiedades similares a LT, que se llamó finalmente “factor de necrosis tumoral” (TNF).⁸² Ambos elementos mostraron gran efectividad al inducir *in vitro* la necrosis de células de fibrosarcoma de ratón.⁸² Estos conceptos fueron extrapolados a enfermedades sistémicas en 1981, cuando se reportaron niveles muy elevados de TNF en modelos de infección experimental para malaria^{83,84} y envenenamiento por endotoxinas bacterianas.⁸⁵

En 1985, los cDNA murinos y humanos de LT y TNF fueron purificados, clonados y expresados como proteínas recombinantes que corroboraron sus propiedades biológicas y permitieron análisis estructurales que revelaron una gran similitud entre estos dos elementos.^{86,87} Casi en simultáneo se lograba purificar, con anticuerpos dirigidos a LT, una proteína de 25 kDa en homogenizados de células de linfoblastoma humano RPMI 1788.^{88,89} Usando el mismo sistema de anticuerpos, un segundo factor citotóxico de 17 kDa, denominado TNF α por su similitud al TNF murino, fue aislado de los sobrenadantes de células mielomonocíticas humanas HL-60.^{86,90} Los primeros perfiles de las secuencias de aminoácidos para las proteínas de 17 (TNF α) y 20 kDa mostraron que compartían un 50% de homología estructural, reforzando el precepto de ser dos entidades diferentes pero sugiriendo también que compartían efectos biológicos.^{86,89}

Posteriormente, la generación de anticuerpos específicos para cada proteína confirmó que estas dos especies eran inmunológicamente diferentes⁹¹ y que probablemente tenían reservorios celulares distintos; mientras TNF α era producida principalmente por macrófagos, LT (finalmente denominada TNF β) era producida en su mayoría por linfocitos.⁹² Asimismo, en coherencia con su similitud, se demostró que tanto TNF α como TNF β se unen a un receptor común de superficie celular de alta afinidad, presente en la mayoría de los tipos de células.⁹³

La demostración de que la caquectina, inicialmente descrita en la década de 1970 como una hormona responsable de inducir anemia, shock séptico y caquexia en ratones^{94,95}

era el homólogo murino del TNF α humano,⁹⁶ condujo a repensar la importancia de esta citoquina en la enfermedad humana.

En adelante, y después de más de tres décadas, se identificaron un total de 19 ligandos proteicos conocidos como superfamilia TNF (TNFSF). En ella, solo TNF α y TNF β fueron caracterizados a partir de su purificación como proteínas⁹⁷; todos los demás ligandos fueron descritos a partir de análisis por homología de las secuencias de cDNA que codifican elementos comunes para este grupo, como los dominios para formación de trímeros y el motivo hoja beta en la sección central de la molécula.^{98,99}

A su vez, los ligandos tienen la propiedad de unirse a un grupo de receptores, conocido como superfamilia de receptores de TNF (TNFRSF), conformada por 29 miembros diferentes que estructuralmente comparten la forma barril beta y el dominio extracelular de unión a TNFSF rico en cisteínas.¹⁰⁰ Precisamente, la interacción TNFSF/TNFRSF ha motivado el estudio de los efectos pleiotrópicos de TNF α a nivel celular y sus funciones sistémicas en condiciones fisiológicas o durante la enfermedad. Asimismo, este eje ha permitido desarrollar alternativas terapéuticas para diversas patologías caracterizadas por desequilibrios en la función biológica de TNF α . El anexo 1 detalla la diversidad y función biológica de los ligandos de TNFSF y su interacción con TNFRSF.

1.4.2 Biosíntesis y estructura del TNF α

La superfamilia TNF y sus receptores tienen un antiguo origen evolutivo que se remonta a genes de copia única presentes en artrópodos y que se han conservado de manera transversal en todos los vertebrados.¹⁰¹

El gen *tnf* que codifica a TNF α está presente como copia única en el cromosoma 6 humano (cromosoma 17 murino, cromosoma 7 porcino) y consta de cuatro exones y tres intrones. Los exones I y II constituyen la región del péptido señal, mientras que los exones III y IV conforman la región codante. El exón IV por sí solo codifica aproximadamente el 80% de la molécula madura de TNF α .¹⁰²

La producción del transcrito es finamente regulada por factores de transcripción y elementos de unión al DNA, como el factor nuclear kappa de células B (*nuclear factor- κ B*, NF- κ B), la proteína activadora 1 (*activator protein-1*, AP-1) y el factor nuclear asociado a células T activadas (*nuclear factor associated with activated T cells*, NFAT), en coherencia con la presencia de secuencias de unión a estos elementos dentro de la región promotora del gen *tnf*.¹⁰³ Sin embargo, también se ha demostrado que la regulación transcripcional depende

del tipo de célula y del estímulo, lo que implicaría el reclutamiento de distintos factores de transcripción hacia el promotor. ^{103,104}

Asimismo, se han documentado mecanismos de regulación post-transcripcional mediante interacciones con regiones ricas en adeninas y uracilos (*AU-rich element*, ARE) en el extremo 3' del mRNA de TNF α ^{105,106}; esto incluye microRNAs ¹⁰⁷, y elementos que regulan la estabilidad del mensajero como tristetraprolina ¹⁰⁸ y factores de decaimiento ¹⁰⁹.

El mensajero maduro es traducido en una proteína homotrimérica transmembrana de aproximadamente 27 kDa conformada por 233 aminoácidos, referida a veces como pro-TNF o TNF de membrana (mTNF). La enzima convertidora de TNF α (*TNF α converting enzyme*, TACE) corta a nivel de los residuos 76 y 77 de alanina y valina, respectivamente, y genera una porción soluble de 17 kDa que corresponde a la molécula trimérica de TNF α circulante que le confiere a esta citoquina la propiedad de actuar en regiones lejanas al sitio de síntesis.

¹¹⁰

Tanto TNF α como mTNF pueden unirse a TNFR1 y TNFR2 y son biológicamente activas. ¹¹¹ Sin embargo, no existe un consenso sobre las funciones específicas de cada especie. A diferencia de la forma soluble, las propiedades de mTNF estarían limitadas al control celular intrínseco y a la comunicación paracrina célula-célula que inducirían respuestas biológicas de índole local. ^{112,113}

1.4.3 Transducción de la señal

La gran diversidad de funciones que cumple TNF α en el organismo la convierte en una molécula central en la activación, desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune. Si bien esta citoquina es producida por diferentes tipos celulares en distintas regiones del cuerpo, los principales productores son las células del linaje monocítico como los macrófagos, microglia, astrocitos, células de Langerhans, células de Kupffer y macrófagos alveolares. ¹¹⁴

Una vez que ha sido secretado como elemento soluble, el homotrímero de TNF α puede interactuar con gran afinidad con los dominios ricos en cisteínas de los receptores TNFR1 y TNFR2. Si bien la distribución de ambos receptores parece ser ubicua en el organismo, algunos estudios sugieren que TNFR1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos de mamíferos, mientras que la producción de TNFR2 es regulada y se expresa principalmente en las células inmunes. ¹¹⁵

La activación de TNFR2 en células inmunes es responsable de la gran variedad de respuestas inflamatorias atribuidas a TNF α . Los eventos posteriores a la activación de TNFR1 ó TNFR2 pueden ser específicos de acuerdo a las circunstancias fisiológicas y a la naturaleza del estímulo, pero la etapa inicial es común a las vías de señalización mediadas por TNF α . Esta etapa involucra la interacción ligando-receptor, que induce cambios conformacionales en TNFR1 favoreciendo la disociación de la proteína silenciadora de los dominios de muerte (*silencer of death domains*, SODD), que se encuentra constitutivamente unida al dominio intracelular de TNFR1. La liberación de SODD permite a su vez la unión de la proteína adaptadora TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), que servirá como plataforma para reclutar a la serina/treonina quinasa RIP-1 (*receptor interacting protein-1*) y la ubiquitina ligasa TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*).^{116,117}

En adelante, y dependiendo de los elementos que se incorporen al complejo TRADD-RIP-TRAF2, es posible activar hasta tres vías de señalización diferentes que dan como resultado (1) la activación del factor de transcripción NF- κ B, (2) la activación de las vías de las proteínas quinastas activadas por mitógenos (MAPK) ó (3) la inducción de muerte celular. Los efectos netos de estas vías de señalización pueden parecer sinérgicos o antagónicos entre sí, lo que sugiere la existencia de un constante mecanismo de comunicación cruzada y regulación para evitar que sean mutuamente excluyentes.^{118,119}

(1) En el primer caso, la activación de NF- κ B por TNFR1 corresponde a la vía canónica para este factor de transcripción. En este escenario, la proteína inhibitoria I κ B α se encuentra constitutivamente unida al NF- κ B citoplasmático impidiendo su traslocación al núcleo celular. Una vez formado el complejo TRADD-RIP-TRAF2, la acción serina/treonina quinasa de RIP activa a la quinasa de I κ B (IKK), la cual fosforilará a I κ B α favoreciendo su ubiquitinación y posterior degradación por proteosoma.¹²⁰

Con la degradación de I κ B, el heterodímero NF- κ B liberado entra en el núcleo donde puede interactuar con regiones promotoras en el DNA e inducir la expresión de genes específicos para conducir una respuesta fisiológica particular. Por ejemplo, se le ha atribuido la capacidad de favorecer la proliferación y la supervivencia celular mediante factores anti-apoptóticos.¹²¹ Sin embargo, destaca su participación en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, dado que el NF- κ B es un activador global de numerosas citoquinas proinflamatorias (incluyendo TNF α), quimiocinas y sus receptores, además de ser un regulador crítico de la activación y proliferación de células inmunes.¹²⁰

- (2) Por otro lado, la transducción del estímulo en las vías MAPK ocurre de manera canónica en células mamíferas e involucra tres grupos de proteínas ordenadas en familias conocidas por el nombre del último ligando citosólico. De esta forma se tienen a las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las quinasas p38 (p38) y las quinasas c-Jun amino terminales (JNK).¹²² Por una parte, la cascada ERK es común a todos los tejidos y es fuertemente activada por factores de crecimiento y mitógenos; se la ha señalado como un regulador clave en la proliferación celular y fagocitosis.¹²³ En contraste, las cascadas p38 y JNK comparten algunos activadores intermediarios y se ha observado que participan en la respuesta a la hiperosmolaridad, stress oxidativo, citoquinas inflamatorias, y en la regulación de la apoptosis.¹²⁴ Si bien las tres cascadas MAPK responden a TNF α , estudios *in vitro* han demostrado que esta citoquina induce una fuerte activación de JNK, provoca una respuesta moderada de p38 y activa mínimamente a ERK.^{125,126}

Para la activación de JNK, el complejo TRADD-RIP-TRAF2 activa por fosforilación sucesiva las quinasas citosólicas MEKK1, MEKK4 y MEKK7, para finalmente activar JNK e inducir su translocación al núcleo. Desde ahí favorecerá la dimerización de los elementos c-Jun y c-Fos para formar el factor de transcripción AP-1, el cual induce principalmente la expresión de genes pro-apoptóticos y relacionados a la proliferación y diferenciación celular.¹²⁷

- (3) Finalmente, la inducción de muerte celular mediada por activación de TNFR1 involucra el reclutamiento de un grupo de proteínas denominado complejo de señalización inductor de muerte (*death inducing signaling complex*, DISC) conformado por TRADD, la proteína asociada a Fas con dominio de muerte (FADD) y TRAF 1. Una vez formado, DISC actúa como andamiaje que incorpora a la caspasa iniciadora pro-caspasa 8, la cual, tras su activación proteolítica a caspasa-8, activará a las caspasas efectoras caspasa-3 y caspasa-6.¹²⁸ En particular la activación de caspasa-3 es esencial para la muerte celular inducida por TNFR1, ya que activa nucleasas latentes conocidas como CAD (*caspase activated DNase*) que degradan sistemáticamente el DNA genómico de la célula.¹²⁹

La naturaleza pleiotrópica de TNF α alcanza una gran diversidad de mediadores y vías de señalización que en su conjunto describen la complejidad del desarrollo, mantenimiento y control de la respuesta inflamatoria.¹¹⁹ El papel central de esta citoquina la convierte en un blanco atractivo para desarrollar estrategias que permitan controlar los

efectos deletéreos de la inflamación, tal como sucede en algunas patologías de origen autoinmune o infeccioso.

1.4.4 Importancia patológica de TNF α en NCC

Estudios en modelos animales y reportes humanos de NCC indican que mediadores inflamatorios producidos por células de la respuesta inmune innata y adaptativa juegan un papel clave en la progresión de la patología. Asimismo, estudios previos de nuestro grupo han demostrado el incremento significativo de los mensajeros de TNF α y otras citoquinas proinflamatorias en respuesta al tratamiento antihelmíntico, sugiriendo que estas moléculas tienen una función central en las complicaciones post-tratamiento.⁶²

1.5 Tratamiento antiinflamatorio para el control de la NCC

1.5.1 Glucocorticoides: Dexametasona (DEX)

Los glucocorticoides, como la dexametasona (DEX), son fármacos antiinflamatorios, inmunosupresores y descongestivos altamente eficaces. Desde hace décadas, se han administrado en una variedad de trastornos, incluyendo enfermedades autoinmunes, reacciones alérgicas y el control del cáncer, mejorando enormemente la prognosis.¹³⁰

Mecanismo de acción. La similitud estructural de DEX a hormonas esteroides permite que regule una gran variedad de procesos biológicos como agonista de las vías de señalización que normalmente son activados por hormonas.¹³¹ La acción farmacológica de DEX empieza con la unión a un receptor específico para glucocorticoides (GR) en el citoplasma de células inmunes.¹³² En condiciones normales, GR se encuentra como un heterodímero asociado a chaperonas, a la espera de su activación por ligando y posterior translocación al núcleo, que conduce a efectos en la inmunidad innata y adaptativa.^{133,134}

Entre estos efectos destaca la represión de factores de transcripción, como NF- κ B y AP-1, CREB, IRF3, NFAT, T-Bet, GATA-3 y AP-1¹³⁵⁻¹³⁷, los cuales controlan la expresión de especies proinflamatorias como IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, COX-2, E-selectina, iNOS, IFN- γ , TNF- α , ICAM, MCP-1 y VCAM, que a su vez se encuentran regulados negativamente, probablemente por cambios en la estabilidad de sus mRNA.^{138,139}

A nivel celular, se han descrito otros mecanismos que interfieren con el proceso inflamatorio en respuesta a la administración de glucocorticoides. Por ejemplo, la inhibición de la interacción de linfocitos con células endoteliales, que resulta en un menor ingreso de células inmunes a la región inflamada¹⁴⁰; la inhibición de la vía de señalización por *Toll-like*

receptors en células presentadoras de antígeno ¹⁴¹ y la desregulación de la migración y maduración de células dendríticas. ¹⁴²

DEX en NCC. Actualmente, pautas clínicas para el manejo adecuado de la NCC recomiendan la administración de agentes antiinflamatorios, como corticoesteroides, para prevenir la inflamación post-tratamiento ^{143,144}. Si bien no se conoce cuál es el mejor momento para administrarlos, estudios retrospectivos sugieren que el pre-tratamiento con corticoesteroides, como DEX, antes del antihelmíntico permite resolver mejor las complicaciones ^{31,145}.

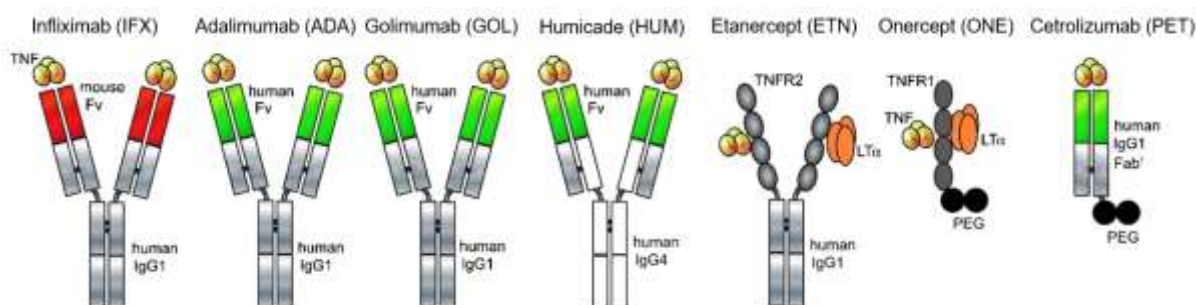
A pesar de que los corticoesteroides son usados frecuentemente para limitar la inflamación y controlar los síntomas, se desconoce el régimen ideal que garantice el uso seguro de ellos y otros agentes antiinflamatorios en el control de la NCC. En consecuencia, la dosis, la duración y el tipo de corticoesteroides empleados se basan en el criterio o preferencia del médico y en la historia clínica particular ¹⁴⁶.

En un trabajo reciente de nuestro grupo usando el modelo porcino de NCC, se ha mostrado la capacidad de DEX en la regulación negativa de transcritos proinflamatorios como TNF α , IL-6 e INF γ en respuesta al tratamiento antihelmíntico. ¹⁴⁷ Estas observaciones son coherentes con las propiedades de DEX de represión de transcritos proinflamatorios. ¹³⁰ Sin embargo, la gran potencia de la actividad antiinflamatoria radica también en su inespecificidad, actuando como antagonista de la proliferación y diferenciación de células inmunes ¹⁴⁸, e induciendo a apoptosis grupos celulares independientemente de su participación en la resolución de la inflamación; por ejemplo, estudios *in vivo* señalan que la administración de DEX reduce el número de linfocitos T reguladores (T_{reg}), limitando también la propiedad de producir citoquinas inmunomoduladoras, como IL-10, en las poblaciones remanentes. ¹⁴⁹

1.5.2 Terapia anti-TNF α : Etanercept

Entre las alternativas para controlar los efectos negativos de la inflamación, a nivel general, el bloqueo de la vía de TNF α representa un blanco atractivo; sobre esta posibilidad se han probado históricamente una gran variedad de fármacos. En las últimas décadas, el desarrollo de biomoléculas más complejas ha permitido mejoras en la vida media funcional de la terapia antiinflamatoria, además al ser compatibles con elementos propios de la respuesta inmune, disminuyen los riesgos de su administración *in vivo*.

De esta forma, se han producido varios anticuerpos monoclonales específicos para TNF α y proteínas de fusión recombinantes. Sus estructuras y propiedades se resumen en la figura 1.



Propiedades	IFX	ADA	GOL	HUM	ETN	ONE	PET
Unión a LT α	×	×	×	×	✓	✓	×
Unión a TNF α soluble	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Neutralización de TNF α soluble	✓	✓	✓	✓	✓	¿?	✓
Unión a mTNF α	✓	✓	✓	¿?	✓	¿?	¿?
Antagonista de mTNF α	✓	✓	✓	¿?	✓	×	×
Unión a región Fc	✓	✓	✓	×	✓	×	×
Inhibición de citoquinas	✓	✓	¿?	¿?	¿?	¿?	✓

Adaptado de Sedger M & McDermott (2014).¹⁰⁴

Figura 1. Estructura de las principales moléculas anti-TNF α y sus propiedades biológicas.

Uno de estos, Etanercept (ETN), es una proteína recombinante de fusión de 934 aminoácidos y peso molecular de 150 kDa.¹⁵⁰ Está constituida por el dominio de unión a ligando extracelular del receptor de TNFR1 humano y la región del fragmento cristalizante (Fc) de la inmunoglobulina humana G1 (IgG1). La región Fc presente en ETN contiene los dominios constantes C_H2 y C_H3, mas no el dominio C_H1 de la IgG1 nativa.^{151,152}

La proteína de fusión, su caracterización bioquímica y sus efectos biológicos fueron desarrollados y estudiados durante la década de 1990 por el grupo de Bruce Beutler de la Universidad de Texas (*University of Texas Southwestern Medical Center*) en Estados Unidos, quienes obtuvieron la primera patente de esta proteína¹⁵³ y posteriormente la vendieron a la compañía biofarmacéutica Immunex (hoy Amgen, *Applied Molecular Genetics Inc.*) para iniciar ensayos clínicos.

ETN está catalogado por el Centro de Evaluación e Investigación Biológica (*Center for Biologics Evaluation and Research, CEBER*) de la Administración de Alimentos y Medicamentos del gobierno de los Estados Unidos (*Food and Drug Administration, FDA*) como producto biofarmacéutico o fármaco de origen biológico (*biologic*). Tras varios

ensayos clínicos, entre 1988 y 2004 la FDA autorizó la distribución de este producto bajo el nombre comercial de Enbrel® para tratar algunas enfermedades autoinmunes o con cuadros inflamatorios crónicos. Entre estas se encuentran la artritis reumatoide moderada a grave ¹⁵⁴, artritis reumatoide juvenil poliarticular moderada a grave ¹⁵⁵, artritis psoriásica ¹⁵⁶, espondilitis anquilosante o mal de Bechterew-Strümpell-Marie ¹⁵⁷ y psoriasis epidérmica en placas ¹⁵⁸.

Mecanismo de acción. Como se ha mencionado, los efectos biológicos de TNF α requieren de la unión de homotrímeros de esta citoquina a su receptor (TNFR) en la superficie celular, la dimerización del receptor activado y la subsecuente transducción de la señal a través de sus dominios intracelulares. ^{159,160}

De forma natural, existen también formas solubles de TNFR que actúan como inhibidores competitivos, impidiendo la unión de esta citoquina a los receptores de la superficie. ¹⁶¹ Sin embargo, la presencia de estos antagonistas naturales es insuficiente para bloquear el efecto de TNF α , el cual se encuentra particularmente elevado en la mayoría de enfermedades inflamatorias. ¹⁶²

En base a este evento, ETN, como receptor soluble de TNF α , se le une e inhibe competitivamente su acción, pues evita su interacción con receptores de superficie. La naturaleza dimérica de ETN permite la unión de TNF α libre con una afinidad entre 50 y 1000 veces superior a la observada en formas monoméricas de TNFR solubles. ^{150,163} La gran afinidad de ETN a TNF α explica el efecto antiinflamatorio de este biofármaco.

ETN en NCC. Nuestro grupo ha reportado la importancia de la inflamación cerebral mediada por TNF α usando un esquema de tratamiento con antihelmínticos y antiinflamatorios en el modelo porcino de NCC. En este trabajo se evaluaron cambios en la expresión de genes de mediadores inflamatorios y regulatorios como resultado del pretratamiento con DEX y ETN. El último se empleó para bloquear inflamación derivada de TNF α , citoquina que consistentemente se observó elevada en estudios previos. ⁶² Los resultados mostraron, entre otros efectos, una disminución significativa a en los niveles de expresión de TNF α , IL-6 e INF γ en comparación con la disminución obtenida por DEX ¹⁶⁴.

El uso de ETN en cerdos con NCC permitió controlar la inflamación cerebral generada o exacerbada por PZQ. Sin embargo, es necesario entender mejor otros componentes de la respuesta inmune inducida por el tratamiento antihelmíntico para diseñar esquemas más seguros y eficaces para el control de la NCC.

1.6 Control local de la inflamación: Aclaramiento celular en el granuloma

Canónicamente, el proceso inflamatorio se inicia como consecuencia de una perturbación ocasionada por una lesión física o química causada por un cuerpo extraño, anoxia o estrés metabólico, en alguna región del organismo. Cuando el daño es detectado, se induce que células inmunes migren por vía capilar hacia el tejido lesionado, donde liberan mediadores inflamatorios y productos citotóxicos para limitar la extensión de la región afectada.^{165,166} Estas células, entre las que destacan los granulocitos, suelen ser blancos apoptóticos para la acción de los glucocorticoides.¹⁶⁷

1.6.1 Apoptosis en la respuesta inmune

Entre las formas de muerte celular, la apoptosis es el mecanismo que garantiza un recambio organizado e inocuo de prácticamente todas las células del organismo. Este evento es transversal en varios procesos biológicos como el desarrollo, la homeostasis y procesos patológicos.

Una estrategia para amortiguar y terminar la respuesta inflamatoria es la muerte programada de células activadas. A través de la apoptosis, las células anulan la capacidad de responder a las señales celulares y sus componentes enzimáticos pierden toda función biológica al ser degradados.

Las características finales de la apoptosis son la condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y la formación de protrusiones a manera de sacos membranosos que encapsulan elementos citotóxicos, entre otros remanentes celulares. La formación de estos sacos permite que células especializadas, como los macrófagos, puedan fagocitarlos, limpiando el tejido de elementos innecesarios o peligrosos que pueden ser reciclados metabólicamente. Este evento, conocido como aclaramiento, es clave en el control de la inflamación y eventualmente permite el remodelamiento tisular en la región lesionada.¹⁶⁸

Por ejemplo, los neutrófilos, eosinófilos y mastocitos reclutados durante un proceso inflamatorio contienen una gran cantidad de enzimas citotóxicas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que son encapsuladas durante la apoptosis.^{169,170} Estas células contienen una gran cantidad de agentes citotóxicos y proteolíticos que al ser liberados permiten la destrucción de agentes extraños y células dañadas.¹⁷¹

Precisamente el carácter destructivo de los granulocitos es regulado constantemente mediante la inducción de apoptosis. En el caso específico de los neutrófilos, se ha reportado,

además de sus propiedades citotóxicas, la capacidad de fagocitar y encapsular agentes infecciosos para finalmente entrar en apoptosis.¹⁷² Las alteraciones morfológicas que sufren estas células durante la apoptosis facilitan su reconocimiento por células fagocíticas especializadas –como macrófagos periféricos o residentes y células dendríticas– las cuales los eliminan de la región afectada en un proceso denominado aclaramiento o eferocitosis.^{168,173}

El aclaramiento de cuerpos apoptóticos por macrófagos es fundamental para la resolución de la inflamación local y existen evidencias de que los neutrófilos apoptóticos ejercen efectos antiinflamatorios específicos en macrófagos aledaños que incluyen la producción de citoquinas inmunomodulatorias como TGF- β e IL-10.^{174,175} Estudios *in vitro* han demostrado que si estos elementos no son aclarados rápidamente podrían inducir necrosis de células vecinas, cambiando el pH local que activa a otras enzimas lisosomales. Asimismo, las ROS liberadas pueden desestabilizar a inhibidores de proteasas, exponiendo aún más a células cercanas.¹⁷⁶

En condiciones normales, el SNC no cuenta con macrófagos periféricos que se encarguen del proceso de aclaramiento. Por esta razón, la microglia, como macrófago residente, es el primer candidato a dirigir el aclaramiento de cuerpos apoptóticos. Esto fue corroborado recientemente en estudios *in vivo* de modelos de isquemia cerebral, donde la acción fagocítica de las microglías controló el aclaramiento de neutrófilos activados presentes en el parénquima.¹⁷⁷

Asimismo, se ha podido observar *in vivo* que el aclaramiento mediado por macrófagos periféricos induce la secreción del ligando Fas, miembro de TNFSF, favoreciendo la apoptosis de neutrófilos cercanos.¹⁷⁸ Por otra parte, estudios *in vitro* mostraron que los cuerpos apoptóticos que son fagocitados también sirven como estímulo negativo, el cual reduce la activación de la microglia. Así, disminuye la expresión de agentes proinflamatorios como TNF α e IL-12, y se favorece la expresión de citoquinas inmunomodulatorias como IL-10 y TGF β .¹⁷⁹

Estos mecanismos de retroalimentación sugieren que el control de la inflamación cerebral mediante apoptosis es una estrategia similar a la sistémica, basada en la remoción de elementos tóxicos para dar lugar a la etapa de reparación tisular.¹⁶⁶

1.6.2 Linfocitos T *helper* 17 (T_H17) en el reclutamiento de células fagocíticas

Hace aproximadamente una década, el paradigma T_H1/T_H2 de la inmunidad adaptativa se expandió a un tercer grupo de células T efectoras caracterizadas por la elevada expresión de IL-17.^{180,181} El fenotipo T_H17 es una población distinta a T_H1 y T_H2 , que se diferencia a partir de T_H0 por otros estímulos y expresa moléculas efectoras propias. Los determinantes más importantes para la diferenciación efectiva en T_H17 son la coestimulación por el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) y la citoquina proinflamatoria IL-6.^{182,183} (Figura 2)

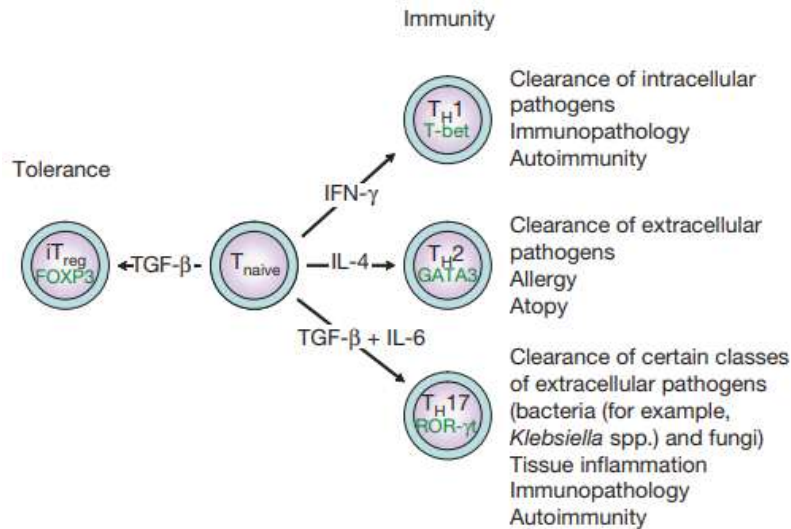


Figura 2. Esquema de la diferenciación de células inmunes efectoras. Tomado de Bettelli E. et al (2008).¹⁸²

La respuesta T_H17 mediada por IL-17 favorece la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, $TNF\alpha$ e IL-1 β , y quimiocinas como CXCL1 y CXCL10. Mediante estas señales, se reclutan neutrófilos y se estimulan metaloproteinasas (MMPs) para remodelar la matriz extracelular.^{182,184,185} T_H17 sería una respuesta transversal a situaciones que no son bien resueltas por las respuestas T_H1/T_H2 y que requieren que productos de inflamación sean retirados. Asimismo T_H17 coordinaría el tránsito de la inmunidad innata hacia la inmunidad adaptativa, y favorecería el reclutamiento de otras especies celulares a los sitios de infección luego del proceso inflamatorio.^{186,187}

Al tratarse de una respuesta inmune más transversal, el mantenimiento de T_H17 es necesario para el desarrollo de la inflamación crónica. En este contexto, la participación de IL-23 como estabilizador de células T_H17 es clave. Si bien IL-23 no tiene efectos significativos durante la diferenciación desde T_H0 , participaría como un agente que garantiza la expansión y estabilización del fenotipo T_H17 .¹⁸⁸ Estudios *in vitro* mostraron que el cultivo de células T_H17 por largos periodos requiere estimulación por IL-23.¹⁸⁹ Asimismo, cultivos

celulares estimulados con IL-6 y TGF- β no adquieren un fenotipo inflamatorio sin la presencia de IL-23.¹⁹⁰

La acción de IL-17 e IL-23 como agentes estimulador y estabilizador, respectivamente, ha sido descrita principalmente en procesos inflamatorios autoinmunes¹⁸⁹ y en menor medida en procesos inflamatorios de origen infeccioso por parásitos y bacterias¹⁹¹. Algunos estudios *in vivo* de modelos de neuroinflamación han indicado que la fuente principal de IL-17 son las especies celulares que se infiltran de la periferia atravesando la BHE, pero también células residentes del SNC, como microglia y astrocitos, producen y poseen receptores para esta citoquina.¹⁹²

Asimismo, estudios en modelos animales de artritis reumatoide han reportado efectos sinérgicos de la respuesta T_h1 y T_h17 en el reclutamiento y activación de macrófagos a las regiones con procesos inflamatorios en curso.¹⁹³

1.6.3 Linfocitos T reguladores (T_{reg}) como inhibidores inflamatorios

Por otro lado, las células T regulatorias (T_{reg}), caracterizadas por la expresión del factor de transcripción FoxP3, son también agentes importantes en el desarrollo y control de la neuroinflamación, y su expansión a regiones afectadas favorece el aclaramiento de elementos innecesarios mediante apoptosis.¹⁹⁴ Estudios *in vivo* han reportado también que las poblaciones T_{reg} permiten controlar, en sinergia con citoquinas inmunoregulatorias, los efectos deletéreos de la inflamación en el cerebro¹⁹⁵. Finalmente, las T_{reg} se han descrito como agentes protectores durante el desarrollo de enfermedades del SNC.¹⁹⁶

Si bien los efectos de la población T_{reg} en poblaciones celulares específicas pueden ser diversos, los efectos supresores de las células T_{reg} se han estudiado principalmente en el contexto de su capacidad para limitar *in vitro* las respuestas de las células T activadas. Las células T_{reg} pueden suprimir la actividad de las células asesinas naturales (NK) y los neutrófilos *in vitro*, y también limitan las respuestas inflamatorias crónicas *in vivo*.¹⁹⁷

II. Pregunta de Investigación

El papel de las respuestas T_{h17} y T_{reg} ha sido escasamente estudiado en la inflamación que causa síntomas en NCC, y menos aún en presencia de agentes antiinflamatorios, que son la norma en el manejo de la enfermedad. Con el modelo de infección natural en cerdos de NCC, usaremos el esquema de tratamiento con antihelmínticos (PZQ) y pretratamiento con dos agentes antiinflamatorios para evaluar el comportamiento de los procesos de apoptosis, y las poblaciones T_{h17} y T_{reg} en las células del granuloma cerebral formado en torno al parásito.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Demostrar la participación de respuestas T_{h17} y T_{reg} en la inflamación post tratamiento y evaluar el efecto del pretratamiento antiinflamatorio con ETN, comparado con el pretratamiento con DEX, sobre los mecanismos de control de la inflamación (apoptosis, citoquinas de las respuestas T_{h17} y T_{reg}) en el granuloma de NCC porcina.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la participación de la apoptosis en el desarrollo de la inflamación en el granuloma de NCC exacerbado por el tratamiento antihelmíntico.
- Detectar por inmunofluorescencia células apoptóticas y evaluar la expresión del mensajero de caspasa-3 por RT-qPCR en muestras cerebrales de NCC con tratamiento antihelmíntico y pretratamientos antiinflamatorios.
- Evaluar por RT-qPCR la expresión de los mensajeros asociados a las respuestas T_{h17} (IL-23 e IL-17) y T_{reg} (FoxP3) en el granuloma de NCC en respuesta al tratamiento antihelmíntico y antiinflamatorios.

IV. Materiales y Métodos

4.1 Diseño general

En uno de los trabajos previos de nuestro grupo se desarrolló un esquema de tratamiento con drogas antihelmínticas y antiinflamatorios en el modelo porcino de NCC.¹⁴⁷ Las muestras cerebrales obtenidas de cada grupo de tratamiento fueron procesadas para análisis de expresión génica e inmunofluorescencia. Los cambios en la abundancia relativa de transcritos de mediadores apoptóticos (Casp3), de citoquinas de la respuesta Th17 (IL-17 e IL-23) y del marcador de respuesta T_{reg} (FoxP3), fueron cuantificados por RT-qPCR.

Por otro lado las secciones histológicas obtenidas a partir de muestras cerebrales de cada grupo sirvieron para la detección *in situ* de células apoptóticas por el método TUNEL para su posterior cuantificación automatizada a partir de imágenes generadas por microscopía. En la figura 3 se muestra el esquema de los experimentos realizados en las muestras cerebrales empleadas en este trabajo, la aproximación técnica y el propósito para cada caso.

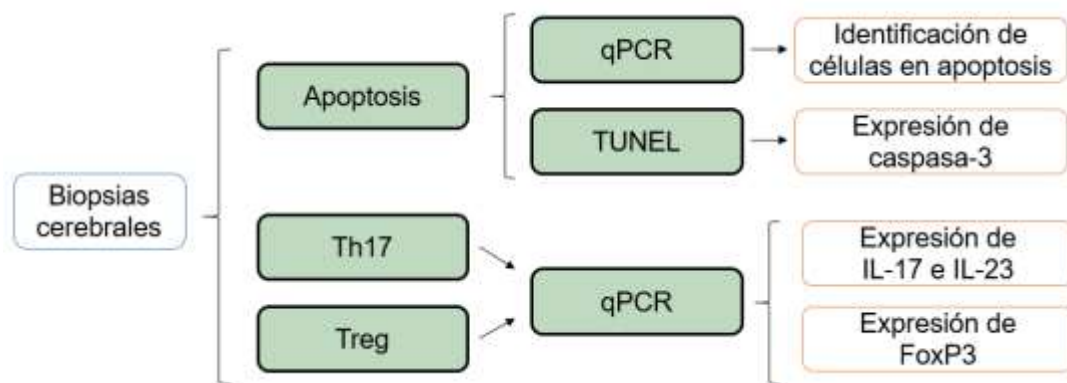


Figura 3. Flujograma del diseño experimental para cada objetivo.

4.2 Animales y consideraciones éticas

Para el presente estudio se utilizaron muestras obtenidas de 12 cerdos naturalmente infectados con NCC, seropositivos a ensayo por Western Blot. Las muestras de tejido cerebral, tanto para análisis histológico y molecular, provienen del proyecto "Efecto de tratamientos con un antihelmíntico y antiinflamatorios sobre la permeabilidad vascular en cerebro de cerdos naturalmente infectados con *Taenia solium*" (SIDISI 62392) realizado en el laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis, Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité Institucional de Ética para Investigación en Animales (CIEIA) de la

UPCH. Todos los procedimientos relacionados al mantenimiento de cerdos y su posterior sacrificio se hicieron bajo un protocolo aprobado por CIEIA.

4.3 Esquema de tratamiento y muestras cerebrales

Se utilizó un modelo de tratamiento experimental en cerdos naturalmente infectados por *T. solium*, diseñado en el laboratorio para estudiar la asociación entre la disrupción de la BHE y la inflamación en NCC, utilizando la extravasación del colorante Azul de Evans ⁷⁵. Los animales seleccionados fueron agrupados como cerdos que no recibieron tratamiento (UT; n=3), cerdos que recibieron una dosis única de 100 mg/kg de PZQ (día 0) por vía oral (PZQ, n=3) y cerdos que recibieron PZQ y un pretratamiento con 3 dosis de 0.2 mg/kg de DEX, en los días -1, +1 and +3 (DEX/P, n=3) ó 2 dosis de 25 mg/cerdo de ETN en los días -7 y 0 (ETN/P, n=3).

Al quinto día de tratamiento, se inyectó el colorante de Azul de Evans (AE) al 2% por vía intrarterial (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 con formalina helada al 10% (3.7% formaldehído en PBS, pH 7.2) con ayuda de una bomba peristáltica. El cerebro fue removido e inmediatamente seccionado y condicionado según el propósito.

Para la evaluación histológica, se colectaron muestras semicúbicas de cerebro de aproximadamente 1 cm de lado. Las muestras fueron incluidas en parafina y se realizaron cortes consecutivos de aproximadamente 4 µm con micrótopo, que fueron posteriormente fijados en láminas portaobjetos previamente tratadas con poli L-lisina (Sigma, St. Louis, MO). De manera paralela, las muestras destinadas al análisis de expresión de marcadores seleccionados se preservaron inmediatamente en solución caotrópica (RNA Later®, Qiagen) y se almacenaron a -70° C hasta el momento de la extracción de RNA.

4.4 Demostración *in situ* de apoptosis en el granuloma de NCC

4.4.1 Detección de células en apoptosis por inmunofluorescencia

La detección de células en apoptosis se realizó mediante el kit ApopTag® (Merck Millipore, USA) para la identificación *in situ* de apoptosis mediante el marcado de final de corte de dUTP de la terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL). Para ello las láminas con tejido fijado fueron desparafinadas a 56° C, inmersas en xilol y rehidratadas por baños sucesivos en un gradiente de etanol (desde absoluto hasta 70%) hasta agua destilada. Para la exposición de antígenos, las láminas fueron incubadas en proteinasa K 1X (20 µg/mL) a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación se realizaron lavados sucesivos con PBS a pH 7.2, para finalmente adicionar la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT) proporcionada en el kit, la cual se incubó a 37° C por 1 hora de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente se lavaron los remanentes con PBS pH 7.2 y se añadieron 20 µL del anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fluoresceína proporcionado en el kit para su incubación a temperatura ambiente por 30 minutos evitando en todo momento la exposición innecesaria a la luz. Finalmente, se lavaron los excedentes con PBS pH 7.2 y se agregó 20 µL de DAPI (1 µg/mL; Vector Laboratories, USA) a cada sección como contraste para el análisis en fluorescencia. La reactividad del ensayo se evaluó en el microscopio confocal LSM 880 Airyscan (Zeiss, Alemania) usando el láser de 488 nm para excitar el fluoróforo FITC incluido en el sistema y el láser 405 para identificar núcleos celulares marcados por DAPI. Las células TUNEL positivas mostraron una apariencia verde al observarse bajo estas condiciones. La estandarización de este método se realizó con tejido de ganglio de cerdo sano como control positivo. El anexo 2 muestra un esquema del principio de la técnica y las características de células apoptóticas observadas en el control positivo.

4.4.2 Evaluación de la antigüedad de las células de infiltrado inflamatorio y límites de la región de análisis

La administración del colorante AE durante la perfusión de los animales permitió calificar cualitativamente el estado de la BHE en el tejido pericístico del hospedero. Las células marcadas con EB se identificaron por auto fluorescencia y adquirieron una apariencia rojiza tras la excitación con el láser de 633 nm del microscopio confocal LSM 880 Airyscan (Zeiss, Alemania). Considerando que la administración del AE se realizó por vía periférica horas antes de la necropsia, las células marcadas con AE corresponden a las últimas células en infiltrarse al granuloma cerebral.

Finalmente, con el propósito de homogenizar la región de análisis en los cortes histológicos se consideraron para el análisis todas las células circunscritas dentro de la reacción inflamatoria o granuloma, la cual fue definida por la presencia de alguna célula marcada por AE. Un ejemplo de los límites de la región de análisis para una sección puede observarse en los paneles I y II de la figura 4.

4.4.3 Procesamiento de imágenes y conteo celular automatizado

La cuantificación de células positivas para cada de las imágenes generadas por microscopia confocal se realizó usando el software Image J® siguiendo un protocolo implementado y desarrollado en el laboratorio. Las imágenes digitales se convirtieron a sus equivalentes de 8 bits para obtener valores dicotómicos del contenido de cada pixel.

Considerando la presencia de algunos núcleos superpuestos se ejecutó el algoritmo de segmentación del paquete Fiji de Image J (*Fiji is Just Image J*) siguiendo el comando *Process > Binary > Watershed*. Finalmente, con la herramienta *Analyze Particles* se fijaron condiciones para excluir elementos que no reúnen las características morfológicas de una célula. Se establecieron parámetros basados en el tamaño (*Size*: 10-100 pixeles) y circularidad (*Circularity*: 0.80-1.00, donde 1 indica una circunferencia perfecta). Con estos dos criterios se logró contabilizar de manera automática elementos positivos que reúnan con los criterios morfológicos esperados para células del infiltrado inflamatorio. Como control de calidad para el reconocimiento automatizado de elementos se utilizó nuevamente las secciones histológicas de ganglio de cerdo sano marcadas por el kit de TUNEL (Anexo 2).

4.5 Análisis de la expresión de mensajeros apoptóticos y mensajeros de las poblaciones celulares T_h17 y T_{reg}

4.5.1 Extracción de RNA

El RNA se purificó a partir del tejido homogenizado en TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante y manteniendo las muestras a 4° C durante todo el proceso. La extracción incluyó una etapa de extracción con fenol (TRIzol®) y cloroformo para la formación de fases orgánica y acuosa respectivamente, la precipitación de la fase acuosa con isopropanol absoluto (0.5 mL de isopropanol por cada mL de TRIzol®) y el lavado del precipitado o pellet con etanol al 75% (1 mL de etanol al 75% por cada 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 evaluó 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 se almacenó a -80° C hasta su uso.

4.5.2 Generación de cDNA por transcripción reversa

Se generó cDNA de cada muestra a partir de 10 μL de RNA total (100ng/μL) mediante transcripción reversa con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche®, USA). Se consideró para cada reacción 2 μL de oligo dTs 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 enzima transcriptasa reversa (20 U/μL) para volumen final de 20 μL por reacción. Finalmente, el termociclador Hot Bonnet® PTC-150 (Mini Cyclyer™) fue usado para ejecutar un protocolo de 10 min a 25° C, 30 min a 55° C y 5 min a 85° C, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

4.5.3 PCR cuantitativo en tiempo real

El análisis de expresión se ejecutó 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 hidrolizable Taqman hidrolizable alcanzando un volumen final de 10 μL para cada reacción. El gen *h3f3a* que codifica para la histona 3A de *Sus scrofa* se utilizó como control endógeno de la expresión en base a su probada estabilidad en muestras cerebrales, la cual fue evaluada en un trabajo previo del laboratorio que condujo a su validación como gen normalizador.¹⁹⁸ Los niveles de expresión para cada marcador se analizaron como el antilogaritmo en base 2 del número de ciclo de cuantificación (Cq) corregido por el Cq de gen de control endógeno ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), que representa un aumento (o disminución) de la expresión respecto al gen de control.¹⁹⁹ Los detalles de las sondas dirigidas a los mensajeros de IL-17, IL-23, FoxP3 y caspasa-3, se describen en el anexo 2.

4.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos por el conteo automatizado de células y por los ensayos de expresión se evaluaron por estadística no paramétrica. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para grupos independientes, calculada con el software Prism (Graphpad® San Diego, CA). Las diferencias con valores p de <0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

V. Resultados

La información obtenida por qRT-PCR e IHC, de acuerdo al diseño (Figura 3) representa la primera descripción de la dinámica de eventos relacionados al aclaramiento celular en la neuropatología de NCC y sus alteraciones por el pre tratamiento con antiinflamatorios.

5.1 Distribución de la muestra

Para esta tesis se trabajó únicamente con muestras cerebrales con una alteración significativa de la BHE (quistes con cápsulas azules), pues esta condición es la que permite que poblaciones celulares del sistema periférico ingresen al SNC. Por otro lado, de acuerdo a trabajos previos de nuestro grupo, estas muestras permiten apreciar mucho mejor las diferencias en los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias e antiinflamatorias entre los grupos de tratamiento.^{62,76} Asimismo, después del tratamiento con PZQ, la proporción y el número de cápsulas con BHE intacta (quistes claros) se redujeron drásticamente en relación al grupo UT, lo que dio como resultado una variación inaceptable en los parámetros estudiados por lo que la inferencia estadística no es confiable o no es posible.¹⁴⁷

Tabla 1. Distribución del tamaño muestral de acuerdo al grupo de tratamiento.

Propósito	Tratamiento	Número de cerdos	Número de quistes*	Total
Análisis de expresión (RT-qPCR IL17, IL23, FoxP3 y Casp3)	UT	3	3	41
	PZQ	3	11	
	DEX/P	3	18	
	ETN/P	3	9	
Inmunofluorescencia (TUNEL)	UT	3	6	33
	PZQ	3	9	
	DEX/P	3	9	
	ETN/P	3	9	

* Para todos los análisis se consideraron solo quistes azules (BHE alterada).

Con estas consideraciones se seleccionaron 41 muestras cerebrales y 33 secciones histológicas para los ensayos de expresión e inmunofluorescencia, respectivamente. En la tabla 1 se detalla la distribución de las muestras evaluadas de acuerdo al grupo de tratamiento y al propósito.

5.2 El tratamiento antihelmíntico con PZQ incrementa el número de células apoptóticas y aumenta la expresión de caspasa 3 en el granuloma de NCC.

La evaluación de apoptosis por TUNEL se realizó en 33 secciones histológicas de cerdos tratados o no con PZQ y que recibieron pre tratamiento antiinflamatorio con DEX o ETN. La región de análisis se delimitó en la extensión del granuloma, la cual fue definida como el tejido del hospedero que rodea al quiste y con presencia de células AE⁺. Tanto las células TUNEL⁺ y AE⁺ fueron detectadas por microscopia de fluorescencia para la adquisición de imágenes. El conteo automatizado de células positivas se realizó considerando parámetros de tamaño y circularidad similares a los de una célula ideal.

Al comparar el grupo UT y PZQ se observó un gran aumento en el número de células TUNEL⁺. La figura 4 muestra fotos a diferentes aumentos de un quiste del grupo PZQ, en el que las células marcadas de verde son TUNEL⁺. Observaciones en distintas regiones del granuloma indican que la presencia de células en apoptosis es homogénea y constituyen una población abundante, especialmente en regiones cercanas al parásito (recuadro 4C). El conteo automatizado corrobora esta observación indicando un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de células TUNEL⁺ de 2.51% en UT a 63.71% en el grupo PZQ (Figura 5C, Tabla 2).

Asimismo, la expresión relativa del mRNA de caspasa 3, evaluada por qPCR a partir del RNA obtenido de 41 muestras cerebrales, comprobó lo observado por inmunofluorescencia. Los niveles de este transcrito se expresaron aproximadamente 60 veces más en el grupo PZQ en comparación a UT (Figuras 7A y 7B, Tabla 3).

En conjunto estas observaciones indican que el fenómeno de apoptosis es muy reducido durante el desarrollo del cisticerco viable en el parénquima cerebral, y que se incrementa en asociación con la patología inflamatoria de NCC.

5.3 Los pretratamientos antiinflamatorios con DEX y ETN reducen levemente la expresión de casp3 y la apoptosis inducidas por PZQ en el granuloma de NCC

El efecto de los agentes antiinflamatorios sobre la apoptosis inducida por PZQ se evaluó también por RT-qPCR e inmunofluorescencia. Para ello se compararon los niveles de expresión de los transcritos de casp3 y el número de células TUNEL⁺ en los grupos con pre tratamientos antiinflamatorios, DEX/P y ETN/P, contra el grupo PZQ. En ambos casos se encontró una leve disminución.

El pretratamiento DEX/P fue significativamente más efectivo ($p=0.0043$, Figura 5A y Tabla 2) disminuyendo aproximadamente en 5 órdenes los niveles de casp3 de PZQ (Figura 5B y Tabla 3). En contraste, a pesar de indicar una disminución en casi 3 órdenes con respecto

a PZQ (Figura 5B y Tabla 3), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo ETN/P con respecto a PZQ ($p=0.2771$, Figura 5B y Tabla 2).

Asimismo, la disminución en el número de células TUNEL⁺ en los grupos DEX/P y ETN/P es coherente con lo observado en los ensayos de RT-qPCR. Ambos antiinflamatorios mostraron una disminución con respecto a PZQ (Figura 5C y Tabla 2). Sin embargo, una vez más solo el pre tratamiento con DEX/P fue más efectivo en reducir el porcentaje de células TUNEL⁺ de 63.71% a 35.68% ($p=0.0188$). La reducción a 40.71% observada en el grupo ETN/P no fue estadísticamente significativa ($p=$, Figura 5C y Tabla 2).

Los resultados obtenidos sugieren que la depleción de la apoptosis parece ser más agresiva tras el pretratamiento con DEX. Por el contrario, lo observado en el grupo ETN/P sugiere que la terapia anti-TNF α preservaría mejor el fenómeno de apoptosis. El mantenimiento de la dinámica apoptótica podría ser un evento importante durante el aclaramiento celular en el granuloma de NCC. La evaluación de marcadores relacionados a poblaciones celulares que intervienen en el proceso de aclaramiento proporcionaría información complementaria a lo observado hasta aquí en términos de apoptosis neta.

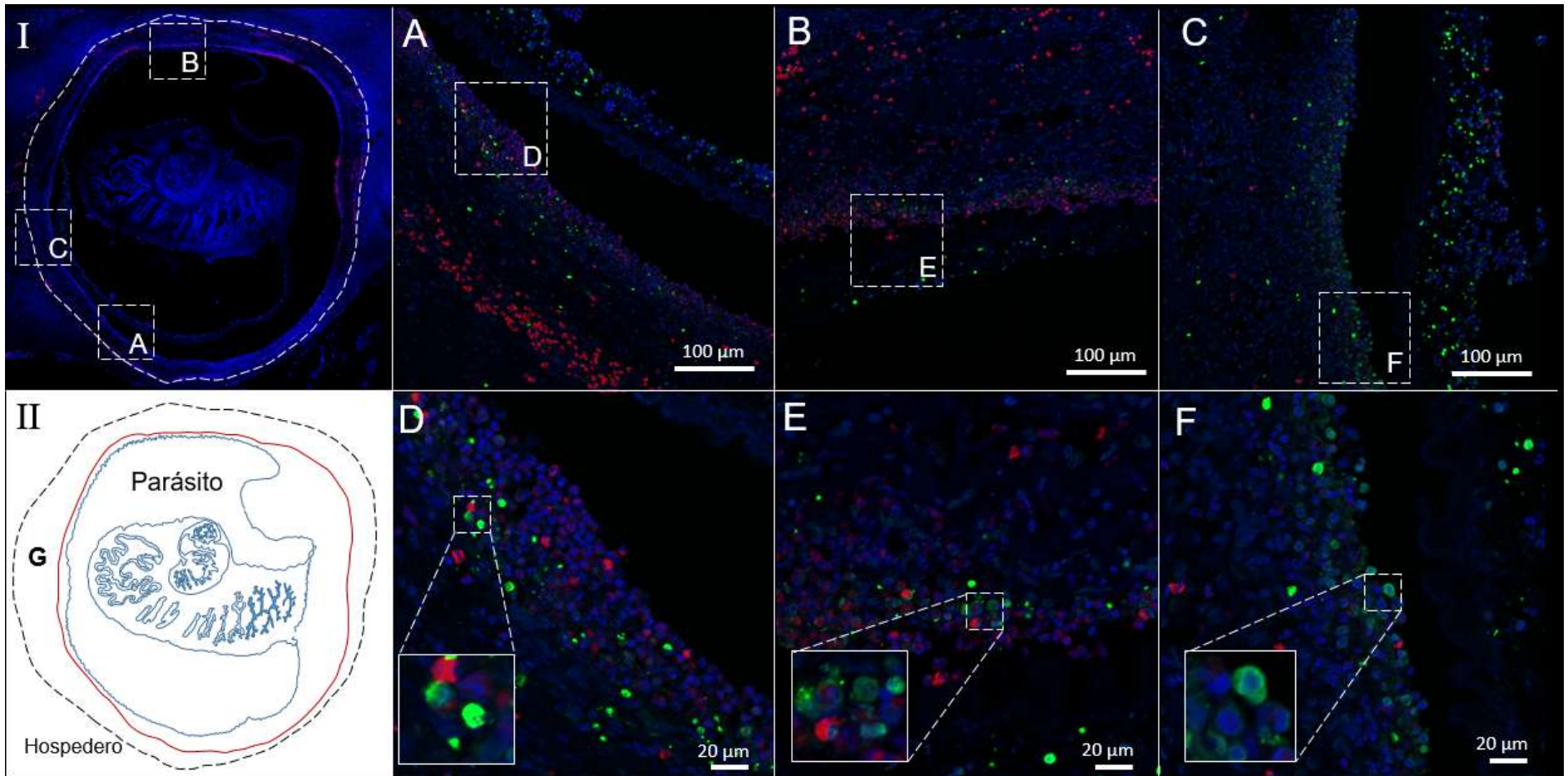


Figura 4. Células en apoptosis en el granuloma cerebral inducido por el tratamiento antihelmíntico con PZQ.

Las células en apoptosis fueron detectadas por el método de TUNEL en secciones cerebrales fotografiadas por microscopía confocal. La región del granuloma (G) fue definida en base al infiltrado de células marcadas por AE (rojo) presente en el tejido del hospedero que colinda al perímetro del parásito. Las células TUNEL⁺ (verde, FITC) presentes en esta región fueron consideradas para el conteo automatizado y la posterior comparación entre grupos de tratamiento. (I) La reconstrucción del parásito y el esquema de la región de análisis (II) se realizaron por fotografías sucesivas a un aumento de 20X.

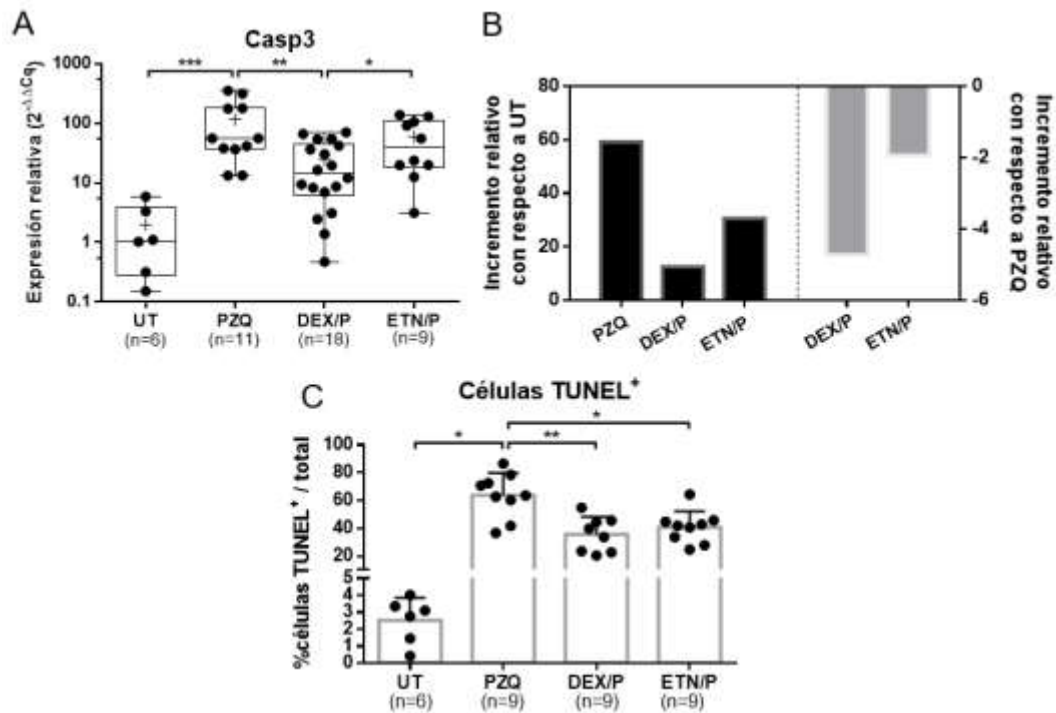


Figura 5. Evaluación de la apoptosis en el granuloma de NCC en respuesta al pre tratamiento con antiinflamatorios.

(A) Análisis de la expresión relativa RT-qPCR del mensajero de Casp3 con respecto a H3F3A como gen de referencia. Cada punto representa una cápsula (tejido pericístico del hospedero) evaluada por duplicado. (B) Incremento relativo de la expresión de casp3 con respecto a los niveles obtenidos en grupos controles. Los valores se muestran como la razón de la expresión con respecto a UT (barras negras) ó como la inversa de la razón con respecto a PZQ (barras grises). (C) Conteo de células marcadas por TUNEL en secciones histológicas de muestras cerebrales tratadas con agentes antihelmínticos. Cada punto representa el porcentaje de células apoptóticas con respecto al total de células presentes en el granuloma de un quiste. Las diferencia inter grupales se realizaron con el test U de Mann-Whitney U, los asteriscos representan el nivel de significancia: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$.

5.4 Mensajeros de las respuestas T_{h17} y T_{reg} disminuyen en respuesta al pretratamiento antiinflamatorio.

Las poblaciones celulares T_{h17} y T_{reg} participan activamente en el proceso de aclaramiento celular en la respuesta inmune periférica y en el SNC. Por consiguiente, la marcada respuesta inflamatoria, característica de NCC, representa un buen escenario para explorar la participación de las poblaciones T_{h17} y T_{reg} en la patología de esta enfermedad y analizar cómo la terapia antiinflamatoria podría alterarlas.

Se evaluó por RT-qPCR la expresión relativa de los mensajeros de las citoquinas IL-17 e IL-23 que corresponden a la respuesta T_{h17} , y del factor de transcripción FoxP3 característico de la respuesta T_{reg} . A primera vista, se puede apreciar un incremento

significativo de estos tres elementos en el grupo PZQ con respecto a los valores basales del grupo sin tratamiento UT (Figura 6). En el caso específico de IL-17 e IL-23, los niveles de estas citoquinas en PZQ con respecto a UT aumentan aproximadamente en 15 ($p < 0.0001$) y 19 veces ($p = 0.0002$), respectivamente. La expresión del factor de transcripción FoxP3 sigue la misma tendencia incrementándose hasta 91 veces más en PZQ ($p = 0.0002$) con respecto a UT (Figuras 6A-D, Tablas 2 y 3). Estos resultados indican que los componentes que identifican a las respuestas T_{h17} y T_{reg} se encuentran activamente expresados durante la patología de NCC.

Por otro lado, el efecto del pretratamiento con antiinflamatorios resultó en una disminución de la expresión de los elementos de las respuestas T_{h17} y T_{reg} , siendo DEX/P el que produjo una disminución más significativa. Los niveles de IL-17 e IL-23 en DEX/P con respecto de PZQ disminuyeron aproximadamente en 13 ($p < 0.0001$) y 4 veces ($p = 0.0031$), respectivamente. De manera similar, la expresión de FoxP3 se redujo 7 veces en DEX/P ($p = 0.0002$).

Por el contrario, la comparación del grupo ETN/P con PZQ solo mostró una leve disminución en factor de 2 tanto para IL-17 e IL-23 sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la expresión de FoxP3 sí fue significativamente menor en ETN/P ($p = 0.0356$), reduciéndose hasta 7 veces menos con respecto a PZQ (Figuras 6B, 6D, 6F; Tablas 2 y 3).

Al igual que lo observado con los marcadores apoptóticos, la terapia anti-TNF α preserva mejor la activación (IL-17) y mantenimiento (IL-23) de la respuesta T_{h17} , así como el desarrollo de la respuesta T_{reg} en el granuloma de NCC.

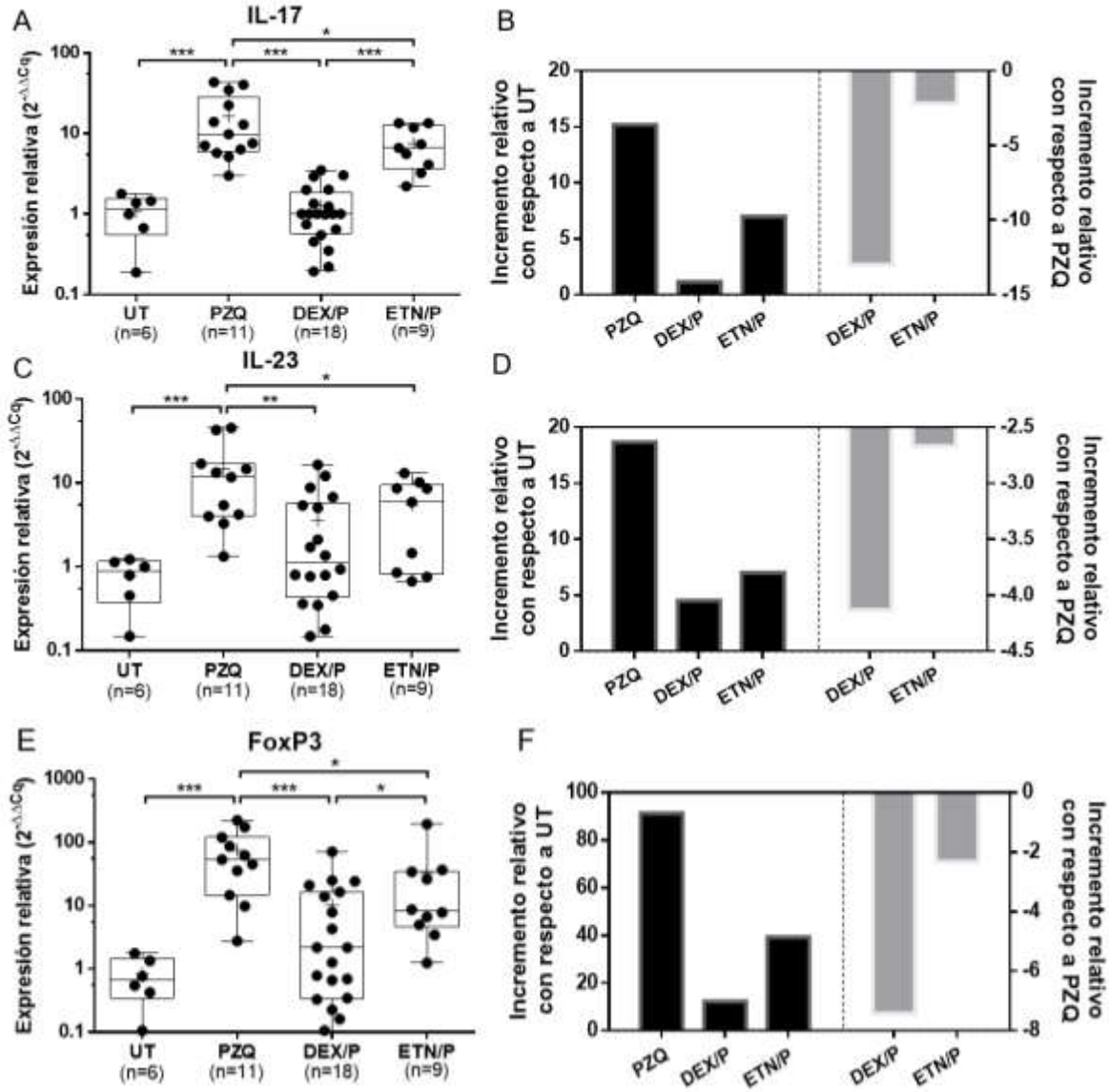


Figura 6. Análisis de expresión relativa de mensajeros asociados a las respuestas T_{H17} y T_{reg} en el granuloma de NCC. Se evaluaron los niveles de expresión de las citoquinas (A) IL-17 e (C) IL-23 asociadas a la respuesta T_{H17} , y del (E) factor de transcripción FoxP3 característico de la respuesta T_{reg} . Cada punto representa una cápsula (tejido pericístico del hospedero) evaluada por duplicado. De acuerdo al test U de Mann-Whitney U, los asteriscos representan el nivel de significancia: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$. (B, D, F) Con la finalidad de apreciar mejor las variaciones en los niveles de expresión de cada mensajero, se muestran los valores como la razón de la expresión de cada grupo con respecto al grupo UT (barras negras) ó la inversa de la expresión con respecto a PZQ (barras grises).

Tabla 2. Comparación entre grupos en ensayos de expresión génica y conteo de células.

Ensayo	Condiciones de Tratamiento (n) media, mediana				Test U Mann Whitney (p value)			
	UT	PZQ	DEX/P	ETN/P	UT vs PZQ	PZQ vs DEX/P	PZQ vs ETN/P	DEX/P vs ETN/P
TUNEL	(6) 2.5196, 2.9355	(9) 63.7142, 63.6711	(9) 35.6842, 36.8105	(9) 40.7159, 41.8940	0.0004	0.0037	0.0188	0.4135
Casp3	(6) 1.9671, 1.0615	(11) 116.4949, 55.9409	(18) 24.6436, 14.2181	(9) 60.2199, 39.7684	0.0002	0.0043	0.2771	0.0353
IL-17	(6) 1.0766, 1.1812	(11) 16.3464, 9.7851	(18) 1.2595, 1.0000	(9) 7.5321, 6.6345	<0.0001	<0.0001	0.1415	<0.0001
IL-23	(6) 0.7978, 0.9007	(11) 14.9058, 11.8146	(18) 3.6105, 1.1547	(9) 5.5896, 5.9278	0.0002	0.0031	0.0941	0.2312
FoxP3	(6) 0.8252, 0.6557	(11) 75.2760, 53.4147	(18) 10.1410, 2.1797	(9) 32.4496, 8.2298	0.0002	0.0002	0.0356	0.0342

Se exponen el tamaño de muestra (n) y los estadísticos resumen (media, mediana) de cada grupo y el valor de p obtenido por el análisis estadístico de las comparaciones intergrupales.

Tabla 3. Resumen del incremento realtivo (fold) de los ensayos de expresión génica.

Ensayo	Incremento relativo (<i>fold</i>)				
	vs UT			vs PZQ $\left(-\frac{1}{x}\right)$	
	PZQ	DEX/P	ETN/P	DEX/P	ETN/P
Casp3	59.2216	12.5278	30.6135	-4.7271	-1.9344
IL-17	15.1833	1.1698	6.9961	-12.9784	-2.1702
IL-23	18.6836	4.5255	7.0062	-4.1284	-2.6667
FoxP3	91.2215	12.2891	39.3233	-7.4229	-2.3197

Para interpretar mejor las variaciones de la expresión relativa de cada marcador, se muestra el incremento como una razón con respecto al valor obtenido en UT y la disminución como la inversa de la razón obtenida con respecto a PZQ.

VI. Discusión

La inflamación cerebral es la fuente más reconocida de síntomas en NCC, y los muchos componentes que afectan la respuesta al tratamiento, así como al acompañamiento terapéutico con antiinflamatorios, no se han explorado sistemáticamente. Este trabajo tuvo como finalidad explorar la contribución del fenómeno de apoptosis y las respuestas inmunes T_{h17} y T_{reg} , eventos asociados al proceso de aclaramiento celular, en la patología de NCC, y estudiar sus alteraciones en respuesta a la terapia antiinflamatoria.

Con ayuda de un esquema de tratamiento con PZQ desarrollado en nuestro laboratorio para el modelo porcino de NCC, es posible exacerbar la respuesta inmune para estudiar la progresión de eventos y moléculas de interés que ocurren durante la fase clínica de la enfermedad.^{62,200} Asimismo, este modelo ha permitido estudiar también el efecto de pre tratamiento con agentes antiinflamatorios –como DEX y ETN– para el control de la inflamación en NCC.¹⁴⁷ El uso de la tinción AE, en el caso de este trabajo permitió seleccionar los granulomas con infiltrado de células periféricas; las determinaciones de RT-qPCR e IHC se hicieron únicamente en tejidos teñidos de azul por evidenciar macroscópicamente la disrupción de la BHE y la consiguiente infiltración.

Nuestros resultados indicaron, en primer lugar, que los niveles de apoptosis y de las respuestas T_{h17} y T_{reg} aumentaron tras la administración de PZQ. Esto concuerda con las observaciones en estudios clínicos en pacientes con NCC y modelos animales donde se ha estudiado la contribución periférica y local de estas poblaciones celulares (ver secciones 6.2 y 6.3).

Por otro lado, el pre tratamiento con antiinflamatorios demostró que DEX redujo significativamente estos procesos en comparación con la acción de ETN, que los redujo solo levemente. La discusión se centra en contrastar los cambios de los niveles de expresión de marcadores de las respuestas T_{h17} y T_{reg} y la proporción de células en apoptosis reportados en este trabajo y explicar el papel que podrían cumplir estos eventos en la neuropatología de NCC.

6.1 Apoptosis en NCC: mecanismo de control intrínseco de la inflamación.

La muerte celular programada se ha documentado ampliamente como una estrategia sistémica para resolver la inflamación, limitando la progresión y los efectos paracrinos de células inmunes activadas durante una lesión.²⁰¹

Pocos reportes exploran el papel de la apoptosis en la reacción inflamatoria asociada a cisticercos de *T. solium*. En cerdos con infección natural, un estudio con cisticercos musculares identificó células apoptóticas en la reacción inflamatoria asociada al parásito, ²⁰² mientras un trabajo independiente, con otro grupo de animales, corroboró la presencia de células TUNEL⁺ en cortes histológicos del granuloma cerebral. ²⁰³ Sin embargo, ambos trabajos fueron realizados en cerdos sin ningún tratamiento, por lo que la discusión se limitó a las estrategias del parásito para evadir la respuesta inmune durante la fase asintomática de la enfermedad, entre estas, la apoptosis de linfocitos inducidos por elementos secretados por el cisticerco ²⁰⁴

Finalmente, un estudio clínico en pacientes con diferentes formas activas de NCC reveló niveles elevados del ligando apoptótico Fas en el líquido cefalorraquídeo de individuos con crisis epilépticas, ²⁰⁵ es decir con NCC sintomática, la cual depende de la reacción inflamatoria asociada a los parásitos. ²⁰⁶ Esta observación es congruente con lo reportado en este trabajo, donde la apoptosis –en términos de la expresión de casp3 y el número de células TUNEL⁺– se incrementa significativamente con la administración de PZQ (Figuras 4 y 5).

Si bien el diseño experimental de este trabajo no permite discutir los tipos celulares que corresponden a las células TUNEL⁺ detectadas en el granuloma, entre las poblaciones celulares que son reclutadas, los granulocitos –como los neutrófilos, basófilos y eosinófilos– son por convención los más abundantes y contribuyen significativamente en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. ²⁰⁷

El papel de la apoptosis en la patología de NCC no se ha explorado, pero su presencia significativa en el granuloma que se aprecia en la figura 4, correspondiente al grupo PZQ, muestra que este proceso (células TUNEL⁺, marca verde) es parte de la reacción a la inflamación exacerbada por el antihelmíntico (células AE⁺, marca roja). La exploración de otros eventos implicados en la homeostasis y el control de la reacción inflamatoria podría complementar esta primera observación.

6.2 Participación de citoquinas Th17 en NCC: algo más que moléculas proinflamatorias.

El eje IL-17/IL-23 es importante para la amplificación y mantenimiento de la respuesta Th17, respectivamente. La participación de estas citoquinas en la respuesta inmune de NCC se ha explorado en algunos estudios clínicos (ver más abajo). Sin embargo, solo un trabajo realizado en un modelo murino de NCC generado por inoculación cerebral de cisticercos de *T. crassiceps* describió el perfil proinflamatorio mixto de Th1 y Th17, caracterizado por los niveles elevados IL-17 en el sobrenadante de cerebros homogenizados, durante la fase aguda de la infección. ²⁰⁸

En contraste, los estudios clínicos en pacientes con variantes de NCC solo discuten la contribución independiente de IL-17 o IL-23. En uno de ellos se comparó, entre otras moléculas, la producción *in vitro* de IL-17 en células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes con NCC parenquimal y subaracnoidea. Si bien no se encontraron diferencias entre estos grupos y solo se consideraron pacientes sin tratamiento antihelmíntico, la cantidad de IL-17 soluble fue detectable y similar a otras citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-6.²⁰⁹ En otro trabajo realizado también en células mononucleares de individuos con NCC sintomática y asintomática, se observó que los niveles de IL-17 e IL-23 fueron significativamente mayores en los casos sintomáticos y estuvieron acompañados del incremento de citoquinas proinflamatorias como INF γ y TNF α .²¹⁰

La asociación entre la inflamación local y las citoquinas IL-17 e IL-23 de estos reportes es congruente con los presentes resultados en tejido parenquimal, donde los transcritos de IL-17 e IL-23 se incrementan significativamente tras 5 días de haber inducido la inflamación local con PZQ (Figura 8A-D, Tablas 2 y 3). Si bien esta observación es muy similar a la reportada en otras citoquinas proinflamatorias descritas en trabajos previos de nuestro grupo, es probable también que los roles de IL-17 e IL-23 en NCC no estén exclusivamente limitados a la progresión de la inflamación, sobre todo si consideramos que en esta enfermedad existen mediadores proinflamatorios más potentes, como TNF α , IL-6 e INF γ .⁶²

Entre otras funciones de T_h17, se ha reportado *in vitro* la capacidad de IL-17 de reclutar neutrófilos mediante la estimulación de la expresión de selectinas, integrinas, quimiocinas, además de potenciar el efecto proinflamatorio de TNF α .²¹¹

Asimismo, en el contexto de la eferocitosis de neutrófilos apoptóticos mediada por macrófagos, hay indicios sólidos de la existencia de un circuito de retroalimentación que controla la homeostasis de estas células a través de los efectos de IL-17 e IL-23. Estudios *in vivo* han demostrado que la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos –mediada por macrófagos y células dendríticas– limita la producción de IL-23 en estas células.²¹² Esta citoquina actúa en linfocitos Th17 y linfocitos NK para producir IL-17, la cual favorece a su vez la expresión de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) que deriva en la granulopoyesis.^{213,214}

6.3 Linfocitos T_{reg} en el control de la inflamación en NCC

Las posibles contribuciones de las T_{reg} en el control de la neuroinflamación se han explorado en tres estudios clínicos con pacientes con NCC. En el primero se cuantificó por citometría de flujo la población T_{reg} en células mononucleares de sangre periférica y en líquido

cefalorraquídeo de pacientes con NCC y controles sanos, encontrando niveles elevados en los individuos con NCC. Este reporte, del 2012, describió por primera vez la participación de T_{reg} locales y sistémicos en la patología de NCC humana.²¹⁵ En un trabajo similar, se estudiaron los mecanismos de acción de las células T_{reg} para controlar la respuesta inmune, encontrando asociaciones entre el aumento de T_{reg} y el incremento de IL-10 presentes en sangre periférica y en líquido raquídeo de pacientes con NCC.²¹⁶ Finalmente, un análisis *ex vivo* en los sobrenadantes de células mononucleadas de pacientes con NCC no encontró diferencias en los niveles de T_{reg} con respecto a controles sanos.²⁰⁹

Por otro lado, a diferencia de T_{h17} , la participación de T_{reg} sí ha sido explorada en un trabajo de nuestro grupo en el cual se empleó NCC porcina con inflamación inducida (y exacerbada) por PZQ. En ese estudio se observó mayor expresión del mensajero de FoxP3 tras cinco días del tratamiento con dosis única de PZQ en comparación con el día 2 después del tratamiento y controles no tratados.⁶² Sin embargo, no se había incluido un pretratamiento con antiinflamatorios.

En este trabajo, los antiinflamatorios DEX y ETN disminuyeron la expresión del marcador FoxP3 (Figura 6E y 6F). Al contrario, estudios *in vitro* para explorar los efectos de corticoesteroides en células inmunes, muestran que el tratamiento con DEX incrementa la expresión de FoxP3 en linfocitos humanos, aunque este aumento fue notorio recién 20 días después de agregar DEX al cultivo²¹⁷. Es preciso mencionar que esa aproximación no contempla un estímulo inflamatorio –como el parásito o el tratamiento con PZQ–, por la respuesta a DEX podría no ser del todo informativa. Asimismo, nuestro esquema de tratamiento no nos permite observar qué ocurre con la respuesta T_{reg} más allá de seis días después de iniciar la administración con DEX, por lo que es probable que esta respuesta participe más activamente en la terapia prolongada con corticoesteroides.

6.4 La terapia antiinflamatoria altera la inducción y mantenimiento de T_{h17} y la activación de T_{reg}

El bloqueo de la vía de TNF α es una estrategia interesante para evaluar la importancia de esta citoquina en la inmunopatología de NCC, además de representar una herramienta para el diseño de nuevos esquemas de terapia antiinflamatoria para controlar las complicaciones de la administración de la droga antihelmíntica en el SNC.

Nuestro grupo reportó recientemente los efectos de DEX y ETN en la supresión de la inflamación pericística en el granuloma de NCC exacerbado por PZQ y la disminución, en el tejido cerebral,

de la expresión de mediadores inflamatorios, inmunoregulatorios, vasculares y de remodelamiento de la matriz extracelular ¹⁶⁴. A pesar de que estas observaciones componen una descripción bastante detallada del efecto de antiinflamatorios sobre los procesos asociados a las respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2, cuya participación en la enfermedad se ha visto en modelo murino ²¹⁸ y pacientes ²¹⁹, no se exploró la participación de las respuestas Th17 y T_{reg}, que también son importantes mediadores en la inflamación del SNC, tal como se ha reportado en esclerosis múltiple y el mal de Alzheimer ²²⁰. El presente trabajo incluye la determinación de marcadores de ambas respuestas en NCC porcina exacerbada por PZQ y con pretratamiento antiinflamatorio con DEX y ETN, y una demostración del papel de la apoptosis en estos escenarios.

Los resultados muestran un incremento en la expresión de IL-17 en el grupo que solamente recibió PZQ en relación al grupo no tratado. Dado que TNF α es un elemento crítico en el desarrollo de la neuroinflamación y que posee efectos sinérgicos con IL-17, era de esperarse que el estímulo inflamatorio generado por la administración de PZQ también produzca también un incremento significativo en las citoquinas de la respuesta Th17 que se presentan en nuestros resultados (Figura 6A-D).

Asimismo, el efecto antiinflamatorio de DEX y ETN sobre citoquinas proinflamatorias ¹⁴⁷ y la reportada relación de estos elementos con las respuestas Th17 y T_{reg} anticipaba una reducción en la expresión de los marcadores empleados en este trabajo para describir la progresión de estas poblaciones (Figura 6E y 6F).

Asimismo, en modelos *in vivo* para el estudio de enfermedades autoinmunes, la expresión de IL-17 disminuye tras la administración de DEX, probablemente por la transrepresión vía la inhibición del factor de transcripción ROR γ , crítico para la diferenciación a Th17 ²²¹. El efecto represor de DEX sobre la respuesta Th17 puede observarse también en nuestros resultados, donde el pretratamiento con este glucocorticoide generó una gran disminución en los mensajeros de IL-17 e IL-23, significativamente mayor que la disminución por ETN en el primer caso.

Finalmente, se ha reportado también que las respuestas Th17 y T_{reg} participan en la inducción de apoptosis: Estudios *in vitro* sugieren que microglías estimuladas por IL17 confieren propiedades citotóxicas que contribuyen a la remoción celular y al daño neuronal ²²². Precisamente, la sinergia entre TNF α y IL-17 se ha señalado como un potente inductor de apoptosis vía la generación de radicales libres de oxígeno (ROS), disfunción mitocondrial y arresto del ciclo celular ²²³. En esta tesis, los ensayos de expresión de caspasa-3 y el conteo de células que fueron marcadas por TUNEL indicaron que ambos antiinflamatorios redujeron moderadamente la apoptosis en el

granuloma de NCC, quizá como reflejo de la disminución de IL17, aunque no deben descontarse otros factores que desencadenan apoptosis en el cerebro.

Se conoce la capacidad de los glucocorticoides para resolver procesos inflamatorios modulando la expresión de citoquinas proinflamatorias o limitando la proliferación celular de especies inmunes²²⁴. Sobre todo, uno de los mecanismos indirectos de acción de estos fármacos es inducir apoptosis, aunque la ruta no se ha definido a nivel subcelular²²⁵. Se ha observado en estudios *in vitro* que la inducción de apoptosis por DEX se produciría por la represión de elementos de unión al DNA que favorecen la expresión de genes de supervivencia²²⁶ y por la activación de la vía intrínseca de las caspasas²²⁷.

Algunos estudios sobre el efecto de la terapia anti-TNF α para modelos de inflamación crónica demuestran la inducción de apoptosis en poblaciones celulares específicas como macrófagos, mas no en linfocitos²²⁸. Esta característica en el mecanismo de acción de los biosimilares (como ETN) podría explicar la relativa homogeneidad en los niveles de apoptosis observados para los grupos DEX/P y ETN/P. De todas maneras, el efecto proapoptótico de ambos antiinflamatorios posiblemente tenga mecanismos y blancos celulares diferentes. Dado que la composición celular del granuloma de NCC es muy diversa, sería difícil establecer diferencias sobre la inducción de apoptosis, ya que la abundancia relativa de poblaciones específicas puede variar mucho de acuerdo a la localización del parásito en el cerebro y a la intensidad de la respuesta inmune del hospedero.

Son necesarias más evaluaciones que permitan describir de forma más detallada la susceptibilidad de poblaciones celulares específicas a la apoptosis inducida por DEX o ETN. Asimismo esquemas de tratamiento más prolongados permitirían describir la participación de T_h17 y T_{reg} en la inflamación crónica de NCC y cómo estas poblaciones responden a la administración prolongada de agentes antiinflamatorios.

VII. Conclusiones

- El aumento de las citoquinas IL-17 e IL-23 y el factor de transcripción FoxP3 en el grupo tratado con PZQ, indican que las poblaciones T_h17 y T_{reg}, ambas producidas periféricamente, participan activamente en el desarrollo del granuloma de NCC.
- El pretratamiento antiinflamatorio con DEX produce una disminución muy marcada de las poblaciones T_h17 y T_{reg}, observada como una disminución en la expresión de las citoquinas IL-17, IL-23 y el marcador FoxP3. Por el contrario la terapia anti-TNF α con ETN permite conservar mejor las respuestas T_h17 y T_{reg} en el granuloma de NCC.
-
- La observación de células apoptóticas y el aumento en la expresión del transcrito de caspasa-3 en el granuloma de NCC, sugiere que este fenómeno participaría también en el desarrollo del proceso inflamatorio como un mecanismo de control.
- Ambos pretratamientos antiinflamatorios redujeron levemente la apoptosis en comparación con el grupo PZQ. La gran similitud entre los grupos DEX y ETN sugiere la existencia de mecanismos distintos a los inducidos por TNF α que favorecen la progresión de la apoptosis.

VIII. Limitaciones y Recomendaciones

El modelo porcino desarrollado por nuestro grupo ha proporcionado información importante sobre los eventos que toman lugar en la inflamación aguda que es responsable principal de las manifestaciones clínicas en NCC. Sin embargo, el esquema de tratamiento con antihelmínticos y antiinflamatorios solo permite describir los acontecimientos durante los cinco días posteriores a la administración de los fármacos. La observación en cohortes con intervalos de tiempo más grandes que permitan observar el mantenimiento o incluso la eventual resolución de la inflamación proporcionaría material importante para elaborar nuevas hipótesis y definir rutas en el progreso de la inflamación cerebral por NCC, potencialmente extrapolables a otras enfermedades del SNC.

Por otro lado, el sistema para detectar células en apoptosis (TUNEL⁺) permitió elaborar conjeturas sobre el aumento o disminución absoluto de la apoptosis en el granuloma de NCC en los distintos grupos de tratamiento. Sin embargo, esta aproximación no permite la identificación morfológica de las poblaciones celulares implicadas. Ensayos complementarios con marcadores específicos de poblaciones celulares potencialmente implicadas proporcionarían información importante sobre la composición de la población en apoptosis.

Los ensayos de expresión de RT-PCR de las citoquinas T_h17 (IL-17 e IL-23) aportan información sobre el desarrollo de esta respuesta a nivel transcripcional. Sin embargo, no fue posible

complementar estas observaciones con la detección de las proteínas a nivel celular, dado que el fenotipo de superficie de T_{h17} es bastante inespecífico y requiere la combinación de varios marcadores para su identificación por aproximaciones más sofisticadas como citometría de flujo. Una alternativa para resolver esta limitación sería la evaluación por inmunofluorescencia de la distribución de IL-17 e IL-23 en el granuloma. También la detección de células T_{reg} por su fenotipo de superficie requiere la combinación de varios marcadores. El marcaje con anticuerpos dirigidos al factor de transcripción FoxP3 podría complementar bien lo observado en los ensayos de RT-qPCR. Sin embargo, la distribución nuclear de FoxP3 dificulta su detección por sistemas convencionales de inmunofluorescencia.

Finalmente, en uno de los trabajos recientes de nuestro grupo se discutió la relativa resistencia de cerdos a los efectos inmunosupresores de corticoesteroides.^{147,229} Es posible que las dosis administradas en el esquema de tratamiento, intencionalmente baja para evitar otras infecciones durante el periodo de estudio, no permitieran observar la magnitud de lo que representa la terapia antiinflamatoria en humanos, sin embargo ha sido suficiente para encontrar diferencias significativas para los eventos descritos en este trabajo.

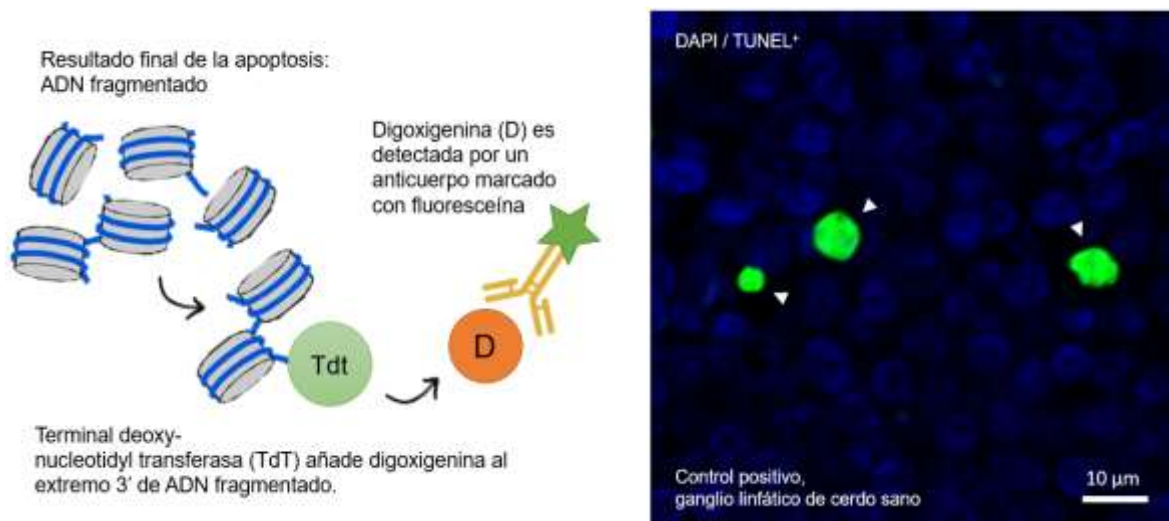
IX. Anexos

Anexo 1. Detalle de la función biológica de los miembros de la superfamilia TNF y sus receptores.

Nombre	Símbolo	Gen	Receptor(es)	Expresión celular y función en la respuesta inmune	Referencias
Linfotoxina alfa	TNF β , TNFSF1B	<i>lta</i>	TNFR1, TNFR2	Células NK, linfocitos B y T, y células endoteliales. Inducción de inflamación, inducción tumorigénesis, respuesta antiviral y antibacteriana y, desarrollo y mantenimiento de órganos linfoides.	92,230–233
Factor de necrosis tumoral	TNF α , TNFSF1A	<i>Tnf</i>	TNFR1, TNFR2	Macrófagos (microglías), astrocitos, células NK, linfocitos B y T, neuronas y células endoteliales. Regulación de la diferenciación y proliferación de células inmunes, inducción de la inflamación y apoptosis, inhibición de la tumorigénesis e inhibición de la replicación viral.	78,92,115,118,234–237
Linfotoxina beta	TNF γ	<i>ltb</i>	LT- β R	Células NK y linfocitos T CD4+ y CD8+ activados y células dendríticas. Inducción de la inflamación y respuesta antiviral, desarrollo de órganos linfoides y participación en tumorigénesis.	233,238
OX40 ligando	OX40L, CD252, Gp34, CD134L	<i>Tnfrsf4</i>	CD134	Neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B y T, células endoteliales y células musculares lisas. Activación y proliferación de linfocitos T.	239,240
CD40 ligando	CD40, CD154, TRAP, Gp39, T-BAM	<i>Cd40lg</i>	CD40, p50	Células NK, linfocitos T CD4+ activados, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células del epitelio tímico, células Reed-Sternberg. Regulación de la respuesta inmune adaptativa mediante activación de células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos, microglías, linfocitos B).	99,241–244
Fas ligando	FasL, CD178, APTL, CD95L, gp39	<i>Faslg</i>	FasR, CD95, Apo1, DR2	Esplenocitos activados, timocitos, células epiteliales, hepatocitos, linfocitos maduros/activados, células NK. Regulación de la homeostasis de células T e inducción de apoptosis.	99,243,245–248
CD27 ligando	CD27L, CD70	<i>Cd70</i>	CD27	Precursores hematopoyéticos, linfocitos B y T CD4+ y CD8+, mastocitos, células epiteliales y células musculares lisas. Homeostasis de células T y regulación de la activación de células B.	97,249–251
CD30 ligando	CD30L, CD153	<i>Tnfrsf8</i>	CD30	Inducción de apoptosis de linfocitos B y T, inducción de inflamación, regulación de autoinmunidad.	252–254
CD137 ligando	CD137L, 4-1 BBL	<i>Tnfrsf9</i>	CD137	Linfocitos B, macrófagos, mastocitos, neutrófilos y células dendríticas. Activación de células presentadoras de antígeno, inducción de inflamación.	239,255–257
Ligando de inducción de	TRAIL, CD253, APO-2L	<i>Tnfrsf10</i>	TRAILR1, DR4, Apo2,	Células dendríticas, células NK y linfocitos T. Inhibición de tumorigénesis e inducción de apoptosis	78,119,258

apoptosis relacionado a TNF			DR5, OPG, DcR1, DcR2		
Ligando del receptor activador de NF-κB	RANKL, CD254, OPGL, TRANCE, ODF	<i>Tnfsf11</i>	RANK, TRANCER	Osteoclastos, osteoblastos, células T activadas, células del timo y nódulos linfoides. Desarrollo y expansión de tejidos, regeneración y remodelamiento de la matriz ósea, maduración de las células dendríticas.	97,259,260
Ligando de inducción débil de apoptosis relacionado a TNF	TWEAK, APO-3L, DR3L	<i>Tnfsf12</i>	TWEAKR, FN14	Monocitos, células endoteliales y fibroblastos. Regulación y desarrollo de angiogénesis, inducción de apoptosis.	78,261-264
Ligando inductor de proliferación	APRIL, CD256, TALL-2, TRDL1	<i>Tnfsf13</i>	BCMA, TACI	Macrófagos, células B, células adrenales, hepatocitos, células epiteliales. Desarrollo, proliferación y maduración de linfocitos B, y mantenimiento de células B efectoras.	265-267
Factor activador de la célula B	BAFF, CD257, BLyS, TALL-1, TNFSF20	<i>Tnfsf13b</i>	TACI, BAFFR	Precursores linfoides, linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas, timocitos. Estimulación y proliferación de linfocitos B.	266,268,269
Ligando mediador de entrada de herpes virus	LIGHT, HVEM, LT-γ, CD258	<i>Tnfsf14</i>	LIGTHR, HVEM, LT-βR	Linfocitos B y T, granulocitos, monocitos, células dendríticas, precursores linfoides. Proliferación de linfocitos T, regulación de apoptosis de células activadas.	97,98,233,270
Inhibidor de crecimiento del endotelio vascular	VEGI, TL1, TL-1A	<i>Tnfsf15</i>	DR3	Células endoteliales, células NK, linfocitos T CD4+ y CD8+, células B, macrófagos y células dendríticas. Inhibición de angiogénesis, inducción de apoptosis.	98,101,271
Factor de necrosis tumoral inducible por glucocorticoides	GITRL, AITRL, TL-6	<i>Tnfsf18</i>	GITR, AITR, EDAR	Linfocitos T CD4+ CD25+, folículos capilares, células endoteliales, regulación y mantenimiento de linfocitos T, inducción y regulación de apoptosis.	78,272-274
Ectodiplasina A	ED1-A1, ED1-A2	<i>Eda</i>	XEDAR, TROY, DR3, DR6	Precursores linfoides, neuronas, células de Schwaan. Inducción y regulación de apoptosis, desarrollo de tejidos provenientes del ectodermo.	275,276

Anexo 2. Esquema del fundamento de la técnica TUNEL para marcaje de células apoptóticas.



El método de TUNEL (Merck Millipore, USA) para marcaje de células apoptóticas contempla el marcaje con etiquetas de digoxigenina en el extremo 3' del ADN fragmentado y su posterior detección con un anticuerpo marcado con fluoresceína que facilita la visualización por sistemas de microscopía de fluorescencia. La validación de este método se realizó en cortes histológicos de ganglio linfático de cerdo infectado como control positivo. Las células TUNEL⁺ adquirieron una apariencia verde brillante (cabezas de flecha) tras la excitación con un láser de 488 nm.

Anexo 3. Características de las sondas empleadas en el análisis de expresión por qPCR.

Sonda	Descripción	Producto (pb)	Reportero/q uencher	Gene Assay ID [†]	Gene bank ID*
<i>h3f3a</i>	Histona H3, familia 3A de <i>Sus scrofa</i>	102	VIC/MGB	Ss03381754_u1	396970
<i>Il17a</i>	Interleuquina 17 de <i>Sus scrofa</i>	113	FAM/MGB	Ss03392097_g1	449530
<i>Il23a</i>	Interleuquina 23 de <i>Sus scrofa</i>	98	FAM/MGB	Ss03392353_m1	100310803
<i>foxp3</i>	Factor de transcripción <i>forkhead box P3</i> de <i>Sus scrofa</i>	105	FAM/MGB	Ss03376695_u1	444998
<i>casp3</i>	Caspasa-3 de <i>Sus scrofa</i>	111	FAM/MGB	Ss03375440_u1	397244

[†] Los códigos corresponden a los catálogos de ensayos disponibles para sondas prediseñadas por la casa comercial Thermo Scientific (Life Technologies, USA).

* Los códigos corresponden a los números de acceso para cada gen disponibles en la base Gene bank del NCBI.

X. Referencias bibliográficas

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. M. Tapeworms (cestodiasis). *Gastroenterol. Clin. North Am.* **25**, 637–53 (1996).
4. Hoberg, E. P. Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. *Parasitol. Int.* **55**, S23–S30 (2006).
5. Garcia, H. H. & Del Brutto, O. H. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet. Neurol.* **4**, 653–61 (2005).
6. Del Brutto, O. H. Neurocysticercosis: up-dating in diagnosis and treatment. *Neurol.* **20**, 412–8 (2005).
7. Del Brutto, O. H. Human cysticercosis (*Taenia solium*). *Trop. Parasitol.* **3**, 100–3 (2013).
8. García, H. H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A. W. & Gilman, R. H. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* **362**, 547–56 (2003).
9. Garcia, H. H., Del Brutto, O. H. & Cysticercosis Working Group in Peru. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol.* **4**, 653–661 (2005).
10. Garcia, H. H., Nash, T. E. & Del Brutto, O. H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet. Neurol.* **13**, 1202–15 (2014).
11. Cardenas, F. *et al.* *Taenia solium* ocular cysticercosis: findings in 30 cases. *Ann. Ophthalmol.* **24**, 25–8 (1992).
12. Moolani, Y., Bukhman, G. & Hotez, P. J. Neglected tropical diseases as hidden causes of cardiovascular disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1499 (2012).
13. Boa, M. E. *et al.* Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. *Vet. Parasitol.* **106**, 155–64 (2002).
14. De Souza Queiroz, L., Filho, A. P., Callegaro, D. & De Faria, L. L. Intramedullary cysticercosis. Case report, literature review and comments on pathogenesis. *J. Neurol. Sci.* **26**, 61–70 (1975).
15. Bandres, J. C., White, A. C., Samo, T., Murphy, E. C. & Harris, R. L. Extraparenchymal neurocysticercosis: report of five cases and review of management. *Clin. Infect. Dis.* **15**, 799–811 (1992).
16. Garcia, H. H., Rodriguez, S., Friedland, J. S. & Cysticercosis Working Group in Peru. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. *Parasite Immunol.* **36**, 388–396 (2014).
17. Sikasunge, C. S., Johansen, M. V., Phiri, I. K., Willingham, A. L. & Leifsson, P. S. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet. Parasitol.* **160**, 242–50 (2009).

18. Carpio, A. Neurocysticercosis: an update. *Lancet. Infect. Dis.* **2**, 751–62 (2002).
19. Garcia, H. H., Gonzalez, A. E. & Gilman, R. H. Cysticercosis of the central nervous system: how should it be managed? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 423–7 (2011).
20. Nash, T. E. *et al.* Neurocysticercosis: A natural human model of epileptogenesis. *Epilepsia* **56**, 177–183 (2015).
21. Nash, T. E. & Neva, F. A. Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Cerebral Cysticercosis. *N. Engl. J. Med.* **311**, 1492–1496 (1984).
22. García, H. H. *et al.* Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 747–56 (2002).
23. Diwan, A. R. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**, 364–9 (1982).
24. Rosas, N., Sotelo, J. & Nieto, D. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* **43**, 353–6 (1986).
25. Fogang, Y. *et al.* Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. *Int. J. Gen. Med.* **8**, 333 (2015).
26. Garcia, H. H. H. *et al.* A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 249–258 (2004).
27. Takayanagui, O. O. M., Odashima, N. S., Bonato, P. S., Lima, J. E. & Lanchote, V. L. Medical management of neurocysticercosis. *Expert Opin. Pharmacother.* **12**, 2845–2856 (2011).
28. Singh, G. & Sander, J. Anticysticercal treatment and seizures in neurocysticercosis. *Lancet Neurol.* **3**, 207–208 (2004).
29. Evans, C., Garcia, H. H., Gilman, R. H. & Friedland, J. S. Controversies in the management of cysticercosis. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 403–5 (1997).
30. Márquez-Caraveo, C., Góngora-Rivera, F., Santos Zambrano, J., Hernández, R. & Soto-Hernández, J. L. Pre-treatment with corticosteroids and a single cycle of high dose albendazole for subarachnoidal cysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 938–9 (2004).
31. Nash, T. E., Mahanty, S., Garcia, H. H. & Cysticercosis Group in Peru. Corticosteroid use in neurocysticercosis. *Expert Rev. Neurother.* **11**, 1175–83 (2011).
32. Organization, W. H. Report of the WHO expert consultation on foodborne trematode infections and taeniasis. (2011).
33. Coyle, C. M. *et al.* Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1500 (2012).
34. Organization, W. H. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. (2015).
35. Torgerson, P. & Macpherson, C. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Vet. Parasitol.* (2011).
36. Coyle, C. & Mahanty, S. Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. ... *neglected Trop.* ... (2012).

37. Lustigman, S. & Prichard, R. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. *PLoS Negl Trop ...* (2012).
38. Del Brutto, O. & García, H. Epidemiology of Human Cysticercosis in Non-endemic Regions and in the Traveler. *Cysticercosis Hum. Nerv. Syst.* (2014).
39. Schantz, P., Wilkins, P. & Tsang, V. Immigrants, imaging, and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. *Emerg. Infect.* (1998).
40. Mewara, A., Goyal, K. & Sehgal, R. Neurocysticercosis: a disease of neglect. *Trop. Parasitol.* (2013).
41. Ndimubanzi, P. & Carabin, H. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Negl Trop ...* (2010).
42. Flisser, A., Craig, P. & Pawlowski, Z. Epidemiological studies of taeniosis and cysticercosis in Latin America. *Proc. NATO ...* (2002).
43. Organization, W. H. *Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases.* (2010).
44. Medina, M. Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch. Intern. ...* (1990).
45. Román, G. & Sotelo, J. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull. World ...* (2000).
46. Bern, C. *et al.* Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1203–9 (1999).
47. Rajshekhar, V., Joshi, D. & Doanh, N. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Trop.* (2003).
48. Yindan, C., Longqi, X. & Xiaonong, Z. Distribution and disease burden of cysticercosis in China. ... *Asian J Trop Med Pub Heal.* (2004).
49. Mafojane, N., Appleton, C. & Krecek, R. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop.* (2003).
50. Geerts, S., Zoli, A. & Nguekam, J. The taeniasis-cysticercosis complex in West and Central Africa. *Southeast Asian J Trop ...* (2004).
51. Praet, N. & Speybroeck, N. The disease burden of *Taenia solium* cysticercosis in Cameroon. *PLoS Negl Trop ...* (2009).
52. Carabin, H. & Krecek, R. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop. Med. ...* (2006).
53. 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).
54. Winkler, A. & 3rd, A. W. Epilepsy and neurocysticercosis in sub-Saharan Africa. ... *Klin. Wochenschrift* (2009).
55. Romagnani, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **21**, 152–8 (1991).

56. Duncan, D. D. & Swain, S. L. Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2506–2514 (1994).
57. Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. & Huston, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* **145**, 3796–806 (1990).
58. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145–173 (1989).
59. Hirahara, K. & Nakayama, T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the T_h 1/T_h 2 paradigm. *Int. Immunol.* **28**, 163–171 (2016).
60. 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).
61. Singh, A., Prasad, K. & Prasad, A. Immune responses to viable and degenerative metacestodes of *Taenia solium* in naturally infected swine. *Int. J. ...* (2013).
62. Mahanty, S. *et al.* Post-treatment vascular leakage and inflammatory responses around brain cysts in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop ...* **9**, e0003577 (2015).
63. Del Brutto, O. & García, H. Cysticercosis of the human nervous system. (2014).
64. 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).
65. Nash, T., Bartelt, L. & Korpe, P. Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation. *Am. J. ...* (2014).
66. Londoño, D., Alvarez, J. & Trujillo, J. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet. ...* (2002).
67. 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).
68. Sikasunge, C. & Johansen, M. *Taenia solium* porcine cysticercosis: viability of cysticerci and persistency of antibodies and cysticercal antigens after treatment with oxfendazole. *... Parasitol.* (2008).
69. Gonzalez, A. & Bustos, J. Efficacy of diverse antiparasitic treatments for cysticercosis in the pig model. *Am. J. ...* (2012).
70. 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).
71. Nico, B. & Ribatti, D. Morphofunctional aspects of the blood-brain barrier. *Curr. Drug Metab.* (2012).
72. Allen, T. & Orahovats, P. Combination of toluidine dye isomers with plasma albumin. *Am. J. Physiol. ...* (1950).

73. Saria, A. & Lundberg, J. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *J. Neurosci. Methods* (1983).
74. 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).
75. 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).
76. 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).
77. 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).
78. Aggarwal, B. B., Gupta, S. C. & Kim, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* **119**, 651–65 (2012).
79. O'Malley, W. E., Achinstein, B. & Shear, M. J. Action of Bacterial Polysaccharide on Tumors. II. Damage of Sarcoma 37 by Serum of Mice Treated With *Serratia Marcescens* Polysaccharide, and Induced Tolerance. *J. Natl. Cancer Inst.* **29**, 1169–1175 (1962).
80. Kolb, W. P. & Granger, G. A. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: characterization of human lymphotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **61**, 1250–5 (1968).
81. Granger, G. A., Shacks, S. J., Williams, T. W. & Kolb, W. P. Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature* **221**, 1155–7 (1969).
82. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3666–70 (1975).
83. Clark, I. A., Virelizier, J. L., Carswell, E. A. & Wood, P. R. Possible importance of macrophage-derived mediators in acute malaria. *Infect. Immun.* **32**, 1058–66 (1981).
84. Wood, P. R. & Clark, I. A. Macrophages from *Babesia* and malaria infected mice are primed for monokine release. *Parasite Immunol.* **6**, 309–17 (1984).
85. Clark, I. A. Suggested importance of monokines in pathophysiology of endotoxin shock and malaria. *Klin. Wochenschr.* **60**, 756–8 (1982).
86. Pennica, D. *et al.* Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* **312**, 724–9 (1984).
87. Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A. & Goeddel, D. V. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6060–4 (1985).
88. Aggarwal, B. B., Moffat, B. & Harkins, R. N. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.* **259**, 686–91 (1984).
89. Aggarwal, B. B., Henzel, W. J., Moffat, B., Kohr, W. J. & Harkins, R. N. Primary structure

- of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J. Biol. Chem.* **260**, 2334–44 (1985).
90. Aggarwal, B. B. *et al.* Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 2345–54 (1985).
 91. Bringman, T. S. & Aggarwal, B. B. Monoclonal Antibodies to Human Tumor Necrosis Factors Alpha and Beta: Application for Affinity Purification, Immunoassays, and as Structural Probes. *Hybridoma* **6**, 489–507 (1987).
 92. Kelker, H. C. *et al.* Characterization of human tumor necrosis factor produced by peripheral blood monocytes and its separation from lymphotoxin. *Int. J. cancer* **36**, 69–73 (1985).
 93. Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. & Hass, P. E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature* **318**, 665–7 (1985).
 94. Cerami, A. The value of failure: the discovery of TNF and its natural inhibitor erythropoietin. *J. Intern. Med.* **269**, 8–15 (2011).
 95. Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P. & Cerami, A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* **161**, 984–95 (1985).
 96. Beutler, B. *et al.* Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552–4 (1985).
 97. Ware, C. F. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 181–4 (2003).
 98. Bodmer, J.-L., Schneider, P. & Tschopp, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 19–26 (2002).
 99. Cosman, D. A family of ligands for the TNF receptor superfamily. *Stem Cells* **12**, 440–455 (1994).
 100. Lotz, M., Setareh, M., von Kempis, J. & Schwarz, H. The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 1–7 (1996).
 101. Wiens, G. D. & Glenney, G. W. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev. Comp. Immunol.* **35**, 1324–1335 (2011).
 102. Spriggs, D. R., Deutsch, S. & Kufe, D. W. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol. Ser.* **56**, 3–34 (1992).
 103. Falvo, J. V., Tsytsykova, A. V. & Goldfeld, A. E. Transcriptional Control of the TNF Gene. *Curr. Dir. Autoimmunity* **11**, 27–60 (2010).
 104. Sedger, L. M. & McDermott, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 453–472 (2014).
 105. Zhang, T., Kruys, V., Huez, G. & Gueydan, C. AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 952–8 (2002).
 106. Stamou, P. & Kontoyiannis, D. L. Posttranscriptional Regulation of TNF mRNA: A Paradigm of Signal-Dependent mRNA Utilization and Its Relevance to Pathology. *Curr. Dir. Autoimmun.* **11**, 61–79 (2010).

107. Zhu, J. *et al.* TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein. *Sci. Rep.* **7**, 12239 (2017).
108. Deleault, K. M., Skinner, S. J. & Brooks, S. A. Tristetraprolin regulates TNF TNF- α mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. *Mol. Immunol.* **45**, 13–24 (2008).
109. Stoecklin, G., Lu, M., Rattenbacher, B. & Moroni, C. A constitutive decay element promotes tumor necrosis factor alpha mRNA degradation via an AU-rich element-independent pathway. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3506–15 (2003).
110. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
111. Perez, C. *et al.* A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63**, 251–8 (1990).
112. Decoster, E., Vanhaesebroeck, B., Vandenaabeele, P., Grooten, J. & Fiers, W. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable murine tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **270**, 18473–8 (1995).
113. Grell, M. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J. Inflamm.* **47**, 8–17 (1996).
114. Flynn, J. L. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. *Immunity* **2**, 561–72 (1995).
115. Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **20**, 87–103 (2010).
116. Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495–504 (1995).
117. Shi, J.-H. & Sun, S.-C. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Front. Immunol.* **9**, 1849 (2018).
118. Kalliolias, G. D. & Ivashkiv, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 49–62 (2016).
119. Aggarwal, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756 (2003).
120. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 17023 (2017).
121. Piva, R., Belardo, G. & Santoro, M. G. NF- κ B: A Stress-Regulated Switch for Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 478–486 (2006).
122. Roux, P. P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320–44 (2004).
123. Arthur, J. S. C. & Ley, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 679–692 (2013).
124. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807–69

- (2001).
125. Sabio, G. & Davis, R. J. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* **26**, 237–45 (2014).
 126. McLeish, K. R. *et al.* Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 537–45 (1998).
 127. Dhanasekaran, D. N. & Reddy, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245–51 (2008).
 128. Ho, P. & Hawkins, C. J. Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J.* **272**, 5436–5453 (2005).
 129. Enari, M. *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43–50 (1998).
 130. Rhen, T. & Cidlowski, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1711–1723 (2005).
 131. Becker, D. E. Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. *Anesth. Prog.* **60**, 25–31; quiz 32 (2013).
 132. Tuckermann, J. P., Kleiman, A., McPherson, K. G. & Reichardt, H. M. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **42**, 71–104 (2005).
 133. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **228**, 111–33 (2003).
 134. Lowenberg, M., Stahn, C., Hommes, D. & Buttgerit, F. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* **73**, 1025–1029 (2008).
 135. Clark, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **275**, 79–97 (2007).
 136. De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *J. Neuroimmunol.* **109**, 16–22 (2000).
 137. De Bosscher, K. & Haegeman, G. Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **23**, 281–291 (2009).
 138. Baschant, U. & Tuckermann, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **120**, 69–75 (2010).
 139. Lee, S. W. *et al.* Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 1204–8 (1988).
 140. Pitzalis, C. *et al.* Corticosteroids inhibit lymphocyte binding to endothelium and intercellular adhesion: an additional mechanism for their anti-inflammatory and immunosuppressive effect. *J. Immunol.* **158**, 5007–16 (1997).
 141. Bhattacharyya, S., Brown, D. E., Brewer, J. A., Vogt, S. K. & Muglia, L. J. Macrophage

- glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* **109**, 4313–4319 (2007).
142. Kitajima, T., Ariizumi, K., Bergstresser, P. R. & Takashima, A. A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J. Clin. Invest.* **98**, 142–147 (1996).
 143. García, H. H. *et al.* Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin. Microbiol. ...* **15**, 747–56 (2002).
 144. Baird, R. A. *et al.* Evidence-based guideline: Treatment of parenchymal neurocysticercosis: Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **80**, 1424–1429 (2013).
 145. Marquez-Caraveo, C. Pre-treatment with corticosteroids and a single cycle of high dose albendazole for subarachnoidal cysticercosis. *J. Neurol. ...* (2004).
 146. Nash, T. E. & Garcia, H. H. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 584–594 (2011).
 147. Mahanty, S. *et al.* TNF- α blockade suppresses pericyclic inflammation following anthelmintic treatment in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* (2017). doi:10.1371/journal.pntd.0006059
 148. Orlikowsky, T. W. *et al.* Effect of Dexamethasone on B7 Regulation and T Cell Activation in Neonates and Adults. *Pediatr. Res.* **57**, 656–661 (2005).
 149. Olsen, P. C. *et al.* Glucocorticoids decrease Treg cell numbers in lungs of allergic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **747**, 52–58 (2015).
 150. Peppel, K., Crawford, D. & Beutler, B. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity. *J. Exp. Med.* **174**, 1483–9 (1991).
 151. Goffe, B. & Cather, J. C. Etanercept: An overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* **49**, 105–111 (2003).
 152. Feldmann, M. & Maini, R. N. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat. Med.* **9**, 1245–1250 (2003).
 153. Beutler, B. A., Peppel, K. & Crawford, D. F. DNA encoding a chimeric polypeptide comprising the extracellular domain of TNF receptor fused to IgG vectors and host cells. (1992). at <<https://patents.google.com/patent/US5447851B1/en>>
 154. Haraoui, B. & Bykerk, V. Etanercept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**, 99–105 (2007).
 155. Giannini, E. H. *et al.* Long-term safety and effectiveness of etanercept in children with selected categories of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 2794–2804 (2009).
 156. Kivelevitch, D., Mansouri, B. & Menter, A. Long term efficacy and safety of etanercept in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biologics* **8**, 169–82 (2014).
 157. Frech, T. Treatment of ankylosing spondylitis: focus on etanercept. *Biologics* **1**, 45–51 (2007).
 158. Nguyen, T. U. & Koo, J. Etanercept in the treatment of plaque psoriasis. *Clin. Cosmet.*

- Investig. Dermatol.* **2**, 77–84 (2009).
159. Kolls, J., Peppel, K., Silva, M. & Beutler, B. Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 215–9 (1994).
 160. Smith, R. A. & Baglioni, C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* **262**, 6951–4 (1987).
 161. Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebusch, C. & Wallach, D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J. Exp. Med.* **175**, 323–9 (1992).
 162. Partsch, G. *et al.* Highly increased levels of tumor necrosis factor-alpha and other proinflammatory cytokines in psoriatic arthritis synovial fluid. *J. Rheumatol.* **24**, 518–23 (1997).
 163. Mohler, K. M. *et al.* Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.* **151**, 1548–61 (1993).
 164. Mahanty, S. *et al.* TNF- α blockade suppresses pericyclic inflammation following anthelmintic treatment in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0006059 (2017).
 165. Haanen, C. & Vermes, I. Apoptosis and inflammation. *Mediators Inflamm.* **4**, 5–15 (1995).
 166. Wallach, D. & Kovalenko, A. Keeping inflammation at bay. *Elife* **3**, (2014).
 167. Ronchetti, S., Ricci, E., Migliorati, G., Gentili, M. & Riccardi, C. How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 4090 (2018).
 168. Arandjelovic, S. & Ravichandran, K. S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* **16**, 907–17 (2015).
 169. Fadeel, B. & Kagan, V. E. Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species. *Redox Rep.* **8**, 143–150 (2003).
 170. Haslett, C. *et al.* Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **345**, 327–333 (1994).
 171. Rosales, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* **9**, 113 (2018).
 172. Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C. & Rossi, A. G. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* **2**, 216–27 (2010).
 173. Ravichandran, K. S. & Lorenz, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 964–974 (2007).
 174. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* **101**, 890–898 (1998).
 175. Voll, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350–351 (1997).
 176. Jitkaew, S., Witasp, E., Zhang, S., Kagan, V. E. & Fadeel, B. Induction of caspase- and reactive oxygen species-independent phosphatidylserine externalization in primary human

- neutrophils: role in macrophage recognition and engulfment. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 427–437 (2009).
177. Neumann, J. *et al.* Beware the intruder: Real time observation of infiltrated neutrophils and neutrophil—Microglia interaction during stroke in vivo. *PLoS One* **13**, e0193970 (2018).
 178. Brown, S. B., Savill, J., Grauer, O., Toyka, K. V. & Gold, R. Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J. Immunol.* **162**, 480–5 (1999).
 179. Magnus, T., Chan, A., Grauer, O., Toyka, K. V & Gold, R. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J. Immunol.* **167**, 5004–10 (2001).
 180. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233–240 (2005).
 181. Bettelli, E., Korn, T. & Kuchroo, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 652–7 (2007).
 182. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* **453**, 1051–1057 (2008).
 183. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).
 184. Fossiez, F. *et al.* T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* **183**, 2593–603 (1996).
 185. Ye, P. *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* **194**, 519–27 (2001).
 186. Stadhouders, R., Lubberts, E. & Hendriks, R. W. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *J. Autoimmun.* **87**, 1–15 (2018).
 187. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 485–517 (2009).
 188. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. *J. Biol. Chem.* **278**, 1910–1914 (2003).
 189. Stritesky, G. L., Yeh, N. & Kaplan, M. H. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J. Immunol.* **181**, 5948–55 (2008).
 190. McGeachy, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **8**, 1390–1397 (2007).
 191. Sehrawat, S. & Rouse, B. T. Interplay of Regulatory T Cell and Th17 Cells during Infectious Diseases in Humans and Animals. *Front. Immunol.* **8**, 341 (2017).
 192. Kawanokuchi, J. *et al.* Production and functions of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* **194**, 54–61 (2008).
 193. Li, J., Hsu, H.-C. & Mountz, J. D. The Dynamic Duo-Inflammatory M1 macrophages and Th17 cells in Rheumatic Diseases. *J. Orthop. Rheumatol.* **1**, 4 (2013).

194. Smigiel, K. S., Srivastava, S., Stolley, J. M. & Campbell, D. J. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. *Immunol. Rev.* **259**, 40–59 (2014).
195. Xie, L., Choudhury, G. R., Winters, A., Yang, S.-H. & Jin, K. Cerebral regulatory T cells restrain microglia/macrophage-mediated inflammatory responses via IL-10. *Eur. J. Immunol.* **45**, 180–191 (2015).
196. Baek, H. *et al.* Neuroprotective effects of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells in a 3xTg-AD Alzheimer's disease model. *Oncotarget* **7**, 69347–69357 (2016).
197. Richards, H. *et al.* Novel role of regulatory T cells in limiting early neutrophil responses in skin. *Immunology* **131**, 583–92 (2010).
198. Herrera Arrasco, L. E. Efecto de un tratamiento antihelmíntico combinado sobre la respuesta inflamatoria en neurocisticercosis porcina. *Universidad Peruana Cayetano Heredia* (Universidad Peruana Cayetano Heredia, 2017). at <<http://repositorio.upch.edu.pe/handle/upch/864>>
199. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
200. Marzal, M., Guerra-Giraldez, C. & Paredes, A. Evans blue staining reveals vascular leakage associated with focal areas of host-parasite interaction in brains of pigs infected with *Taenia solium*. *PLoS One* (2014).
201. Greenlee-Wacker, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol. Rev.* **273**, 357–70 (2016).
202. Solano, S., Cortés, I. M., Copitin, N. I., Tato, P. & Molinari, J. L. Lymphocyte apoptosis in the inflammatory reaction around *Taenia solium* metacestodes in porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* **140**, 171–176 (2006).
203. Sikasunge, C. S., Phiri, I. K., Johansen, M. V., Willingham, A. L. & Leifsson, P. S. Host-cell apoptosis in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. *Parasitology* **135**, 1237–42 (2008).
204. Molinari, J. L. *et al.* *Taenia solium*: A Cysteine Protease Secreted by Metacestodes Depletes Human CD4 Lymphocytes in Vitro. *Exp. Parasitol.* **94**, 133–142 (2000).
205. Camargo, J. A. & Bertolucci, P. H. F. Quantification of Fas protein in CSF of patients with neurocysticercosis. *Arq. Neuropsiquiatr.* **70**, 262–266 (2012).
206. Nash, T. E. *et al.* Neurocysticercosis: A natural human model of epileptogenesis. *Epilepsia* **56**, 177–183 (2015).
207. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 181–218 (2014).
208. Moura, V. B. L. *et al.* Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology* **143**, 334–342 (2016).
209. Tuero, I. *et al.* A Comparative Study of Peripheral Immune Responses to *Taenia solium* in Individuals with Parenchymal and Subarachnoid Neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0004143 (2015).
210. Verma, A. *et al.* Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis.

- Med. Microbiol. Immunol.* **200**, 255–261 (2011).
211. Griffin, G. K. *et al.* IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J. Immunol.* **188**, 6287–99 (2012).
 212. Stark, M. A. *et al.* Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* **22**, 285–294 (2005).
 213. Cua, D. J. & Tato, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 479–489 (2010).
 214. Smith, E. *et al.* IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice. *J. Immunol.* **179**, 8274–9 (2007).
 215. Adalid-Peralta, L. *et al.* Human Neurocysticercosis: In Vivo Expansion of Peripheral Regulatory T Cells and Their Recruitment in the Central Nervous System. *J. Parasitol.* **98**, 142–148 (2012).
 216. Arce-Sillas, A. *et al.* Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. *Clin. Exp. Immunol.* **183**, 271–279 (2016).
 217. Prado, C. *et al.* Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology* **216**, 386–392 (2011).
 218. Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T. & Larralde, C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* **84**, 74–81 (1998).
 219. Restrepo, B. I. *et al.* Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect. Immun.* **69**, 4554–60 (2001).
 220. Oberstein, T. J. *et al.* Imbalance of Circulating Th17 and Regulatory T Cells in Alzheimer’s Disease: A Case Control Study. *Front. Immunol.* **9**, 1213 (2018).
 221. Hu, S.-M., Luo, Y.-L., Lai, W.-Y. & Chen, P.-F. Effects of dexamethasone on intracellular expression of Th17 cytokine interleukin 17 in asthmatic mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* **29**, 1185–8 (2009).
 222. Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M. & Yoshimura, A. Post-Ischemic Inflammation in the Brain. *Front. Immunol.* **3**, 132 (2012).
 223. Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Singh, A. K. & Singh, I. Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J. Neurochem.* **116**, 508–21 (2011).
 224. Tuckermann, J. P., Kleiman, A., McPherson, K. G. & Reichardt, H. M. Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **42**, 71–104 (2005).
 225. Brewer, J. A., Kanagawa, O., Sleckman, B. P. & Muglia, L. J. Thymocyte apoptosis induced by T cell activation is mediated by glucocorticoids in vivo. *J. Immunol.* **169**, 1837–43 (2002).
 226. Sharma, S. & Lichtenstein, A. Dexamethasone-induced apoptotic mechanisms in myeloma cells investigated by analysis of mutant glucocorticoid receptors. *Blood* **112**, 1338–1345 (2008).

227. Cifone, M. G. *et al.* Dexamethasone-Induced Thymocyte Apoptosis: Apoptotic Signal Involves the Sequential Activation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C, Acidic Sphingomyelinase, and Caspases. *Blood* **93**, (1999).
228. Catrina, A. I. *et al.* Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: Extended report. *Arthritis Rheum.* **52**, 61–72 (2005).
229. Flaming, K. P., Goff, B. L., Frank, D. E. & Roth, J. A. Pigs are relatively resistant to dexamethasone induced immunosuppression. *Comp. Haematol. Int.* **4**, 218–225 (1994).
230. Roach, D. R. *et al.* Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J. Exp. Med.* **193**, 239–46 (2001).
231. Wilhelm, P. *et al.* Membrane lymphotoxin contributes to anti-leishmanial immunity by controlling structural integrity of lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1993 (2002).
232. Tumanov, A. V *et al.* Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol. Rev.* **195**, 106–16 (2003).
233. Schneider, K., Potter, K. G. & Ware, C. F. Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol. Rev.* **202**, 49–66 (2004).
234. Horiuchi, T. *et al.* Increased expression of membrane TNF-alpha on activated peripheral CD8+ T cells in systemic lupus erythematosus. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 875–9 (2006).
235. MacEwan, D. J. TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.* **135**, 855–875 (2002).
236. 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).
237. Glezer, I., Simard, A. R. & Rivest, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* **147**, 867–883 (2007).
238. Browning, J. L. *et al.* Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847–56 (1993).
239. Arch, R. H. & Thompson, C. B. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 558–65 (1998).
240. Kawamata, S., Hori, T., Imura, A., Takaori-Kondo, A. & Uchiyama, T. Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 5808–14 (1998).
241. Grewal, I. S. & Flavell, R. A. CD40 and CD154 in cel-mediated immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 111–135 (1998).
242. Grewal, I. S., Xu, J. & Flavell, R. A. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* **378**, 617–620 (1995).
243. Cleary, A. M., Fortune, S. M., Yellin, M. J., Chess, L. & Lederman, S. Opposing roles of CD95 (Fas/APO-1) and CD40 in the death and rescue of human low density tonsillar B cells. *J. Immunol.* **155**, 3329–37 (1995).

244. Lens, S. M., Tesselaar, K., den Drijver, B. F., van Oers, M. H. & van Lier, R. A. A dual role for both CD40-ligand and TNF-alpha in controlling human B cell death. *J. Immunol.* **156**, 507–14 (1996).
245. Carey, G. B. *et al.* B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death. *Immunol. Rev.* **176**, 105–15 (2000).
246. Parlato, S. *et al.* CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *EMBO J.* **19**, 5123–34 (2000).
247. Maher, S., Toomey, D., Condrón, C. & Bouchier-Hayes, D. Activation-induced cell death: The controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol. Cell Biol.* **80**, 131–137 (2002).
248. Waring, P. & Müllbacher, A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 312–317 (1999).
249. Agematsu, K. Memory B cells and CD27. *Histol. Histopathol.* **15**, 573–6 (2000).
250. Akiba, H. *et al.* CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 13353–8 (1998).
251. Prasad, K. V. *et al.* CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6346–51 (1997).
252. Cerutti, A. *et al.* Engagement of CD153 (CD30 ligand) by CD30+ T cells inhibits class switch DNA recombination and antibody production in human IgD+ IgM+ B cells. *J. Immunol.* **165**, 786–94 (2000).
253. Blazar, B. R. *et al.* CD30/CD30 ligand (CD153) interaction regulates CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. *J. Immunol.* **173**, 2933–41 (2004).
254. Horie, R. & Watanabe, T. CD30: expression and function in health and disease. *Semin. Immunol.* **10**, 457–470 (1998).
255. Alfaro, C. *et al.* Functional expression of CD137 (4-1BB) on T helper follicular cells. *Oncoimmunology* **4**, e1054597 (2015).
256. Vinay, D. S. & Kwon, B. S. 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. *BMB Rep.* **47**, 122–9 (2014).
257. Anderson, M. W. *et al.* CD137 Is Expressed in Follicular Dendritic Cell Tumors and in Classical Hodgkin and T-Cell Lymphomas. *Am. J. Pathol.* **181**, 795–803 (2012).
258. Aggarwal, B. B., Bhardwaj, U. & Takada, Y. in *Vitamins and hormones* **67**, 453–483 (2004).
259. Boyce, B. F. & Xing, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res. Ther.* **9**, S1 (2007).
260. Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N. & Penninger, J. M. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol. Med.* **12**, 17–25 (2006).
261. Chicheportiche, Y. *et al.* TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family

- that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**, 32401–10 (1997).
262. Wiley, S. R. & Winkles, J. A. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 241–9
 263. MacFarlane, M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol. Lett.* **139**, 89–97 (2003).
 264. Nakayama, M. *et al.* Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J. Immunol.* **168**, 734–43 (2002).
 265. Baert, L., Manfroi, B., Casez, O., Sturm, N. & Huard, B. The role of APRIL - A proliferation inducing ligand - In autoimmune diseases and expectations from its targeting. *J. Autoimmun.* **95**, 179–190 (2018).
 266. Vincent, F. B., Saulep-Easton, D., Figgett, W. A., Fairfax, K. A. & Mackay, F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**, 203–215 (2013).
 267. Hahne, M. *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* **188**, 1185–90 (1998).
 268. Huard, B., Schneider, P., Mauri, D., Tschopp, J. & French, L. E. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *J. Immunol.* **167**, 6225–31 (2001).
 269. Cancro, M. P. The BLyS/BAFF family of ligands and receptors: key targets in the therapy and understanding of autoimmunity. *Ann. Rheum. Dis.* **65 Suppl 3**, iii34–6 (2006).
 270. Matsui, H., Hikichi, Y., Tsuji, I., Yamada, T. & Shintani, Y. LIGHT, a member of the tumor necrosis factor ligand superfamily, prevents tumor necrosis factor- α -mediated human primary hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 50054–61 (2002).
 271. Metheny-Barlow, L. J. & Li, L.-Y. Vascular Endothelial Growth Inhibitor (VEGI), an Endogenous Negative Regulator of Angiogenesis. *Semin. Ophthalmol.* **21**, 49–58 (2006).
 272. Barao, I. The TNF receptor-ligands 4-1BB-4-1BBL and GITR-GITRL in NK cell responses. *Front. Immunol.* **3**, 402 (2012).
 273. Nocentini, G. & Riccardi, C. in *Advances in experimental medicine and biology* **647**, 156–173 (2009).
 274. Azuma, M. Role of the glucocorticoid-induced TNFR-related protein (GITR)-GITR ligand pathway in innate and adaptive immunity. *Crit. Rev. Immunol.* **30**, 547–57 (2010).
 275. Sadier, A., Viriot, L., Pantalacci, S. & Laudet, V. The ectodysplasin pathway: from diseases to adaptations. *Trends Genet.* **30**, 24–31 (2014).
 276. Voutilainen, M. *et al.* Ectodysplasin/NF- κ B Promotes Mammary Cell Fate via Wnt/ β -catenin Pathway. *PLoS Genet.* **11**, e1005676 (2015).