



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

EFECTO DE UN TRATAMIENTO
ANTIHELMÍNTICO COMBINADO
SOBRE LA RESPUESTA
INFLAMATORIA EN
NEUROCISTICERCOSIS PORCINA

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

LUIS EDUARDO HERRERA ARRASCO

LIMA – PERÚ

2017

Asesor:

Cristina Guerra Giraldez, PhD.

DEDICATORIA

A mi familia y mi asesora, por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial para mi Asesora Cristina Guerra por su apoyo a lo largo de toda esta etapa, a los miembros del laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis para crear un buen ambiente de trabajo y apoyarme en la realización del proyecto.

Un agradecimiento especial a la Dra. Vanessa Adui por su apoyo en los temas de PCR en tiempo real y su entera disposición para resolver todas mis dudas respecto a temas relacionados con biología molecular.

Agradezco también a mis padres por su apoyo a lo largo de toda mi carrera profesional y a mis amigos Eduardo Gushiken, Fabiola Valdivia y Jovanka Gencel por su apoyo en el día a día.

Con respecto al financiamiento del presente trabajo de investigación, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación Tecnológica (CONCYTEC/ 031-2015-FONDECYT).

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Marco teórico.....	2
1.1.1 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	2
1.1.2 Neurocisticercosis y sintomatología	4
1.1.3 Diagnóstico.....	6
1.1.4 Tratamiento.....	8
1.1.5 Inflamación en neurocisticercosis.....	9
1.1.6 Barrera hematoencefálica (BHE).....	10
1.1.7 Respuesta inmune en SNC causada por NCC	12
1.1.8 El cerdo como modelo de estudio para neurocisticercosis.....	14
1.2. JUSTIFICACIÓN	17
1.3. HIPÓTESIS	17
1.4. OBJETIVOS	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos específicos.....	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Animales y tratamiento.....	20
2.1.1 Tipo de investigación	20
2.1.2 Población de estudio	20
2.2 Procedimientos.....	21
2.2.1 Extracción de ARN total	21
2.2.2 Generación de ADNc por PCR de transcripción reversa	21
2.2.3 PCR cuantitativo en tiempo real	22
2.2.4 Determinación de la estabilidad de los candidatos a genes de referencia	22

2.3 Variables:	23
2.4 Análisis estadístico	24
III. RESULTADOS	25
3.1 Grupos de trabajo	25
3.2 Selección y perfil de expresión de los candidatos a genes de referencia ...	25
3.2.1 Análisis de la estabilidad de expresión de los candidatos a genes de referencia.....	27
3.2.1.1 Análisis por RefFinder.....	27
3.3 Regulación de marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios en tejido cerebral pericístico.....	28
3.4 Realce de gadolinio (Gd) en las muestras.....	31
3.5 Relación entre marcadores de inflamación y realce de la solución de gadolinio.....	34
IV. DISCUSIÓN.....	37
4.1 Presencia de inflamación y realce en las imágenes de resonancia.....	38
4.2 Respuesta mixta post tratamiento	39
4.3 Altos niveles de TNF	41
4.4 Modelo de inflamación.....	41
4.5 Histona 3, gen de referencia	43
4.6 Observaciones generales	44
V. CONCLUSIONES	48
5.1. RECOMENDACIONES	48.
VI. BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS.....	58
Anexo 1. Normalización de genes de referencia.....	58
1. Análisis por método comparativo de Ct.....	58

2. Análisis por BestKeeper	59
3. Análisis por NormFinder	60
4. Análisis por geNorm	61
Anexo 2. Imágenes histológicas.....	62
Anexo 3. Estadios inflamatorios muestras HD	63
Anexo 4. Perfiles de expresión estratificadas por cerdo.....	64

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción general de animales de estudios	25
Tabla 2. Candidatos a genes de referencia.....	26
Tabla 3. Análisis por RefFinder	27
Tabla 4. Cambio en los niveles de expresión de los genes proinflamatorios y antiinflamatorios y realce de gadolinio como efecto del tratamiento con Praziquantel y Albendazol.	29
Tabla 5. Cambio en los niveles de expresión de los genes proinflamatorios y antiinflamatorios y realce de gadolinio como efecto del tratamiento con Praziquantel y Albendazol.	30
Tabla 6. Análisis de regresión del realce de solución de gadolinio con cada uno de los marcadores en cada grupo de tratamiento.....	35
Tabla 7. Análisis de regresión múltiple entre el realce de la solución de gadolinio y marcadores proinflamatorios (IL-6 e INF)......	35
Tabla 8. Análisis de regresión múltiple del realce de la solución de gadolinio y marcadores proinflamatorios (TNF e IL-6).	36
Tabla 9. Análisis de regresión múltiple del realce de la solución de gadolinio y marcadores proinflamatorios (TNF e INF)......	36
Tabla A1.1. Comparación Ct de genes de referencia candidatos.....	59
Tabla A1.2. Análisis por BestKeeper	60
Tabla A3. Clasificación estadios inflamatorios.....	63

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	3
Figura 2. La barrera hematoencefálica	11
Figura 3. Cuantificación de realce de Gd.....	23
Figura 4. Distribución de valores de Ct de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras.....	26
Figura 5. Regulación de genes proinflamatorios como efecto del tratamiento. .	32
Figura 6. Regulación de genes antiinflamatorios como efecto del tratamiento...33	
Figura 7. Reactivación de astrocitos y microglías producto del tratamiento.	42
Figura A1.1. Distribución de valores de Ct de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras.	58
Figura A1.2. Ranking de los candidatos a genes de referencia en base a los valores de estabilidad calculados por NormFinder	60
Figura A1.3. Ranking de los genes candidatos de referencia en base a los valores de estabilidad calculado por geNorm	61
Figura A2. Imágenes histológicas	62

Resumen

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad del sistema nervioso central (SNC) causada por la infección con el estado larval (quiste o cisticerco) del platelminto *Taenia solium*. Cuando el parásito muere o es dañado por el tratamiento con antihelmínticos se puede producir inflamación cerebral y síntomas como epilepsia. La NCC es la causa más importante de epilepsia secundaria en nuestro país y en países en desarrollo. Nuestro grupo ha determinado previamente que la inflamación está relacionada con la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y también está directamente asociada a los hallazgos observados en la resonancia magnética nuclear (RMN). Dado que hay una relación entre la inflamación a nivel histopatológico y las imágenes de resonancia magnética, buscamos determinar si los perfiles de expresión de los elementos inmunes pueden estar asociados con la RMN. Para este trabajo, se usaron tres grupos de cerdos naturalmente infectados. El primer y el segundo grupo fueron tratados con praziquantel y albendazol. Un tercer grupo permaneció sin tratar para servir como control. Se obtuvieron imágenes de RMN antes y después de tratamiento. Se tomó el tejido pericístico para el análisis de expresión génica por RT-qPCR. Se midió la expresión de marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios en el tejido alrededor del quiste. Se encontró que hay una respuesta mixta (proinflamatoria y antiinflamatoria) a los 2 días de tratamiento y una relación positiva entre un perfil proinflamatorio y el realce de Gd en imágenes de RMM a los 5 días de tratamiento. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones clínicas y confirman la inflamación encontrada en la RMN, una herramienta clínica clave. Nuestro trabajo nos permiten proponer el uso de marcadores de inflamación como predictores de inflamación cerebral.

Abstract

Neurocysticercosis (NCC) is a disease of the central nervous system (CNS) caused by infection with the larval stage (cyst or cysticercus) of the tapeworm *Taenia solium*. When the parasite dies or is damaged by treatment with anthelmintics, cerebral inflammation and symptoms such as epilepsy can occur. NCC is the most important cause of secondary epilepsy in our country and in developing countries. Our group has previously determined that inflammation is related to altered permeability of the blood-brain barrier (BBB) and is also directly associated with the findings of magnetic resonance imaging (MRI). Since there is a relationship between inflammation at the histopathological level and magnetic resonance imaging, we sought to determine whether if the expression profiles of the immune elements may be associated with MRI. For this study, three groups of naturally infected pigs were evaluated. The first and second groups were treated with praziquantel and albendazole. A third group remained untreated to serve as a control. MRI was obtained before and after treatment. The pericystic tissue was taken for the analysis of gene expression by Rt-qPCR. The expression of proinflammatory and antiinflammatory markers in the tissue around the cyst were measured. It was found that there is a mixed (proinflammatory and antiinflammatory) response at 2 days of treatment and a positive relationship between a proinflammatory profile and Gd enhancement in MRI images at 5 days of treatment. These results are in agreement with clinical observations and confirm the inflammation around the cyst found in MRI, a key clinical tool. Our work allows us to propose the use of inflammation markers as predictors of cerebral inflammation.

I INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC), enfermedad del sistema nervioso central (SNC) causada por la infección con el estado larval (quiste o cisticerco) del platelminto *Taenia solium*, afecta a un estimado de 50 millones de personas a nivel mundial con muchos casos sintomáticos en América Latina. Es un problema de salud pública en países en vías de desarrollo de América Latina, África y Asia, debido a la existencia de regiones con falta de sistemas de saneamiento y alcantarillado¹. Junto con estas características existen sistemas rústicos de crianza de cerdos bajo condiciones sanitarias pobres. En Estados Unidos esta enfermedad no es endémica, pero se ha reportado aumento de casos de pacientes con NCC debido a la migración de personas procedentes desde zonas endémicas, haciendo la NCC una enfermedad emergente².

La NCC es una de las mayores causas de epilepsia a nivel mundial, con una ocurrencia de más del 80% en aquellos pacientes que presentan síntomas³. En el Perú se reporta que existen zonas hiperendémicas, donde cerca del 40% de casos de epilepsia están asociados a NCC. La NCC también se relaciona con casos de hipertensión intracraneal⁴.

La manifestación de síntomas se debe principalmente a la inflamación en el cerebro, la cual depende de la respuesta inmune frente al parásito en proceso de degeneración, así como a características de la infección como el número de quistes y su ubicación en el cerebro^{5,6}. Nuestro grupo ha determinado previamente que el incremento en la inflamación está relacionada con la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y también está directamente asociada a datos clínicos observados en la resonancia magnética nuclear (RMN). Dado que hay una

relación entre la inflamación a nivel histopatológico y las imágenes de resonancia magnética⁷, buscamos determinar si los perfiles de expresión de los elementos inmunes pueden estar asociados con la RMN. Para este trabajo, se usaron tres grupos de cerdos naturalmente infectados. Un grupo permaneció sin tratar para servir como control, y dos grupos fueron tratados con praziquantel y albendazol, por 2 y 5 días respectivamente. Se practicó RMN a los cerdos antes y después de recibir el tratamiento. La existencia de una relación significativa entre algún marcador inmune y la RMN apoyaría el uso de su perfil de expresión como una medida de inflamación en el cerebro porcino, con la posibilidad de extrapolar estos resultados a NCC humana.

1.1 Marco teórico

1.1.1 Ciclo de vida de Taenia solium

Taenia solium tiene un ciclo de vida que involucra dos hospederos principales (Figura 1). El cerdo es el hospedero intermedio natural, mientras que el hombre es el único hospedero definitivo y puede ser hospedero intermedio de forma accidental. De este modo, el humano es el único hospedero del estadio adulto del parásito, mientras que el estado larval (cisticerco) puede infectar tanto a cerdos como a humanos.

La teniasis se adquiere por la ingesta de carne de cerdo infectado con larvas de *T. solium*. Los cisticercos ingeridos evaginan en el intestino humano y mediante estructuras de la cabeza (escólex) se pueden adherir a la pared del intestino y desarrollar el estadio adulto del parásito. La tenia adulta es un gusano plano con una anatomía que consta de un escólex conformado por cuatro ventosas y un rostelo rodeado por dos filas de ganchos, y el estróbilo (resto del cuerpo) que se centran en

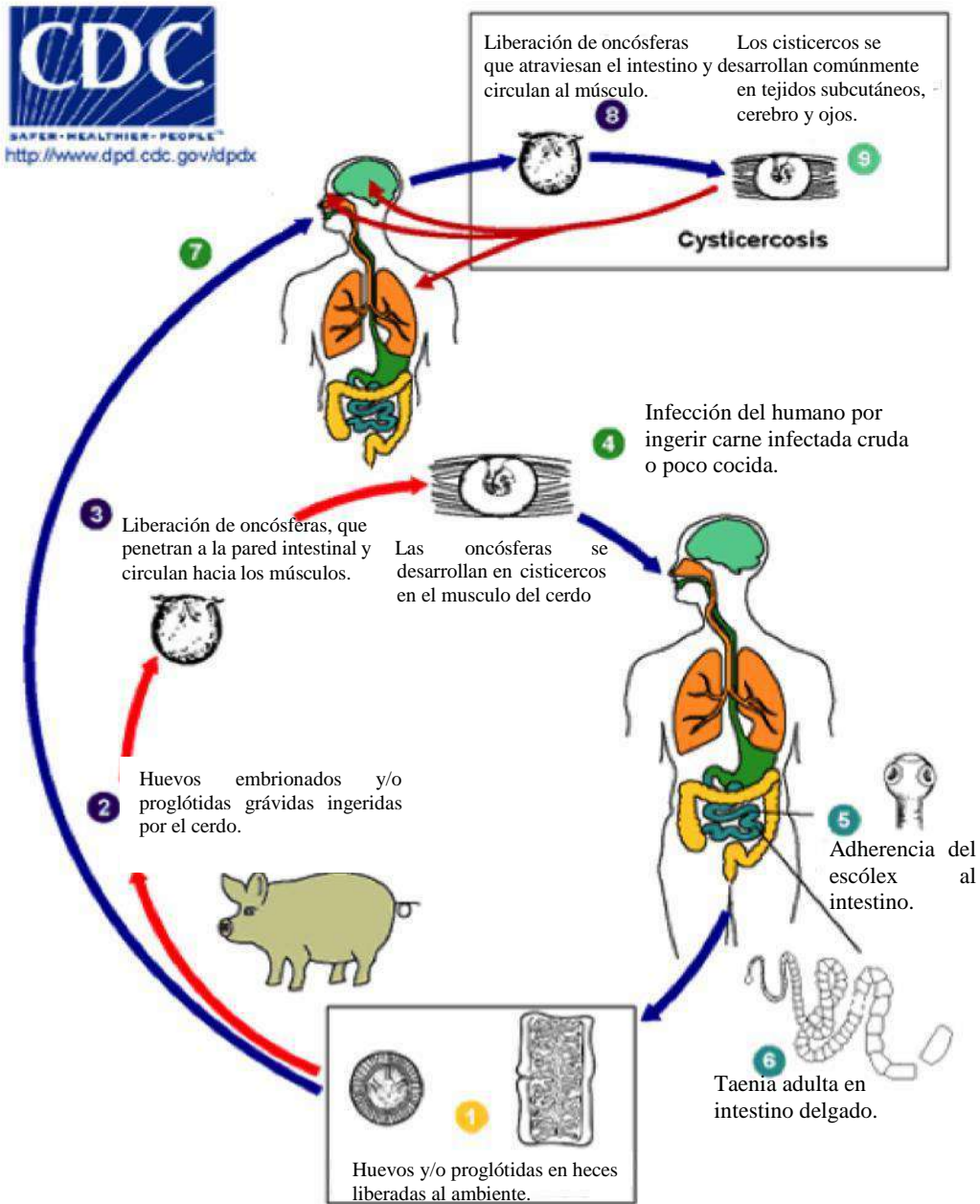


Figura 1. Ciclo de vida de *T. solium* (CDC: Centers for Disease Control and Prevention)⁹¹

cientos de proglótidas, cada una de las cuales contienen un sistema nervioso primitivo, órganos reproductivos femeninos y masculinos donde se producen los huevos, y sistemas de excreción y secreción. Cuando estos segmentos son maduros y son capaces de producir oncosferas a partir de los huevos, se los denomina proglótidas grávidas, que pueden desprenderse del estróbilo mediante un proceso denominado apolisis y ser liberados al ambiente en las heces del portador⁸.

El desarrollo de cisticercosis ocurre en el cerdo o en el ser humano al ingerir huevos u oncosferas presentes en alimentos o líquidos contaminados con heces. Una vez ingeridos estos, los embriones se liberan por acción de los ácidos estomacales y pasan al intestino delgado; luego de atravesar la mucosa intestinal llegan a la circulación, mediante la cual potencialmente pueden infectar cualquier tejido, como el músculo, cerebro u otros órganos, donde llegan a desarrollar como cisticerco⁹.

1.1.2 Neurocisticercosis y sintomatología

Los cisticercos son vesículas membranosas llenas de fluido y un escólex invaginado; en su superficie tienen proyecciones llamadas microtricas que maximizan la captación de nutrientes¹⁰. El cisticerco pasa por cuatro fases de desarrollo: fase vesicular, donde el quiste está viable y posee una membrana delgada que contiene fluido traslúcido; fase coloidal, donde el quiste pierde viabilidad y está rodeado de una cápsula compuesta de fibras de colágeno con o sin infiltrado de células inmunes del hospedero; fase granular, donde la membrana se engrosa y se adhiere totalmente a la cápsula; y la fase calcificada, en la que el quiste se reduce y endurece¹¹.

En el caso que el cisticerco se aloje en el sistema nervioso central (SNC), esta infección se denomina neurocisticercosis. De los muchos huevecillos embrionados que pueden ser ingeridos por el hospedero solo unos cuantos llegan a establecerse en el SNC. Aquellos bien establecidos pueden permanecer en estadio vesicular por largos periodos gracias a mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero y a la protección de la barrera hematoencefálica, que restringe el acceso de células inmunes periféricas al tejido cerebral⁹.

La NCC puede afectar tanto a hombres como a mujeres de todas las edades, con un pico de incidencia entre las edades de 20 y 50 años. Sin embargo, las manifestaciones clínicas varían en niños y adultos¹². La sintomatología de la NCC puede manifestarse por dos mecanismos. Por un lado, el quiste puede obstaculizar la circulación del líquido cefalorraquídeo (LCR), lo que trae consigo un incremento de la presión intracerebral; segundo, un quiste viable genera muy poca o leve respuesta inflamatoria por parte del hospedero, pero luego de un determinado tiempo puede entrar en un proceso de degeneración y desencadenar una intensa respuesta inflamatoria, con la subsecuente formación de un granuloma y cambios en el tejido nervioso adyacente al quiste (tejido pericístico) ^{13,14}. Hay diversos factores que determinan la gravedad de los síntomas, entre ellos el número, el tamaño, la ubicación de los quistes y la intensidad de la respuesta inmune por parte del hospedero¹³.

El quiste puede ubicarse en la masa parenquimal o en el espacio extraparenquimal¹⁵. Quistes viables en la zona parenquimal pueden pasar inadvertidos por el sistema inmune y no generar síntomas. Sin embargo, hay una fuerte relación entre la presencia de quistes en zona parenquimal y ataques epilépticos; esto se relaciona con la respuesta inflamatoria provocada por la degeneración del quiste. Además, los quistes viables, por efecto de su masa, se asocian al aumento de la presión del líquido cefalorraquídeo. De todas maneras, la prognosis para el tratamiento de pacientes con quistes parenquimales es favorable. Por otro lado, la ubicación extraparenquimal puede presentarse en el espacio subaracnoideo, ventricular y/o medular. A diferencia de la zona parenquimal, quistes en el espacio subaracnoideo pueden presentar un crecimiento anormal de gran masa, una forma anormal altamente proliferativa denominada quiste subaracnoideo

hiperproliferativo o también “racemoso”¹⁶. Los quistes ubicados en los ventrículos pueden generar hidrocefalia debido a un bloqueo del LCR. Debido a la diferencia de las manifestaciones clínicas, pacientes con quistes extraparenquimales no tienen una buena prognosis; estas formas de NCC se asocian a una alta tasa de mortalidad¹⁵.

La inflamación cerebral es uno de los factores más importantes en el desarrollo de la NCC sintomática y la causa de muchas de las complicaciones asociadas a la mortalidad. Una manera de detectarla y además de apreciar su evolución una vez iniciado el tratamiento, es a través de imágenes médicas (tomografía computarizada o resonancia magnética nuclear, RMN). El método que brinda mayor información es la resonancia con contraste. El hallazgo está basado en el realce de la solución de contraste, el cual puede estar asociado a los eventos inmunológicos presentes en el tejido pericístico^{6,14,17}. El uso de marcadores de contraste basados en gadolinio (Gd) en pacientes con NCC permite asociar el realce de Gd en las RMN a la aparición de síntomas (ataques epilépticos, crisis convulsivas, cefaleas, etc.) y a la evolución del paciente¹⁴. La molécula de Gd es un compuesto hidrofílico el cual queda excluido de paso en una BHE intacta, por lo que en una BHE dañada si permite su ingreso y se hace posible la detección por la RMN¹⁸.

1.1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de NCC esta basado normalmente en el análisis de neuroimágenes y confirmado por pruebas serológicas, pero sigue siendo un desafío para aquellas zonas hiperendémicas donde el acceso a estas pruebas es aún un problema. Para determinar la presencia de infección por *T. solium* se toman en cuenta la epidemiología, serología, imágenes del cerebro y patología. Una de las pruebas

serológicas más usadas es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que detecta antígenos del parásito utilizando anticuerpos monoclonales murinos contra *T. saginata*¹⁹, pero su interpretación puede complicarse por reacciones cruzadas con otras infecciones helmínticas y por su poca sensibilidad en infecciones de quiste único. Otra prueba serológica es el enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB); esta prueba utiliza la reactividad contra las glicoproteínas del parásito purificadas con lectinas de lenteja²⁰, y tiene una alta sensibilidad y especificidad salvo en aquellos pacientes que solo presentan un único quiste. Las pruebas de detección de antígenos parasitarios pueden detectar la presencia de quistes viables^{20,21}. La detección de anticuerpos, en cambio, muchas veces puede tener falsos positivos, ya que en zonas endémicas se pueden encontrar personas con infecciones asintomáticas pasadas, cisticercosis muscular o subcutánea, que también pueden dar falsos positivos. Por esto, la especificidad de esta técnica para el diagnóstico de NCC disminuye¹⁴.

Para determinar el tratamiento, un diagnóstico positivo no es suficiente, también es esencial tener conocimiento de la cantidad de quistes, su posición, tamaño y estadio en el cerebro; para esto comúnmente se utilizaban técnicas radiológicas, pero su uso se discontinuó por su potencial peligro. Actualmente, la visualización de lesiones en el cerebro se logra mediante imágenes computarizadas obtenidas por tomografía computarizada (CT) y RMN. CT tiene una especificidad y sensibilidad de alrededor de 95% para el diagnóstico de NCC, mientras que la RMN proporciona resultados más exactos sobre el grado de infección, el tamaño, localización y estado de la lesión. La desventaja de estas pruebas es su alto costo²².

1.1.4 Tratamiento

Debido a la heterogeneidad de síntomas entre los individuos infectados, el tratamiento necesita ser personalizado. Este puede estar orientado a controlar los síntomas o a matar al parásito. Las fases de desarrollo vesicular y coloidal del parásito son las únicas que contienen al parásito vivo y son el blanco de las drogas antihelmínticas²³

El Praziquantel fue la primera droga utilizada en NCC porcina y la primera efectiva en el tratamiento antiparasitario; es una isoquinolina que daña el tegumento del parásito y lo paraliza^{17,24}. Otras drogas como Albendazol surgieron como alternativas; este es un imidazol que se une a moléculas de tubulina e impide su polimerización hacia microtúbulos y deja sin reservas energéticas al parásito, porque se altera su capacidad de internalizar glucosa^{17,24}. Gracias a que estas dos drogas tienen mecanismos de acción diferentes, es biológicamente posible su uso combinado para tener una mayor eficiencia del control parasitario. Estudios con pacientes infectados con NCC, con quistes viables en la zona intraparenquimal, presentaron un incremento en el efecto parasiticida al tratarlos con el uso combinado de Praziquantel y Albendazol²⁵. Asimismo, estudios in vitro en el laboratorio de Inmunopatología en Neurocisticercosis de la UPCH revelan que el uso combinado de estas drogas muestra efectos sinérgicos, inhibiendo además la liberación de antígenos específicos del parásito²⁶.

El tratamiento con estas drogas puede tener efectos adversos debido al daño que generan en el cisticerco, el cual conduce a la expresión y liberación de moléculas antigénicas, exacerbando la respuesta inflamatoria por parte del hospedero y con

ella los síntomas de la NCC^{17,27}. Por esto, el tratamiento antihelmíntico se acompaña del uso de corticoesteroides para suprimir la inflamación y controlar la sintomatología²⁸.

1.1.5 Inflamación en neurocisticercosis

En el panorama de la infección un quiste viable genera muy poca o leve respuesta inflamatoria por parte del hospedero. Esta situación cambia en el momento en que el quiste entra en un proceso de degeneración por causas naturales, o también por el tratamiento con drogas antihelmínticas, y provoca una respuesta inflamatoria acompañada de cambios en el tejido nervioso.

La respuesta inflamatoria desencadenada por el quiste puede separarse en cuatro etapas, de acuerdo a descripciones de otros investigadores y de nuestro grupo de trabajo^{29,30}. En la primera etapa el quiste es viable y hay una inflamación discreta en la cual el quiste se encuentra rodeado por una capa fina de colágeno; en la segunda etapa, hay presente un infiltrado inflamatorio que se comienza a intercalar con la capa de colágeno; en la tercera etapa, la formación de un granuloma se hace evidente, y en la cuarta etapa el quiste se ve rodeado por un capa de infiltrado rica en eosinófilos, y la membrana del parásito se encuentra degenerada, de manera que las células inmunes invaden el interior del cisticerco y no se distinguen las capas de sus tejidos³¹. Estas etapas se usan en el laboratorio para clasificar los tejidos de acuerdo a la intensidad de inflamación alrededor de los quistes^{29,30} (ver anexo 4).

En un escenario “normal” o saludable, el sistema inmune periférico se encuentra aislado del SNC por una interfaz formada por la barrera hematoencefálica (BHE). No obstante, debido a la infección con *T. solium*, la homeostasis de este sistema se ve alterada; una mayor permeabilidad de la BHE hace capaz la comunicación del SNC

con el sistema inmune periférico, lo que agrava la inflamación. Por otro lado, los astrocitos representan la mayor población no neuronal en el SNC y cumplen un papel fundamental en la formación, mantención y reparación de la BHE³². Un estudio en ratas con cuadros de epilepsia causados por el aumento en la permeabilidad de la BHE, sugiere que el aumento conlleva a la activación de astrocitos, dando lugar a la formación de una cicatriz glial como un mecanismo de reparación para el restablecimiento de la membrana de las células endoteliales que permite la regeneración de la BHE^{33,34}. La cicatriz glial es un proceso de reactivación celular, principalmente astrogliosis³⁵. Uno de los marcadores más utilizados para la identificación de astrocitos reactivos es la proteína acida fibrilar glial (GFAP), un filamento intermedio cuya sobreexpresión es indicador de astrocitos reactivos³⁶.

1.1.6 Barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE es una barrera metabólica, física y de transporte que aísla al SNC del resto del organismo (Figura 2). Está estructuralmente constituida por células endoteliales conectadas entre sí por uniones estrechas (gap junctions, formadas por proteínas denominadas conexinas). Estas células recubren el sistema vascular cerebral y están rodeadas por una lámina basal que interactúa con pericitos y una red de astrocitos adyacentes. En esta red de células estrechamente comunicadas existen uniones adherentes formadas por cadherinas e integrinas³². Las principales funciones que cumple la BHE son separar y proteger al cerebro de compuestos circulantes, controlar el transporte selectivo de moléculas necesarias para el cerebro, detectar cambios en la sangre y comunicarlos al cerebro, y metabolizar sustancias del cerebro³⁷.

La integridad de la BHE se puede ver alterada por tipos diferentes de daño, con patología variada: infecciones, tumores, traumas, infartos, episodios epilépticos u otras afecciones al SNC. También pueden presentarse cambios en sus propiedades y sistema de transporte.

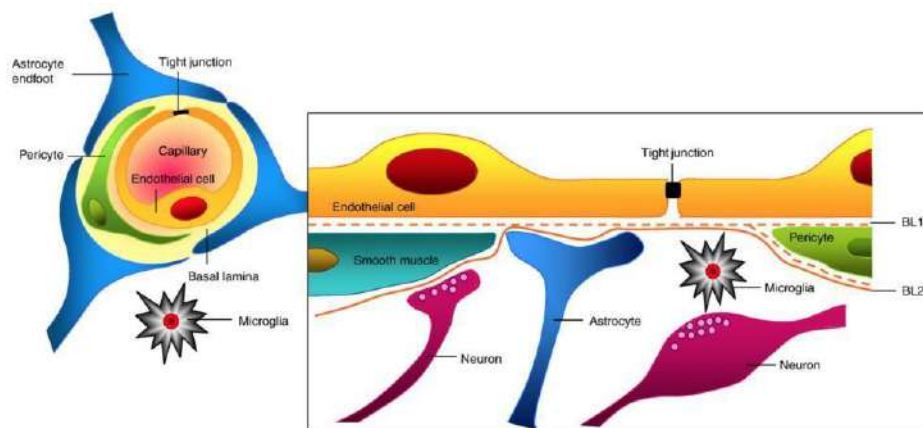


Figura 2. La barrera hematoencefálica ³⁷

Los astrocitos cumplen una amplia gama de funciones a nivel estructural y regulatorio. Participan manteniendo la homeostasis cerebral, balance iónico, metabolismo y sobre todo en el sistema de defensa del cerebro. La actividad de los astrocitos se ha visto asociada a distintas patologías como la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple e infecciones como la NCC^{38,39}.

Un daño en el SNC, como un evento epiléptico, conduce a procesos celulares que también generan daño. Este proceso se acompaña por una pérdida de función neuronal y daño en vías axonales, contribuyen a esto la menor expresión de moléculas que promueven el crecimiento axonal o inhibidores de su crecimiento, lo que finalmente resulta en la formación de una cicatriz glial alrededor de la lesión o infección en el cerebro. Diversos estudios sugieren que la causa es la activación de astrocitos, que ocurre con un aumento dramático de las proteínas del citoesqueleto, proteínas extracelulares y proteínas de membrana. Estos astrocitos reactivos

participan en un mecanismo de reparación para la reformación de la membrana glial formando la cicatriz glial^{33,34}.

Diversos marcadores específicos se relacionan con la formación de la cicatriz glial. Estudios de cultivos celulares de astrocitos han confirmado la expresión de moléculas de adhesión como N-CAM^{40,41}, N-cadherina^{34,41} y beta1 integrinas⁴¹. También se reconocen marcadores específicos para la identificación de astrocitos, como la proteína acida fibrilar glial (GFAP), moléculas de la matriz extracelular (ECM), péptidoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG).

La formación de una cicatriz glial tiene efectos beneficiosos en la recuperación de las funciones neuronales luego de la lesión, ya que está acompañada de procesos de revascularización, para abastecer de nutrientes y metabolitos al tejido nervioso, lo que consigue la reparación del tejido dañado y el control de la respuesta inmune. Por otro lado, la formación de la cicatriz glial puede ser un impedimento para la regeneración axonal, debido a que los astrocitos pueden producir moléculas inhibitorias, evitando la recuperación del SNC⁴². Sigue siendo tema de debate la función de la cicatriz glial como amiga o enemiga en el proceso de reparación del SNC⁴³.

1.1.7 Respuesta inmune en SNC causada por NCC

Cuando un patógeno ingresa a un órgano, el hospedero monta una respuesta innata inespecífica con una siguiente respuesta adaptativa específica para la destrucción del parásito. En NCC, mientras el quiste se mantenga viable, la persona infectada se mantiene asintomática porque el parásito es capaz de evadir activamente la respuesta inmune del hospedero. Cuando el quiste degenera, libera antígenos que son reconocidos por las células locales del cerebro, microglía y astrocitos, las cuales

liberan citoquinas proinflamatorias, que a su vez promueven la producción de metaloproteasas de matriz que alteran la BHE y permiten la entrada al cerebro de células del sistema inmune periférico⁴⁴. Todo el conjunto de células que ahora se encuentran alrededor del quiste producen mediadores inmunes, como citoquinas que finalmente son la principal causa de la presentación de síntomas. Existen diferentes estudios con diferentes resultados al estudiar la respuesta inmune en NCC, lo que implica la heterogeneidad en la respuesta debida a distintos factores. Estudios en modelos murinos sugieren que inicialmente se muestra una respuesta protectora para el hospedero (o de tipo Th1), etapa inflamatoria donde se muestran niveles altos de interleucina 2 (IL-2) e interferón gama (INF γ); luego existe un cambio hacia una respuesta permisiva para el parásito (o de tipo Th2) a medida que la infección progresa; esta es una etapa regulatoria caracterizada por altos niveles de interleucinas IL-4, IL-6 e IL-10. Este cambio de respuesta Th1 a Th2 puede ser la razón de que el parásito persista por largos periodos⁴⁵. Por otro lado, estudios en cerdos naturalmente infectados revelan niveles variados de marcadores inmunes en el hospedero según el estadio del parásito. Los quistes viables se encontraron asociados a niveles altos de IL-10 (respuesta regulatoria y antiinflamatoria tipo Th2); tejido en torno a quistes degenerados mostró niveles elevados de IFN γ , TNF α , IL-1b, IL-2, IL-6 e IL-8 (respuesta proinflamatoria tipo Th1) y tejidos asociados a quistes calcificados mostraron niveles elevados de interleucinas (IL-4, IL-10 e IL-6) y TNF α (respuesta antiinflamatoria, regulatoria y proinflamatoria tipo mixta Th1/Th2)⁴⁶.

De acuerdo a estudios inmunohistoquímicos, en muestras de cerebros de personas con NCC sintomática predomina una respuesta Th1, caracterizada por altos niveles de IL-12⁴⁷. Por otro lado, en otro estudio con pacientes con NCC asintomáticos vivos y utilizando la prueba de ELISA para la detección de citoquinas en suero, se

encontró que predomina una respuesta Th2 caracterizada por altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-13⁴⁸.

1.1.8 El cerdo como modelo de estudio para neurocisticercosis

El cerdo, hospedero intermedio natural de *T. solium*, se ha utilizado frecuentemente para estudios de NCC, ya que según descripciones histológicas la respuesta alrededor del parásito es muy similar a la respuesta en neurocisticercosis humana³⁰. Al igual que en el humano, los quistes viables generan una leve o nula respuesta inmune, mientras que la degeneración del quiste por causas naturales o debido al tratamiento con drogas antihelmínticas produce una respuesta inmune exacerbada⁴⁹. La respuesta inflamatoria ocasiona una compresión neural, astrogliosis, formación de granuloma y disrupción de la BHE⁵⁰.

Estudios en el Laboratorio de Neurocisticercosis de la UPCH utilizando cerebros de cerdos naturalmente infectados y el tinte vital azul de Evans han permitido identificar áreas en el cerebro donde la permeabilidad de la BHE se ha modificado. El tinte azul de Evans forma un complejo estable con la albúmina sérica, el cual es incapaz de atravesar la BHE intacta^{51,52}. Por lo tanto, si se inyecta el colorante a un animal vivo, posteriormente solo el tejido cerebral con la BHE alterada presentará coloración azul^{29,53,54}. Los cerebros de cerdos infectados con *T. solium* y tratados con drogas antihelmínticas contienen una mayor cantidad de quistes rodeados de tejido teñido de azul en comparación con los cerebros de cerdos infectados no tratados⁵⁴.

La respuesta inflamatoria se aprecia como estadios inflamatorios que pueden analizarse semi cuantitativamente siguiendo patrones descritos en el anexo 2 y que serán discutidos más adelante. El método semi cuantitativo mencionado permitió caracterizar la inflamación en el tejido cerebral alrededor del quiste (cápsula), y

demostrar que esta respuesta fue inducida o exacerbada por una dosis única y alta de Praziquantel. Se determinó que el tejido cerebral con disrupción en la BHE (teñido con azul de Evans) muestra niveles elevados de IL-6, IFN γ y TNF α , genes proinflamatorios asociados a una respuesta Th1. Además, los niveles de expresión de genes inmunoreguladores como IL-10 e IL-2Ra se encontraron disminuidos en torno a quistes teñidos comparados con los no teñidos (BHE intacta). También se encontraron niveles altos de otros marcadores de células reguladoras como CTLA4 y FoxP3, así como también altos niveles de dos metaloproteasas, MMP1 y MMP2, proteínas que participan en la regulación de la permeabilidad de la BHE y para las cuales se ha demostrado también un papel importante en el desarrollo de síntomas en pacientes con NCC^{29,55}. Por otro lado, otro grupo estudió cápsulas pericísticas colectadas de cerebros de cerdos infectados luego de aplicarles una dosis de Albendazol para inducir o exacerbar la respuesta inflamatoria alrededor del quiste. Este tratamiento se asoció a una respuesta inflamatoria tipo Th1, determinada por niveles elevados de las citoquinas IFN γ e IL-6, asociados a una disminución en los niveles de citoquinas regulatorias como IL-10 e IL-4⁵⁶. Estos estudios toman como unidad de análisis muestras en la zona de infección y no séricas, por lo que representa directamente a la inflamación local.

Los resultados de estos dos últimos reportes se obtuvieron utilizando dosis únicas de la droga (bien Praziquantel o Albendazol), con la finalidad de garantizar un cuadro inflamatorio en los cerdos tratados. Estudios posteriores llevados a cabo también por el laboratorio de Neurocisticercosis de la UPCH han trabajado con 12 cerdos naturalmente infectados con larvas de *T. solium*, a los cuales se les administró un tratamiento combinado de Praziquantel y Albendazol, similar al utilizado en pacientes con NCC humana²⁵. En este estudio se obtuvieron imágenes

de resonancia magnética nuclear (RMN) basales y post-tratamiento para cada uno de los cerdos, además se cuantificó el realce del Gd y se determinó la ubicación específica de cada uno de los quistes en el cerebro. Se sabe que el realce del Gd observado en las resonancias magnéticas de contraste está asociado al edema y a mayor permeabilidad de la BHE^{29,57}. Asimismo, un reciente estudio de nuestro grupo de trabajo, también en cerdos tratados, ha confirmado la relación entre el realce de contraste de RMN, tinción de azul de Evans y resultados de histopatología en inflamación pericística⁷, esto con la finalidad de relacionar la inflamación inducida por el tratamiento y las observaciones clínicas de las RMN, y ver la evolución de la enfermedad.

De esta manera, se desea continuar las investigaciones de este último trabajo, estudiando el perfil de la respuesta inmune post-tratamiento combinado con Praziquantel y Albendazol, y su relación con el realce del Gd de las RMN. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real se obtuvieron perfiles de expresión de la respuesta inmune de cada grupo de cerdos tratados. Se ha analizado distintos marcadores de la respuesta inmune, como citoquinas proinflamatorias (IL-6, IFN , TNF α) y citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13). Así mismo, se evaluó la relación entre los perfiles de expresión genética y el realce del Gd de la solución de contraste. La selección de los marcadores de respuesta inmune se estableció en base a resultados de investigaciones previas en las cuales se obtuvieron variaciones importantes en la expresión de estas citoquinas luego de una dosis alta de Praziquantel²⁹. Este trabajo también incluye la validación y selección del gen de referencia óptimo para la normalización de los datos por PCR en tiempo real.

1.2. Justificación

La neurocisticercosis (NCC) es la causa más importante de epilepsia secundaria en nuestro país y otros países en desarrollo. Estudios en humanos, animales e *in vitro* han demostrado la efectividad del Praziquantel y Albendazol cuando son usados aisladamente o combinados. Sin embargo, luego de la administración de las drogas existe una exacerbación inflamatoria entre los días 2 y 5 post tratamiento. En la actualidad se vienen planteando esquemas terapéuticos combinados con estas dos drogas pero sus efectos están siendo aún estudiados. Así, la exacerbación inflamatoria que conduce a las crisis convulsivas luego del tratamiento sigue siendo un problema. Este estudio en cerdos naturalmente infectados busca describir las bases de la respuesta inmune aguda. La RMN es el método más útil para el diagnóstico y seguimiento de NCC pero tiene la desventaja de no ser siempre accesible. Identificar marcadores de respuesta proinflamatoria o antiinflamatoria que correlacionen con imágenes de RMN aportaría una herramienta para conocer la evolución de la enfermedad y permitiría un monitoreo fino del tratamiento. Por lo tanto, la existencia de una relación significativa entre algún marcador inmune y la RMN apoyaría el uso de su perfil de expresión como una medida de inflamación en cerebro porcino, con la posibilidad de extrapolar estos resultados a NCC humana.

1.3 Hipótesis

En cerebros de cerdos naturalmente infectados con larvas de *Taenia solium*, el realce del Gd en la solución de contraste en tejido pericístico, tal como se observa por resonancia magnética, está relacionado con una respuesta inflamatoria inducida

por el tratamiento combinado con dos drogas antihelmínticas (Praziquantel y Albendazol).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general:

- Determinar la relación entre el realce del Gd de la solución de contraste empleada en RMN y la **respuesta inmune**, inducida por el tratamiento combinado con dos drogas antihelmínticas (Praziquantel y Albendazol), en cerebros de cerdos naturalmente infectados con larvas de *Taenia solium* (neurocisticercosis porcina).

Objetivos específicos:

1. Determinar el mejor gen de referencia, cuya expresión es más estable, para trabajar con muestras de cerebro de cerdo naturalmente infectado y tratado con drogas antihelmínticas, a fin de normalizar los datos de PCR en tiempo real.
2. Cuantificar mediante PCR en tiempo real la expresión de genes de citoquinas involucrados en procesos pro y antiinflamatorios en una colección de cápsulas de tejido cerebral pericístico colectadas de cerdos con NCC, con y sin tratamiento combinado de drogas antihelmínticas.
3. Evaluar la asociación entre los perfiles de expresión genética de citoquinas (pro y antiinflamatorias) y el realce de la solución de contraste basada en Gd en imágenes de RMN de cerebro porcino infectado antes y después del tratamiento combinado .

II Materiales y métodos

2.1 Animales y tratamiento

Las muestras provienen de un proyecto primario en el que se colectaron cápsulas pericísticas (tejido que rodea al quiste) de cerebros de cerdos naturalmente infectados con *Taenia solium*. La tabla 1 muestra la distribución de animales según el tratamiento: siete cerdos naturalmente infectados recibieron tres dosis de Praziquantel (Merck, Darmstadt, Germany) oral de 25mg/kg, separadas por 2 horas, solo el primer día de tratamiento, y Albendazol (Zentel, GlaxoSmithKline, Peru) 15 mg/kg/día dividido en dos tomas por 2 (4 cerdos; grupo T48) o 5 días (3 cerdos; grupo T120). Tres cerdos infectados no recibieron tratamiento para servir como controles (grupo NT). A todos los animales se les practicó una resonancia magnética nuclear (RMN) basal, previa al tratamiento antihelmíntico. Cumplidos los días del tratamiento, se realizó una segunda RMN (Protocolo T1 con solución de contraste, el Gd ingresa al cerebro, difunde en el tejido intersticial, y resulta en un incremento de la señal, de modo que el líquido se ve de color negro y la señal de la solución de contraste blanca con mayor brillo que el tejido que rodea) el mismo día del sacrificio. Dos horas antes del sacrificio se inyectó a los cerdos el colorante azul de Evans vía la arteria caudal auricular ubicada en una oreja (izquierda o derecha), pasada una hora se administró por la misma vía la solución de contraste (ácido dietilen-triamino pentacético de Gd (Gd-DTPA) para la toma de RMN. Los cerdos fueron anestesiados con ketamina (inyección intramuscular 10 mg / Kg, Agrovvetmarket SA, Perú) y xilazina (2 mg / Kg, Agrovvetmarket SA, Perú) para infusión intravascular y sacrificados al cabo de dos horas con pentobarbital sódico (100- 125 mg / Kg, inyección intravenosa, Agrovvetmarket SA, Perú). Luego del sacrificio se extrajeron los cerebros de los 10 cerdos naturalmente infectados y se colectaron 398 quistes,

211 se hallaron en el hemisferio izquierdo (HI) y 187 en el hemisferio derecho (HD). En la tabla 1 se muestra el número de quistes por cerdo que fueron incluidos en el análisis según los criterios de selección (ver sección 2.1.2). Las muestras de tejido pericístico se obtienen haciendo cortes cúbicos de aproximadamente 1 cm alrededor del quiste sobre hielo seco, las muestras tienen un peso aproximado de 100mg. Las muestras colectadas del HD fueron conservadas en formalina para estudios de histopatología, cuyos resultados se han publicado⁷ y las del HI fueron conservadas en una solución caotrópica (RNALater®, Qiagen) a -80°C. A partir de estas muestras se extrajo RNA y se evaluaron los perfiles de expresión de marcadores inmunes (citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias) mediante PCR en tiempo real. También se colectaron muestras aleatorias de cerebro de un cerdo sano para normalizar los datos de expresión genética.

2.1.1 Tipo de investigación

Análisis secundario, transversal, prospectivo y analítico.

2.1.2 Población de estudio

Se partió de un total de 211 muestras de tejido pericístico. Se utilizó toda la población de muestras conservadas bajo condiciones óptimas para extracción de ARN; en total fueron 87 de los cuales 51 fueron corticomeníngeos y 36 parenquimales (Tabla 1).

Criterios de inclusión (del estudio primario):

- Muestras conservadas correctamente y de forma apropiada para extracción de ARN.
- Tejidos pericísticos provenientes del hemisferio cerebral izquierdo.

Criterios de exclusión (del estudio primario)

- Fase calcificada del estadio larvario.
- Tejido pericístico sin correlato en RMN

2.2 Procedimientos

2.2.1 Extracción de ARN total

Una vez descongeladas, las muestras de 50-100 mg de tejido fueron transferidas a tubos con TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) para ser homogenizadas completamente. El ARN total se aisló siguiendo las indicaciones del fabricante; a saber, una etapa de extracción con fenol (TRIzol®) y cloroformo para la separación de fases, precipitación de la fase acuosa con isopropanol al 100%, lavado del precipitado con etanol al 75% y resuspensión en 50µl de agua libre de nucleasas. Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron en frío para conservar su integridad. La concentración del ARN extraído se determinó con el uso de NanoDrop (NanoDrop Products, Wilmington, DE) mediante espectrofotometría a 260nm y se estimó la calidad mediante la relación entre las absorbancias a 260nm y 280nm (A260/280), considerando valores iguales o mayores a 1.6. El ARN total extraído se llevó a una concentración final de 100ng/µl y se almacenó a -70 °C, en alícuotas para su uso en PCR.

2.2.2 Generación de ADNc por PCR transcripción reversa:

Se sintetizó ADNc a partir del ARN extraído empleando el kit comercial para transcripción reversa de alta capacidad, High Capacity cDNA Reverse transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se añadió 1µg de ARN total en una mezcla de reacción con oligómeros hexámeros aleatorios 1X como cebadores, mezcla de deoxinucleótidos 4mM, 50U de enzima polimerasa multiscrbe y solución tamponante para transcripción reversa 1X, en un volumen final de 20µl. El protocolo de reacción, previamente estandarizado en el laboratorio, es de 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 37 °C y 5 minutos a 95 C en un termociclador (MJ Research PTRC-200, BioRad-MJ Research, Hercules, CA). Las muestras de ADNc se guardaron a – 20 °C.

2.2.3 PCR cuantitativo en tiempo real

El perfil de expresión de genes seleccionados se determinó mediante PCR en tiempo real. Cada muestra se trabajó por duplicado en un volumen final de reacción de 10 μ l. Se agregó, por pocillo, 1 μ l de cada muestra a la mezcla de reacción universal Taqman 1X (Applied Biosystems, Foster City, CA) con sondas/cebadores Taqman específicos para los genes de interés de cerdo. Se utilizó el gen de referencia, determinado también en este trabajo (ver siguiente sección), para normalizar las lecturas. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en un termociclador PikoReal 96 (Thermo Scientific) empleando un protocolo estándar previamente probado en el laboratorio con una etapa de pre-incubación de 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C, y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C más 1 minuto a 60 °C. Según las directrices de guía MIQE⁵⁸ las curvas de calibración se generaron graficando el logaritmo de la dilución inicial de ADNc versus el valor de Ct de cada reacción para determinar los valores de pendiente y coeficientes de correlación (R^2). La eficiencia de cada sonda (E) se calculó mediante la siguiente ecuación:

59

2.2.4 Determinación de la estabilidad de los candidatos a genes de referencia

Se escogieron 4 candidatos a genes de referencia: 18S, Beta actina (ACTB), Histona H3 (H3F3A) y Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para comparar la estabilidad de expresión de cada uno de los genes, se utilizaron 5 de los programas mas usados para este fin en RT-qPCR:

- geNorm (<http://medgen.ugent.br/~jvdesomp/genorm>)
- NormFinder, (<http://moma.dk/normfinder-software>)
- Bestkeeper (<http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>),
- RefFinder (<http://fulxie.0fees.us/?type=reference>)
- método comparativo de Ct⁶⁰.

En el caso de los algoritmos de geNorm y NormFinder, los valores de Ct se convirtieron en cantidades relativas a través del método delta-Ct (Ct) usando la muestra con el menor Ct como normalizador, como se explica en la literatura⁶¹. Para el programa BestKeeper, el método comparativo de Ct y RefFinder, se utilizaron los valores de Ct.

2.3 Variables:

- Tratamiento: Esta variable presenta tres categorías: animales infectados sin tratamiento (cerdos controles), tratamiento de 48 horas (cerdos que fueron sacrificados luego de dos días de recibir una dosis combinada de antihelmínticos) y tratamiento de 120 horas (cerdos que fueron sacrificados luego de cinco días de recibir una dosis combinada de antihelmínticos). Esta variable es categórica.
- Realce del gadolinio: el realce del Gd se obtuvo de las imágenes de RMN tomadas el día inicial del estudio y en el día del sacrificio. Este realce está correlacionado con el edema, con la astrogliosis y con la disrupción de la barrera hematoencefálica^{55,62}. El realce se cuantificó alrededor del quiste, zona llamada tejido pericístico (Figura 3). Es una variable cuantitativa.

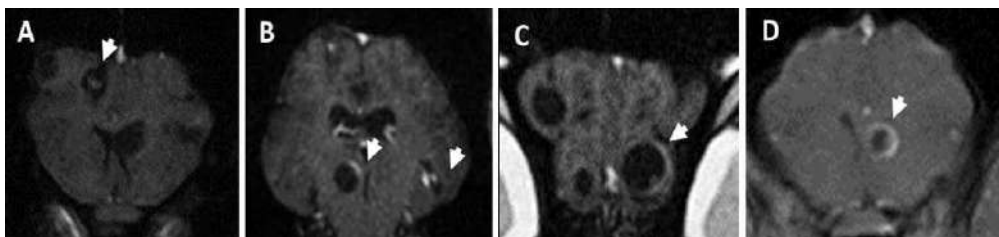


Figura 3. Cuantificación de realce de Gd. A,B,C,D: Un realce positivo se toma como una región donde hay una señal hiperintensa post-contraste; se mide tomando un perímetro alrededor del quiste donde esta la lesión (fecha blanca) y se determina la intensidad de grises, donde 0 es la menor intensidad (negro) y 256 el máximo valor (blanco o hueso). Los datos de cada píxel se promedian y se normalizan tomando a 256 como el 100% y calculando el porcentaje correspondiente para cada muestra. Las figuras A, B, C y D

muestran grados crecientes de realce, donde A no muestra realce alrededor del quiste y D representa el mayor realce.

- Respuesta inmune: interesan los niveles de expresión de IL-6, IFN , TNF α , IL-4, IL-10 e IL-13, de acuerdo a trabajo previo del laboratorio²⁹. Los niveles de expresión se refieren a la expresión relativa de cada gen (o marcador) con respecto al gen control de referencia según el método ⁶¹. La expresión de cada marcador es una variable cuantitativa.

2.4 Análisis estadístico

Exploración de la distribución de cada variable, análisis descriptivo. Se evaluó la normalidad de expresión de cada uno de los marcadores (IL-6, INF , TNF α , IL-4, IL-10 e IL-13) con las pruebas de Shapiro-Wilk, prueba de curtosis y simetría, para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas. Para el análisis bivariado:

- La expresión de cada marcador (variable cuantitativa) se comparó en los diferentes grupos de tratamiento mediante la prueba de Mann-Whitney.
- La relación entre los niveles de expresión de cada marcador y el realce de gadolinio se analizó usando una regresión lineal o multivariada (según el caso) estratificando este análisis de acuerdo a los grupos de tratamiento.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con un 95% de nivel de significancia usando el software estadístico Prism (Graphpad, San Diego, CA) versión 6. La licencia de este software está administrada por el laboratorio LID 115, el cual es la unidad operativa de este proyecto.

III Resultados

3.1 Grupos de trabajo

En la tabla 1 se muestran los grupos correspondientes al número total de muestras de tejido pericístico cerebral utilizado. T48 y T120 corresponden a los grupos de tratamiento. de 48 y 120 horas, respectivamente. De un total de 211 muestras pertenecientes al hemisferio izquierdo del cerebro, se incluyeron solo 87 en el trabajo final. Debido a una mala colección, mal almacenamiento, mala integridad del RNA almacenado o pérdida se excluyó el resto de las muestras. El total de muestras fueron cápsulas teñidas de azul, por lo que no se hace la subdivisión de grupos de claras/azules.

Tabla 1. Descripción general de los animales y muestras del estudio

Condición (grupo)	Código cerdo	Nuevo Código	Sexo	Total cápsulas	Ubicación	
					Corticomeníngea	Parenquimal
NT	9290	a	HEMBRA	8	3	5
NT	9291	b	HEMBRA	5	2	3
NT	17	c	MACHO	26	7	19
T48	9289	d	MACHO	11	6	5
T48	138	e	HEMBRA	3	3	0
T48	139	f	MACHO	5	4	1
T48	140	g	MACHO	7	6	1
T120	4574	h	HEMBRA	1	0	1
T120	9288	i	HEMBRA	3	2	1
T120	16	j	MACHO	18	18	0
Total (n)	N=10			87	51	36

NT: grupo de cerdos infectados no tratados. T48: tratados con PZQ y ABZ por 48h; T120: tratados con PZQ y ABZ por 120h

3.2 Selección y perfil de expresión de los candidatos a genes de referencia

Se escogieron cuatro genes candidatos para el análisis; estos difieren en vías y procesos biológicos, además de ser comúnmente usados en estudios de RT-qPCR y haber sido reportados como aquellos con mayor estabilidad para distintos tejidos de cerdo⁶³⁻⁶⁵. Las secuencias de las sondas y características de los genes candidatos

se muestran en la tabla 2. Para evaluar la estabilidad y abundancia de los genes se hicieron medidas de PCR en tiempo real, de donde se obtuvieron los valores de ciclos de cuantificación (Ct) en cada grupo de cerdos (sanos, infectados e infectados que recibieron tratamiento; ver en materiales y métodos). Para cada gen se midió la eficiencia de PCR, obteniendo valores alrededor de 1.93 y 2.12, con coeficientes de correlación entre 0.976 y 0.996. Haciendo un análisis general, el gen 18S tuvo los niveles de expresión mas elevados en el total de las muestras, equivalentes al menor promedio de valores de Ct (10.84 1.50), seguido de beta-actina (19.92 2.14), GAPDH (21.93 1.98) e histona H3 (22.87 1.70 figura 4).

Tabla 2. Candidatos a genes de referencia

Gen	Número de acceso ARNm	Nombre completo	Función	Eficiencia PCR	R ²
ACTB	DQ845171.1	Beta-actina	Proteína estructural de citoesqueleto	1.93	0.969
18S	X03205.1	18S ARNr eucariótico	Proteina de la maquinaria ribosomal	2.12	0.996
H3F3A	NM_213930.1	Histona H3, familia 3A	Proteína de unión a ADN	1.98	0.994
GAPDH	NM_001206359.1	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Enzima glicolítica	2.02	0.986

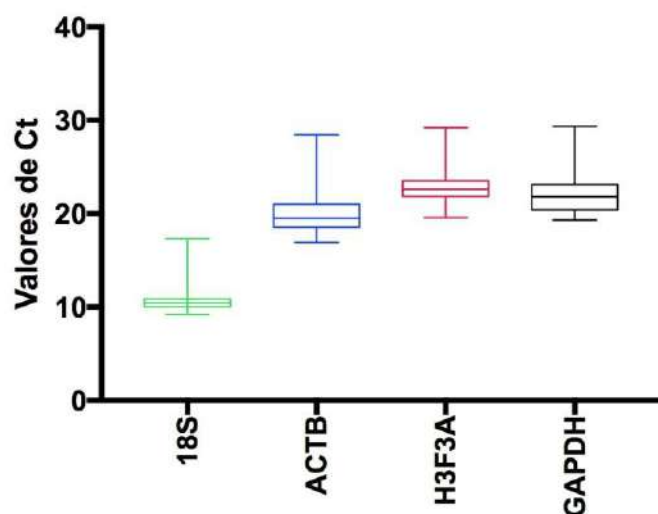


Figura 4. Distribución de valores de Ct de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras. La línea inferior, línea media y línea superior indican los percentiles de hasta 25, 50 y 75%, respectivamente.

3.2.1 Análisis de la estabilidad de expresión de los candidatos a genes de referencia

Los candidatos a servir como gen de referencia en este trabajo se analizaron con los programas y algoritmos más utilizados en esta clase de estudios: Método comparativo de Ct⁶⁰, BestKeeper⁶⁶, NormFinder⁶⁷, geNorm⁶⁸ (ver anexo 1) y RefFinder⁶⁹.

3.2.1.1 Análisis por RefFinder

RefFinder es una herramienta disponible online que se utiliza para asignar un ranking global final mediante el cálculo de una media geométrica ponderada de cada uno de los genes candidatos en base a cada programa analizado previamente (geNorm, Normfinder, BestKeeper y Método Δ Ct). Según el análisis hecho por RefFinder como se muestra en la tabla 3, el gen con mayor estabilidad es H3F3A.

Tabla 3. Análisis por RefFinder. Clasificación de los 4 candidatos a genes de referencia en base a su estabilidad de expresión.

Método	Orden de clasificación*			
	1	2	3	4
Delta Ct	H3F3A	GAPDH	ACTB	18S
BestKeeper	18S	H3F3A	GAPDH	ACTB
NormFinder	H3F3A	GAPDH	ACTB	18S
geNorm	H3F3A/GAPDH		ACTB	18S
Clasificación recomendada por RefFinder	H3F3A	GAPDH	ACTB	18S

* 1: Mejor gen de referencia. Orden descendente.

3.3 Regulación de marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios en tejido cerebral pericístico

Los niveles de expresión de cada uno de los marcadores seleccionados se calcularon utilizando como gen de referencia al gen de Histona H3, por ser el más recomendado por las herramientas informáticas NormFinder, Delta Ct, geNorm y RefFinder (ver sección 3.2.1). En relación a este gen, se calculó la expresión relativa de cada uno de los genes escogidos según el método de ⁶¹. Los valores obtenidos representan los cambios de cada marcador normalizado de acuerdo al gen de referencia y con relación al grupo de cerdos sanos no tratados. Una vez obtenidos los cambios de expresión para cada marcador, se hizo un análisis bivariado para comparar la expresión de cada uno de los marcadores, elegidos en base a un trabajo anterior²⁹, según el tiempo de tratamiento recibido. Se puede observar un incremento en la expresión de los genes proinflamatorios IL-6 e IFN a los dos días de tratamiento. Sin embargo, estos niveles disminuyen a los 5 días de tratamiento (tabla 4, y figura 5). La expresión del gen proinflamatorio TNF se incrementa recién a los 5 días de tratamiento, si bien existe un dato con un alto valor de expresión para este gen, este no se considera un outlier y se mantiene en el análisis debido a que su contraparte histológica y valor de realce de Gd es el más alto de toda la población de muestras. Asimismo, si este valor fuera retirado la tendencia y significancia de los resultados se mantienen iguales. Por otro lado, las citoquinas “antiinflamatorias” IL-13 e IL-4, también muestran incremento en su expresión a los 2 días de tratamiento, la cual en ambos casos desciende a los 5 días de tratamiento (tabla 4, y figura 6). A diferencia de los genes antes mencionados, no se ven cambios en la expresión del gen regulatorio IL-10 en ninguno de los dos grupos de tratamiento.

En la tabla 5 se muestran los resultados de expresión de cada uno de los genes y el realce de Gd estratificados por chanco según cada grupo de tratamiento. Se muestra también la ubicación de las capsulas en el cerebro, pero esto no será materia de análisis debido a que el grupo T120 solo posee un quiste ubicado en la zona parenquimal del cerebro.

Tabla 4. Cambio en los niveles de expresión de los genes proinflamatorios y antiinflamatorios y realce de gadolinio como efecto del tratamiento con Praziquantel más Albendazol.

	Control	T48h	T120h	Valor-p*		
	(n=39)	(n=26)	(n=22)	Control	Control vs	T48 vs
	Mediana	Mediana	Mediana	vs T48	T120	T120
	(Rango)	(Rango)	(Rango)			
TNF	18.02 (1.11-113.08)	20.56 (5-63.17)	51.29 (4.06-3946.21)	0.1406	<0.0001	0.0002
IL-6	1.51 (0.59-18.44)	3.95 (1.8-17.63)	2.24 (0.9-4.32)	<0.0001	0.0105	0.0033
INF	0.48 (0.06-1.67)	2.12 (0.28-7.06)	0.54 (0.1-2.43)	<0.0001	0.6847	<0.0001
IL-4	1.85 (0.03-19.89)	25.11 (0.9-47.14)	7.47 (1.72-26.06)	<0.0001	<0.0001	<0.0001
IL-13	2.59 (0.23-78.05)	21.57 (1.53-49.57)	7.65 (0.54-43)	<0.0001	0.0003	<0.0001
IL-10	2.16 (0.48-18.62)	5.15 (1.72-9.06)	4.14 (1.92-8.66)	0.0002	0.0018	0.4567
Realce **	33.34 (16.66-39.71)	32.74 (30.47-42.29)	35.76 (16.49-44.32)	0.1862	0.0023	0.1001

* Prueba de Mann-Whitney para diferencias entre grupos de tratamiento

** Valores basados en porcentaje, donde 256=100% (ver métodos)

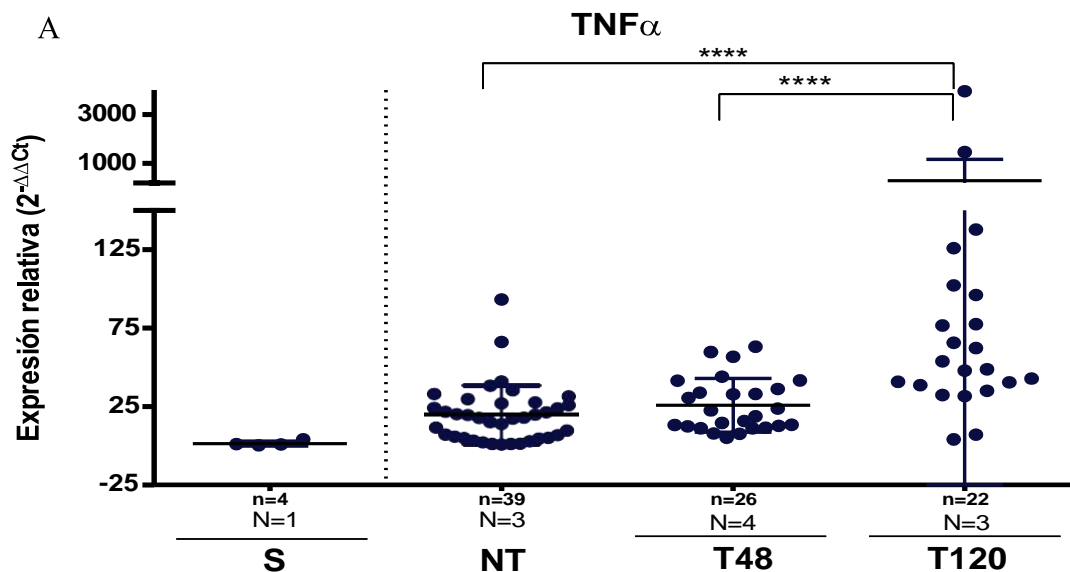
Tabla 5. Cambio en los niveles de expresión de los genes proinflamatorios, antiinflamatorios y realce de gadolinio como efecto del tratamiento con Praziquantel y Albendazol. Análisis individual, por cerdo. Los números bajo el nombre de cada grupo son los códigos de los animales, entre paréntesis se indica el número de quistes.

	Control			PZQ + ABZ 2d				PZQ + ABZ 5d		
	17 (26)	9291 (5)	9290 (8)	138 (3)	139 (5)	140 (7)	9289 (11)	16 (18)	9288 (3)	4574 (1)
	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)	Mediana (Rango)
TNF	21.57 (1.11-113)	3.61 (1.41-35.29)	7.24 (1.6-93.13)	30.51 (18.72-56.74)	41.68 (23.69-63-17)	32.93 (13.37-43.9)	11.4 (5-15.63)	58.08 (31.59-1464.56)	7.12 (4.06-47.88)	3946.21
IL-6	1.25 (0.59-9.61)	3.71 (2.1-18.44)	2.14 (1.51-3.99)	3.22 (3.16-4.26)	9 (2.52-17.63)	2.87 (1.89-5.41)	3.99 (1.8-8.06)	2.3 (1.62-4.29)	1.19 (0.9-4.32)	2.29
INF	0.51 (0.21-1.49)	0.31 (0.06-1.67)	0.5 (0.07-0.84)	2.27 (0.66-2.34)	1.55 (0.65-1.98)	1.96 (1.3-3.85)	2.83 (0.28-7.06)	0.4 (0.1-0.79)	1.01 (0.99-1.41)	2.43
IL-4	2.22 (0.48-19.89)	1.96 (0.89-13.92)	0.7 (0.03-1.41)	42.33 (34.87-44.9)	28.62 (14.66-36.47)	23.9 (10.4-44.75)	21.31 (0.9-47.14)	6.84 (1.72-21.76)	11.38 (3.86-13-35)	26.06
IL-13	2.94 (0.23-78.05)	3.58 (2.3-7.44)	1.05 (0.48-2.59)	21.72 (21.43-25.75)	22.41 (13.1-36.28)	33.97 (11.17-37.82)	17.52 (1.53-49.57)	7.65 (1.04-43)	0.79 (0.54-8.49)	15.2
IL-10	1.9 (0.48-18.62)	5.18 (3.75-16.61)	2.26 (0.63-4-64)	5.67 (2.55-7-36)	6.45 (1.98-9.06)	5.01 (3.1-8.57)	5.06 (1.72-7.28)	4.14 (1.92-8.66)	5.2 (2.2-7.67)	2.82
Realce	34.26 (24.11-41.85)	30.57 (25.01-39.71)	21.36 (16.66-26.46)	36.93 (30.53-44.12)	34.89 (30.71-42.11)	36.03 (29.31-42.63)	36.5 (31.15-45.81)	36.41 (23.84-49.89)	34.43 (27.66-41.85)	44.32
loc ^a										
CM	7 (27%)	2 (40%)	3 (38%)	3 (100%)	4 (80%)	6 (86%)	6 (55%)	18 (100%)	2 (67%)	1 (100%)
P	19 (73%)	3 (60%)	5 (62%)	0	1 (20%)	1 (14%)	5 (45%)	0	1 (33%)	0

^a CM: quistes localizados en región corticomeníngea, P: quistes localizados en región parenquimal

3.4 Realce de Gd en las muestras.

En la evaluación y manejo de NCC, el grado de realce de la solución de contraste en imágenes de RMN es una medida del nivel de inflamación en una lesión específica alrededor del quiste⁷⁰. Gracias a que se tomaron imágenes de RM a los cerdos antes y después del tratamiento, en estas se pudo identificar cada uno de los quistes colectados. Cada cápsula trabajada cuenta con valores de realce de solución de contraste Gd, los cuales se muestran en la tabla 4, última fila. El grupo control muestra algún grado de inflamación, indicado por la sola presencia de niveles de realce alrededor de los quistes, pese a no haber recibido tratamiento. Esto ocurre porque se desconoce el tiempo de infección en cerdos naturalmente infectados. Este hecho debe tomarse en cuenta para las consideraciones posteriores. No hay diferencias significativas en los niveles de realce entre el grupo control y el grupo con 2 días de tratamiento, pero sí entre el control y el grupo con 5 días de tratamiento (tabla 4).



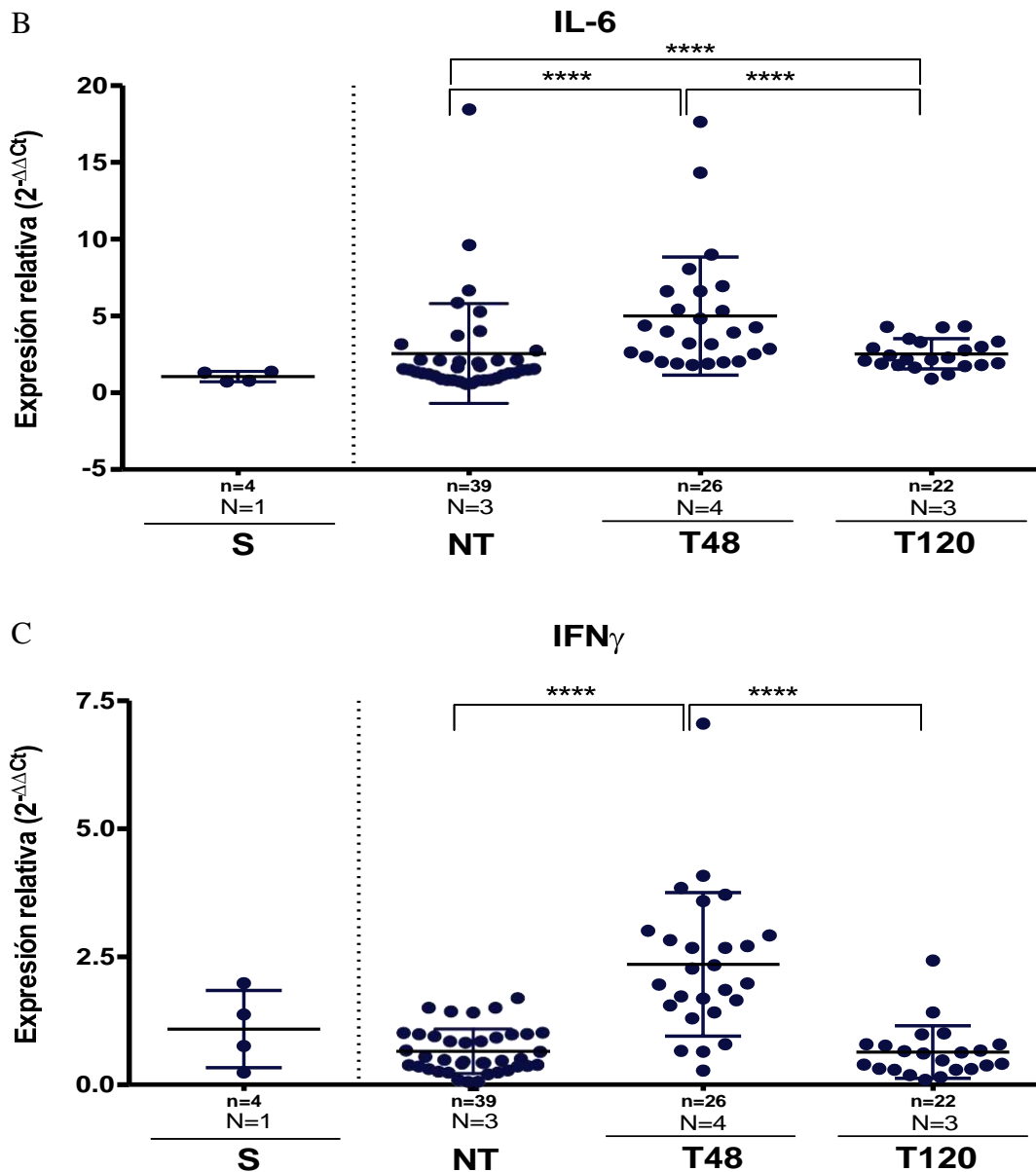


Figura 5. Regulación de genes proinflamatorios como efecto del tratamiento. Se muestran los niveles de expresión de tres genes (ADNc) cuantificados por PCR en tiempo real (RT-qPCR) (usando la fórmula) en tres tipos de muestras; tejido cerebral de cerdos infectados no tratados (control), tejido cerebral de cerdos infectados tratados con Praziquantel y Albendazol por 2 días (T48), y por 5 días (T120), para TNF (A), IFN (B) e IL-6 (C). La expresión relativa de cada uno de los genes representa las veces que se incrementó con respecto a un gen de referencia (Histona H3, H3F3A). Las barras representan las medias e IC95 para cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión génica se indican con asteriscos ($p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney). Los asteriscos representan un nivel de significancia: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$, ****: $p < 0,0001$).

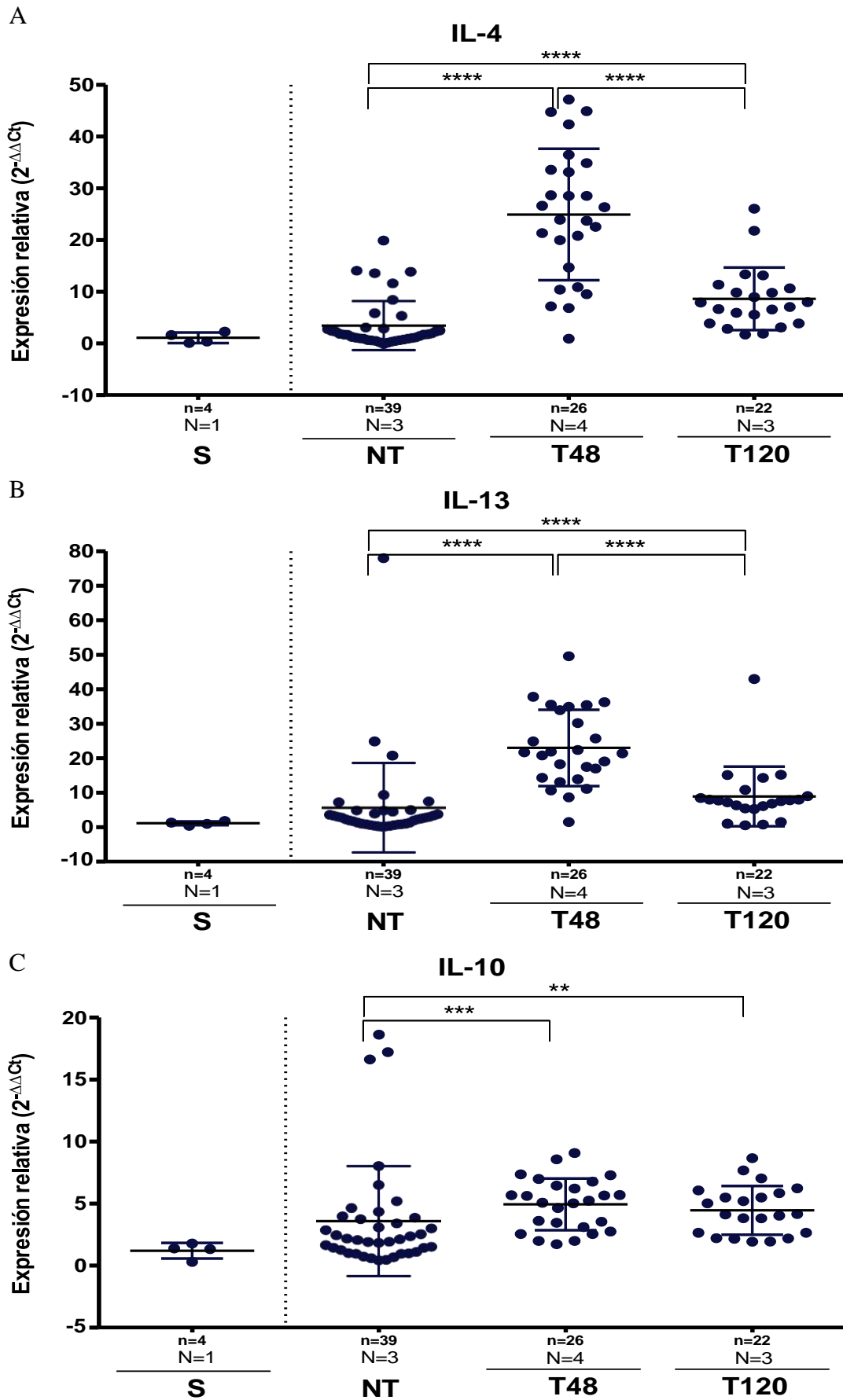


Figura 6. Regulación de genes antiinflamatorios como efecto del tratamiento. Se muestran los niveles de expresión de ADNc de tres genes cuantificados por PCR en tiempo real (RT-qPCR) en los diferentes tipos de tejido cerebral para IL-4 (A), IL-13 (B) e IL-10 (C). Las barras representan las

medias e IC95 para cada grupo. Las diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión génica se indican con asteriscos ($p < 0,05$, prueba de Mann-Whitney). Los asteriscos representan un nivel de significancia: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$, ****: $p < 0,0001$).

3.5 Relación entre marcadores de inflamación y realce de la solución de gadolinio

La presencia de realce de la solución de gadolinio en imágenes de RMN se considera comúnmente como una evidencia de alteración de la BHE. Experimentalmente, la presencia y grado de extravasación de azul de Evans (AE) después de su inyección intravascular en tejido cerebral es una medida directa de alteración de la BHE⁵³. Se ha demostrado la correlación positiva entre el realce de la solución de gadolinio, grado de extravasación de AE y resultados histopatológicos en cerdos tratados naturalmente infectados con NCC⁷. Por lo tanto, el grado de realce puede ser usado como una medida de inflamación en el cerebro. Para este trabajo se buscó determinar si la relación entre RMN e inflamación podía observarse en el componente molecular. El análisis de regresión para determinar si existe relación RMN – expresión de citoquinas fue ajustado por cerdo, ya que existe heterogeneidad entre los perfiles de expresión de cada uno de ellos (Tabla 5). En el grupo control que no recibió tratamiento no se encontró relación entre el realce y ninguno de los marcadores de inflamación. En el grupo de 2 días de tratamiento se halló una relación significativa con IFN e IL-13 ($p=0.019$, $p=0.021$, tabla 6). Por último, en el grupo de 5 días de tratamiento encontramos una relación significativa entre el realce y los marcadores proinflamatorios TNF e IFN ($p=0.006$, $p=0.01$, tabla 6). La relación con IL-6 no fue significativa ($p=0.06$), pero el valor de p está muy cercano al punto de corte y puede significar una relación.

Tabla 6. Análisis de regresión del realce de solución de gadolinio con cada uno de los marcadores en cada grupo de tratamiento.

	Control (coef, p)	R ² (R)	T48 (coef, p)	R ² (R)	T120 (coef, p)	R ² (R)
TNF	0.008, 0.79	0.001 (0.034)	-0.084, 0.11	0.156 (-0.394)	0.003, 0.01	0.128 (0.358)
IL-6	0.142, 0.37	0.006 (0.077)	-0.009, 0.93	0.001 (-0.031)	1.37, 0.06	0.045 (0.212)
IFN	2.601, 0.35	0.035 (0.187)	0.886, 0.02	0.114 (0.338)	5.255, 0.01	0.182 (0.427)
IL-4	0.376, 0.43	0.092 (0.303)	-0.078, 0.12	0.071 (-0.266)	0.237, 0.33	0.051 (0.226)
IL-13	0.122, 0.31	0.074 (0.272)	-0.087, 0.02	0.065 (-0.255)	0.172, 0.233	0.05 (0.224)
IL-10	0.203, 0.50	0.020 (0.14)	-0.299, 0.56	0.028 (-0.167)	-0.025, 0.907	0.001 (-0.031)

*Regresión lineal simple entre el realce de gadolinio y los niveles de expresión relativa de cada uno de los marcadores.

Según el análisis bivariado de cada marcador y el realce de gadolinio, se encuentra relación con un perfil proinflamatorio (TNF , IFN e IL-6) en el grupo de tratamiento de 5 días. Por lo tanto, existe la posibilidad de una relación de más de un marcador proinflamatorio con el realce, para lo cual se llevó a cabo una análisis multivariado. Como se muestra en la tabla 8, existe una relación significativa entre el par de marcadores IL-6 e IFN con el realce en el grupo de 5 días de tratamiento (tabla 7), de igual forma que para el par de marcadores TNF e IL-6 (tabla 8). Sin embargo, al comparar el par de marcadores TNF- e IFN- no se encontró relación significativa con el realce (tabla 9).

Tabla 7. Análisis de regresión múltiple entre el realce de la solución de gadolinio y marcadores proinflamatorios (IL-6 e IFN).

	Coef, Valor-p*		
	Control	T48	T120
	r ² = 0.1145	r ² = 0.0438	r ² = 0.247
IL-6	0.1615, 0.488	-0.0180, 0.902	1.066, 0.016
IFN	2.6683, 0.329	0.8873, 0.017	5.019, 0.011

* Regresión lineal múltiple entre el realce de gadolinio y los niveles de expresión relativa de cada uno de los marcadores

Tabla 8. Análisis de regresión múltiple del realce de la solución de gadolinio y marcadores proinflamatorios (TNF e IL-6).

	Coef, Valor-p		
	Control	T48	T120
	$r^2 = 0.0079$	$r^2 = 0.1782$	$r^2 = 0.1617$
TNF	0.0103, 0.710	-0.0964, 0.041	0.0025, 0.012
IL-6	0.1493, 0.333	0.1438, 0.067	1.1786, 0.014

* Regresión lineal múltiple entre el realce de gadolinio y los niveles de expresión relativa de cada uno de los marcadores

Tabla 9. Análisis de regresión múltiple del realce de la solución de gadolinio y marcadores proinflamatorios (TNF e IFN)

	Coef. Valor-p*		
	Control	T48	T120
	$r^2 = 0.0383$	$r^2 = 0.2022$	$r^2 = 0.1868$
TNF	-0.0134, 0.658	-0.0673, 0.252	0.0007, 0.178
IFN	2.9173, 0.301	0.596, 0.119	4.408, 0.026

* Regresión lineal múltiple entre el realce de gadolinio y los niveles de expresión relativa de cada uno de los marcadores

IV. Discusión

El uso del modelo porcino en el estudio de la neurocisticercosis ha permitido responder varias interrogantes sobre la respuesta inflamatoria cerebral generada o exacerbada por el tratamiento antihelmíntico. El cerdo es hospedero intermediario natural de la enfermedad, por lo que la obtención de cerdos infectados no requiere ninguna manipulación experimental, pero tiene la desventaja de que se trabaja sin conocer el tiempo de infección. Además, las semejanzas entre los cerebros del cerdo y humano son suficientes como para hacer comparaciones patológicas. La

RMN es una de las pruebas diagnósticas no invasivas más utilizadas por los médicos para el manejo de NCC. Su aplicación en cerdos infectados ha confirmado que el realce de Gd correlaciona con una alteración en la permeabilidad de la BHE y con inflamación cerebral definida histológicamente⁷. La presente investigación buscó identificar una relación entre la expresión de uno o más marcadores de respuesta inflamatoria y el realce de Gd en imágenes de RMN, y confirmar la relación entre los resultados de RMN y la inflamación a nivel de expresión de genes. Esta relación puede servir como un predictor de inflamación para poder seguir de manera mas fina la evolución de la enfermedad y dirigir el tratamiento.

El principal hallazgo de esta investigación es confirmar, en cerebros de cerdos infectados, una relación positiva entre el realce de Gd y un perfil proinflamatorio a nivel de expresión génica (TNF e IFN) a los 5 días de tratamiento antihelmíntico (tabla 4), resultado que concuerda con estudios previos en modelo porcino que relacionan la inducción de inflamación y alteración de la BHE como consecuencia de un tratamiento agudo con Praziquantel^{29,54}. Del mismo modo, estos resultados concuerdan con observaciones clínicas en pacientes, que encuentran aumento del realce de Gd en zonas alrededor del quiste post tratamiento^{71,72}.

4.1 Presencia de inflamación y realce en las imágenes de resonancia

En este trabajo se presentó que todos los grupos de cerdos mostraban realce de Gd en las MRN, pero las diferencias fueron significativas para los grupos de cerdos control y el grupo de tratamiento T120 (Tabla 4). Este realce es clínicamente una medida indirecta de la presencia de inflamación alrededor del quiste^{7,70}

Es importante mencionar que poseemos información de la contraparte histológica de este grupo de muestras, de un estudio paralelo en el cual se trabajó con tejidos provenientes del hemisferio derecho (se utilizó el HI en este trabajo), donde se utilizó

IHC para determinar los estadios inflamatorios (score de inflamación) alrededor del quiste y el daño de las estructuras del quiste (score de daño)⁷.

La clasificación de los estadios inflamatorios sigue criterios adaptados a partir de parámetros planteados por otro grupo de investigación^{30,31}. Básicamente, se habla de cuatro estadios inflamatorios (IS1-IS4) en orden ascendente en extensión y gravedad de la reacción inflamatoria alrededor del quiste (ver anexo 2). Se encontró que el grupo de cerdos que no recibió tratamiento no tuvo tejidos con estadios IS4, mientras que los grupos de cerdos que recibieron praziquantel y albendazol (por 48h y 120h) presentaron un número reducido de quistes rodeados de tejido con estadios inflamatorios IS1 e IS2; la mayoría de los tejidos colectados presentaron estadio IS3⁷. Esta fase se caracteriza por encontrar una capa rica en eosinófilos alineados alrededor del quiste seguida de una capa de células epitelioides y algunas células gigantes multinucleadas, y todo rodeado de un infiltrado de células inmunes. Solo se encontraron estadios inflamatorios IS4 en los grupos tratados, donde el número de células gigantes multinucleadas aumenta y el infiltrado aumenta al doble del estadio IS3 (ver anexo 3). De la misma forma, se halló mayor daño en las estructuras del quiste en los grupos de cerdos que recibieron tratamiento⁷³. La presencia mayoritaria de estadios inflamatorios IS3 (y también la aparición de estadios IS4) en los grupos tratados confirma que efectivamente la administración del tratamiento estimuló o aumentó la respuesta inflamatoria alrededor del quiste y la identidad de las células presentes (células gigantes multinucleadas y células epitelioides) puede ser el reflejo de los niveles elevados de TNF a los 5 días post tratamiento.

Existe un estudio en el cual se correlacionó un perfil inflamatorio (elevación de IL-6) con el realce en imágenes de RMN en las cisternas de pacientes con NCC subaracnoidea. La expresión de citoquinas en LCR se midió por ELISA en pacientes

previamente tratados con Albendazol y corticoesteroides ⁷⁴. La zona en el cerebro en la cual se encontró relación con el realce es distinta a la de este trabajo, al igual que el tratamiento utilizado, pero ambos casos correlacionan positivamente con perfiles proinflamatorios. La importancia del presente trabajo es que se observó directamente la zona afectada en el cerebro (tejido cerebral pericístico), responsable directa de la respuesta inflamatoria, asociada directamente a la manifestación de síntomas en pacientes tratados.

4.2 Respuesta mixta post tratamiento

El efecto del tratamiento con antihelmínticos, como Praziquantel y Albendazol, sobre la respuesta de citoquinas en el modelo porcino ha sido probado, pero por separado^{29,56}. Praziquantel y Albendazol provienen de derivados distintos, Praziquantel deriva de pirazinoisoquilona, mientras Albendazol es un derivado de benzimidazol, por lo que estas drogas poseen diferentes mecanismos de acción. Probablemente ambos antihelmínticos afectan de manera distinta la expresión de citoquinas en el hospedero. El tratamiento con Praziquantel estimula la expresión de citoquinas relacionadas a una respuesta proinflamatoria (IFN , IL-6 y TNF) y disminuye la expresión de marcadores inmunoregulatorios (IL-10)²⁹. Asimismo, el Albendazol provoca una respuesta proinflamatoria (IFN , IL-6)⁵⁶. Aunque el uso por separado de estas drogas provoca respuestas similares en los perfiles de expresión de citoquinas proinflamatorias, su uso combinado no necesariamente cumplirá con estos mismos patrones.

En este trabajo se encuentra que el uso combinado provoca una respuesta mixta proinflamatoria y antiinflamatoria (IFN , IL-6, IL-4, e IL-13) (Tabla 4, Figuras 5 y 6) a los dos días de tratamiento. Es importante mencionar que se trabajó con un grupo de cerdos con la particularidad de ya presentar inflamación previa al tratamiento,

como muestra el realce de Gd en las imágenes de RMN y los niveles elevados de TNF (Tabla 4) en los cerdos que no recibieron tratamiento. Esto induce a pensar que existiría un escenario de “alerta” a cualquier alteración de la homeostasis ya alcanzada en el cerebro, y por esto la presencia de la respuesta mixta al enfrentar los cerdos al tratamiento. La modulación de la respuesta inmune producto del tratamiento (Praziquantel y Albendazol) ha sido estudiada en otras infecciones con helmintos, como *Schistosoma mansoni*, encontrando un perfil mixto de citoquinas⁷⁵.

Se observa que la respuesta mixta encontrada a los dos días de tratamiento es vencida ya que los niveles de las citoquinas, tanto proinflamatorias como antiinflamatorias disminuyen al quinto día de tratamiento, posiblemente debido al estímulo prolongado del tratamiento por cinco días. Esta deducción se apoya en la disminución de la expresión de citoquinas antiinflamatorias y el aumento de la expresión de TNF, potente activador de inflamación. La infección con helmintos ha sido asociada con la modulación de la respuesta inmune de su hospedero, mientras los parásitos sigan viables en el organismo⁷⁶. La población de muestras aquí trabajadas incluye quistes degenerados, no viables, los cuales ya habían perdido la capacidad de modular la respuesta inmune: el hospedero monta una respuesta inflamatoria para su eliminación⁷⁷, evidenciado aquí por los niveles elevados de TNF.

4.3 Altos nivel de TNF

La expresión de TNF se encontró elevada ya antes del tratamiento y se ve siempre asociada al realce de Gd, relación que se confirma al quinto día de tratamiento (tabla 6). TNF es quizás uno de los principales iniciadores de inflamación y está muy relacionado a lesiones en el cerebro, donde experimenta un rápido aumento de expresión. Estudios clínicos de desórdenes inflamatorios, como encefalitis por VIH y

meningitis, muestran niveles elevados de TNF bajo condiciones normales del SNC, sin alteración de la BHE.^{78,79} TNF puede ser producido localmente por astrocitos y microglía⁸⁰. Cuando la BHE está alterada, a la producción local de TNF se agrega un aporte periférico importante, como es en este caso, donde el tejido pericístico extraído está mayoritariamente conformado por infiltrado de células periféricas.

4.4 Modelo de inflamación

Si bien no se han identificado las poblaciones celulares en nuestra muestra, se sabe que existe una participación conjunta de las células inmunes periféricas y las células del SNC, astrocitos y microglía, en el proceso inflamatorio. El astrocito cumple roles importantes en la mantención, alteración y reparación de BHE en el SNC³². En NCC porcina se ha reportado la presencia de astrogliosis y formación de una cicatriz glial que rodea al parásito degenerado^{50,81}. La formación de esta cicatriz puede servir como un aislador de inflamación que permite que no se dañen o sigan dañado zonas del cerebro⁸². Se sabe también que en respuesta a diferentes estímulos, tanto la microglía como astrocitos sobre expresan moléculas del Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (cumplen un rol de células presentadoras de antígeno, APC) y de citoquinas proinflamatorias como TNF e IL-6⁸³. Hemos encontrado que existe un aumento de la producción de TNF en respuesta al tratamiento (al día 5), el tratamiento puede ser un estímulo para que se libere nuevamente antígeno al medio, haya una reactivación de astrocitos y microglías, y sean estas células las responsables del aumento en la expresión de TNF encontrado. Asimismo, la presencia mayoritaria de estadios inflamatorios IS3 e IS4 en los grupos tratados confirma que efectivamente la administración del tratamiento estimula o aumenta la respuesta inflamatoria alrededor del quiste y la identidad de las células presentes (células gigantes multinucleadas y células epiteloides) podrían ser también, junto

con los astrocitos y microglías reactivas, los responsable de los altos niveles de TNF encontrado (Figura 6).

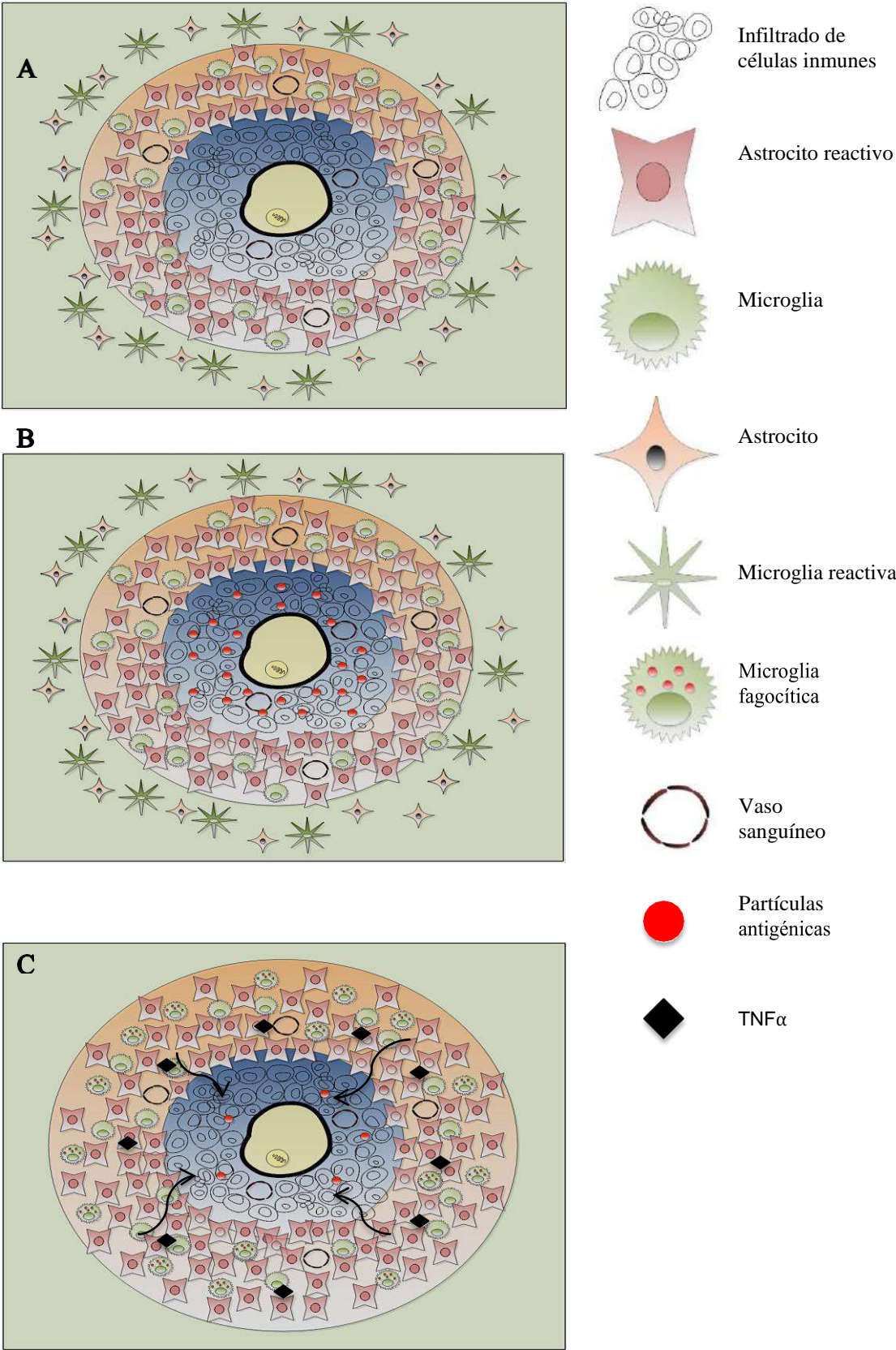


Figura 6. Modelo de reactivación de astrocitos y microglías como producto del tratamiento. A) se muestra el granuloma formado alrededor del quiste conformado por un infiltrado celular (células inmunes periféricas) generalmente eosinófilos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, seguido de una cicatriz gliar conformada por astrocitos y microglías reactivas (células del SNC). B) Luego de recibir el tratamiento es posible que el quiste, que se encuentra en proceso de degeneración, libere antígenos al medio, e C) interactúen con células residentes del SNC como astrocitos y microglías, y produzcan citoquinas proinflamatorias, como TNF .

4.5 Histona 3, gen de referencia

Este trabajo también incluye la selección y validación de un gen de referencia para la normalización de los datos, bajo nuestras condiciones experimentales y el tipo de tejido utilizado. La PCR en tiempo real es una de las técnicas de cuantificación de expresión de genes más usadas. Su alta sensibilidad y reproducibilidad dan la posibilidad de medir un gran cantidad de muestras y genes en simultáneo. Sin embargo, existen muchos factores que pueden afectar la obtención de datos, y la selección del mejor gen de referencia es uno de los más críticos. Un gen de referencia, o gen constitutivo, es aquel gen que debe expresarse de forma constante en todas las muestras bajo las condiciones experimentales elegidas. Sin embargo, encontrar un gen que cumpla con todas estas características no es algo trivial^{84,85}. Para un análisis preciso de expresión de genes por PCR en tiempo real la validación y selección de genes de referencia es crucial⁵⁸.

Existen estudios de validación y selección de genes de referencia para el modelo porcino⁶³⁻⁶⁵, pero muy pocos toman en cuenta el tejido cerebral en sus análisis. Así mismo, los estudios reportados demuestran heterogeneidad en los resultados^{64,65,86}. Debido a la falta de consenso en los resultados y a la ausencia de estudios en muestras cerebrales bajo nuestras condiciones experimentales, fue necesario

seleccionar y validar genes de referencia para nuestro modelo. El análisis global de 5 programas encontró que la variación en la expresión de los genes candidatos elegidos no muestran diferencias sustanciales (tabla 3), y mostró que el gen de Histona H3 sería el más estable a nivel de expresión y el óptimo para la normalización de los datos, sin invalidar a los otros como genes de referencia. Existen trabajos publicados con tipo de muestra similar al nuestro, en los cuales se utiliza los genes beta actina y 18S como genes de referencia, pero no explican el método de selección y validación para su uso^{29,56}.

4.6 Observaciones finales

Comúnmente se utiliza la cuantificación de ARNm como una aproximación de la concentración y actividad de su proteína correspondiente. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la expresión genética puede estar regulada en ambos puntos, ARN y proteína. Además, la cantidad de proteína producida por una molécula de ARN puede variar según el tejido o condición experimental. Teniendo en cuenta la vida media de las moléculas de ARNm de los genes medidos en este trabajo, sabemos que oscilan entre 30 y 60 minutos⁸⁷⁻⁸⁹ y según los tiempos de medición post tratamiento que realizamos sí tenemos una expresión representativa de ese punto de tiempo. Si bien los cambios a nivel de expresión de ARN no siempre reflejan la producción final de proteína, este tipo de estudios son muy útiles para la identificación de potenciales candidatos para su estudio a nivel proteico.

Este es el primer trabajo que estudia la modulación de la respuesta inmune, a nivel genético. Además, el uso combinado de estas drogas es usualmente el tratamiento de pacientes, acompañado con la administración previa de corticoesteroides para evitar complicaciones por la inflamación que causa la destrucción de los parásitos.

Previamente se ha demostrado que existe un efecto de la ubicación de los quistes en el cerebro sobre la inflamación post tratamiento⁷, si bien se cuenta con este dato, esta asociación solo es significativa en el grupo tratado por 5 días. Debido a la identidad de nuestras muestras, solamente tuvimos un quiste en la zona parenquimal del cerebro (HD) para el grupo T120, lo que hace imposible incluir el análisis por ubicación en el cerebro. Sin embargo, tomando en cuenta que la mayoría de quistes en el grupo T120 tienen ubicación corticomeníngea, donde la inflamación es menor post tratamiento comparado con quistes parenquimales, la modesta relación hallada entre el realce de Gd y el perfil proinflamatorio tiene mayor relevancia aún. Es decir, con más muestras parenquimales puede predecirse una mayor asociación.

Existen estudios en cerdos sobre la respuesta inflamatoria asociada con el grado de degeneración de los quistes en el cerebro, mostrando que los resultados encontrados en cerdos correlacionan muy bien con los hallados en humanos. Las células presentes en el granuloma de ambas especies son del mismo tipo (células plasmáticas, linfocitos B y T, macrófagos, mastocitos) rescatando la abundante eosinofilia encontrada en cerdos, que no ocurre en humanos^{30,31}. Este hecho podría resaltar la posibilidad de medir marcadores inmunes como es el caso de IL-5, principal molécula encargada de la regulación de funciones y supervivencia de eosinófilos. Este trabajo no incluyó la medición de este marcador, ya que se basa principalmente en aquellos mediadores inmunes reportados que están altamente relacionados al aumento de la respuesta inflamatoria y asociados a la presencia de síntomas⁴⁴.

El presente trabajo busca aportar nuevos conocimientos a las bases inmunes de la respuesta inflamatoria en NCC post tratamiento antihelmíntico y su relación con resultados clínicos dados por la RMN. El trabajo *in vivo* con el cerdo implica una

labor de logística compleja y con muchas limitaciones; los cerdos de campo no constituyen poblaciones homogéneas. En este estudio se trabaja con tiempos de exposición al tratamiento en torno a la primera semana, debido a que la experiencia clínica asocia la presencia de síntomas post tratamiento a este tiempo. Este modelo ya ha dado aportes importantes en entender las bases inmunes de la enfermedad^{7,29,53,54,90}. El humano infectado por *T. solium* puede o no presentar síntomas y si estos se presentan ocurren años después de que se adquirió la infección. Por lo que, representar en el modelo porcino el prolongado tiempo de infección que ocurre en el humano, era un factor limitante, que se intentó superar al incluir algunos chanchos con tres o más años en cautiverio (marcados en gris en tabla 5), con infección por *T. solium* detectada el día de captura. Existen limitaciones de trabajo, como la variada carga parasitaria entre cada uno de los cerdos, las diferencias entre cerdos a la respuesta del tratamiento y las posibles diferencias que pudiera haber entre las observaciones en el cerdo y su contraparte humana. A pesar de esto, los resultados obtenidos y las relaciones encontradas entre las imágenes de RMN y la expresión de ciertas citoquinas pueden ser una muy buena herramienta para seguir mejorando el manejo de la enfermedad.

Los resultados encuentran una relación positiva entre un perfil proinflamatorio y el realce de la solución de Gd en las imágenes de resonancia a los 5 días de tratamiento. Se ha encontrado principalmente la relación con el TNF , pero el realce encontrado debe ser causa de varios factores y la acción conjunta de un grupo de mediadores inflamatorios. La interpretación de la respuesta inmune a los 2 días de tratamiento, dada por la expresión de los marcadores utilizados como respuesta al tratamiento, es compleja ya que nos encontramos en un panorama mixto, donde quizás el estudio de otros componentes inmunes pueda esclarecer el rol de la respuesta regulatoria en este punto de la enfermedad. Más estudios con este

modelo, por ejemplo identificando las poblaciones celulares que participan en la respuesta inflamatoria alrededor del quiste, pueden brindar información del rol tanto de la inmunidad local (células como microglía y astrocitos) como periférica. Estos resultados son la base para próximos trabajos que analicen los componentes proinflamatorios en muestras serológicas, determinen su relación con las observaciones en cerebro, y permitan proponer marcadores como predictores de inflamación cerebral.

V Conclusiones

- El gen de Histona H3 es el mejor gen de referencia para normalizar los datos de PCR en tiempo real para muestras de tejido cerebral porcino en las presentes condiciones experimentales.
- El tratamiento combinado con PZQ y ABZ promueve una respuesta mixta proinflamatoria y antiinflamatoria (TNF , IFN , IL-13 e IL-4) en el segundo día de tratamiento, con una subsecuente disminución de los niveles de expresión de las citoquinas IL-4, IL-13, IL-6, IFN e IL-10 luego de cinco días de tratamiento. Una excepción fue el gen de TNF que se encontró elevado previo al tratamiento y aumentó hasta el quinto día.
- Se encontró una relación positiva entre el realce de la solución de contraste en las RMN y la expresión de genes proinflamatorios, como TNF e INF , al quinto día post tratamiento.

Recomendaciones

- La respuesta inmune no depende de un solo factor, por lo que es necesario explorar otros marcadores inmunes que puedan relacionarse directamente a las observaciones mediante RMN.
- La prolongación del tratamiento por más de 5 días traería mayor información de lo que pueda pasar después con la respuesta inmune reflejada en la expresión de sus componentes inmunes.

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García, H. H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A. W. & Gilman, R. H. Taenia solium cysticercosis. *Lancet (London, England)* **362**, 547–56 (2003).
2. Nash, T. E. *et al.* Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology* **67**, 1120–7 (2006).
3. Singh, G., Burneo, J. G. & Sander, J. W. From seizures to epilepsy and its substrates: neurocysticercosis. *Epilepsia* **54**, 783–92 (2013).
4. Ong, S. *et al.* Neurocysticercosis in radiographically imaged seizure patients in U.S. emergency departments. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 608–13 (2002).
5. Garcia, H. H., Gonzalez, A. E. & Gilman, R. H. Cysticercosis of the central nervous system. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 423–427 (2011).
6. Nash, T. E. & Garcia, H. H. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nat. Rev. Neurol.* **7**, 584–94 (2011).
7. Cangalaya, C. *et al.* Perilesional Inflammation in Neurocysticercosis - Relationship Between Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging, Evans Blue Staining and Histopathology in the Pig Model. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004869 (2016).
8. Del Brutto, O. H. & Garcia, H. H. Neurocysticercosis. *Handb. Clin. Neurol.* **114**, 313–25 (2013).
9. Flisser, A. Taeniasis and cysticercosis due to Taenia solium. *Prog. Clin. Parasitol.* **4**, 77–116 (1994).
10. Kotpal, R. Modern Text Book of Zoology: Invertebrates. (2012).
11. Escobar, A. The pathology of neurocysticercosis. In: Palacios, E., Rodr'iguez-Carvajal, J., Taveras, J.M.(Eds.), Cysticercosis of the Central Nervous System. Charles C. Thompson. *Springfield IL*, pp, 27–54 (1983).
12. Del Brutto, O. H. Neurocysticercosis in infants and toddlers: report of seven cases and

- review of published patients. *Pediatr. Neurol.* **48**, 432–5 (2013).
13. Alvarez, J. I. *et al.* The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J. Neuroimmunol.* **127**, 139–44 (2002).
 14. Garcia, H. H., Nash, T. E. & Del Brutto, O. H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet. Neurol.* **13**, 1202–1215 (2014).
 15. Estañol, B., Corona, T. & Abad, P. A prognostic classification of cerebral cysticercosis: therapeutic implications. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **49**, 1131–4 (1986).
 16. Bickerstaff, E. R., Cloake, P. C. P., Hughes, B. & Smith, W. T. The racemose form of cerebral cysticercosis. *Brain* **75**, 1–18 (1952).
 17. Garcia, H. H. *et al.* Pharmacokinetics of combined treatment with praziquantel and albendazole in neurocysticercosis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **72**, 77–84 (2011).
 18. Salford, L. G., Nittby, H. & Persson, B. R. R. Effects of Electromagnetic Fields From Wireless Communication upon the Blood-Brain Barrier. (2012). at http://www.bioinitiative.org/report/wp-content/uploads/pdfs/sec10_2012_Effects_Electromagnetic_Fields_Wireless_Communication.pdf
 19. Espíndola, N. M. *et al.* Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3178–84 (2005).
 20. Tsang, V. C., Brand, J. A. & Boyer, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* **159**, 50–9 (1989).
 21. Rosas, N., Sotelo, J. & Nieto, D. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* **43**, 353–6 (1986).

22. Nash, T. E. & Neva, F. A. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N. Engl. J. Med.* **311**, 1492–6 (1984).
23. Murthy, J. M. & Subba Reddy, Y. V. Prognosis of epilepsy associated with single CT enhancing lesion: a long term follow up study. *J. Neurol. Sci.* **159**, 151–5 (1998).
24. Sotelo, J., Escobedo, F., Rodriguez-Carbajal, J., Torres, B. & Rubio-Donnadieu, F. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N. Engl. J. Med.* **310**, 1001–7 (1984).
25. Garcia, H. H. *et al.* Efficacy of combined antiparasitic therapy with praziquantel and albendazole for neurocysticercosis: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet. Infect. Dis.* **14**, 687–95 (2014).
26. Mahanty, S. *et al.* Sensitive in vitro system to assess morphological and biochemical effects of praziquantel and albendazole on *Taenia solium* cysts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 211–7 (2011).
27. Kramer, L. D. Medical treatment of cysticercosis--ineffective. *Arch. Neurol.* **52**, 101–2 (1995).
28. Nash, T. E., Mahanty, S., Garcia, H. H. & Cysticercosis Group in Peru. Corticosteroid use in neurocysticercosis. *Expert Rev. Neurother.* **11**, 1175–83 (2011).
29. Mahanty, S. *et al.* Post-treatment vascular leakage and inflammatory responses around brain cysts in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003577 (2015).
30. Londoño, D. P., Alvarez, J. I., Trujillo, J., Jaramillo, M. M. & Restrepo, B. I. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: Immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet. Parasitol.* **109**, 249–259 (2002).
31. Alvarez, J. I. *et al.* Granuloma Formation and Parasite Disintegration in Porcine Cysticercosis: Comparison with Human Neurocysticercosis. *J. Comp. Pathol.* **127**, 186–193 (2002).
32. Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the

- blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41–53 (2006).
33. Seiffert, E. *et al.* Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J. Neurosci.* **24**, 7829–36 (2004).
 34. Vázquez-Chona, F. & Geisert, E. E. N-cadherin at the glial scar in the rat. *Brain Res.* **838**, 45–50 (1999).
 35. Fawcett, J. W. & Asher, R. A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* **49**, 377–91 (1999).
 36. Claycomb, K., Johnson, K., Winokur, P., Sacino, A. & Crocker, S. Astrocyte Regulation of CNS Inflammation and Remyelination. *Brain Sci.* **3**, 1109–1127 (2013).
 37. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).
 38. Banks, W. A. & Erickson, M. A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol. Dis.* **37**, 26–32 (2010).
 39. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16**, 1–13 (2004).
 40. Geisert, E. E., Murphy, T. P., Irwin, M. H. & Larjava, H. A novel cell adhesion molecule, G-CAM, found on cultured rat glia. *Neurosci. Lett.* **133**, 262–6 (1991).
 41. Neugebauer, K. M., Tomaselli, K. J., Lilien, J. & Reichardt, L. F. N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell Biol.* **107**, 1177–87 (1988).
 42. Rolls, A., Shechter, R. & Schwartz, M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 235–41 (2009).
 43. Sofroniew, M. V. Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neurosci.* **11**, 400–407 (2005).
 44. Singh, S. K. & Prasad, K. N. Immunopathogenesis of Neurocysticercosis: Role of Cytokines. *Immunome Res.* **11**, 1–4 (2015).

45. 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).
46. Singh, A. K. *et al.* Immune responses to viable and degenerative metacestodes of *Taenia solium* in naturally infected swine. *Int. J. Parasitol.* **43**, 1101–7 (2013).
47. Restrepo, B. I., Llaguno, P., Sandoval, M. A., Enciso, J. A. & Teale, J. M. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J. Neuroimmunol.* **89**, 64–72 (1998).
48. Chavarría, A. *et al.* TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* **5**, 1109–15 (2003).
49. Nash, T. E., Bartelt, L. A., Korpe, P. S., Lopes, B. & Houpt, E. R. Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **90**, 318–21 (2014).
50. 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**, 242–250 (2009).
51. Allen, T. H. & Orahovats, P. D. Combination of toluidine dye isomers with plasma albumin. *Am. J. Physiol.* **161**, 473–82 (1950).
52. Patterson, C. E., Rhoades, R. A. & Garcia, J. G. Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J. Appl. Physiol.* **72**, 865–73 (1992).
53. 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**, (2014).
54. 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).
55. Gupta, R. K. *et al.* T1-Weighted Dynamic Contrast-Enhanced MR Evaluation of Different Stages of Neurocysticercosis and Its Relationship with Serum MMP-9 Expression. *Am. J. Neuroradiol.* **34**, 997–1003 (2012).
56. Singh, A. K. *et al.* Immune response to *Taenia solium* cysticerci after anti-parasitic therapy. *Int. J. Parasitol.* (2015). doi:10.1016/j.ijpara.2015.05.007
57. de Souza, A. *et al.* Perilesional gliosis around solitary cerebral parenchymal cysticerci and long-term seizure outcome: a prospective study using serial magnetization transfer imaging. *Epilepsia* **52**, 1918–27 (2011).
58. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
59. Real-time PCR handbook. at <<http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>>
60. Silver, N., Best, S., Jiang, J. & Thein, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **7**, 33 (2006).
61. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
62. Chang, K. H., Lee, J. H., Han, M. H. & Han, M. C. The role of contrast-enhanced MR imaging in the diagnosis of neurocysticercosis. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* **12**, 509–12
63. Park, S.-J. *et al.* Selection of appropriate reference genes for RT-qPCR analysis in Berkshire, Duroc, Landrace, and Yorkshire pigs. *Gene* **558**, 152–158 (2015).
64. Svobodová, K., Bílek, K. & Knoll, A. Verification of reference genes for relative quantification of gene expression by real-time reverse transcription PCR in the pig. *J. Appl. Genet.* **49**, 263–265 (2008).

65. Li, Q. *et al.* Evaluation of potential reference genes for relative quantification by RT-qPCR in different porcine tissues derived from feeding studies. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 1727–34 (2011).
66. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509–15 (2004).
67. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–50 (2004).
68. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
69. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. & Zhang, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol. Biol.* (2012). doi:10.1007/s11103-012-9885-2
70. Chang, K. H., Lee, J. H., Han, M. H. & Han, M. C. The role of contrast-enhanced MR imaging in the diagnosis of neurocysticercosis. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* **12**, 509–12
71. Nash, T. E. *et al.* Treatment of neurocysticercosis: Current status and future research needs. doi:10.1212/01.wnl.0000238514.51747.3a
72. Mahanty, S. & Garcia, H. H. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog. Neurobiol.* **91**, 172–184 (2010).
73. Cangalaya, C. *et al.* Radiological evolution of porcine neurocysticercosis after combined antiparasitic treatment with praziquantel and albendazole. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005624 (2017).

74. Gongora-Rivera, F., Luis Soto-Hernandez, J., Guevara, P. & Sotelo-Morales, J. In Neurocysticercosis, CSF Cytokines Correlate With Cerebral Blood Flow Velocities. *Neurology* **71**, 1119–1122 (2008).
75. Silveira-Lemos, D. *et al.* Cytokine Pattern of T Lymphocytes in Acute Schistosomiasis mansoni Patients following Treated Praziquantel Therapy. *J. Parasitol. Res.* **2013**, 909134 (2013).
76. McSorley, H. J., Hewitson, J. P. & Maizels, R. M. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* **43**, 301–10 (2013).
77. White, A. C., Robinson, P. & Kuhn, R. Taenia solium cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem. Immunol.* **66**, 209–30 (1997).
78. Grimaldi, L. M. *et al.* Elevated alpha-tumor necrosis factor levels in spinal fluid from HIV-1-infected patients with central nervous system involvement. *Ann. Neurol.* **29**, 21–5 (1991).
79. Leist, T. P., Frei, K., Kam-Hansen, S., Zinkernagel, R. M. & Fontana, A. Tumor necrosis factor alpha in cerebrospinal fluid during bacterial, but not viral, meningitis. Evaluation in murine model infections and in patients. *J. Exp. Med.* **167**, 1743–8 (1988).
80. Buttini, M., Appel, K., Sauter, A., Gebicke-Haerter, P.-J. & Boddeke, H. W. G. M. Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience* **71**, 1–16 (1996).
81. Alvarez, J. I. *et al.* The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by Taenia solium metacestodes displays an active response. *J. Neuroimmunol.* **127**, 139–144 (2002).
82. Burda, J. E., Bernstein, A. M. & Sofroniew, M. V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* **275**, 305–315 (2016).
83. Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A. & Marunouchi, T. Production of tumor necrosis

- factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* **491**, 394–7 (1989).
84. Thellin, O. *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* **75**, (1999).
 85. Haberhausen, G., Pinsl, J., Kuhn, C. C. & Markert-Hahn, C. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 628–33 (1998).
 86. Nygard, A.-B., Jørgensen, C. B., Cirera, S. & Fredholm, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* **8**, 67 (2007).
 87. Mijatovic, T. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha mRNA remains unstable and hypoadenylated upon stimulation of macrophages by lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6004–12 (2000).
 88. Paschoud, S. *et al.* Destabilization of Interleukin-6 mRNA Requires a Putative RNA Stem-Loop Structure, an AU-Rich Element, and the RNA-Binding Protein AUF1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8228–8241 (2006).
 89. Conlon, P. J., Tyler, S., Grabstein, K. H. & Morrissey, P. Interleukin-4 (B-cell stimulatory factor-1) augments the in vivo generation of cytotoxic cells in immunosuppressed animals. *Biotechnol. Ther.* **1**, 31–41
 90. 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).
 91. Centers for Disease Control and Prevention. Parasites-Cysticercosis. <http://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/biology.html> [Acceso: 24 de julio 2016].

Anexos

Anexo 1 Normalización de genes de referencia

1. Método comparativo de Ct

Este método primero forma todos los pares posibles y luego compara la expresión relativa en cada par de genes para cada una de las muestras y así identifica con certeza el mejor gen de referencia. Cuando los genes GAPDH y H3F3A son comparados con el resto de los genes candidatos, se asocian a valores con menor dispersión de datos (DesvSt Media 0.99 y 0.93 respectivamente, tabla A1 y figura A1.1). Por otro lado, el otro par de genes, 18S y ACTB, muestran valores con mayor dispersión de datos al ser comparados con el resto de genes (DesvSt Media 1.23 y 1.02 respectivamente, tabla A1 y figura A1.1). Basados en estos resultados, los datos sugieren al gen H3F3A como al mejor gen de referencia, ya que muestra la mayor estabilidad a nivel de expresión (DesvSt Media 0.93, tabla A1).

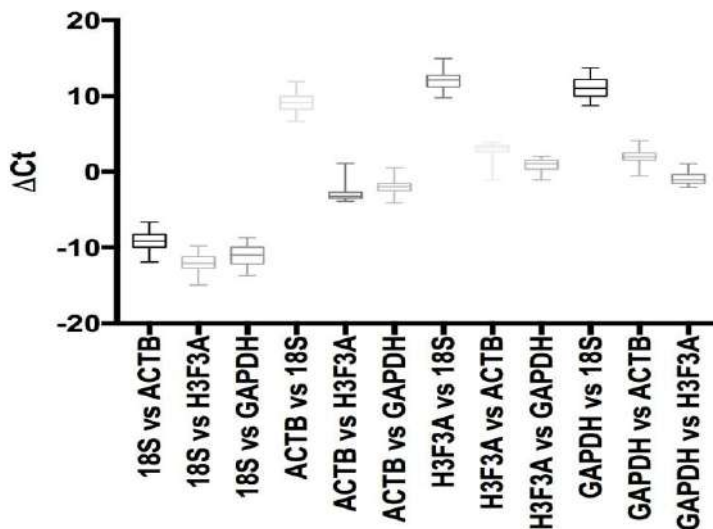


Figura A1.1. Distribución de valores de Ct de los candidatos a genes de referencia sobre todas las muestras. La línea inferior, línea media y línea superior indican los percentiles de hasta 25, 50 y 75%, respectivamente.

Tabla A1. Comparación Ct de genes de referencia candidatos

	Media Ct	DesvSt	DesvSt Media
18S vs ACTB	-9.09	1.23	1.23
18S vs H3F3A	-12.03	1.12	
18S vs GAPDH	-11.09	1.33	
ACTB vs 18S	9.09	1.23	1.02
ACTB vs H3F3A	-2.95	0.93	
ACTB vs GAPDH	-2.00	0.91	
H3F3A vs 18S	12.03	1.12	0.93
H3F3A vs ACTB	2.95	0.93	
H3F3A vs GAPDH	0.95	0.74	
GAPDH vs 18S	11.09	1.33	0.99
GAPDH vs ACTB	2.00	0.91	
GAPDH vs H3F3F	-0.95	0.74	

2 Análisis por BestKeeper

Bestkeeper puede trabajar con los valores crudos de Ct, sin necesidad de una transformación de datos. Este determina el mejor gen de referencia al aplicar un análisis de correlación por pares de todos los genes candidatos y selecciona a los más adecuados en función a la variación de la desviación promedio (SP), covarianza y poder de cada gen. Nuestro análisis muestra que hay un alto grado de variación de Ct (valores de SP mayores a 1) en los niveles de expresión de ACTB, H3F3A y GAPDH y solo el gen 18S muestra poca variación de Ct (valor menor a 1, SP=0.91). El ranking de genes derivado del análisis de estabilidad de expresión dado por Bestkeeper se muestra en la tabla A2.

Tabla A2. Análisis por BestKeeper. Estadística descriptiva de candidatos a genes de referencia

	18S	ACTB	H3F3A	GAPDH
N*	49	49	49	49
Media geométrica	10.75	19.82	22.81	21.84
Media aritmetica	10.84	19.92	22.87	21.93
Valor mínimo	9.21	16.92	19.59	19.31
Valor máximo	17.3	28.44	29.22	29.36
Desv. promedio	0.91	1.53	1.19	1.49
Covarianza	8.41	7.67	5.19	6.81

*N: número de observaciones

3 Análisis por NormFinder

El método de NormFinder evalúa la estabilidad de expresión de genes (valor de estabilidad) de acuerdo a variaciones en el grupo y entre los grupos para cada gen. La expresión del gen es más estable cuanto menor es su valor de estabilidad. Según este análisis, se obtuvieron los siguientes valores: 0.308 (H3F3A), 0.462 (GAPDH), 0.478 (ACTB) y 0.739 (18S), como se muestra en la Figura A1.2. Según estos resultados el gen H3F3A tiene la mayor estabilidad de expresión, seguido de GAPDH, ACTB y por último 18S.

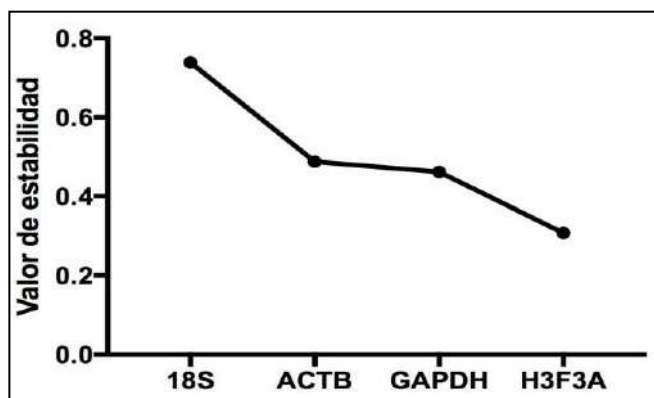


Figura A1.2. Ranking de los candidatos a genes de referencia en base a los valores de estabilidad calculados por NormFinder

4 Análisis por geNorm

El algoritmo geNorm se utilizó para calcular el promedio de los valores de estabilidad de expresión (M) para cada gen candidato seleccionado sobre la base de las medias aritméticas bajo nuestras diferentes condiciones experimentales. El valor M se calculó en cada paso a medida que se iba excluyendo el gen con menor estabilidad, hasta llegar a los dos genes más estables. Una vez obtenidos los valores M, se hizo un ranking de los 4 genes analizados. Los 4 genes mostraron buenos niveles de estabilidad de expresión ($M < 1.5$) según el punto de corte recomendado por Vandesompele et al⁶⁸. Los genes H3F3A y GAPDH son el mejor par de genes de referencia (Figura A1.3).

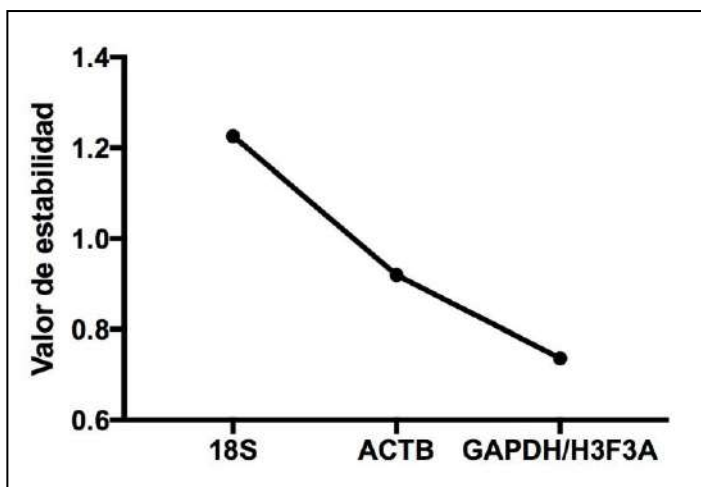


Figura A1.3. Ranking de los genes candidatos de referencia en base a los valores de estabilidad calculado por geNorm

Anexo 2. Estadios de inflamación. Imágenes histológicas que demuestran la escala utilizada para medir la respuesta inflamatoria por parte del huésped y los daños en las estructuras del quiste.

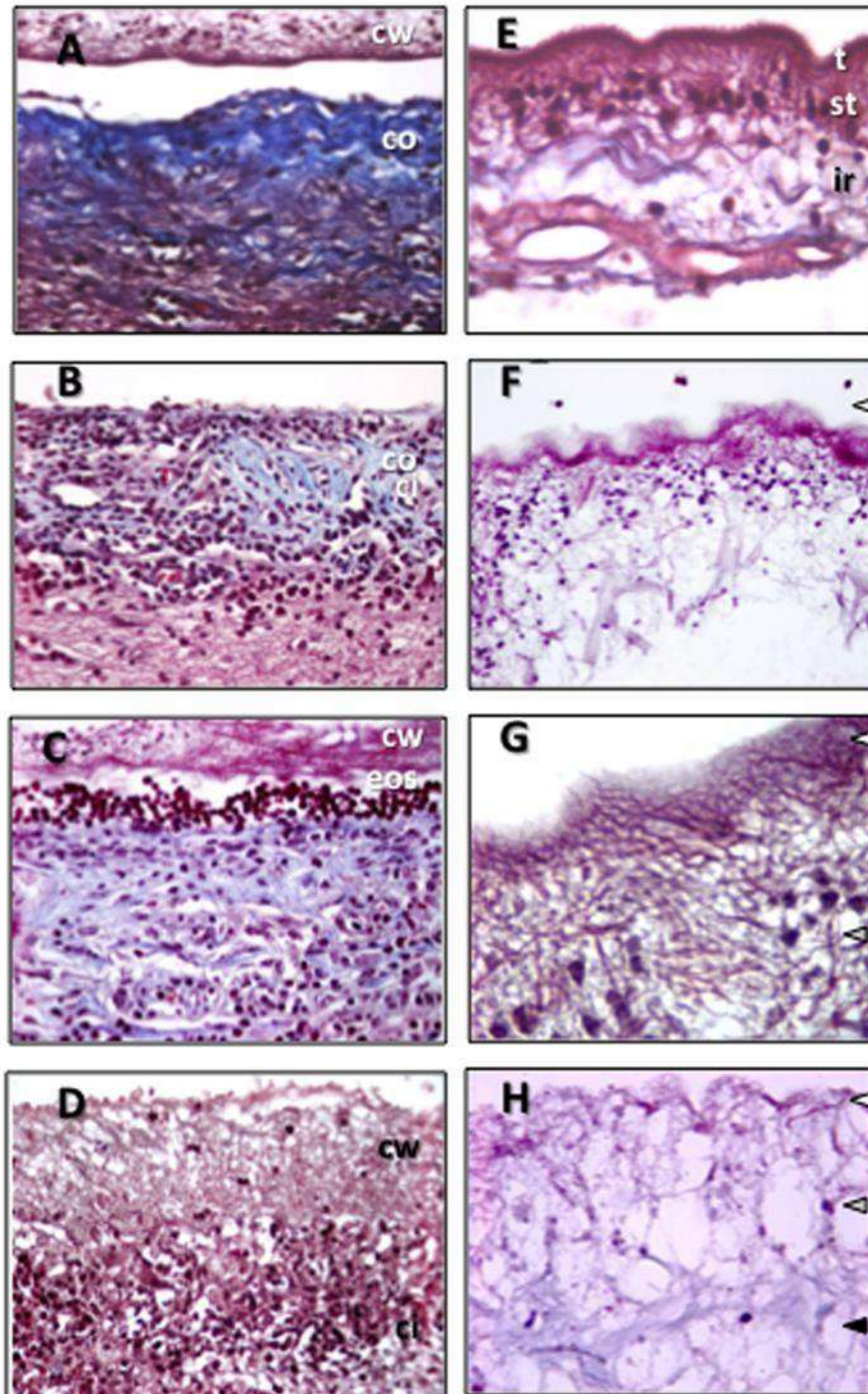


Figura A2. Paneles A-D: imágenes representativas de quistes y tejidos pericísticos típicos de las fases inflamatoria (IS, por *inflammatory stage*) 1 (A), IS2 (B), IS3 (C) e IS4 (D). Paneles E-H: Imágenes representativas de quistes que ilustran los puntajes de daño (DS, por *damage score*): DS0 (E), DS1 (F), DS2 (G) y DS3 (H). Todas las secciones de tejido se tiñeron con la tinción tricrómica de Masson. Ampliación 400x en todos los paneles. Clave: colágeno (co), pared del quiste (cw, por *cyst*

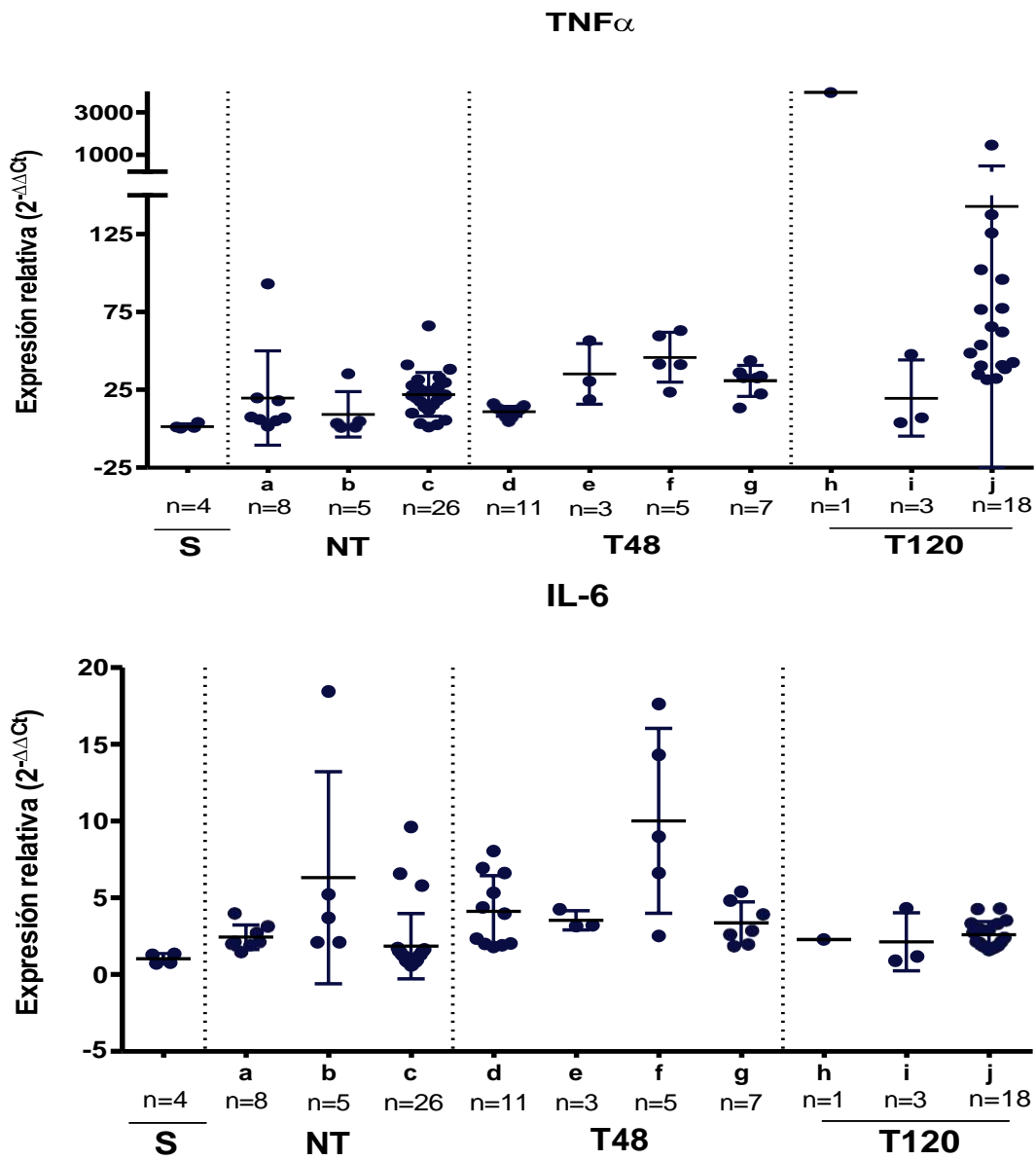
wal), infiltrado celular (ci, por celular infiltrate), eosinófilos (eos), tegumento (t, punta de flecha hueca), subtegumento (st, punta de flecha gris) y región interna (ir, por internal región)²⁹.

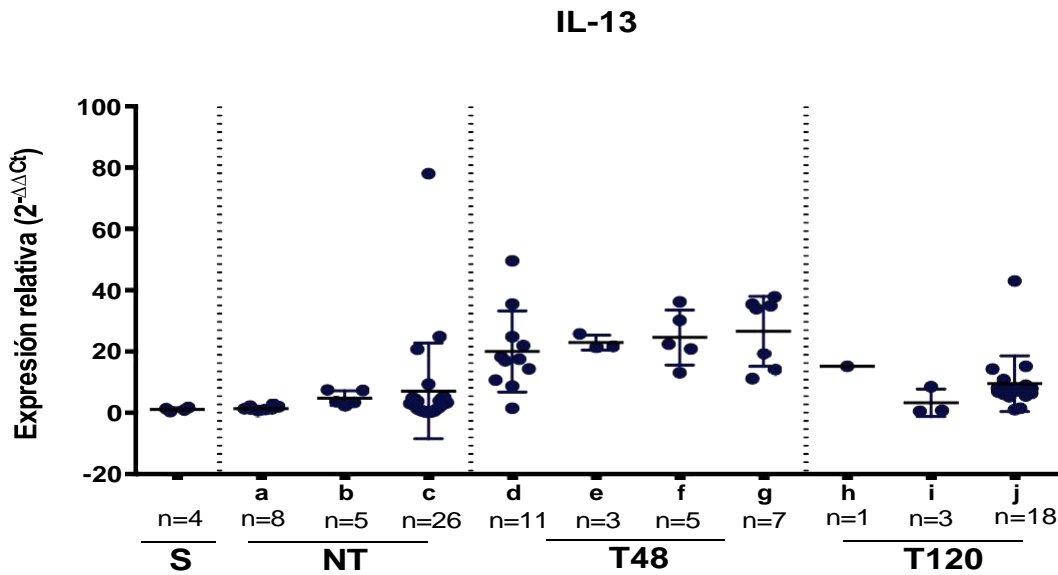
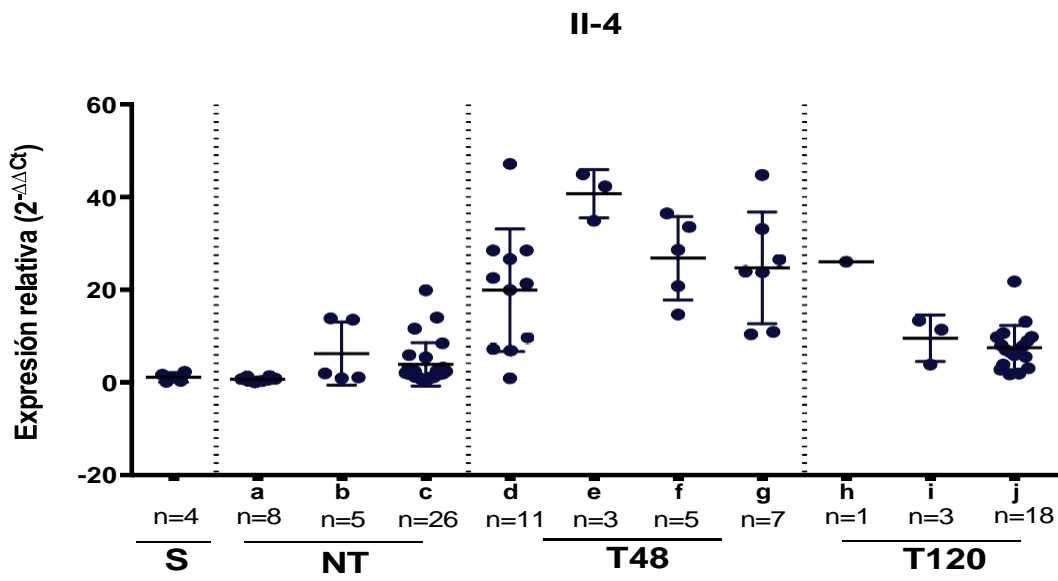
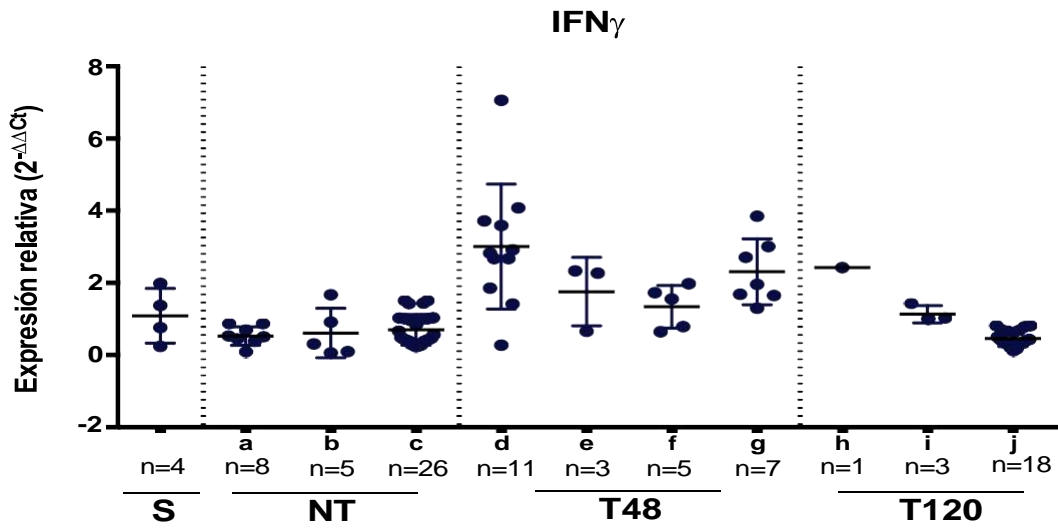
Anexo 3. Evaluación histopatológica según grupo de tratamiento.

Tabla A3. **Estadios inflamatorios** observados en cada grupo de tratamiento. Los datos en cada célula representan la mediana y el rango de los quistes en el estrato⁷. Estos datos corresponde a las muestras del Hemisferio izquierdo del mismo set de cerdos utilizados en este trabajo (hemisferio derecho).

		Mediana de IS grupo NT (rango)	Mediana de IS grupo T48 (rango)	Mediana de IS grupo T120 (rango)
Estadios de Inflamación (n = 113)	IS 1	0 (0–28)	0 (0–0)	0 (0–21)
	IS 2	60.5 (0–100)	0 (0–40)	0 (0–100)
	IS 3	37.5 (0–100)	90 (0–100)	78 (0–100)
	IS 4	0 (0–0)	10 (0–100)	5 (0–100)

Anexo 4. Graficas de perfiles de expresión de citoquinas estratificadas por cerdo





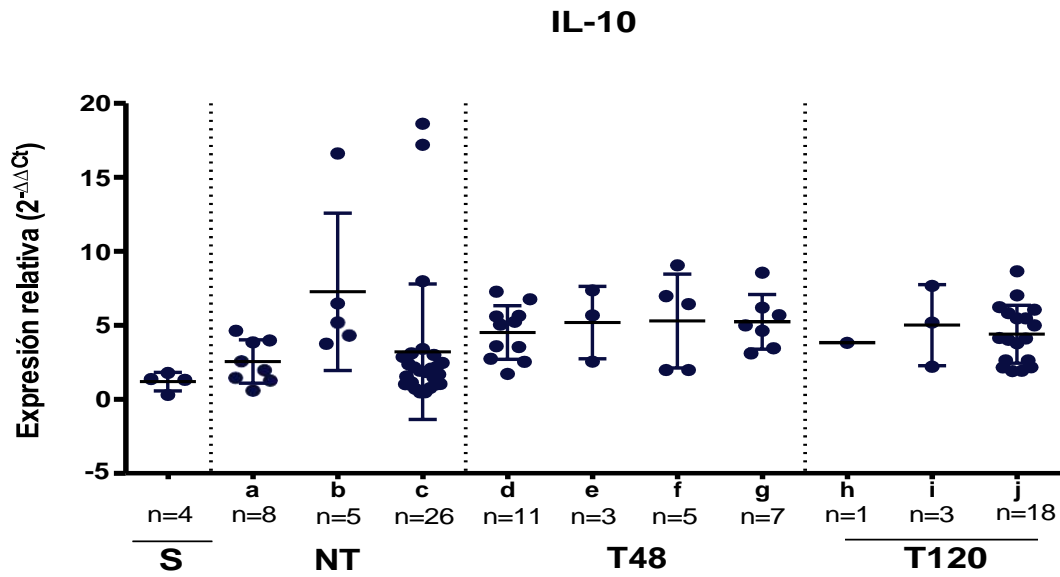


Figura A3. Regulación de genes proinflamatorios y antiinflamatorios como efecto del tratamiento estratificado por cerdo. Se muestran los niveles de expresión de ADNc de tres genes cuantificados por PCR en tiempo real (RT-qPCR) en los diferentes tipos de tejido cerebral para TNF , IL-6, IFN , IL-4, IL-13 e IL-10. Las barras representan las medias e IC95 para cada grupo.

