

11261

12/  
2es.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAPACIDAD DE ACTIVACION *IN VITRO* DE LOS EOSINOFILOS  
PERIFERICOS DE PACIENTES ADULTOS CON  
NEUROCYSTICERCOSIS.

Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Médicas

Alumno: Juan Francisco Hernández Sierra



Tutoras:

Susana Navarrete Navarro

Blanca Elsa Rivera García



Participantes:

Sigifredo Pedraza Sánchez.

Jefferson Proaño Narváez.

Lugar de Realización:

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

261113

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***Cada vida es una luz que desciende e ilumina brevemente al mundo***

**DEDICATORIA**

***A Sandy:***

Gracias corazón, por ser la dulce y suave brisa que impide que se apague.

***A kikito, carlitos y sandrita:***

Gracias, por ser el viento que impulsa esta breve flama, a convertirse en una gran fogata

***A mis padres:***

Gracias por ser piedra y eslabón, pero sobre todo las pequeñas pajas y los guesos leños de mi infancia y juventud.

***Juan Francisco Hernández Sierra***

## **AGRADECIMIENTOS:**

A Alejandrito, Rocío, Lupita y Alejandro.

A la Señora Teresita Trejo Luna de Barrenechea y al Señor José Andrés Barrenechea Alvarez por su apoyo y consejo.

A la Señora Gloria Alvarez de Barrenechea (q.p.d.) por su cariño de ayer y hoy.

A la doctores Blanca Elsa Rivera García, Susana Navarrete Navarro, Maria del Carmén Martínez García y Juan Garduño Espinosa por enseñarme la metodología de la vida.

A Sigifredo Pedraza por enseñarme lo intricado de la investigación básica

A la Dra Beatriz Velásquez Castillo por recibirme y cobijarme.

A Francisco Aedo por enseñarme que para la cultura no hay edad

A Francisco, Andrés, Sergio, Ismael, Abraham, Onofre, Victoria, Miguel y Francisco por ser mis amigos.

***Juan Francisco Hernández Sierra***

## **INDICE:**

<b>Página</b>	<b>Tema</b>
<b>5</b>	<b>Lista de abreviaturas.</b>
<b>6</b>	<b>Relación de cuadros</b>
<b>7</b>	<b>Relación de figuras</b>
<b>8</b>	<b>Resumen</b>
<b>9</b>	<b>Antecedentes</b>
<b>13</b>	<b>Planteamiento del problema</b>
<b>14</b>	<b>Hipótesis</b>
<b>14</b>	<b>Objetivos</b>
<b>15</b>	<b>Diseño de estudio</b>
<b>16</b>	<b>Definición operacional de las variables</b>
<b>16</b>	<b>Selección de la muestra</b>
<b>17</b>	<b>Cálculo del tamaño de la muestra</b>
<b>18</b>	<b>Técnica de separación, activación y marcaje de los eosinófilos periféricos</b>
<b>23</b>	<b>Análisis estadístico</b>
<b>23</b>	<b>Consideraciones éticas</b>
<b>24</b>	<b>Resultados</b>
<b>26</b>	<b>Discusión</b>
<b>29</b>	<b>Referencias</b>
<b>35</b>	<b>Cuadros y figuras.</b>

## **ABREVIATURAS:**

<b>NCC</b>	<b>neurocisticercosis</b>
<b>ELISA</b>	<b>Inmunoensayo ligado a enzimas</b>
<b>FITC</b>	<b>Fluoresceína</b>
<b>IET o EITB</b>	<b>Inmunolectro transferencia</b>
<b>IL-5</b>	<b>Interleucina 5</b>
<b>IV</b>	<b>intraventricular</b>
<b>LCR</b>	<b>Líquido cefalorraquídeo</b>
<b>PA</b>	<b>Parenquimatosa</b>
<b>PAF</b>	<b>Factor activador plaquetario</b>
<b>PBS</b>	<b>Solución salina amortiguada con fosfatos.</b>
<b>RM</b>	<b>Resonancia magnética</b>
<b>SA</b>	<b>Subaracnoidea</b>
<b>SSH</b>	<b>Solución salina de Hanks</b>
<b>TAC</b>	<b>Tomografía axial computada</b>
<b>UFR</b>	<b>Unidades de fluorescencia relativa</b>

**RELACION DE CUADROS:**

**Página**

**Cuadro I.** Cuenta diferencial porcentual de leucocitos antes y después de la separación con gradiente Ficoll-Hypaque ( n= 4).....36

**Cuadro II .** Fluorescencia relativa (UFR ) encontrada a diferentes concentraciones y tiempo de incubación con PAF, IL-5 y avidina-fluoresceinada utilizados en el marcaje de eosinófilos periféricos.....37

**Cuadro III.** VEdad y sexo de acuerdo a gravedad, localización y número de cisticercos en pacientes con neurocisticercosis pag 38.....38

**Cuadro IV.** Fluorescencia relativa de los eosinófilos de pacientes con neurocisticercosis calcificados por localización, gravedad y número de cisticercos.....39

**Cuadro V.** Frecuencia de lesiones por localización y número de cisticercos en pacientes con neurocisticercosis benigna y maligna..... 40

## RELACION DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estandarización del tiempo de incubación de los granulocitos con PAF .....	41
<b>Figura 2.</b> Estandarización de la cantidad de IL-5 biotinilada para el marcaje de eosinófilos.....	42
<b>Figura 3.</b> Estandarización del tiempo de incubación con avidina fluoresceïnada para el marcaje de eosinófilos.....	43
<b>Figura 4.</b> Estandarización de la cantidad de avidina fluoresceïnada para el marcaje de eosinófilos.....	44
<b>Figura 5.</b> Localización de eventos en gráfica de granularidad vs fluorescencia-IL-5 de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo.....	45
<b>Figura 6.</b> Localización de eventos por tamaño vs granularidad de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo.....	46
<b>Figura 7</b> Frecuencia de manifestaciones clínicas en pacientes con neurocisticercosis benigna y maligna.....	47
<b>Figura 8.</b> Fluorescencia relativa emitida por los eosinófilos activados de pacientes con NCC de diferente gravedad y sujetos sin la enfermedad.....	48

## **CAPACIDAD DE ACTIVACION *IN VITRO* DE LOS EOSINOFILOS PERIFERICOS DE PACIENTES ADULTOS CON NEUROCISTICERCOSIS**

**Antecedentes:** La neurocisticercosis humana es causada por el metacéstodo de *Taenia slium*. Su espectro clínico abarca desde la ausencia de sintomatología (NCC benigna) hasta los casos fatales (NCC maligna). No existe al momento evidencia de alteraciones inmunológicas que expliquen esta susceptibilidad. Por otro lado, existe evidencia de que los eosinófilos activados son responsables del daño tisular inicial a blancos parasitarios.

**Objetivo:** Determinar si existe diferencia entre la capacidad de activación *in vitro* de los eosinófilos periféricos de pacientes con NCC de diferente gravedad y sujetos sin la enfermedad.

**Material y métodos:** Estudio transversal analítico de tres grupos: 7 pacientes con NCC maligna, 7 con NCC benigna y 7 sujetos sin la enfermedad (diganosticados por ELISA en LCR, Tomografía axial computada y resonancia magnética nuclear), y sin eosinofilia actual, tratamiento inmunosupresor o antecedente de atopia. Se les extrajo 5 mL de sangre venosa , para la separación de granulocitos, los cuales se activaron inespecíficamente con factor activador plaquetario y se marcaron con IL-5 biotinilada y posteriormente con Avidina-fluoresceinada. El grado de activación se midió en unidades de fluorescencia relativa mediante citometría de flujo. El análisis se efectuó con la prueba de Kruskall-Wallis Y el *análisis a posteriori* con U de Mann-Whitney con ajuste descendente del nivel alfa.

**Resultados:** No existió diferencia significativa entre los grupos en cuanto frecuencia de sexo y edad; Tampoco la hubo entre los pacientes con NCC benigna y maligna en lo referente al número y localización de los cisticercos. Al comparar los grupos por la capacidad de activación de los eosinófilos se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los pacientes con NCC benigna y maligna, con respecto de los sujetos sin la enfermedad.

**Discusión:** La menor capacidad de activación encontrada en los pacientes con NCC sugiere una susceptibilidad aumentada hacia esta enfermedad, la cual podría estar determinada genéticamente.

## **ANTECEDENTES:**

La neurocisticercosis humana (NCC) es causada por la infección del metacestodo de *Taenia solium*. Es una entidad clínica de presentación pleomórfica, determinada por el número y localización de los cisticercos, etapa de evolución de la enfermedad y la respuesta del hospedero (1).

La frecuencia mundial de muertes por cisticercosis es de aproximadamente 50 mil por año (2); sin embargo, Rabiela encontró en 4,250 autopsias, 135 casos con NCC (3.1%), siendo la causa directa de muerte sólo en el 20% de ellos (en el 80% restante no se documentó la existencia de sintomatología), lo que sugiere que al menos en nuestro país, por cada paciente muerto por esta patología existen 4 sujetos con neurocisticercosis (3).

El diagnóstico de NCC se realiza con base en el cuadro clínico descrito y neuroimagen compatible (tomografía axial computarizada y/o resonancia magnética). Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de esta parasitosis son la inmunoelectrotransferencia ( IET o EITB ) y el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) (4-13).

Las clasificaciones existentes para NCC son complementarias: a) la NCC se clasifica de acuerdo al número de cisticercos en única (75% del total de casos) y múltiple, cuando existen 2 ó más cisticercos (25%) (3); b ) Sotelo la clasifica en activa e inactiva dependiendo del grado de calcificación de los mismos (4) y c) con base en su gravedad clínica, Estañol la divide en benigna y maligna; la primera de ellas evoluciona en forma crónica, generalmente asintomática o con presencia de crisis convulsivas y/o cefalea como únicas manifestaciones. La forma maligna es de inicio agudo o subagudo, con datos clínicos de hipertensión endocraneana, dificultad en la marcha, alteración en las funciones mentales y síndromes hemisféricos entre otros (14,15).

Se ha encontrado que la mayoría de los antígenos del cisticerco inducen diferentes clases de anticuerpos en el humano, con el siguiente orden de frecuencia: IgG, IgM, IgE, IgA, IgD; sin embargo, existe ausencia de correlación entre su presencia y el curso clínico de la enfermedad (1). Por otro lado, para conocer un aspecto de la relación hospedero-parásito se ha estudiado la respuesta inmune celular a través de la reacción cutánea al PPD (derivado protéico purificado) la cual se encuentra deprimida; aunque esta anomalía también se observa en otros padecimientos neurológicos crónicos no infecciosos. Además, la transformación blastoide de los leucocitos periféricos hacia la concavalina es normal en los pacientes con NCC (Morales Z, Medina E, Correa D, comunicación personal), lo mismo que las cifras de linfocitos T y B y la respuesta de las células B a diversos mitógenos (16,17).

Lo anterior sugiere poca participación de la inmunidad celular y humoral estudiada en esta forma, en la relación hospedero-parásito (18).

La asociación entre eosinofilia y parasitosis se ha establecido previamente (19). El eosinófilo es una célula principalmente tisular que se encuentra en relación 100:1 con respecto a los eosinófilos circulantes. Permanece en sangre periférica de 12 a 26 horas y por diapédesis pasa a los tejidos (predominantemente a las superficies epiteliales expuestas) y tiene ahí una vida media de 2 a 5 días. Posée tres tipos de gránulos (primarios, secundarios y menores) conteniendo diversas enzimas. Las más estudiadas son: la proteína de Charcot-Leiden (liposfolipasa), la proteína básica principal (MBP), la proteína catiónica del eosinófilo (ECP) (estas dos últimas con potente actividad helmintotóxica), la neurotoxina derivada de los eosinófilos (EDN), la peróxidasa del eosinófilo (EPO), y otras como la aril-sulfatasa, la beta-glucuronidasa, la lipoxigenasa y la fenol-oxidasa. (20-24).

Existen dos subpoblaciones de eosinófilos con base en su densidad: los hipodensos y los normodensos. La evidencia actual sugiere que los eosinófilos hipodensos son eosinófilos activados, ya que: a) son metabólicamente más

activos que los eosinófilos normodensos (aumento en el consumo de O<sub>2</sub>) ; presentan aumento en viabilidad, quimioluminiscencia, producción de peróxido de hidrógeno, síntesis de nuevas proteínas secretables y actividad parasiticida, y c) los eosinófilos hipodensos presentan aumento en sus receptores de membrana para IgE e IL5.(25-27) En forma natural la proporción de eosinófilos hipodensos en sangre periférica sólo se encuentra aumentada en los casos de eosinofilia, independientemente de la causa de ésta (alergia, parasitosis, síndrome hipereosinofílico) (28-30)

Durante las dos últimas décadas, han aparecido nuevas evidencias que apoyan el papel del eosinófilo como célula efectora para la destrucción de los parásitos. En resumen estas evidencias consisten en:

**1) Capacidad de los eosinófilos activados para destruir directamente los parásitos.**

Se ha observado que los eosinófilos obtenidos de pacientes con eosinofilia son hipodensos debido a desgranulación y que *in vitro* son más activos en el daño y muerte de blancos parasitarios que los provenientes de pacientes testigos (31-41). Además, este daño es independiente de la presencia de suero inmune, lo que apoya el hecho de que en la etapa tisular de los parásitos el principal mecanismo de defensa es la respuesta de tipo celular (30).

**2) Capacidad de los eosinófilos para producir enzimas que destruyen los parásitos.**

Se ha demostrado que las enzimas granulares de los eosinófilos presentan actividad helmintotóxica contra *Trichinella spirallis* y *Schistosoma mansoni*, (34,41,42).

**3) Capacidad del suero antieosinofílico para abolir esta respuesta.**

En un estudio se inoculó con *S. mansoni* ratones resistentes a éste parásito y que posteriormente se les administró suero antieosinófilo,

antimacrófago, antilinfocítico o antineutrófilo; se observó una abolición de esta resistencia únicamente en los ratones tratados con suero antieosinófilo, elevándose el número de parásitos al mismo nivel que los ratones sensibles (43-45)

#### **4) Infiltración de los eosinófilos, desgranulación, adherencia y destrucción parasitaria.**

Se ha observado desgranulación de los eosinófilos y liberación de enzimas parasiticidas con destrucción del blanco parasitario en la respuesta inmune contra tremátodos, nemátodos y cestodos (*S. mansoni*, *Brugia pahangi*, *Taenia spirallis*, *Agyrostrongilus cantonensis*, *Taenia taeniaeformis*, *Oncocerca volvulus*) (32, 46-53)

En cisticercosis humana se observa una reacción inflamatoria rodeando al cisticerco en la que los eosinófilos forman parte de dicha reacción, junto con linfocitos, otros polimorfonucleares y células gigantes; además, se ha determinado que existen diferencias en la capacidad de activación de los eosinófilos en pacientes con otras patologías, lo que podría hacer pensar en alguna alteración de la función de estos, en relación a cierta predisposición a la NCC o a una mayor gravedad; no obstante, su papel en la resistencia del hospedero hacia la cisticercosis es aún desconocida (20,21,54).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La neurocisticercosis humana es una patología con alta morbi-mortalidad en nuestro país. El espectro clínico abarca desde la ausencia de sintomatología hasta los casos fatales, pero el conocimiento actual de la relación hospedero-parásito en esta entidad no permite aún explicar el motivo de estas diferencias.

Recientemente los hallazgos en modelos experimentales han permitido identificar la importancia de los eosinófilos *activados* como parte de las células efectoras en la destrucción de diferentes parásitos en fase tisular. Así mismo, las investigaciones en cerdos (único modelo animal de cisticercosis por *T. solium*) y los hallazgos de autopsia en seres humanos permiten inferir que los eosinófilos son los posibles responsables del daño inicial al cisticerco.

Se desconoce si existe asociación entre una menor capacidad de activación intrínseca de los eosinófilos (transformación a formas efectoras) y la presencia de neurocisticercosis en humanos, por lo que nos preguntamos :

¿Es diferente la capacidad de activación *in vitro* de los eosinófilos periféricos, de pacientes con neurocisticercosis y sujetos sin la enfermedad ? y, ¿ Es diferente esta capacidad de activación entre pacientes con NCC de diferente gravedad clínica ?

## **HIPÓTESIS:**

- La capacidad de activación *in vitro* de los eosinófilos periféricos de sujetos sin cisticercosis es mayor que la de los eosinófilos obtenidos de sujetos con neurocisticercosis.
- La capacidad de activación de los eosinófilos periféricos es mayor en los sujetos sin cisticercosis comparado con los pacientes con NCC benigna y la de ambos con mayor capacidad de activación que los sujetos con enfermedad maligna.

## **OBJETIVOS PRINCIPALES**

- Determinar si existe diferencia entre la capacidad de activación *in vitro* de los eosinófilos periféricos de sujetos con y sin neurocisticercosis.
- Determinar si existe asociación entre el grado de activación *in vitro* de los eosinófilos y la gravedad clínica de la NCC.

## **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

- Determinar si existe diferencia entre el grado de activación *in vitro* de los eosinófilos y la localización cerebral de los cisticercos.
- Determinar si existe diferencia en el grado de activación *in vitro* de los eosinófilos y el número de cisticercos de los casos estudiados

## **MATERIAL Y METODOLOGÍA**

**Diseño del estudio:** Transversal analítico de tres grupos: 1) pacientes con neurocisticercosis benigna, 2) pacientes con neurocisticercosis maligna y 3) sujetos sin neurocisticercosis. Los grupos 1 y 2 pertenecen a la consulta de Neurología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y el 3er grupo pertenece a la consulta de Neurocirugía del mismo Hospital.

### **I Criterios de inclusión:**

1. Edad mayor a 16 años.
2. Diagnóstico clínico de NCC benigna o maligna en cualquier fase de la enfermedad corroborado mediante ELISA en LCR y suero, así como tomografía (TAC) y resonancia magnética (RM) de cráneo (grupos 1 y 2).
3. Pacientes hospitalizados con TAC negativa para NCC y ELISA negativo en LCR y suero para cisticercosis (grupo 3).
4. Sin eosinofilia al momento del estudio (menos de 500 eosinófilos absolutos/mm<sup>3</sup>).
5. Sin tratamiento esteroideo o inmunosupresor en los últimos 4 meses.

### **II. Criterios de exclusión (no inclusión):**

1. Que no acepten participar en el estudio.
2. Desnutrición de tercer grado.
3. Pacientes con NCC intraventricular como localización única.
4. Pacientes con antecedentes de atopia personal.

## **Definición operacional de variables:**

**Sujetos sin la enfermedad:** personas sin evidencia clínica e imagenológica de neurocisticercosis (TAC y RM) y ELISA negativo para ésta en LCR.

**Neurocisticercosis benigna:** Pacientes con diagnóstico clínico caracterizado por la presencia de crisis convulsivas y/o cefalea de cualquier tipo como únicos datos, además de RM y TAC compatible con NCC parenquimatosa o subaracnoidea calcificada o no, dorsolateral o basal, corroborado por un medio inmunológico (ELISA en LCR) (14,15).

**Neurocisticercosis maligna:** Pacientes con uno o varios de los siguientes signos o síndromes clínicos: hipertensión endocraneana, alteraciones de la marcha, cambios de conducta, parálisis de nervios craneales, síndromes hemisféricos o brotes psicóticos, identificados por el médico tratante, además por RM y TAC, imágenes compatibles de neurocisticercosis, corroborado por un medio inmunológico (ELISA en LCR positiva para cisticercosis) (14,15).

**Atopia:** El diagnóstico se estableció con base en un cuestionario construido en el departamento de alergia del Hospital de Especialidades, CMN SXXI, IMSS el cual incluye preguntas sobre antecedentes familiares y personales de asma, rinitis alérgica y dermatitis atópica.

**Selección de la muestra :** Para los grupos 1 y 2 se realizó con base a los criterios de selección mediante muestreo consecutivo de casos prevalentes. Los controles (grupo 3) fueron elegidos consecutivamente de pacientes hospitalizados a los que se les realizó intervención neuroquirúrgica por otra patología diferente a neurocisticercosis y que reunían los criterios de selección mencionados.

**Validación de la imagen resonancia magnética para el diagnóstico de neurocisticercosis :** Se determinó la validez y reproducibilidad inter-observador de la interpretación de los estudios de imagen por resonancia magnética (55), en dos neuroradiólogos expertos, que examinaron 101 pacientes; 40% con diagnóstico de NCC y 60% con otras patologías similares. El área bajo la curva resultante fue de 97 % ( error estandar = 2.2 ) y Kappa ponderada de 0.84. Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y razón de probabilidad promedio fueron de 0.95, 0.92, 0.88 y 17.5 respectivamente.

**Tamaño de la muestra:** Se consideró el diseño del estudio (transversal analítico), la diferencia observada de 30 unidades de fluorescencia relativa (UFR) en la inducción experimental de la activación de eosinófilos con interleucina-5 (IL-5), vs. no activación y un error estándar = 5 (56).

Para el estudio se aceptó una diferencia mínima entre los grupos más cercanos ( maligna vs benigna) de 15 unidades de fluorescencia relativa, que constituye el 50% de lo referido, con un poder del 80% y un nivel de confianza del 95% bimarginal (57).

$$n = \frac{2 ( Z_{\alpha} + Z_{\beta} )^2 \sigma^2}{\Delta^2}$$

$$\alpha = 0.05, Z_{\alpha} = 1.96$$

$$\beta = 0.20, Z_{\beta} = 0.84$$

$$\Delta (\text{diferencia}) = 15$$

$$\sigma (\text{desviación estándar}) = 11.1$$

**Resultado**

n = 7 para cada grupo ( total =21 ).

## SEPARACIÓN, ACTIVACIÓN Y MARCAJE DE LOS EOSINÓFILOS PERIFÉRICOS.

La determinación de la activación de los eosinófilos periféricos se efectuó por citometría de flujo, dado el bajo rendimiento de otras técnicas previamente estandarizadas para este fin (58-62).

Dado que se excluyeron a pacientes con eosinofilia, los eosinófilos se consideraron con igual grado de activación basal entre los grupos.

Se realizó un marcaje indirecto de los receptores para IL-5 de estos granulocitos. Los eosinófilos fueron separados como células polimorfonucleares (63). Posteriormente se les estimuló *in vitro* con factor activador plaquetario (PAF por sus siglas en inglés Platelet Activating Factor), con el fin de *activar* a los eosinófilos, término que comprende entre otras manifestaciones aumento en la expresión de receptores de membrana para IL-5 en forma directamente proporcional a su grado de activación. A continuación se incubaron con IL-5 biotinilada para que se uniera específicamente a estos y posteriormente fueron incubados con avidina-FITC para su marcaje. Las células así marcadas por inmunofluorescencia fueron separadas en forma virtual, mediante la creación de una ventana específica para eosinófilos y analizadas en forma ciega al grupo del paciente, en un citómetro de flujo de rayos laser de Argón ( $\lambda=488$  nm), Facs Sort (Becton-Dickinson, San José CA, EUA). La activación de los eosinófilos se estimó por el aumento en la fluorescencia específica, leyendo en el canal FI-1, y adquiriendo 10,000 células por tubo.

## **ESTANDARIZACIÓN:**

### **Separación de los eosinófilos:**

Se obtuvieron 7 mL de sangre venosa, para la separación de los granulocitos por gradiente Ficoll-Hypaque (60). Posteriormente se extrajo el sobrenadante (solución de Hanks, linfocitos y gradiente) y se recuperó la interfase de polimorfonucleares. Se lavó dos veces con solución salina de Hanks, pH 7.4 (SSH) centrifugando durante 5 minutos a 400 x g y, el botón fue finalmente resuspendido hasta 1300  $\mu$ L con SSH, para dividirlo en 13 partes de 100  $\mu$ L cada una.

Se determinó la viabilidad de las células por exclusión de Azul Tripano al 0.1%, la cual fue superior al 98 %. La cuenta diferencial de leucocitos antes y después de la separación, se muestra en el cuadro I. El número de eosinófilos disponibles para cada lectura, a partir de la muestra posterior a la separación de los mononucleares fue de 18,600 (límites de:12,300 - 26,200).

### **Activación con factor activador plaquetario (PAF):**

Para determinar el tiempo óptimo de incubación con factor activador plaquetario (PAF), se agregó 20  $\mu$ L de una solución  $10^{-7}$  molar, incubándose tres de las muestras a 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 15, 25 y 60 minutos (muestras a, b y c), permaneciendo constantes la concentración y tiempo de incubación con interleucina 5 biotiniliada ( IL-5/b ) y de avidina-fluoresceinada (cuadro II). Posteriormente se lavaron con solución salina 0.15 molar amortiguada con fosfatos 0.01 M, pH 7.2 más azida de sodio al 0.1 % y, suero fetal bovino al 2% (PBS-SFB), a 200 g durante 3 minutos. Los resultados pueden observarse en la figura 1.

No se utilizó IL-5 como activador, dada la posible competencia por el receptor entre ésta y la IL-5 biotinilada con la que se marcó posteriormente. Además, no se dispuso de anticuerpo marcado contra el receptor.

#### **Biotinilización de IL-5 y marcaje de los eosinófilos:**

*Biotinilización de la interleucina 5:* para biotinilizar la IL-5 se dializó 1 µg de IL-5 (PM 45 kDa) diluido en 1 mL de agua estéril utilizando una membrana de diálisis (Spectra pore, poro de exclusión de 6 - 8,000 kDa ) contra solución amortiguadora de carbonatos (pH 9.6) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se agregó a la IL-5 dializada, 200 µL de biotina, la cual se preparó previamente en dimetil - sulfóxido a concentración de 1 mg/mL. Esta mezcla se incubó bajo protección de la luz durante 3 horas, a temperatura ambiente y en agitación constante. Por último se dializó contra PBS durante una hora, con tres recambios de solución cada 20 minutos (74). Una vez biotinilizada la IL-5 se probó a concentraciones de 100 y 10 ng/mL mediante inmuno-dot con avidina - peroxidasa; se utilizó como control negativo un anticuerpo irrelevante y como positivo una proteína marcada, previamente probada por ELISA.

#### **Marcaje de los eosinófilos con interleucina-5 biotinilada:**

Para determinar la cantidad de IL-5 a utilizar en el ensayo definitivo se probaron cantidades de 10, 50 y 100 µL ( muestras b, d y e, cuadro II ) de IL-5 bitonilada a concentración de 10 ng / mL. incubando durante 25 minutos a 37 ° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Estas cantidades se agregaron a las células previamente activadas con PAF a concentración y tiempo de incubación constantes, para posteriormente marcarse con avidina - fluoresceinada. Se lavó con PBS - SFB a 200 g durante 3 minutos (ver figura 2)

### **Marcaje con avidina-fluoresceinada:**

Para determinar la concentración y tiempo de incubación óptimo con avidina-fluoresceinada, se realizaron ensayos con 25 y 50  $\mu\text{g}$  de ésta y, de la mejor (50  $\mu\text{g}$ ) se probaron incubaciones durante 30, 45 y 60 minutos (muestras b, f y g, cuadro II). La incubación se realizó a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se lavó con PBS-azida a 1500 g durante 3 minutos. Se protegieron de la luz y se lisaron los eritrocitos con una solución comercial de lisis (Facs lysing solution, Becton-Dickinson) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último se resuspendieron a 1mL de PBS para su análisis, por citometría de flujo (figura 3 y 4).

### **Análisis por citometría de flujo:**

El análisis de las muestras fue realizado en el citómetro de Flujo Facs Sort (Becton Dickinson, San José California, EUA) y el programa Lysis II. Para verificar que la población de células seleccionada para su análisis, incluía a la mayoría de los eosinófilos, se hizo un experimento separando células en el citómetro de flujo y se caracterizaron morfológicamente. Para ello se utilizó una muestra activada y marcada con IL-5/b-Avidina-FITC en la forma previamente mencionada ( muestra b, cuadro II). Se graficó en primer lugar los eventos por tamaño contra granularidad ( figura 5 ) y se delimitó una región que incluía las células de mayor granularidad; a continuación se marcó una nueva región de los eventos más fluorescentes en la gráfica de granularidad contra fluorescencia (figura 6). Finalmente para separar los eosinófilos se utilizó como criterio, el que las células estuvieran dentro de las dos regiones descritas, lo que en términos de citometría se denomina *logical gate*. Posterior a su separación por el método de sort-exclusion del citómetro, fueron concentradas y se realizó un frotis con la tinción de Wright para la cuenta diferencial. El experimento se repitió en dos ocasiones

con el fin de determinar la frecuencia media de eosinófilos, en las región seleccionada.

Una vez determinada la región de lectura de eosinófilos, se procedió a analizar las muestras procesadas, para determinar la fluorescencia relativa de cada una de ellas (55-59)

### **Ensayo definitivo:**

Se obtienen 7 mL de sangre venosa, la cual se hepariniza en tubos de vidrio de 10 mL y se diluye con 7 mL de solución salina de Hanks, pH 7.4 (SSH, Gibco lab.). Se centrifuga a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre 5 mL de gradiente Ficoll-Hypaque (Sigma). Se extrae el sobrenadante (S. Hanks, linfocitos y gradiente) y se recupera la interfase de polimorfonucleares. Se lava dos veces con SSH, centrifugando durante 5 mins a 400 x g y el botón se resuspende hasta 300  $\mu$ L con SSH, para dividirlo en 3 partes de 100  $\mu$ L cada una ( a, b y c). Se agrega a la muestra "a" 20  $\mu$ L de PAF  $10^{-7}$  M y se incuba a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 25 minutos. Se lava con solución salina 0.15 M amortiguada con fosfatos 0.01 M, pH 7.2, más azida de sodio al 1 % y suero fetal bovino al 2% (PBS-SFB), a 200 g durante 3 minutos. Posteriormente a las muestras "a" y "b" se les agrega 50 microlitros de IL-5/b (concentración de 10 ng/mL ) y se incuba durante 25 minutos a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se lava con PBS-SFB a 200 g durante 3 minutos. Por último se agrega a las mismas muestras, 25  $\mu$ g de avidina-fluoresceinada y se incuba durante 45 minutos a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se lava con PBS-azida a 1500 g durante 3 minutos, dos veces y, se lisan los eritrocitos con la solución de lisis "Facs lysing solution" (Becton-Dickinson) durante 5 minutos a temperatura ambiente; finalmente se lava en dos ocasiones más y se resuspende el sedimento, en 1 mL de PBS para su análisis en el citómetro de flujo. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **Análisis Estadístico:**

Para determinar las diferencias entre las medianas (dada la distribución no paramétrica de los datos) de fluorescencia relativa en los diferentes grupos de estudio, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, tomándose como significativa cuando la  $p$  fue inferior a 0.05.; posteriormente para determinar el grupo(s) de donde provino la diferencia se realizó la prueba de U de Mann-Whitney con ajuste descendente del nivel alfa a 0.01. Las comparaciones de variables categóricas entre los grupos se realizaron mediante  $\chi^2$  o prueba exacta de Fisher si el número de esperados en alguna casilla fue inferior a 5. El cálculo del poder estadístico para las diferencias no significativas se realizó con base en la diferencia estandarizada y el número de sujetos incluidos por grupo (64,65).

### **Consideraciones éticas:**

Las maniobras y procedimientos realizados en los participantes son los que habitualmente se utilizan para establecer el diagnóstico de neurocisticercosis (ELISA, TAC y RM), a excepción del examen de sangre venosa (riesgo menor), para lo cual se solicitó el consentimiento por escrito a los participantes. De esta forma no se transgreden las normas éticas de la reunión de Helsinki de 1964 y su revisión en 1975.

## **RESULTADOS:**

Se estudiaron 14 sujetos con NCC de los cuales 7 fueron clasificados como malignos y 7 como benignos. Con respecto al lugar de procedencia tanto en los sujetos con y sin neurocisticercosis, predominó el Distrito Federal (10 de 14 y 6 de 7 respectivamente).

No se encontró diferencia significativa en la frecuencia de sexos y la mediana de edad, al clasificar los casos de neurocisticercosis por gravedad, número de cisticercos y localización de la enfermedad (Cuadro III), lo que sugiere grupos comparables.

El tiempo de evolución de la neurocisticercosis entre los sujetos con enfermedad maligna y benigna, fue superior en los segundos con mediana de 47 (12-85 meses) contra 15 meses (1-22 meses) en el grupo con enfermedad maligna ( $p = 0.01$ ).

En la figura 7 se muestra la frecuencia de las diferentes manifestaciones clínicas entre los grupos mencionados. Como se observa, cefalea fue la manifestación más frecuente en los casos de NCC de cualquier gravedad, las crisis convulsivas predominaron en el grupo de NCC benigna, mientras que las alteraciones mentales y síndromes hemisféricos en los casos de enfermedad maligna. Llama la atención que en el 80% de los casos de éste último grupo, no se encontró papiledema al momento del diagnóstico.

El grupo control estuvo constituido por pacientes con: aneurisma cerebral (32.7%), meningioma (28.5%), glioma de tallo cerebral y fistula de LCR (14.2 %, cada uno).

El número absoluto basal de eosinófilos en sangre periférica, determinados en los tres grupos de acuerdo a su clasificación por gravedad mostró medianas similares ( $p = 0.5$ ). Al comparar la fluorescencia de los eosinófilos provenientes de pacientes con NCC parenquimatosa (32 UFR), subaracnoidea (73.6 UFR) y la mixta (158 UFR), la diferencia no fue significativa ( $p = 0.43$ ) (cuadro IV).

La fluorescencia relativa de los eosinófilos activados de los pacientes con NCC benigna, fue de 206.74 UFR, mientras que en los sujetos con enfermedad maligna fue de 222.2 URF y en las personas sin la enfermedad ascendió a 1,156.8 URF,  $p = 0.008$  ( ver cuadro IV y figura 8 ). Las comparaciones de dicho resultado surgieron de la diferencia entre los grupos de NCC benigna y controles (  $p = 0.001$  ) y entre NCC maligna y controles (  $p = < 0.01$  ) ya que la comparación entre el grupo de NCC benigna y maligna no fue significativa (  $p = 0.2$  ).

Al agrupar a los pacientes de acuerdo al número de cisticercos, no se demostró diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la capacidad de activación de los eosinófilos ( cuadro IV ). Lo anterior puede deberse a que el poder del estudio calculado para encontrar diferencia entre estos grupos, fue menor a 5%.

No existió diferencia en el número de cisticercos entre el grupo con NCC benigna ( mediana = 5 ) y maligna ( mediana = 6 ) (  $p = .86$  ).

En los pacientes con NCC maligna se encontró una mayor frecuencia de localización de los cisticercos en la región intraventricular combinada con la parenquimatosa ( 4 de 7 pacientes ); en cambio, no existió ningún caso en el grupo de NCC benigna, que incluyera la localización intraventricular ( 0 de 7 pacientes ) ( cuadro V ).

## DISCUSION:

La participación de los eosinófilos en la defensa del hospedero ante infecciones parasitarias, no se ha determinado en su totalidad; sin embargo, la presencia de eosinofilia a nivel tisular y en sangre periférica durante el proceso inflamatorio, sugiere que participa en forma activa en la defensa del hospedero (22).

En ensayos *in vitro*, se ha mostrado que los eosinófilos presentan capacidad parasiticida únicamente en su forma activada y que la sólo presencia de ellos durante el proceso inflamatorio no es suficiente (31-41). En modelos *in vivo* la única evidencia de asociación de eosinófilos tisulares "activados" y resistencia a la parasitosis, lo constituye el modelo de cisticercosis hepática causada por *T. taeniaeformis*, los eosinófilos se encontraban adheridos y degranulados en la cepa resistente (BALB/cj), mientras que en la cepa susceptible (C3H/HeDub), los eosinófilos estaban adyacentes a los cisticercos y sin desgranular (48).

En la NCC, los estudios realizados con el fin de asociar los cambios inmunológicos con la respuesta de defensa del hospedero, no han mostrado relación alguna con la respuesta humoral o con cambios en la mitogénesis y transformación blastoide (66-67).

En este estudio se demostró que la activación *in vitro* de los eosinófilos periféricos de los pacientes con NCC, es menor en relación a la activación de los eosinófilos de los pacientes sin la enfermedad. Este hecho sugiere que los eosinófilos tienen participación activa en el mecanismo de defensa del hospedero.

Sin embargo, no se encontraron diferencias en el grado de activación de los eosinófilos periféricos en relación a la gravedad de la enfermedad, incluso el gradiente presentado es inverso al propuesto, ya que los casos con NCC maligna mostraron una mayor capacidad de activación, aunque no significativa ( poder estadístico < 5 %) que el grupo con NCC benigna.

Por otro lado, los resultados sugieren que la diferente expresión clínica de la enfermedad puede ser debida al efecto mecánico de los cisticercos, ya que en los sujetos con enfermedad maligna se encontró una mayor frecuencia de localización intraventricular, lo que obstruye el flujo normal de líquido cefalorraquídeo y produce hipertensión intracraneal en forma temprana y grave, en comparación con los pacientes con enfermedad benigna, en donde ningún caso tuvo esta localización ( 57 % vs 0 ).

La mayoría de los casos con NCC incluidos recibieron tratamiento con albendazol (11 de 14), a diferencia de los sujetos incluidos en el grupo de pacientes sin esta enfermedad (0 de 7), lo que podría confundir los resultados si este fármaco disminuyera la capacidad de activación de los eosinófilos y por lo tanto explicara las diferencias encontradas. Sin embargo, existe evidencia actual que lo hace poco probable. Las investigaciones sobre la farmacología del albendazol sugieren que su mecanismo de acción permite una mejor función de los eosinófilos en el ataque al cisticerco (68), lo que se corrobora en nuestro estudio, ya que la fluorescencia relativa de los casos con tratamiento fue mayor a la de los casos que no recibieron (103.4 vs 59 UFR).

Cuando los eosinófilos son *activados*, presentan características particulares como hipodensidad, degranulación, aumento en la capacidad quimiotáctica y expresión en los receptores de membrana para IL-5, lo que se asocia a una mayor capacidad parasitocida (52-57,63-65). Los resultados presentados en el presente estudio fueron obtenidos *in vitro*, sin embargo sugieren que *in vivo* la incapacidad relativa de los eosinófilos para activarse puede ser el factor permisivo para desarrollar la enfermedad, en un medio en el que todos estamos expuestos a los huevecillos de la *Taenia solium* (69).

Por otro lado existen publicaciones relacionadas con la presencia de "marcadores" de susceptibilidad y resistencia a la neurocisticercosis parenquimatosa, en la que el antígeno de histocompatibilidad principal HLA A28 (clase I), se asocia a un aumento 3.5 veces más alto de adquirir neurocisticercosis, en tanto que el Dqw2 (clase II) se asocia a una menor

frecuencia de la enfermedad en los sujetos (70). El mecanismo por el cual se explica lo anterior es desconocido, sin embargo, como en otras patologías se podría proponer la presencia de asociación entre el HLA y alteraciones en la capacidad de activación de los eosinófilos; por ejemplo, a través de la expresión defectuosa de las integrinas beta 1 y beta 2 en los pacientes con NCC, las cuales participan en el reclutamiento y la activación de los eosinófilos (71,72).

La estimación del grado de activación en este estudio se realizó a través de la medición de la capacidad de los eosinófilos para unir IL-5, hecho que está relacionado con la expresión del receptor para esta citocina. Estudios futuros deberán encaminarse por un lado a demostrar la participación tisular (*in vivo*) en la defensa del hospedero ante la NCC, y por otro a la medición de otras citocinas como IL-4, inmunoglobulinas como IgE (73), y la producción o liberación de proteínas de los eosinófilos que permitan aclarar si éstas están relacionadas con la diferente expresión clínica de la enfermedad y/o se asocian con una clase especial de HLA.

## REFERENCIAS :

1. Flisser A. Relación hospedero parásito en la cisticercosis humana y porcina. *Gac Med Mex* 1987; 123: 157-62.
2. Centers for Disease control and prevention. Neurocysticercosis. Update: International task force for disease eradication. *MMWR* 1992;41:697-8.
3. Rabiela M, Rivas A, Rodriguez J. Anatomopathological aspects of human brain neurocysticercosis. *Pathol* 1979;17:119-36.
4. Sotelo J, Guerrero B, Rubio F. Neurocysticercosis: a new Classification based on active and inactive forms: A study of 753 cases. *Arch Intern Med* 1985.145:442-45.
5. Krammer L, Locke G, Byrd S, Daryabagi J. Cerebral cysticercosis: documentation of Natural History with CT. *Radiology* 1989;171:459-62.
6. García H, Herrera G, Gilman R. Discrepances between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1986;49:1044-49.
7. Teitelbaum O, Lin M, Watanabe A, Stull M, Manz H. MR imaging of neurocysticercosis. *Am Neuroradiol* 1989;153:857-66.
8. Gemme J, Maldonado Y, Enzmann D, Hotez P, Overturf G, Schantz P. Consensus: diagnosis and management of neurocysticercosis in children. *Pediatr Infect Dis* 1993;455-61.
9. Barry M, Kaldjian L. Neurocysticercosis. *Seminar Neurol* 1993;13:131-143.
10. Corona T, Pscoe D, Gonzalez D, Abad P. Anticysticercous antibodies in serum and CSF in patients with cerebral cysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1986;49:1044-49.
11. Rosas N, Sotelo J, Nieto D. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch Neurol* 1986; 43: 363-66.
12. Wilson M, Bryan R, Fried J. Clinical evaluation of the cysticercosis IET in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1991; 164: 1007-9.

- 13.Chang K, Kim W, Cho S, Hani M, Kim C. Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Neuroradiol* 1990;53:656-61.
- 14.Estañol B, Corona BT, Abad P. A prognostic clasification of cerebral cysticercosis: Therapeutic implications. *J Neurol Neurosur Psychiatr* 1986; 49:1131-34.
- 15.Del Brutto O, Sotelo J. Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* 1988;10:1075-1087.
- 16.Cunningham A. *Understandig immunology*. Nueva York, Academic press, 1978, pp-208-09
- 17.Flisser A, Willms K, Laclette J, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. *Cvsticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Nueva York, Academic Press, 1982, 575.
- 18.Couldwell W, Michael L, Appurzo J. *Cysticercosis cerebri*. *Neurosurg Clin North Am* 1992;3:471-80.
- 19.Cunningham A. *Understandig immunology*. Nueva York, Academic press, 1978, pp-208-09
- 20.-Capron M, Spielberg H, Prin L, Bennich H, Butterworth E, Pierce R, Ovaissi M, Capron A.. Role of IgE receptor in effector function of human eosinophils. *J immunol* 1984;132:462-467.
- 21.- Valdés M, Calero M. Deficiency of eosinophil peroxidase detected by automated cytochemistry. *Acta Haematol* 1987;78:265
- 22.-Noemí I, Atias A. Eosinofilia y parasitosis. En: Atias A. *Parasitología clínica*. Santiago, Chile. Ed Mediterraneo, 3<sup>a</sup> ed, 1991: 457-61
- 23.-Braker R, Loering D, Ten R, Hamman K, Pease L, Gleich G. Eosinophil cationic protein cDNA. *J immunol* 1989;143:952-55.
- 24.-White C, Maxwell J, Gallin J. Changes in the structural and functional properties of human eosinophils during experimental hookworm infection. *J Infect Dis* 1986;154:778-783.

- 25.- Kapp A., Zeck G. Interleukin-5 induced granulocyte activation in atopic patients. *Br J Dermatol* 1991;125:108-115.
- 26.- Ramesh K, Roclin E, Pincus S. Activated human eosinophils synthesize new proteins. *Bioch Bioph Acta* 1987; 923:241-249.
- 27.- Chihara J, Plumas J, Guart V, Tavernier J, Prin L, Capron A, Capron M. Characterization of a receptor for IL5 on human eosinophils: variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1990;172:1347-51
- 28.- Bass D, Grover W, Lewis J, Szejda P. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. *J Clin Invest* 1980;66:1263-73.
- 29 - De Simone C, Donelli G, Melle D, Rosati F, Sorice F. Human eosinophils and parasitic diseases II. Characterization of two cell fractions isolated at different densities. *Clin Exp Immunol* 1982;48:249-255.
- 30.- Englekirk P, Williams J, Signs M. Interactions between *Taenia taeniaeformis* and host cells in vitro: rapid adherence of peritoneal cells to strobilocerci. *Int J Parasitol* 1981; 11:461.
- 31.Massmoen T, Bell M, Loegering D, Gleich G, Prendergast F, McKean D. Biochemical and aminoacid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. *J Biol Chem* 1988;263:12559-12563.
- 32.Butterworth A, Vadas M, Wassom D, Dessein A, Hogan M, Sherry B, et al. Interactions between human eosinophils and schistosomula of *Shistosoma mansoni*. *J Exp Med* 1979;150:1456-1471.
- 33.Butterworth A, Wassom D, Gleich D, Loegering D, David J. Damage of schistosomula of *Schistosoma Mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J immunol* 1979 122;221-29.
- 34.Wassom D, Gleich G. Damage of *Trichinella spiralis* newborn larvae by eosinophil major basic protein. *Am J trop Med Hyg* 1979;28:60-63.
- 35.Willms K, Merchant T. The inflammatory reaction surrounding *Taenia Solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. *Parasite Immunol* 1980;2:261-275.

36. Basten A, Boyer M, Beeson P. Mechanisms of eosinophilia. I. Factors affecting the eosinophil response of rats to *Trichinella spiralis*. J Exp Med 1970; 131: 1271-87.
37. De aluja A, Vargas G. The histopathology of porcine neurocysticercosis. Vet Parasitol 1988; 28:65-77.
38. Kay A, Austen K. Antigen-antibody induced cutaneous eosinophilia in complement deficient guinea-pigs. Clin Exp Immunol 1972; 11: 37-42.
39. Basten A. , Beeson P. Mechanisms of eosinophilia II. Role of the lymphocyte. J Exp Med 1970; 131: 1288-1305.
40. Boyer M, Basten A, Beeson P. Mechanisms of eosinophilia III. Supresion of eosinophilia by agents known to modify immune responses. Blood 1970; 36: 458-69.
41. Hamann K, Barker R, Loegering A, Gleich G. Comparative toxicity of purified human eosinophil granule proteins for newborn larvae of *Trichinella spiralis*. J Parasitol 1987;73:523-529.
42. Ackerman S, Gleich G, Leogering D, Richardson B, Butterworth A. Comaparative toxicity of purified human eosinophil granule cationic proteins for schistosomula of *S. Mansoni*. Am J trop Med Hyg 1985;34: 735-45.
43. Mahmoud A, Warren M, Peters P. A role in acquired resistance to *Schistoma mansoni* infection as determined by antieosinophil serum. J Exp Med 1975;142:805-813.
44. Butterworth A, David J, Franks D, Mahmaud A. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to <sup>51</sup>Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: Damage by purified eosinophils. J Exp Med 1977; 145:136-50.
45. Huerta L, Terrazas L, Sciuto E, Larralde C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. J Parasitol 1992; 78: 471-6.

46. Yazdanbakhsh K, Eckman C, De Boer M, Ross D. Purification of eosinophils from normal human blood, preparation of eosinoplasts and characterization of their functional response to various stimuli. *Immunology* 1987;60:123.
47. Hamman K, Gleich G, Checkel J, Leogering G, McCall J, Barker R. In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. *J Immunol* 1990; 144:3166-3173.
48. Letonja T, Hammerberg C. *T. Taeniaeformis*: early inflammatory response around developing metacestodes in the liver of resistant and susceptible mice. *J Parasitol* 1987;73:971.
49. Ansari A, Williams J. The eosinophilic response of rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. *J Parasitol* 1976; 62: 728-36.
50. Pullin J. Observations on liver lesions in lambs experimentally infected with the cysticercus of *Taenia hydatigena*. *Can J Comp Med* 1955; 14: 17-25.
51. Weiss S, Test S, Carel M, Eckmann D. Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science* 1986; 234: 200-3.
52. Koenderman L, Bruijnzeel L. Increased sensitivity of the chemoattractant-induced chemiluminescence in eosinophils isolated from atopic individuals. *Immunology* 1989;67:534-36.
53. Pincus S, Butterworth A, Robbins D, Vadas M. Antibody dependent eosinophil-mediated damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni*: Lack of requirement for oxidative metabolism. *J Immunol* 1981;126:1794-99.
54. Tek Y. Cytologic Diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Cytol* 1994;38:87-89.
55. Hanley J, Mc Neil B. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983 ;148 :839-43.
56. Walsh G, Likura Y. Flow cytometric analysis of increased IgE uptake by normal eosinophils following activation with PAF-acether and other inflammatory mediators. *Int Arch Allergy Immunol* 1989;88:194-96.
57. Gore S. Assessing clinical trials. Trial size. *Br Med J* 1981;282:1687-9.

58. Enokihara H, Furosowa S, Nakakubo H. T cells from eosinophilic patients produce IL-5 with il-2 stimulation. *Blood* 1989;73:1809-1813.
59. Rotehnberg M, Petersen J, Stevens R. IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3t3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity, and sustained antibody dependent cytotoxicity. *Parasitol Res* 1992; 87: 243-6.
60. López A, Williamson J, Gamble J. Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* 1986;78:1220-28.
61. Yazdanbakhsh M, Eckman CM, De Boer M, Ross D, Verhoven A. Eosinophils do respond to fMLP. *Blood* 1987;70:379-83.
62. López M, Arellano J, Scherer G, Kretschmer R. The killing of *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Arch Med Res* 1992;23:143-45.
63. Boyüm A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Inv* 1968;97:77.
- 64.- Altman D. How large a sample. *Br Med J* 1980;281:1336-8.
65. Sheila G. Statistics in question. Art of significance testing. *Br Med J* 1981;283:600-2. ||
66. Basten A , Beeson PB. Mechanisms of eosinophilia. II. Role of the lymphocyte. *J Exp Med* 1970; 131: 1288-1305.
67. Boyer M , Basten A , Beeson P. Mechanisms of eosinophilia III. Supresion of eosinophilia by agents known to modify immune responses. *Blood* 1970; 36: 458-69.
68. Quintero E. Praziquantel vs. albendazol for cysticercosis. *Neurosurg* 1988;23:128.
- 69.- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Tzipe G, Sciutto E, Gutierrez G et al. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pub Mex* 1992;34:197-210.

70. Del Brutto O, Granados G, Talamas O, Sotelo J, Gorodezky C. Genetic Pattern of the HLA system: HLA A,B,C,DR and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Hum Biol* 1991;63:85-93.
71. Kita H, Gleich G. Extracellular matrix proteins attenuate activation and degranulation of stimulated eosinophils. *J Immunol* 1996;156:1174-81.
72. Broomé U, Nemeth A, Hultcrantz R, Scheynius A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. *J Hepatol* 1997; 26:857-62.
73. Takenaka K, Kuribayashi H, Nakamine M, Tsujimoto Y. Regulation of cytokines of eosinophilopoiesis and immunoglobulin E production in mice. *Immunol* 1993;78:541-6.
74. Guedeson J, Temyck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1131-39.

### Cuadro I.

**Cuenta diferencial porcentual de leucocitos antes y después de la separación con gradiente Ficoll-Hypaque ( n= 4).**

<b>Célula</b>	<b>Pre-separación ( % )</b>		<b>Post-separación ( % )</b>	
	<b>Mediana</b>	<b>Rango 95 %</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango 95 %</b>
Linfocitos	24	16 - 45	4.5	2 - 8
Monocitos	1	0 - 2	2.5	0 - 3
<b>Eosinófilos</b>	2	2	9	8 - 10
Basófilos	0	0	0	0
Polimorfonucleares	73	53 - 80	82.5	76 - 90

**Cuadro II.**

**Fluorescencia relativa (UFR) encontrada a diferentes concentraciones y tiempo de incubación con PAF, IL-5 y avidina-fluoresceinada utilizados en el marcaje de eosinófilos periféricos.**

<b>Muestra</b>	<b>PAF</b> tiempo de incubación en minutos	<b>IL-5</b> cantidad en $\mu\text{g}$	<b>Avidina-FITC</b> tiempo de incubación en minutos	<b>UFR</b> media de la fluorescencia relativa
a	15	50	45	190.0
b	25	50	45	365.8
c	60	50	45	534.8
d	25	10	45	208.9
e	25	100	45	295.6
f	25	50	30	205.0
g	25	50	60	273.5
h	-	50	45	269.7
i	-	-	45	250.6
j	-	-	-	125.5
k	-	50	-	93.4
l	25	-	-	80.2
m	25	50	-	113.9

**Cuadro III.**

**Edad y sexo de acuerdo a gravedad, localización y número de cisticercos en pacientes con neurocisticercosis.**

CLASIFICACION	GRUPOS	n	EDAD	p	SEXO	p <sup>&amp;</sup>
			Mediana y rango al 95% en años		femenino	
Localización	Parenquimatosa	2	52 (48-56)	0.33*	50%	0.29
	Subaracnoidea	2	35.5 (27-44)		50%	
	Mixta	10	42.9 (35-58)		82.5%	
Gravedad	NCC Benigna	7	46.7 (28-50)	0.46*	57%	0.81
	NCC Maligna	7	40 (30-48)		71%	
	Sanos	7	50.7 (36-64)		57%	
Número de cisticercos	1 a 10	9	41.6 (30-59)	0.56**	40 %	0.34
	11 ó más	5	46 (35-53)		60%	

\* Kruskal-Wallis, \*\* T de student, & Chi<sup>2</sup> o prueba exacta de Fisher.

**Cuadro IV.**

**Fluorescencia relativa de los eosinófilos de pacientes con neurocisticercosis calcificados por localización, gravedad y número de cisticercos.**

CLASIFICACION	GRUPOS	n	Fluorescencia relativa (mediana)	p
Localización	Parenquimatososa	2	32 (5-59)	0.43*
	Subaracnoidea	2	73.6 (27-120)	
	Mixta	10	158 (95-110)	
Gravedad	NCC Benigna	7	206.7 (46-304)	0.008 *
	NCC Maligna	7	222.2 (77-285)	
	Sanos	7	1157 (343-1917)	
Número de cisticercos	1 a 10	9	110 (5-1420)	0.54 **
	11 ó más	5	87 (60-515)	

\* Kruskal-Wallis, \*\* U de Mann Whitney

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Cuadro V.**

**Frecuencia de lesiones por localización y número de cisticercos en pacientes con neurocisticercosis benigna y maligna**

		<b>GRAVEDAD.</b>		
<b>CLASIFICACION:</b>		<b>Benigno.</b>	<b>Maligno.</b>	<b>p*</b>
Número de cisticercos.	1 a 10	57.2 %	71.4 %	0.85 *
	11 ó más.	42.8 %	28.6 %	
Localización.	SA	14.3 %	28.6 %	0.039 *
	PA	28.6 %	7.1 %	
	SA + PA	57.2 %	7.1 %	
	IV + PA	0	57.2 %	

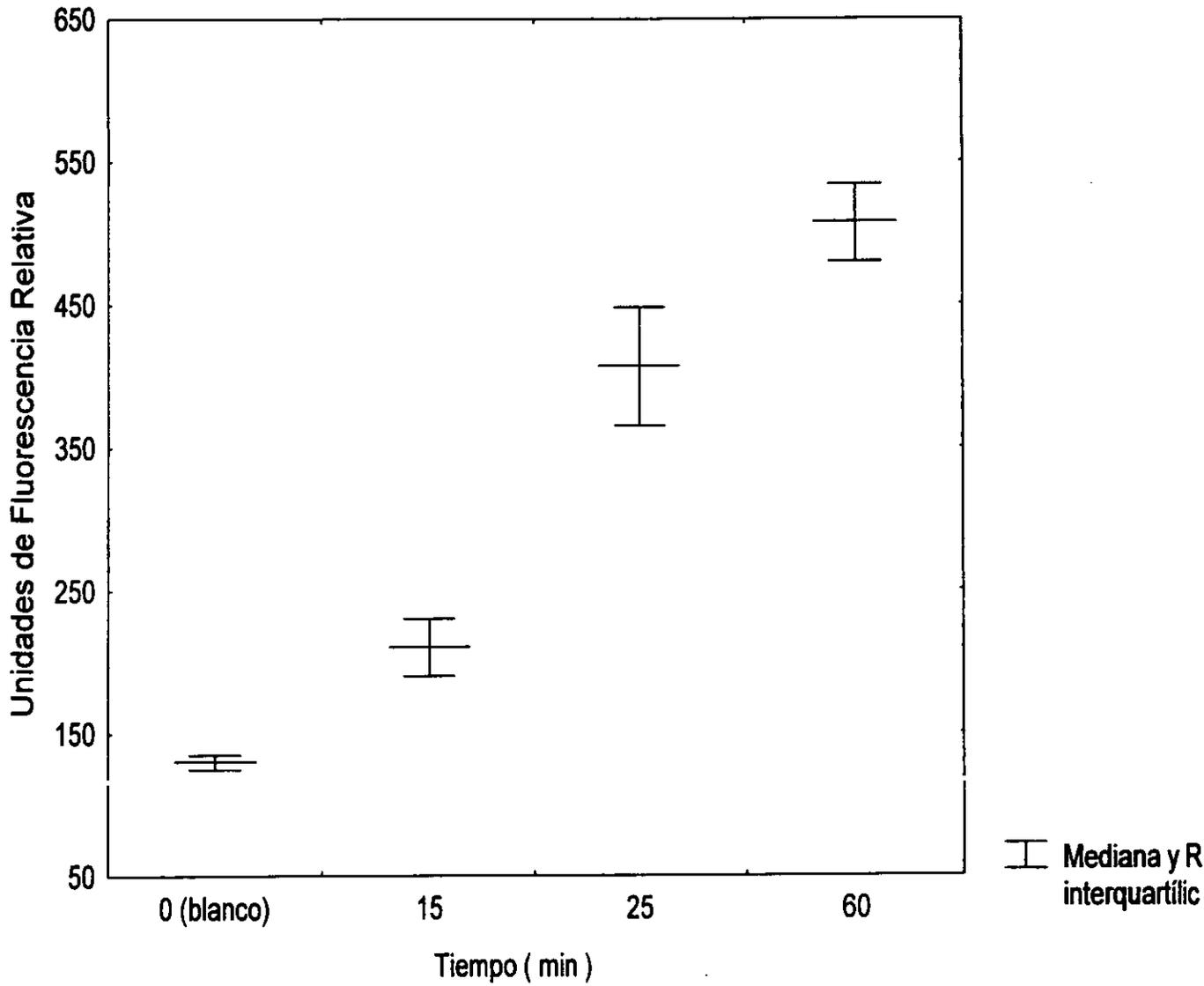
\* Chi<sup>2</sup>

PA = NCC parenquimatosa, SA= NCC subaracnoidea, IV= NCC intraventricular.

Figura 1.

Estandarización del tiempo de incubación de los granulocitos con PAF

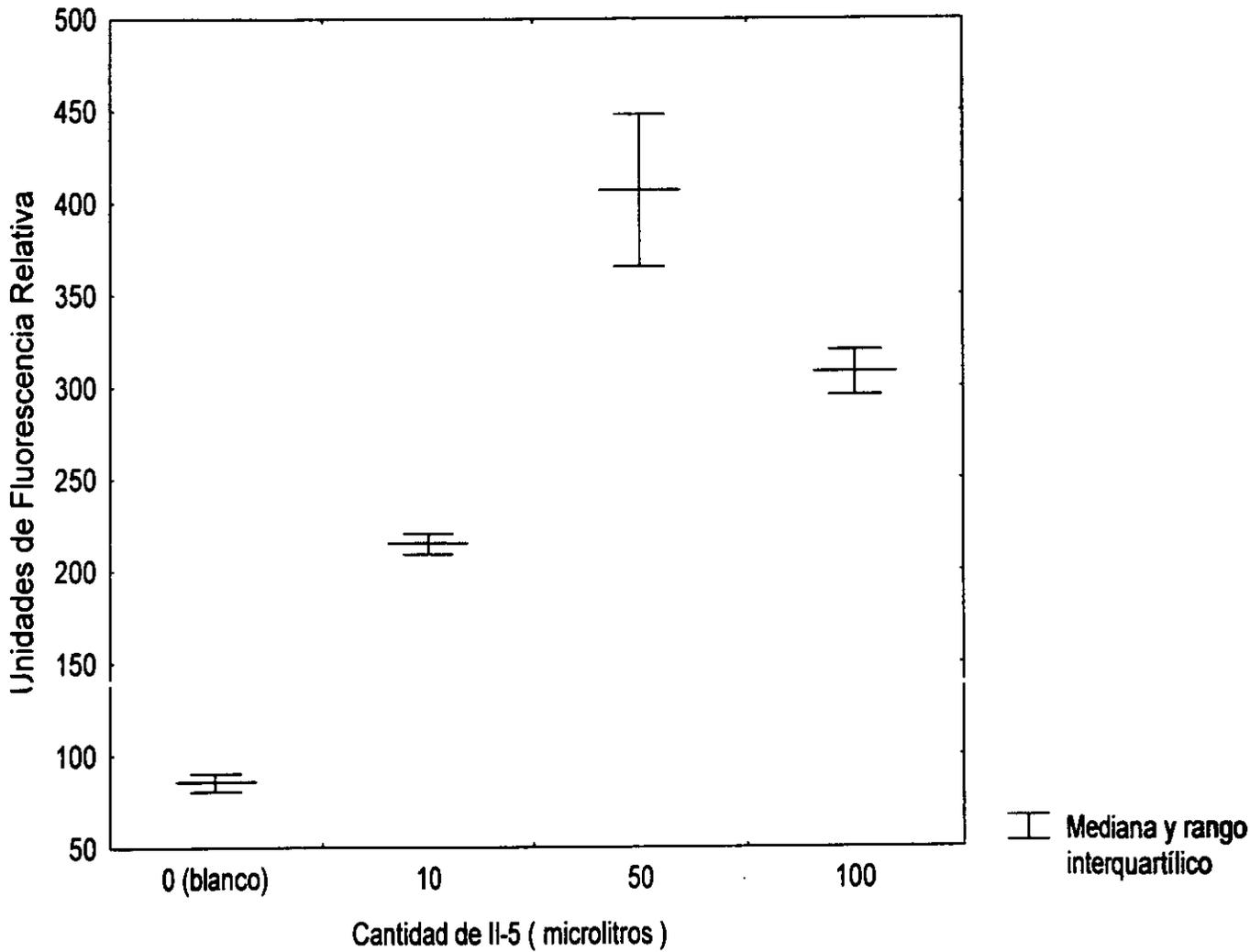
IL-5 ( 50  $\mu$ L, 25 min, FITC 50  $\mu$ g, 45 min )



**Figura 2.**

**Estandarización de la cantidad de IL-5 biotinilada para el marcaje de eosinófilos.**

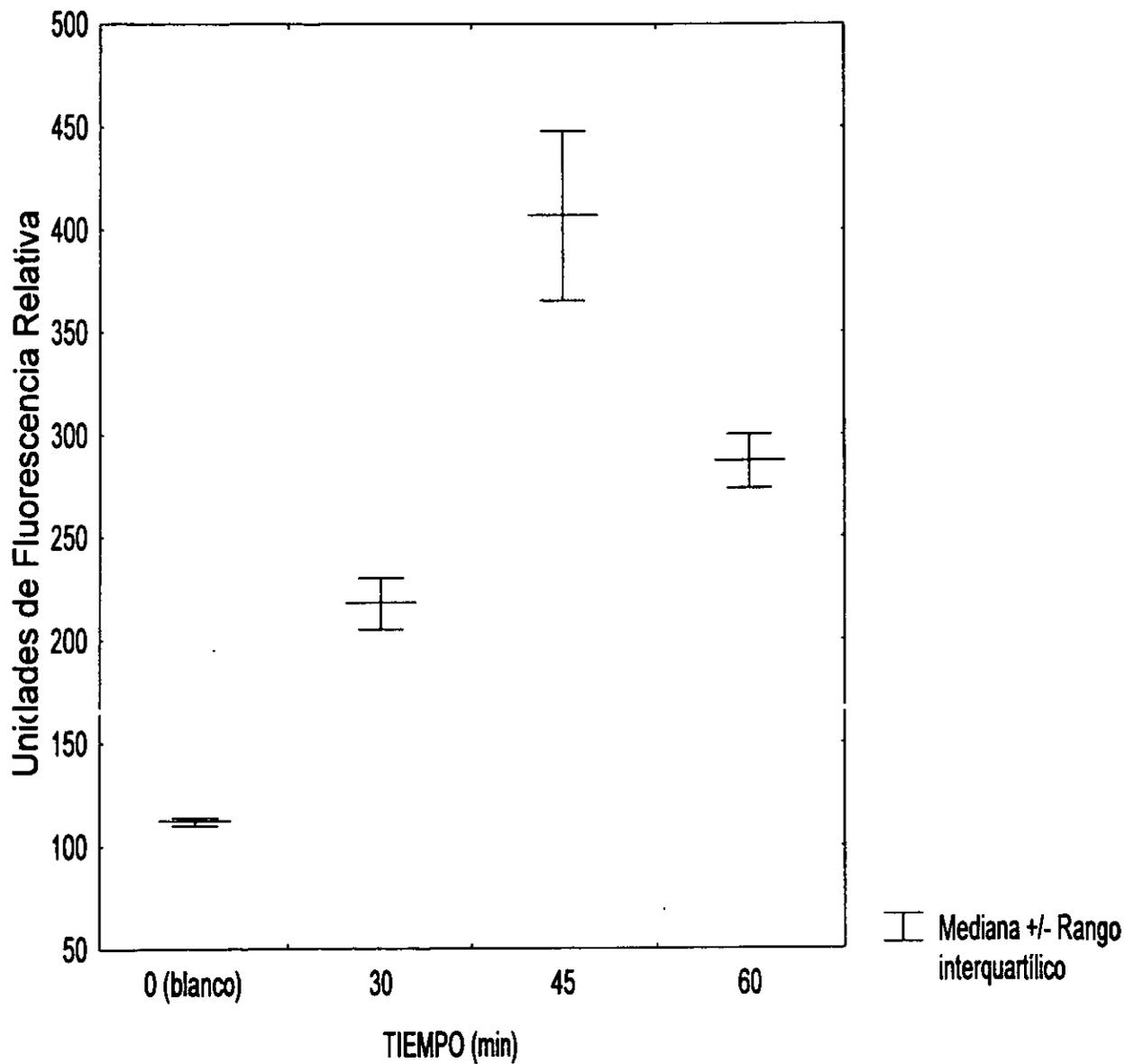
**IL-5 ( 10 ng/mL), PAF (20  $\mu$ L,  $10^{-7}$  M), FITC (50  $\mu$ g, 45 min)**



**Figura 3.**

**Estandarización del tiempo de incubación con avidina fluoresceinada para el  
marcaje de eosinófilos.**

**PAF (25 min,  $10^{-7}$ M, 20  $\mu$ L), IL-5 (50  $\mu$ g, 25 min)**



**Figura 4.**

**Estandarización de la cantidad de avidina fluoresceïnada para el marcaje de eosinófilos.**

**PAF (20  $\mu$ L,  $10^{-7}$  M, 25 min ), IL-5 ( $\mu$ g, 25 min)**

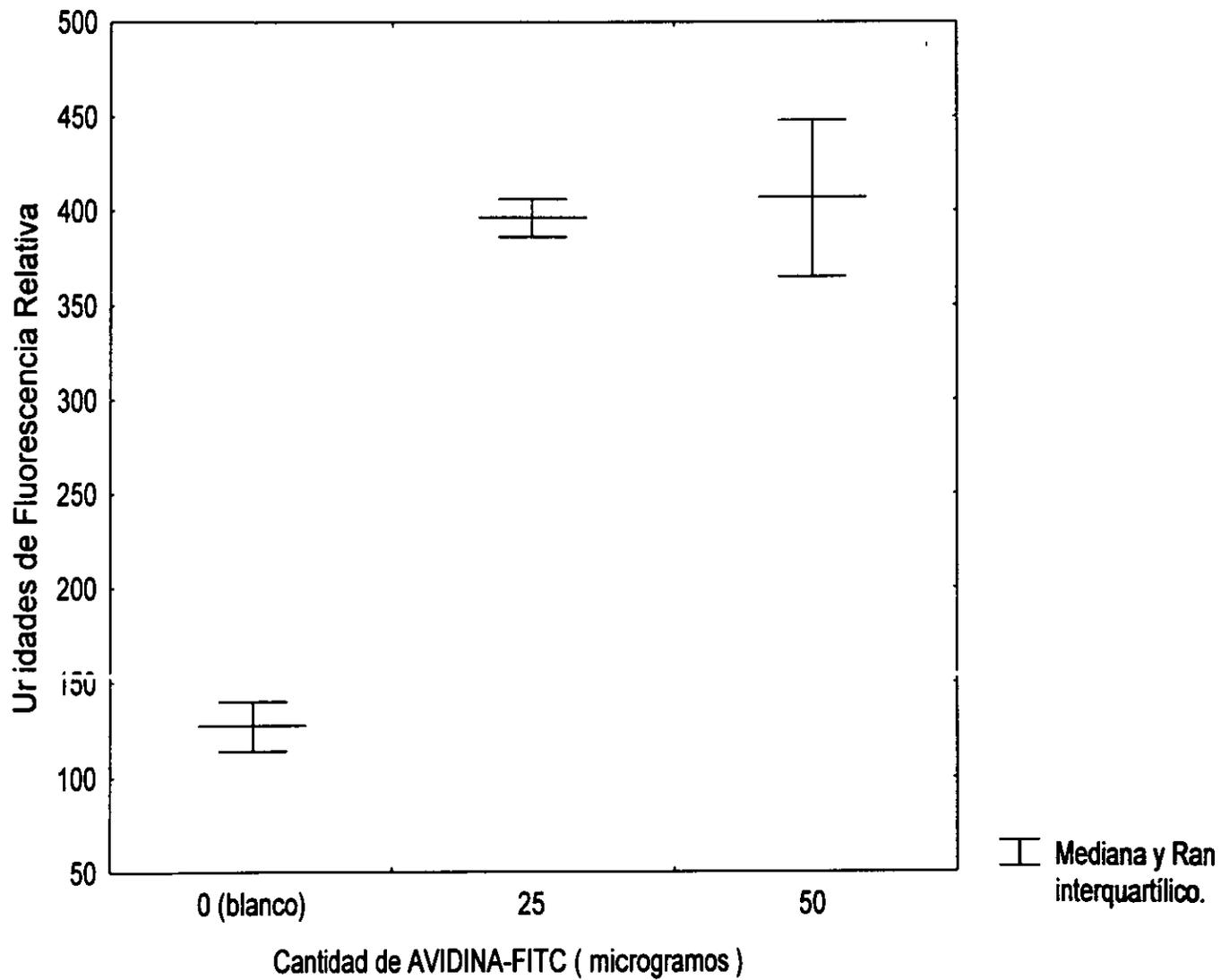
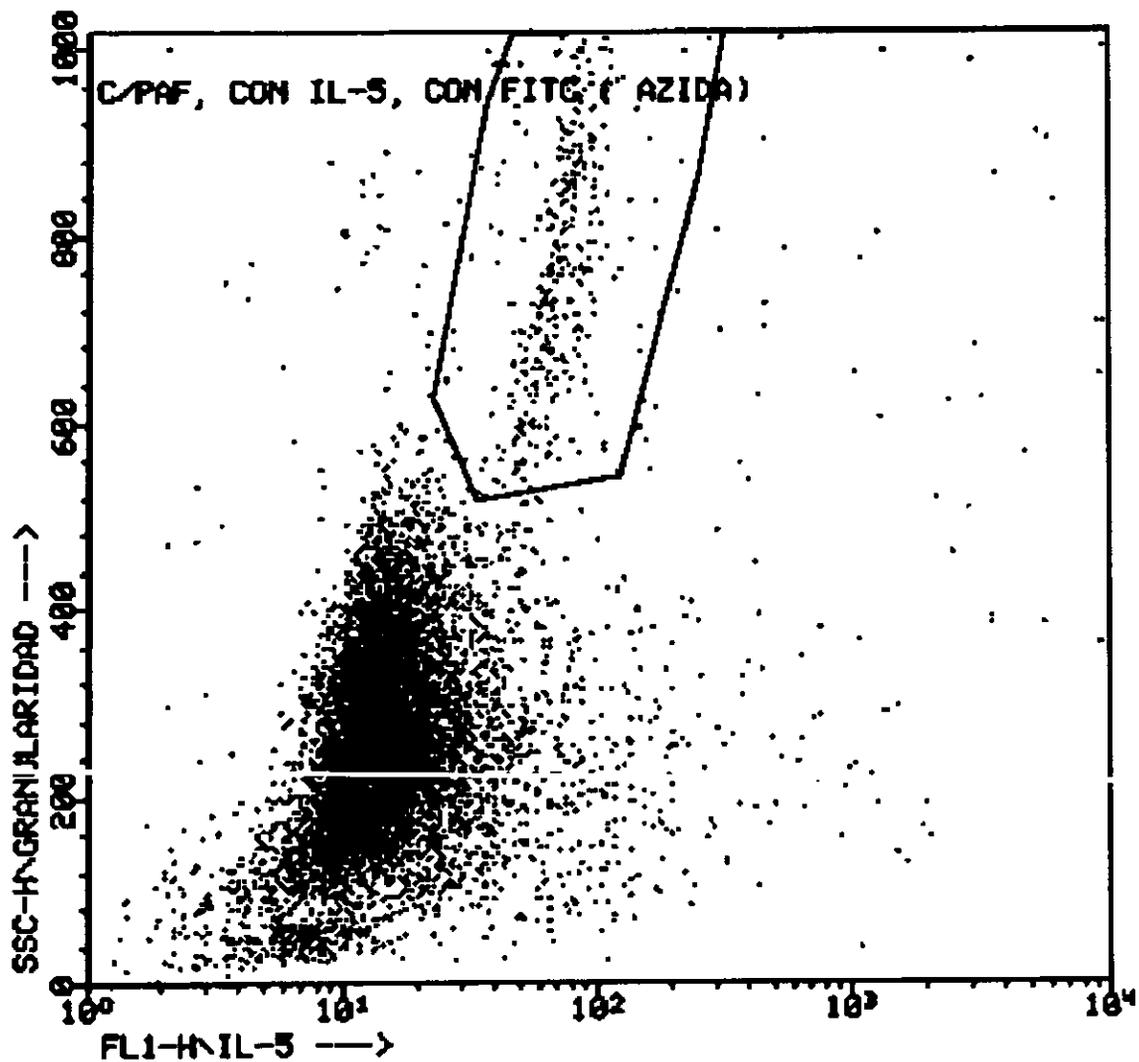


Figura 5.

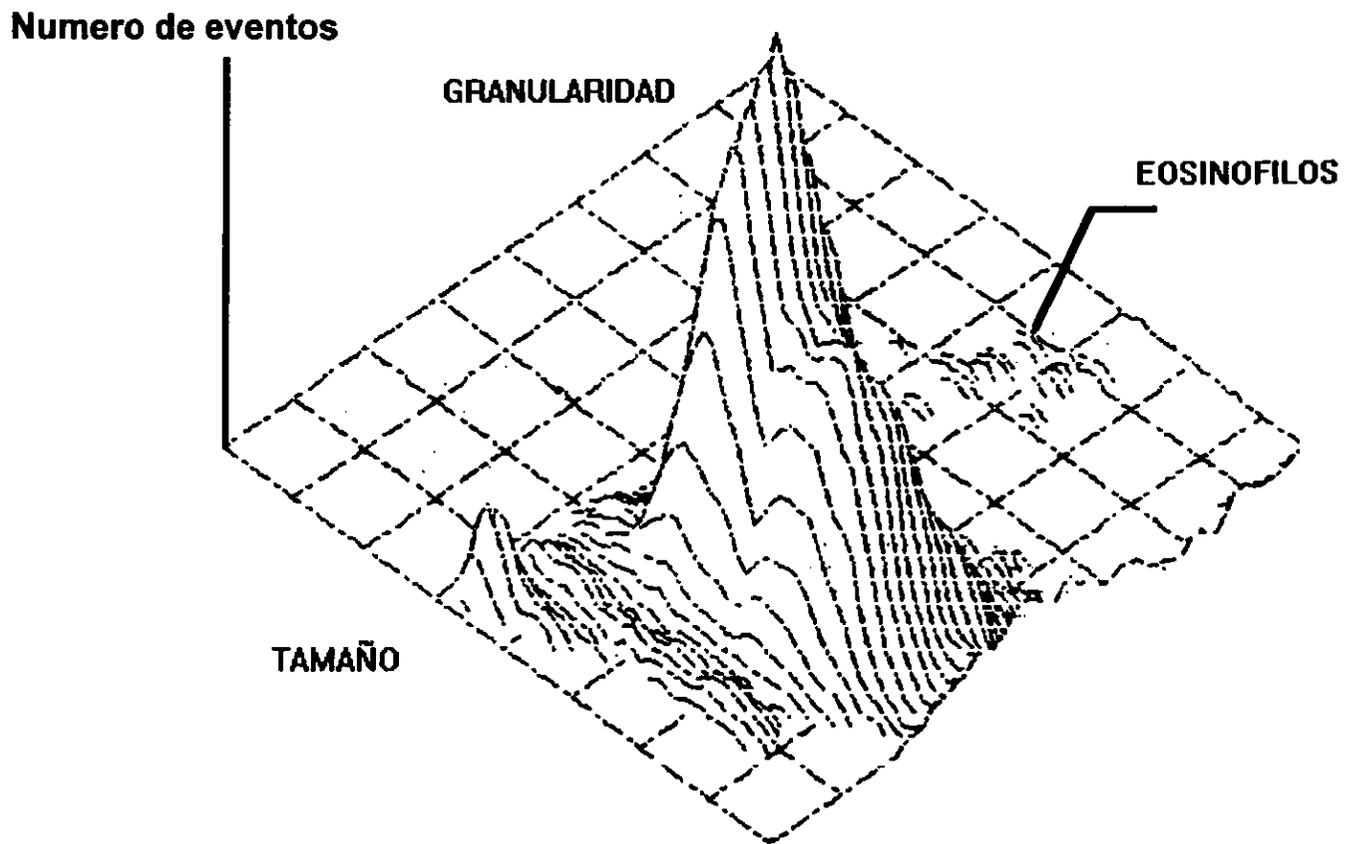
Localización de eventos en gráfica de granularidad vs fluorescencia-IL-5 de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo.



Gráfica de eventos ( leucocitos) por granularidad vs Fluorescencia en el canal 1 (FL1). La región delimitada comprende a los eosinófilos (mayor granularidad y fluorescencia ).

**Figura 6.**

**Localización de eventos por tamaño vs granularidad de leucocitos periféricos mediante citometría de flujo.**

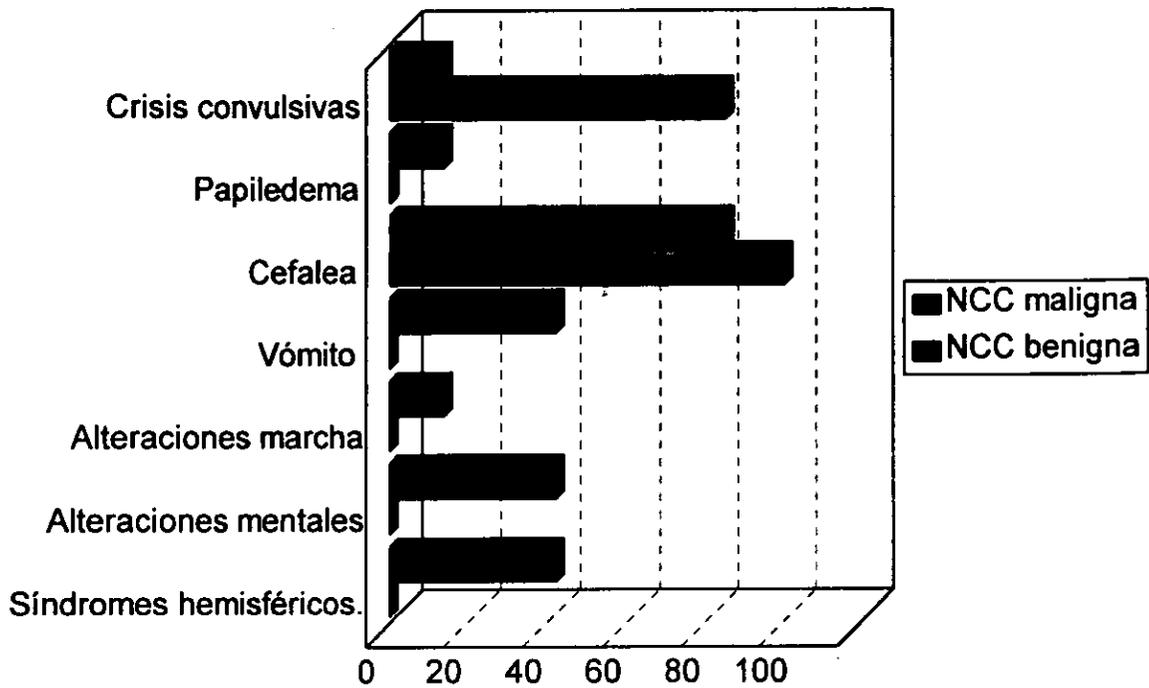


Gráfica tridimensional de eventos ( leucocitos ) por granularidad vs tamaño.

La región delimitada comprende a los eosinófilos.

**Figura 7.**

**Frecuencia de manifestaciones clínicas en pacientes con neurocisticercosis benigna y maligna.**

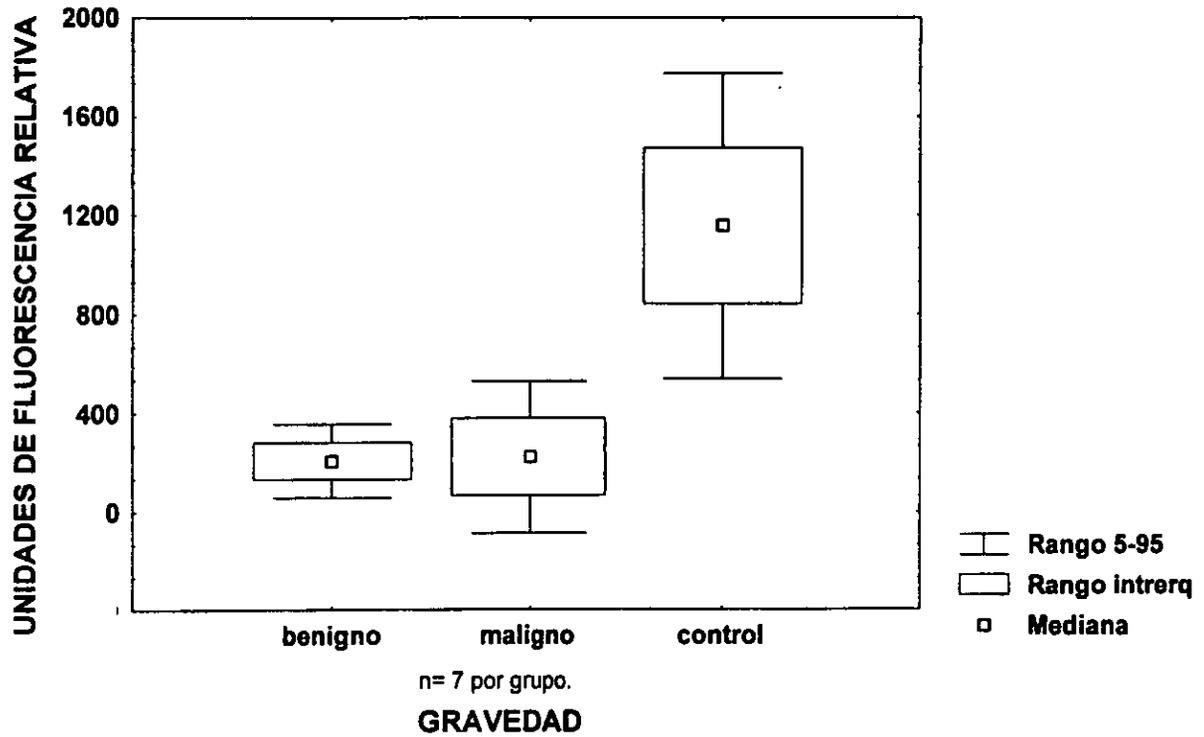


n= 7 por grupo.

porcentaje

**Figura 8.**

Fluorescencia relativa emitida por los eosinófilos activados de pacientes con NCC de diferente gravedad y sujetos sin la enfermedad.



\* cada experimento constó de tres replicaciones.