



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS CÉLULAS T  
REGULADORAS EN LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA  
PROLIFERATIVA DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN  
PACIENTES CON NEUROCISTICERCOSIS HUMANA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:  
ÁLVAREZ LUQUÍN DIANA DENISSE

ASESOR: DRA. LAURA ADALID PERALTA  
ASESOR INTERNO: DRA. EDDA SCIUTTO CONDE  
ASESOR TÉCNICO: M. en C. ASIEL ARCE SILLAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Agradecimientos**

**A mi familia:** Gracias a mis padres, que me han apoyado durante toda mi vida; a mis hermanos Hugo y Alaín, porque sin su apoyo nunca habría llegado hasta donde estoy ahora, pero sobre todo a mi mamá... gracias por jamás rendirte conmigo.

**A Rubén:** Gracias por todo el tiempo que hemos compartido y por toda la ayuda que me has brindado, pero sobre todo por tu apoyo y cariño, ¡¡te amo, pechocho!! También a su familia, quienes me han abierto las puertas de su casa con mucho cariño y que me apoyaron durante mi pequeña estancia en Izcalli.

**A mis amigos:** A todos mis amig@s, que siempre han sido un gran apoyo en mi vida... ¡¡¡gracias por todo!!!

**A la vida:** Por cada una de las enseñanzas y alegrías que me brinda cada día.

## **Agradecimientos académicos.**

**A mi tutora:** No gracias por la paciencia, pero sí por su apoyo incondicional y por exigirme siempre más. Me ha ayudado a darme cuenta de que suficiente no basta y que debo esforzarme más.

**Al M. en C. Asiel Arece Sillas:** Boss, gracias por toda la ayuda y el apoyo que me brindaste durante todo este tiempo.

**Al M. en C. Carlos Castellanos:** Por su ayuda técnica aportada con el citómetro de flujo.

**A Juan Francisco Rodríguez:** Por haber realizado la revisión de este trabajo.

**A Francisco Javier García Vázquez:** Por su apoyo en el aprendizaje de técnicas utilizadas en el presente trabajo.

**A todos mis profesores, pero sobre todo a mis sinodales:** Por todas las enseñanzas y su apoyo en mi proceso de titulación.

**A CONACyT:** Por el apoyo monetario otorgado para la realización de este trabajo.

**A Becas PROBEI:** Por el apoyo monetario otorgado para la conclusión de este trabajo.

La presente tesis fue financiada por los proyectos de CONACyT 100708 y 167278; y por los proyectos de DEGAPA, UNAM IN-213911.

## Índice

Índice de abreviaturas.....	7
Índice de figuras.....	9
Índice de tablas.....	10
Resumen.....	11
Antecedentes.....	13
<i>Taenia solium</i> .....	13
Ciclo de vida.....	14
Neurocisticercosis.....	15
Epidemiología.....	17
Respuesta inmune.....	20
Respuesta proliferativa.....	21
Niveles de proliferación de pacientes con NC.....	24
Células T reguladoras.....	26
Mecanismo de acción.....	28
IL-10.....	30
IL-35.....	30
TGF- $\beta$ .....	31
IL-2.....	32
Justificación.....	36
Hipótesis.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos particulares.....	37
Materiales y métodos.....	38

Muestras de pacientes con NC y sujetos sanos.....	38
Consideraciones éticas .....	39
Antígenos.....	39
Antígeno total (AgT) de cisticerco de <i>T. solium</i> .....	39
Antígeno vesicular (AgV) de cisticerco de <i>T. solium</i> .....	40
Determinación del fenotipo de células T reguladoras .....	40
Determinación de la respuesta proliferativa .....	41
Respuesta proliferativa de PBMCs completas .....	41
Respuesta proliferativa de PBMCs sin Treg .....	42
Medición de citocinas.....	44
Resultados .....	45
Características de los pacientes con NC incluidos en el estudio .....	45
Determinación del fenotipo de células T reguladoras en la sangre.....	47
Correlación de células Treg del LCR con los niveles de Treg de la periferia en pacientes con NC.....	48
Determinación de la respuesta proliferativa .....	49
Medición de citocinas.....	51
Niveles de citocinas en plasma y LCR.....	51
Niveles de citocinas durante la respuesta proliferativa .....	53
Respuesta proliferativa de PBMCs totales (sin fraccionar) y PBMCs sin Treg (fracciones 1+4).....	55
Discusión.....	58
Determinación del porcentaje de células Treg en la sangre y del LCR de pacientes con NC.....	58
Determinación de la respuesta proliferativa .....	60
Medición de citocinas en plasma y LCR .....	61
Niveles de citocinas durante la respuesta proliferativa .....	63

Respuesta proliferativa de PBMCs (sin fraccionar) y PBMCs sin Treg (fracciones 1+4).....	64
Conclusiones.....	66
Referencias.....	67

## Índice de abreviaturas

Abreviatura	Palabra o palabras completas
<b>AgT</b>	Antígeno total de <i>Taenia solium</i>
<b>AgV</b>	Antígeno vesicular de <i>Taenia solium</i>
<b>AMPc</b>	Adenosina monofosfato cíclico
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>BSA</b>	Albúmina sérica de bovino
<b>DC</b>	Célula dendrítica
<b>CD</b>	Cúmulo de diferenciación
<b>CFSE</b>	Carboxifluoresceína diacetato, succinimidil éster
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FOXP3</b>	<u>Forkhead box 3</u>
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intracelular
<b>ICOS</b>	Co-estimulador inducible de células T
<b>IDO</b>	Indolamina 2,3-dioxigenasa
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>INN</b>	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
<b>LAP</b>	Péptido asociado de latencia
<b>Lck</b>	Tirosina cinasa específica de leucocitos
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>LFA-1</b>	Antígeno asociado a la función linfocitaria tipo 1
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad



<b>NC</b>	Neurocisticercosis
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón de fosfatos salino
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>Percp</b>	Proteína de peridina y clorofila
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina A
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo <u>Roswell Park Memorial Institute</u>
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>Th1</b>	Células T cooperadoras tipo 1
<b>Th2</b>	Células T cooperadoras tipo 2
<b>Tr1</b>	Células T reguladoras tipo 1
<b>Tr3</b>	Células T reguladoras tipo 3
<b>Treg</b>	Célula T reguladora

## Índice de figuras

		Página
Figura 1	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	<b>14</b>
Figura 2	Cisticerco de <i>Taenia solium</i> de forma vesicular.	<b>16</b>
Figura 3	Distribución geográfica de la cisticercosis según la OMS en 2009.	<b>18</b>
Figura 4	Seroprevalencia en la república mexicana por entidad federativa, 1987-1988.	<b>19</b>
Figura 5	Frecuencias anuales de pacientes con NC hospitalizados, 1995-2009.	<b>20</b>
Figura 6	Proceso de proliferación generado por la DC folicular.	<b>23</b>
Figura 7	Muestra la proliferación celular de pacientes con NC en diferentes fases de la enfermedad al estimular con antígeno.	<b>25</b>
Figura 8	Diferenciación de las células Treg.	<b>28</b>
Figura 9	Mecanismos de acción de las células Treg.	<b>29</b>
Figura 10	Proceso de reactivación de un linfocito T por parte de una APC.	<b>33</b>
Figura 11	Cascada de señalización de la IL-2.	<b>35</b>
Figura 12	Diseño experimental	<b>38</b>
Figura 13	Separación de células Treg a partir de células PBMCs totales.	<b>43</b>
Figura 14	Obtención del fenotipo de células Treg por citometría de flujo.	<b>47</b>
Figura 15	Correlación de las células Treg en sangre con los niveles de células Treg en LCR en pacientes con NC.	<b>48</b>
Figura 16	Obtención de los fenotipos celulares por citometría de flujo y análisis de la respuesta proliferativa.	<b>50</b>
Figura 17	Niveles de citocinas antiinflamatorias presentes en plasma	<b>52</b>
Figura 18	Niveles de IL-2 presentes en muestras de plasma	<b>53</b>
Figura 19	Niveles de citocinas presentes en muestras de LCR de pacientes con NC.	<b>53</b>

Figura 20	Niveles de citocinas antiinflamatorias presentes en sobrenadantes de cultivo.	<b>54</b>
Figura 21	Niveles de IL-2 presentes en muestras de sobrenadante de cultivo, relación entre pacientes y controles.	<b>55</b>

### Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Características de los pacientes con NC.	<b>46</b>
Tabla 2	Fenotipo de células CD4 <sup>+</sup> y Treg en sangre de pacientes con NC con respecto a sujetos control.	<b>48</b>
Tabla 3	Respuesta proliferativa con los estímulos de antígenos de <i>T. solium</i> e inespecífico (PHA).	<b>51</b>
Tabla 4	Características de los pacientes con NC.	<b>55</b>
Tabla 5	Respuesta proliferativa de PBMCs totales y PBMCs sin células T reguladoras.	<b>57</b>

## Resumen

**Introducción:** La neurocisticercosis humana (NC) es una enfermedad causada por el establecimiento del cisticerco de *Taenia solium* en el sistema nervioso central. En estudios recientes se ha observado que los pacientes con NC presentan niveles altos de células T reguladoras (Treg) y una disminución de la respuesta proliferativa en relación con sujetos sanos; sin embargo, aún se desconoce si estas células intervienen en el proceso de control de la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). **Objetivo:** Medir la respuesta proliferativa de PBMCs de pacientes con NC a estímulos antigénicos parasitarios y PHA en presencia y en ausencia de células Treg. **Materiales y métodos:** En 25 sujetos con NC y en 16 sujetos control se cuantificaron los niveles de Treg y la respuesta proliferativa a través de citometría de flujo. Se realizaron seis ensayos de proliferación de PBMCs por citometría de flujo en los que se eliminaron las células Treg y se estimularon con antígeno específico e inespecífico del parásito. Finalmente, se midieron por ELISA los niveles de IL-2, IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  en sobrenadantes de cultivo, plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR). **Resultados:** Se obtuvo un aumento significativo en los niveles de células Treg periféricas en los pacientes con NC con respecto a los controles. Los pacientes con NC presentaron una mayor respuesta proliferativa antígeno-específica de células PBMCs en relación con la respuesta de los sujetos control. Al estimular con PHA se observó una disminución en la población CD4 proliferante de los pacientes con NC en relación con los controles. No halló diferencia entre los porcentajes totales de proliferación de PBMCs totales y PBMCs sin Treg de pacientes con NC. Se encontró la presencia de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  en LCR en las muestras de pacientes con NC. **Discusión:** Los niveles de células Treg fueron mayores en los pacientes con NC que en los sujetos control, pero debido a que no existe diferencia entre los porcentajes de proliferación de PBMCs totales y PBMCs sin Treg, puede decirse que las células Treg no participan en el control de la respuesta proliferativa. Sin embargo, la correlación positiva ( $r = 0.67$ ) y los niveles de citocinas que se presentan en muestras de LCR sugieren una participación de las células Treg en el sitio de instalación del parásito. **Conclusiones:** En los

ensayos *in vitro* realizados en este trabajo se demostró que las células Treg no participan en el control de la respuesta proliferativa en los pacientes con NC.

## **Antecedentes**

La cisticercosis es un problema grave de salud pública en varios países en vías de desarrollo, en donde las condiciones sociales, económicas y culturales favorecen el mantenimiento de esta zoonosis. Recientemente se han reportado casos en naciones industrializadas con altos índices de inmigrantes provenientes de áreas endémicas. La Organización Mundial de la Salud la incluye entre las enfermedades desatendidas u olvidadas, que agrupa padecimientos que afectan a un grupo de personas en extrema pobreza, quienes carecen de recursos para resolver su problema de salud. La neurocisticercosis humana (NC) se considera la parasitosis más frecuente del sistema nervioso central, y en alrededor de 70% de los casos genera crisis convulsivas de inicio tardío (Valenzuela-Borrayo, 2010; Fleury y col., 2010).

## ***Taenia solium***

*Taenia solium* pertenece al phylum *Platyhelminthes*, clase *Cestoda*, orden *Cyclophyllidae*, familia *Taenidae*, género *Taenia*, especie *solium*, y es causal de la cisticercosis; es una de las ocho especies de cestodos que infectan a los humanos. El parásito adulto mide entre 2 y 4 metros de largo y se alberga en el intestino delgado de los seres humanos. Anatómicamente está compuesto por el escólex, el cuello y el estróbilo, y está provisto de un tegumento o epitelio que le permite absorber nutrientes del medio. El escólex o cabeza es del tamaño de un alfiler y está compuesto por un rostelo coronado por dos hileras de ganchos y cuatro ventosas, que le permiten adherirse a la mucosa intestinal. A partir del escólex se forma el cuello del cual se derivan los segmentos llamados proglótidos, que en conjunto forman el estróbilo. Los proglótidos pueden ser de tres tipos: los inmaduros son aquellos que no presentan órganos sexuales desarrollados; los maduros, en los que se lleva a cabo la fecundación, poseen órganos genitales masculinos y femeninos, por lo que es un parásito hermafrodita. Los proglótidos más alejados del escólex muestran un útero grávido ramificado lleno de huevos; éstos son expulsados al ambiente junto con las heces del huésped, y cada uno contiene alrededor de 60 000 huevos (Estrada y col., 2012; Flisser, 2011).

## Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito (figura 1) comprende el estadio adulto, el huevo y el metacéstodo. El ser humano, único hospedero definitivo, se contagia ingiriendo carne de cerdo infectada con el cisticerco; éste está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, con un pequeño escólex invaginado. En el sistema digestivo humano, las sales biliares inducen al cisticerco a salir de la vesícula a través de un proceso de evaginación, y a anclarse en el epitelio intestinal para iniciar su transformación al estadio adulto, la cual se completa en aproximadamente cuatro meses. Una vez alcanzada la etapa adulta del parásito, éste es capaz de liberar al ambiente junto con las heces los proglótidos grávidos que contienen miles de huevos infectantes (Flisser, Vargas-Prada y Laclette, 2006).

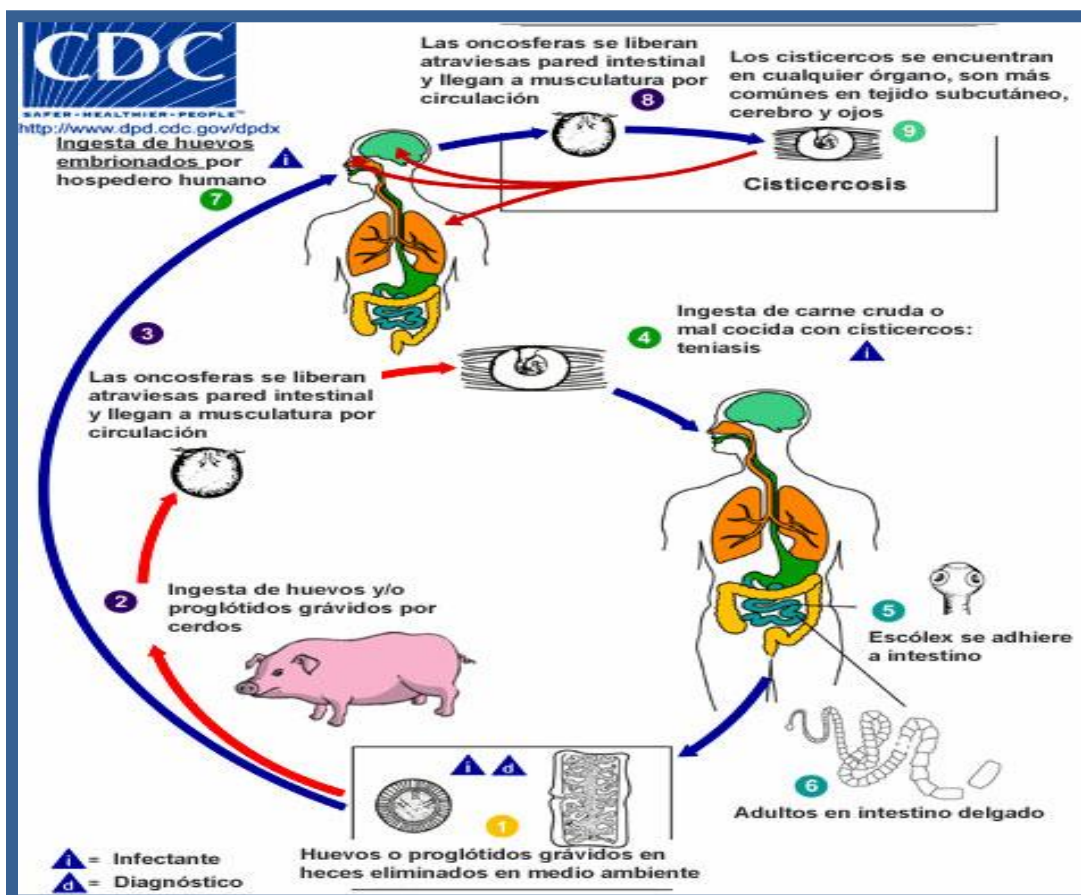


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/biology.html>, Consulta el 13 de septiembre de 2013.

El ciclo continúa cuando el cerdo (hospedero intermediario) ingiere estos huevos, ya sea al consumir heces de una persona infectada de teniosis, o bien alimentos o agua contaminada con estas heces. La cubierta del huevo, llamada embrióforo, se rompe en el intestino por las enzimas digestivas y sales biliares; éstas a su vez activan las oncosferas o embriones hexacantos, que eclosionan y atraviesan la pared intestinal. Viajan a través del torrente sanguíneo y se desarrollan en el músculo esquelético, el tejido subcutáneo, los ojos y en el sistema nervioso central, transformándose en cisticercos. El ciclo de vida se completa cuando un humano ingiere carne mal cocida, contaminada con el cisticerco (Flisser, Vargas-Prada y Laclette, 2006).

La teniosis intestinal casi nunca ocasiona síntomas, y la cisticercosis porcina tampoco ocasiona problemas graves de salud a los cerdos. La gravedad de este parásito reside en que el ser humano puede adquirir cisticercosis. Esto ocurre cuando, al igual que el cerdo, el ser humano ingiere huevos de *Taenia solium*, ya sea al consumir alimentos contaminados con heces o bien por vía fecal-oral. Las manifestaciones más comunes son la cisticercosis ocular, la muscular y la neurocisticercosis (Moral y col., 2013).

### **Neurocisticercosis**

La NC es la enfermedad producida por el establecimiento de la larva o metacéstodo de la *Taenia solium* en el sistema nervioso central (en el parénquima, los espacios subaracnoideos, los ventrículos y la médula espinal). Es una enfermedad pleomórfica debido a diferencias individuales en el número, la localización, el tamaño y la etapa de los parásitos, así como al grado de la respuesta inflamatoria del hospedero (Nash, Mahanty y García, 2013).

Los hallazgos clínicos más frecuentes incluyen epilepsia, hipertensión intracraneal, encefalitis y meningitis. La epilepsia es la manifestación clínica más frecuente, presente en más de 70% de los casos (Estrada y col., 2012).



En las regiones endémicas, la neurocisticercosis es la causa más común de epilepsia de inicio tardío). También puede generar hipertensión intracraneal, deterioro cognitivo y encefalitis. Los cisticercos (figura 2) son vesículas que contienen en su interior un escólex invaginado, el cual presenta una estructura similar a la forma adulta de *Taenia solium* (Estrada y col., 2012).

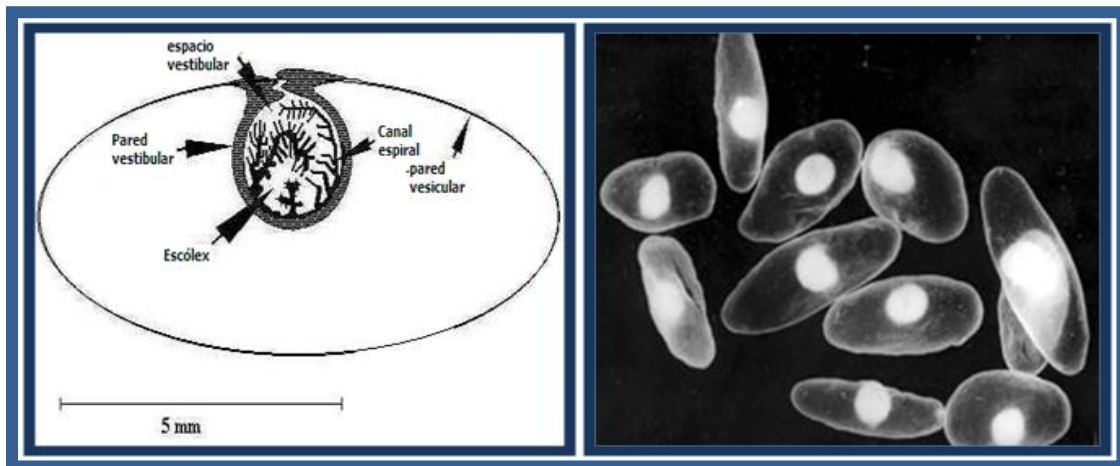


Figura 2. Cisticercos de la *Taenia solium* de forma vesicular.

Tomado de: <a href="http://www.geocities.ws/jvazquez/Introduccionfin.htm">http://www.geocities.ws/jvazquez/Introduccionfin.htm</a> , Consulta el 2 de agosto de 2014.	Tomado de: Larralde y de Aluja, 2006
--	--------------------------------------

El cisticercos penetra en el sistema nervioso central a través del flujo sanguíneo, invadiendo inicialmente el espacio subaracnoideo, posteriormente el córtex cerebral y la unión córtico-yuxtacortical. Cuando los cisticercos entran en el sistema nervioso se encuentran en un estado denominado vesicular, en el que son viables y desencadenan mínimos cambios inflamatorios en el tejido cerebral adyacente. Su aspecto macroscópico varía dependiendo de la localización en el neuroeje y del estadio de la enfermedad (Bhattarai y col., 2012).

Cisticercos con diferentes estadios de evolución y localizaciones pueden coexistir en un mismo paciente. La NC puede clasificarse basándose en la topografía o en el estadio evolutivo de las lesiones. En relación con la topografía, tradicionalmente se han clasificado en cisticercos subaracnoideos, parenquimatosos, ventriculares y espinales, mientras que con respecto al estadio evolutivo se clasifican en estadio

no quístico, vesicular, vesicular-coloidal, nodular-granulomatoso y nodular-calcificado. El aspecto del cisticerco depende de su localización: los parenquimatosos son pequeños y se localizan en la corteza cerebral y los ganglios basales, debido a la gran vascularización de estas áreas (Estrada y col., 2012; Fleury, Sciutto y Larralde, 2012).

Los cisticercos subaracnoideos son pequeños si se localizan en la profundidad de los surcos corticales, o pueden alcanzar tamaños mayores a 50 mm si están en las cisternas del líquido cefalorraquídeo (LCR), debido a que los cisticercos alojados en las cisternas del LCR están formados exclusivamente por membranas adheridas entre sí, ya que en ellos el escólex ha desaparecido por un proceso de degeneración hidrópica, condicionado por la entrada de LCR a la vesícula. Estos cisticercos son llamados de forma racemosa (Fleury, Sciutto y Larralde, 2012).

Los cisticercos ventriculares pueden ser pequeños o grandes, y se localizan en el IV ventrículo; estos parásitos pueden estar adheridos al epéndimo o encontrarse flotando libremente en las cavidades ventriculares. Los cisticercos espinales se localizan en el espacio subaracnoideo o en el parénquima medular, y su aspecto macroscópico es similar al de los quistes localizados en el cerebro (Del Brutto, 2005).

### **Epidemiología**

En México, la frecuencia de la cisticercosis varía entre 0.1% y 7.0%. Entre los factores que propician la enfermedad destaca la crianza doméstica de cerdos, frecuente en las zonas rurales, que es un factor de riesgo importante debido al fecalismo al ras del suelo y el sacrificio de los animales sin control sanitario (Bada y col., 2013). La NC es una enfermedad muy relacionada con el subdesarrollo; es la parasitosis más frecuente del sistema nervioso central y genera en alrededor de 70% de los casos crisis convulsivas de inicio tardío. La NC afecta a hombres y mujeres por igual, y la más afectada es la población campesina entre 16 y 45 años de edad (Bada y col., 2013).

### Distribución mundial de la cisticercosis, 2009

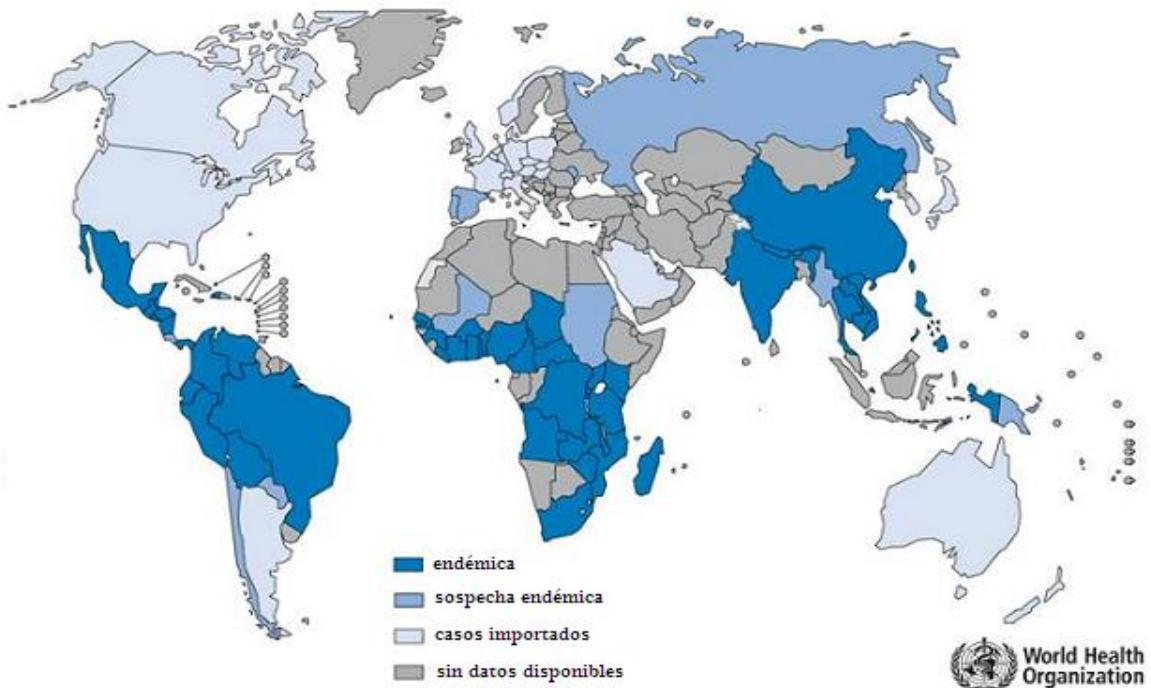
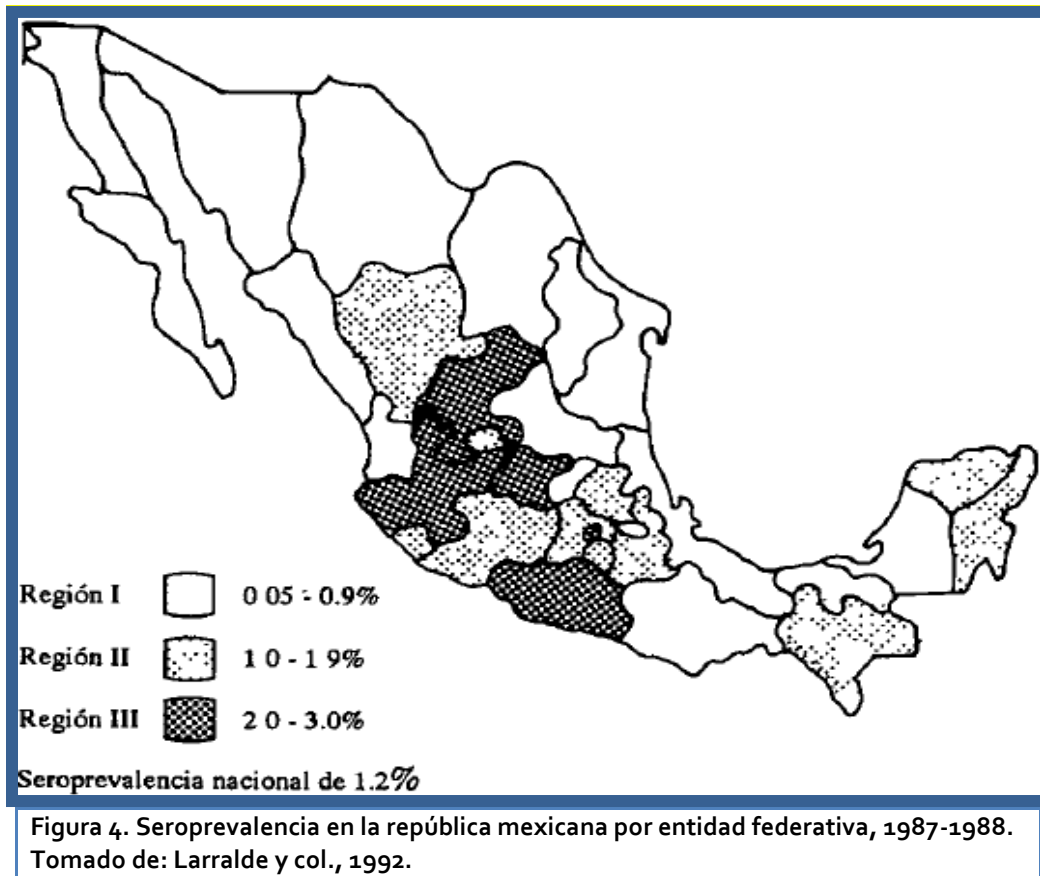


Figura 3. Distribución geográfica de la cisticercosis según la OMS en 2009. Tomado de: <http://www.kidsnewtocanada.ca/conditions/cysticercosis#>, consultado el 8 de julio de 2014.

La enfermedad es endémica en África, Asia y Latinoamérica (figura 3). En esta última región, México y Brasil son los países con prevalencia más alta. Se ha estimado que 75 millones de personas en América Latina están en riesgo de neurocisticercosis, de las cuales 400 000 son sintomáticas. El aumento reciente de migraciones condiciona el incremento en la incidencia de la NC en países desarrollados (Agapejev, 2003; Sáenz y col., 2006).

En uno de los pocos trabajos sobre la seroepidemiología de la cisticercosis en México, que se realizó entre 1987 y 1988 (Larralde y col., 1992), se establece que en todo México existe el riesgo de tener contacto con *Taenia solium*. Cualquiera de las localidades geográficas, los sectores sociales, grupos de edad y sexo pueden ser afectados. Las regiones centro-occidental y el sureste de México son las de mayor riesgo en el país. Como resultado de los estudios serológicos realizados, se observa una seroprevalencia nacional de 1.2%, como se muestra en la figura 4 (Larralde y col., 1992).



En México, los estudios en autopsias han demostrado que entre 2.5% y 3.6% de la población tiene NC (Bada y col., 2013). No se dispone de cifras para la mortalidad asociada con la enfermedad; sin embargo, la forma racemosa del cisticerco se asocia con el peor pronóstico, con elevada tasa de mortalidad (más de 20%). La NC asociada con epilepsia es una de las causas importantes de morbilidad neurológica (Bada y col., 2013).

En 2010 se publicó un estudio realizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) en el que se reveló que la frecuencia de la NC no presentó cambios significativos durante el periodo 1995-2009, siendo aún una enfermedad importante (figura 5) (Fleury y col., 2010).

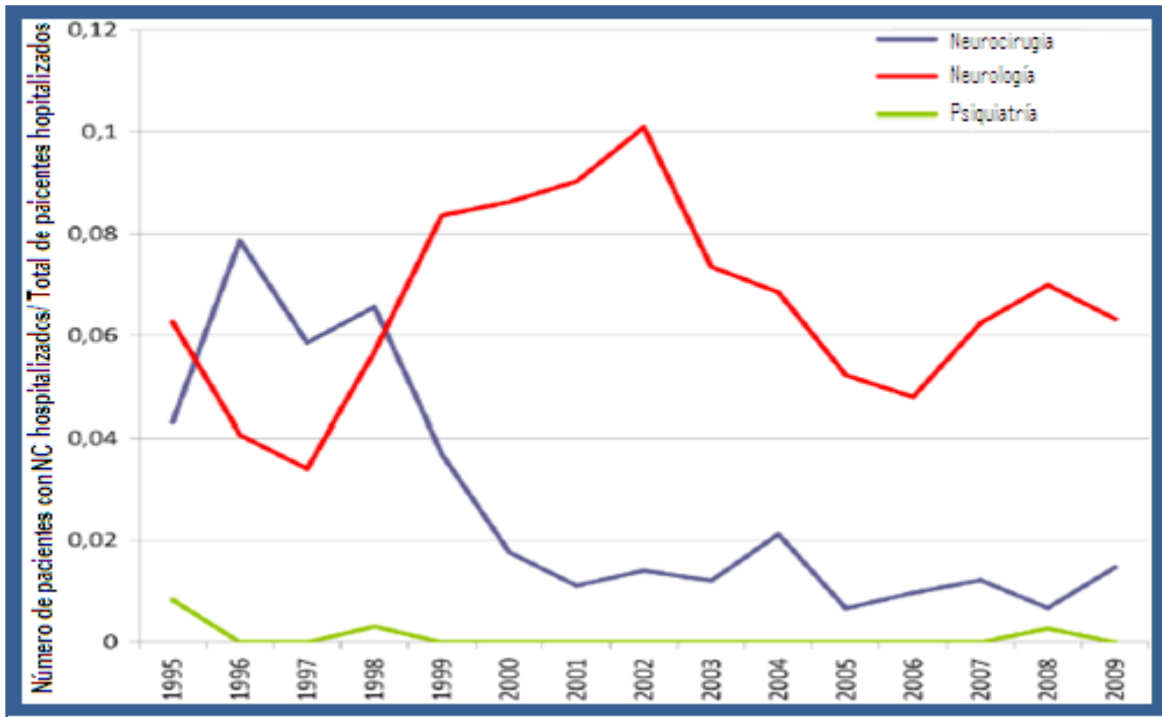


Figura 5. Frecuencias anuales de pacientes con NC hospitalizados 1995-2009. Tomado de Fleury y col., 2010.

### Respuesta inmune

La NC, generada por el establecimiento del cisticerco en el sistema nervioso central, puede presentarse de manera asintomática o bien sintomática (Sáenz y col., 2012).

Los pacientes asintomáticos no presentan un perfil inflamatorio, lo que evita a su vez que expresen síntomas importantes; sin embargo, se ha detectado la presencia en el suero de estos pacientes de niveles altos de las citocinas IL-4 e IL-5, IL-13 y de anticuerpos IgG4 (Chavarría y col., 2003).

Es posible especular que la presencia de IL-4 en los pacientes asintomáticos está involucrada en el proceso de regulación, como se ha reportado en la esquistosomiasis. También se considera que IL-4 es capaz de inducir el cambio de isotipo de IgG4 a IgE. Asimismo, se ha descrito que las citocinas IL-5 e IL-13 están implicadas en la eliminación del parásito. Los pacientes asintomáticos no presentan en el LCR un perfil inflamatorio importante (Chavarría y col., 2003).

En comparación con los pacientes asintomáticos, los sintomáticos presentan niveles altos de las cuatro subclases de IgG, lo que indica que hay una actividad por parte de los linfocitos B dependientes de linfocitos T. La cantidad de anticuerpos circulantes depende del estadio de la enfermedad (Chavarría y col., 2006).

Además, en pacientes sintomáticos se ha detectado en el LCR la presencia de IgGs, eosinófilos, IL-5, IL-6 e IL-10. Se ha visto que la IL-5 y la IL-6 participan en el reclutamiento de células como eosinófilos y se encuentran en pacientes con una respuesta inflamatoria importante. Por otra parte, los niveles altos de IL-10 en el LCR se asocian con la inhibición del proceso inflamatorio (Chavarría y col., 2005; Chavarría y col., 2006).

### **Respuesta proliferativa**

La proliferación celular es un mecanismo de respuesta ante un estímulo. Existen dos tipos de proliferación: 1) durante el *priming* de la respuesta inmune, y 2) durante la respuesta inmune secundaria.

1) El *priming* de la respuesta inmune se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios. Ahí, las células dendríticas foliculares son capaces de activar a los linfocitos T *naive*. En este proceso participan moléculas de adhesión, correceptores, moléculas de coestimulación y la interacción entre el MHC y el TCR (Barrueta y Salmen, 2010).

Entre las moléculas de coestimulación se encuentran la interacción de LFA-1 y CD2 en la célula T con sus respectivos ligandos, ICAM-1/2 y LFA-3 (CD58), en la célula presentadora de antígeno (APC). La molécula principal de coestimulación es el CD28, que se expresa de manera constitutiva en los linfocitos T *naive*. Éste interactúa con sus ligandos CD80/86 expresados en la membrana de la APC. Esta coestimulación permite disminuir el umbral del linfocito T para ser activado y

también permite la progresión del ciclo celular, a la vez que protege a la célula de la apoptosis (Barrueta y Salmen, 2010).

Otra molécula coestimuladora es el ICOS (coestimulador inducible de células T), que interacciona con su ligando, ICOS-L. Esta molécula permite una mayor diferenciación y maduración de las células *naïve* y tiene un papel importante, principalmente después de la activación de la células y en las interacciones entre linfocitos T CD4 y linfocitos B, en el proceso de *priming* (Metcalfe, Cresswell y Barclay, 2011).

CD40-L también forma parte de estas moléculas de coestimulación. CD40 se expresa en las APC y su ligando se expresa en los linfocitos T; la unión de estas moléculas permite una mayor expresión de moléculas como B7, ICAM1 y LFA-3 y la producción de citocinas proinflamatorias (Murphy, Travers, Walport, 2009; Metcalfe, Cresswell y Barclay, 2011).

Los correceptores en el caso de los linfocitos T son las moléculas CD4 y CD8, que ejercen dos funciones principales: 1) incrementan la afinidad y estabilidad de la unión del TCR con el MHC, y 2) están ligados a Lck, una cinasa que inicia la transducción de señales del TCR. Finalmente, la interacción del TCR con el MHC genera la transducción de señales que activan genes involucrados en la proliferación y diferenciación, y en las actividades efectoras de las células. Ello permite la proliferación y diferenciación celular, desencadenando así la generación de células T de memoria antígeno-específicas y la migración de células T efectoras al sitio de instalación del parásito. En el sitio de infección, las células ya activadas necesitarán un reestímulo que les permita ejercer su función (Murphy, Travers, Walport, 2009; Metcalfe, Cresswell y Barclay, 2011). En la figura 6 se describe el proceso de proliferación, en el que interviene la célula dendrítica folicular.

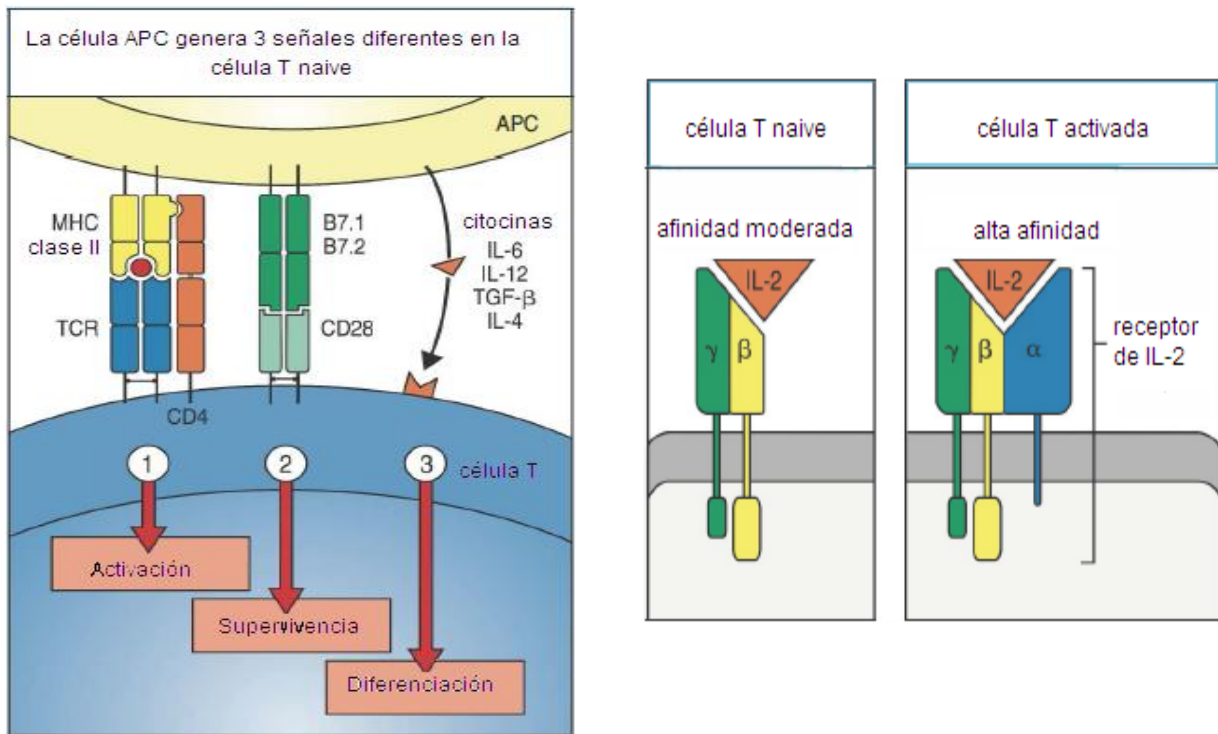


Figura 6. Proceso de proliferación generado por la DC folicular. Del lado izquierdo se muestra a una célula T *naive* previa al contacto con la DC y del lado derecho se muestra el cambio de afinidad del receptor de IL-2 por la citocina. Tomado de: Murphy y col., 2009.

2) La proliferación de células T de memoria. El segundo encuentro con antígenos se lleva a cabo en la periferia o el sitio de infección, y se genera por la activación de los linfocitos T de memoria por parte de alguna APC. Su activación nuevamente necesita la participación de moléculas de adhesión, correceptores, moléculas de coestimulación y la interacción entre el MHC y el TCR, todo lo cual genera la activación de ciertos genes que permiten la proliferación celular y la activación de las funciones efectoras de la célula (Girolomoni, Zambruno y Kanitakis, 2007; Saavedra, 2013).

En estudios *in vitro* es posible medir la respuesta proliferativa generada por células de memoria, ya que éstas se encuentran circulantes en el organismo y pueden obtenerse de manera sencilla por medio de una muestra sanguínea. Para su obtención, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separan del resto de células y líquidos contenidos en la sangre. Se debe incluir un estímulo antigénico que permita a la célula volver a activarse contra el antígeno y proliferar.



Existen diversas formas de medir el proceso de proliferación; una de las más usadas es la tinción citoplasmática con el succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE), molécula que permite evaluar la proliferación mediante la disminución de la fluorescencia en las células hijas usando citometría de flujo (Quah, Warren y Parish, 2007).

El compuesto inicial, la succinimidil éster diacetato de carboxifluoresceína (CFDASE), es una molécula no fluorescente y capaz de atravesar la membrana celular debido a su alta lipofilicidad. La CFDASE entra en la célula y sufre la pérdida de dos grupos acetato debido a la acción de las esterasas, formando entonces el CFSE, una molécula fluorescente y con menor capacidad de atravesar la membrana celular; también es capaz de formar enlaces con otras moléculas intracelulares, permitiendo su estancia dentro de la célula. De esta forma, cuando una célula marcada con CFSE se divide en dos células hijas, cada una posee la mitad de CFSE de la célula marcada inicialmente; por esto, al proliferar las células existe una disminución de la fluorescencia dependiendo de la cantidad de divisiones celulares (Parish, 1999; Quah, Warren y Parish, 2007; Bocharov y col., 2013).

### **Niveles de proliferación de pacientes con NC**

La respuesta proliferativa puede estar relacionada con diferentes aspectos, tanto del parásito como de los pacientes; sin embargo, se ha estudiado más la relacionada con el grado de sintomatología. Así, los pacientes con NC pueden dividirse en dos tipos: aquellos que no presentan ningún tipo de sintomatología (asintomáticos) y aquellos que sí la presentan (sintomáticos) (Chavarría y col., 2006).

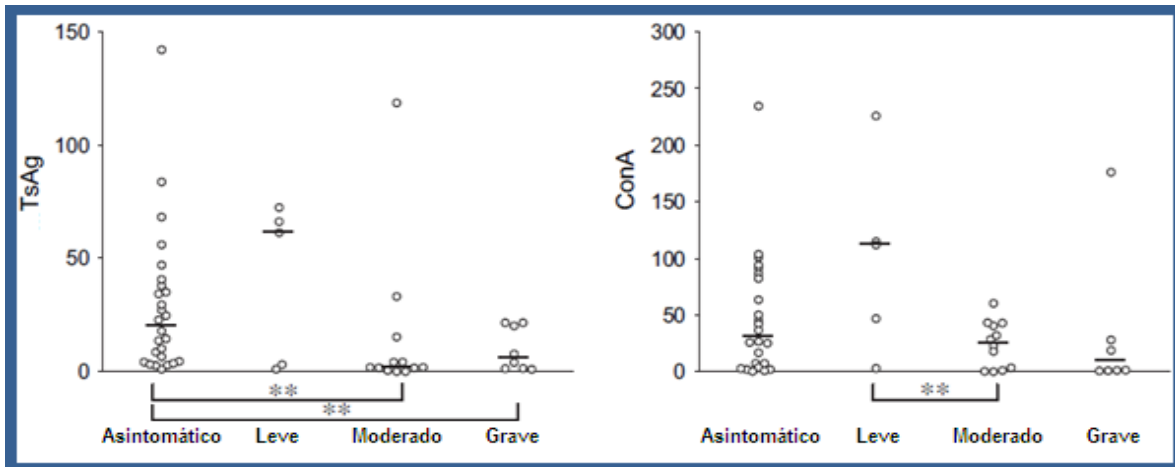


Figura 7. Muestra la proliferación celular de pacientes con NC en diferentes fases de la enfermedad al estimular con antígeno. Tomado de: Chavarría y col., 2006.

En un estudio previo, realizado por Chavarría y col. en 2006, se midió la respuesta proliferativa en PBMCs de pacientes con NC manejando dos estímulos antígenicos (figura 7): uno específico del parásito (AgT) y otro inespecífico (ConA). Los pacientes se clasificaron en dos grupos, asintomáticos y sintomáticos; los sintomáticos se subdividieron de acuerdo con un examen clínico en tres grupos: leve (sin síntomas o sólo con dolor de cabeza), moderado (déficit focal o convulsiones) y grave (hipertensión intracraneal) (Chavarría y col., 2005). Al cultivar las células en presencia de los antígenos específicos de *Taenia solium* se observó que tanto los pacientes asintomáticos como los de sintomatología leve presentaron una buena respuesta proliferativa. Por su parte, los pacientes con sintomatología moderada y grave mostraron una respuesta proliferativa disminuida (Chavarría y col., 2006).

Los autores determinaron el perfil de citocinas durante la respuesta proliferativa en pacientes asintomáticos y sintomáticos. Para esto recolectaron los sobrenadantes de los ensayos *in vitro* de proliferación estimulados con Ag de *T. solium* y los analizaron por ELISA. Los pacientes asintomáticos presentaron niveles altos de IL-4, IL-5, IL-12 e IL-13. Los pacientes con sintomatología moderada y grave mostraron niveles bajos de IL-1b, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de la proliferación (Chavarría y col., 2006).

En otro estudio se demostró que los pacientes con parásitos calcificados presentaron una menor respuesta proliferativa comparados con los pacientes que tenían parásitos activos. Además de la disminución en la respuesta proliferativa y los diferentes perfiles de citocinas, también se ha demostrado que el cisticerco de *T. solium* promueve el incremento, a nivel sistémico y local, de células Treg, las cuales pueden participar en el control de la inflamación (Bueno y col., 2001; Adalid-Peralta y col., 2012).

### **Células T reguladoras**

Las células Treg constituyen un grupo particular de linfocitos CD4<sup>+</sup> que desempeñan una función fundamental en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios, evitando la aparición de enfermedades autoinmunes. Además regulan el desarrollo de una respuesta inmune exacerbada frente a agentes patógenos o frente a distintos alérgenos, manteniendo así la respuesta inmune de forma homeostática. Sin embargo, en algunas parasitosis pueden promover un control excesivo de la respuesta inmune, lo cual le permite al parásito su permanencia en el hospedero, comprometiendo así la integridad del mismo (Vergara, 2009; Sakaguchi, 2010; Adalid-Peralta y col., 2011).

Las células Treg desempeñan un papel muy importante en el control de la respuesta inmune. Estas células presentan un fenotipo CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> y expresan el factor de transcripción Foxp3. Se clasifican en dos grupos: Treg naturales (generadas en el timo, nTreg) y Treg inducidas (generadas en la periferia, iTreg), las cuales se muestran en la figura 8 (Wang y col., 2007; Sakaguchi, 2011).

Las nTreg se presentan en el organismo antes de la infección por un patógeno; se caracterizan por presentar algunas moléculas de superficie, entre las que se encuentran CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y el factor de transcripción Foxp3 (Siachoque, Satisfesteban e Iglesias-Gamarra, 2011).

Estas células adquieren su capacidad reguladora intra-tímicamente, y representan de 1% a 10% del total de células T CD4<sup>+</sup> (Siachoque, Satisteban e Iglesias-Gamarra, 2011). En los compartimentos linfoides, los linfocitos Treg presentan TCRs que no tienen afinidad por el reconocimiento de péptidos propios y se autorregulan, con el fin de prevenir la autoinmunidad (Siachoque, Satisteban e Iglesias-Gamarra, 2011).

Las células iTreg se producen en la sangre periférica por la conversión de células T inmaduras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> en presencia de un microambiente particular. Las iTreg se generan por estimulación antigénica bajo condiciones especiales en la periferia. Expresan el CD25 durante el curso de una respuesta inmunológica normal, pero de manera variable. En el caso de FoxP3, la expresión de este factor es transitoria y de menor intensidad. Las iTreg incluyen dos subconjuntos: las células Th3 y las Tr1, las cuales secretan el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) e IL-10, respectivamente (Siachoque, Satisteban e Iglesias-Gamarra, 2011).

Se ha demostrado que las células iTreg se desarrollan durante la inducción de la tolerancia oral a un alérgeno, y podrían tener un papel importante en la inducción de la tolerancia durante la inmunoterapia; sin embargo, su fenotipo es mucho menos estable que el de las células nTreg (Siachoque, Satisteban e Iglesias-Gamarra, 2011).

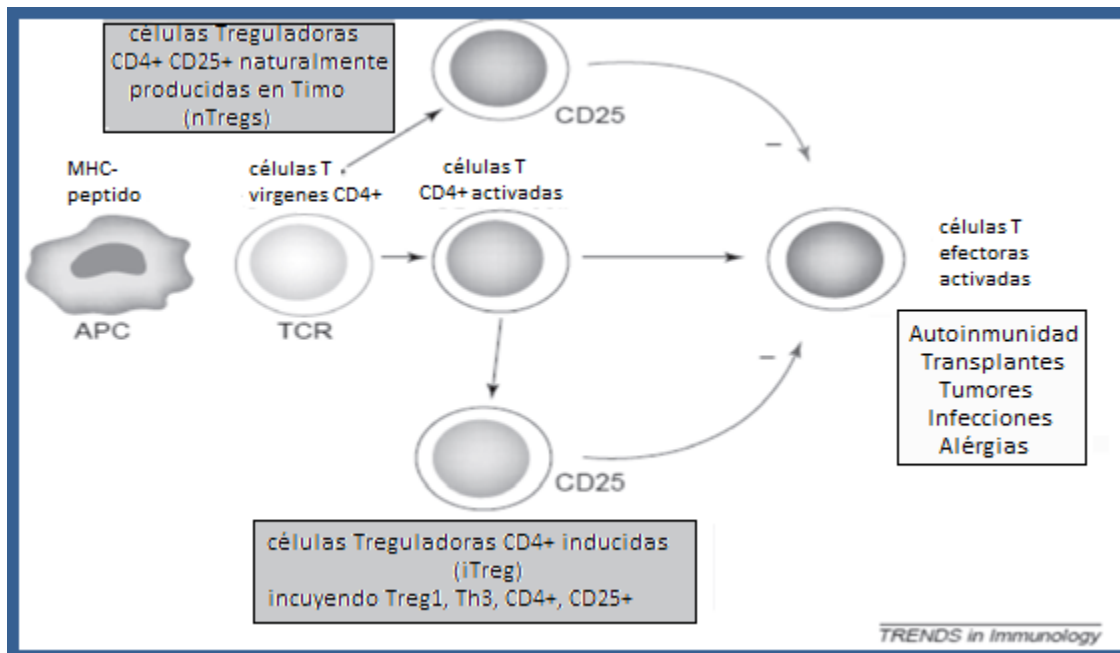


Figura 8. Diferenciación de las células Treg. Tomado de: Siachoque, Satisteban e Iglesias-Gamarra, 2011.

### Mecanismo de acción

Es probable que el mecanismo por el que las células Treg promueven la supresión inflamatoria (figura 9) combine varios submecanismos, que dependen del medio y del tipo de respuesta inmune en las Treg. Entre ellos tenemos:

- 1) Supresión de la respuesta por medio de citocinas inmunorreguladoras como IL-35, IL-10 y TGF- $\beta$ , de las cuales se ha descrito su producción por este tipo celular.
- 2) Citólisis de linfocitos B, T citotóxicos, T efectoras y células NK a través de moléculas pro-apoptóticas como perforinas y granzimas.
- 3) Interrupción metabólica, al disminuir las concentraciones de IL-2 en el ambiente, capturándola a través del receptor CD25 que expresan.
- 4) Liberación de adenosina, que al unirse con su receptor en las células efectoras las inhibe y además promueve la generación de más Treg, ya que impide la producción de IL-6 y promueve la producción de TGF- $\beta$ .

5) Supresión de células T efectoras mediante la transferencia de AMPc a través de uniones de membrana.

6) A través de la interacción célula-célula mediante CTLA-4, CD80 o CD86, que induce una cascada de señalización negativa en las células dendríticas.

7) Producción de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual cataliza la conversión de triptófano a kinurenina, un metabolito con propiedades inmunosupresoras (Julow, 2004; Vignali, Collison y Workman, 2008).

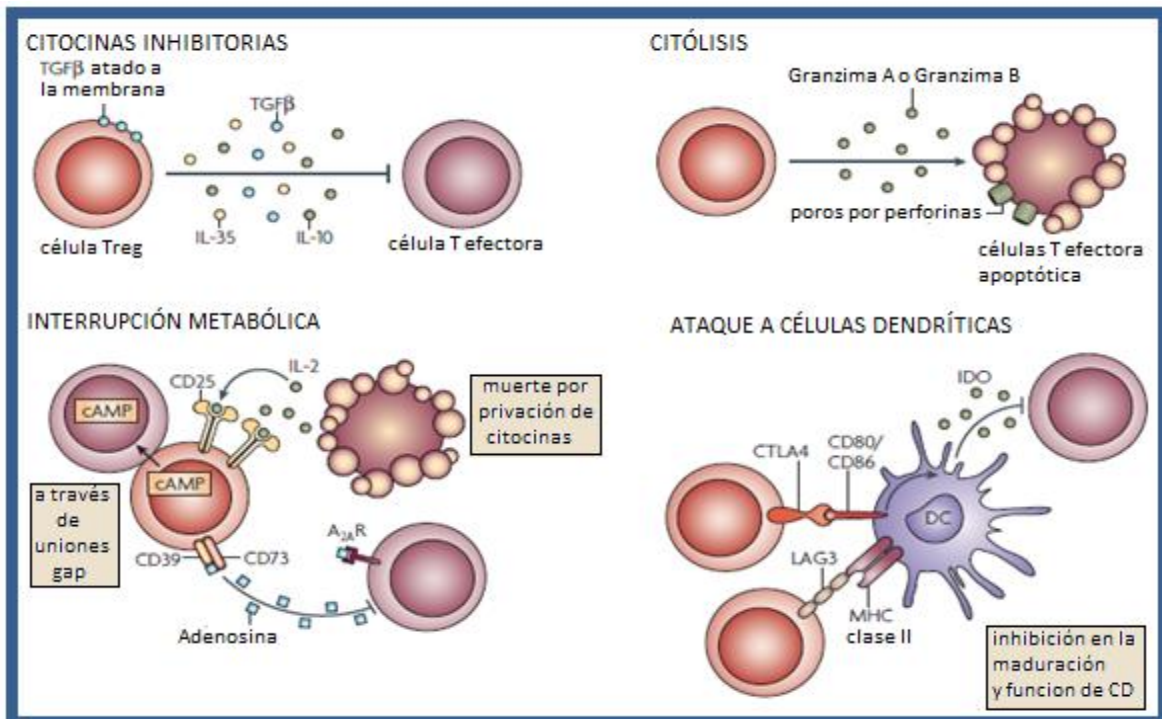


Figura 9. Mecanismos de acción de las células Treg. Tomado de: Vignali, Collison y Workman, 2008.

Entre estos mecanismos destacan aquellos que pueden estar involucrados en el proceso de inhibición de la proliferación celular, incluyendo la producción de citocinas como TGF-β, IL-10 e IL-35, y la expresión del receptor de IL-2.

## **IL-10**

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina inmunosupresora y antiinflamatoria indispensable para la homeostasis en un proceso de infección e inflamación. Es una citocina homodimérica con un peso molecular de 37 kDa; la IL-10 murina y la humana tienen una homología de 80%. Es producida por células T cooperadoras, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Sin embargo, hay una gran cantidad de células efectoras capaces de producir esta citocina, como las células B, linfocitos T citotóxicos (CTL), células natural killer (NKs), mastocitos y granulocitos como neutrófilos y eosinófilos (Antoniv e Ivashkiv, 2011).

La IL-10 es una citocina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias producidas por los linfocitos T y los macrófagos, como son IFN- $\gamma$ , IL-2 y GM-CSF. También inhibe la respuesta proliferativa de células T. En las APC reduce su capacidad presentadora bloqueando el MHC-II, reduciendo así la expresión de moléculas coestimuladoras como el CD80/CD86 (Adalid-Peralta y col., 2011; Subramanianian y Cheng, 2012).

La IL-10 activa la transcripción de STAT3, requerido para los efectos antiinflamatorios de la IL-10, incluyendo la inhibición de la expresión de genes proinflamatorios. Esto lo realiza mediante la inducción de la activación de genes y represores transcripcionales que median la represión de promotores de genes y citocinas inflamatorias (Antoniv e Ivashkiv, 2011).

## **IL-35**

La interleucina 35 (IL-35) es una citocina heterodimérica que forma parte de la familia de la interleucina 12 (IL-12). Los linfocitos T convencionales son capaces de producir esta citocina al exponerse a células dendríticas infectadas con rinovirus y por linfocitos T CD4<sup>+</sup> obtenidos de pacientes infectados de hepatitis B. La IL-35 es una citocina con dos funciones conocidas: suprime la proliferación de células T cooperadoras y genera la conversión de células T *naïve* en células Treg altamente supresoras (iTr35) (Collison y col., 2013).

## **TGF- $\beta$**

La familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) incluye un gran número de factores, estructural y funcionalmente relacionados, que actúan como reguladores multifuncionales de un amplio rango de procesos biológicos. El TGF- $\beta$  fue descubierto en 1983 por su capacidad de “transformar” el crecimiento de fibroblastos en cultivo. El TGF- $\beta$  es una proteína de 25 kDa y es una citocina multifuncional debido a los efectos que tiene sobre diferentes tipos celulares (Nakamura, Kitani y Strober, 2001; López y Ramos, 2008).

La señalización del TGF- $\beta$  controla diversas funciones celulares, incluyendo la proliferación, el reconocimiento, la apoptosis, la tumorigénesis y la diferenciación celular. El TGF- $\beta$  pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas; es una proteína homodimérica, producida por una gran variedad de células, como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Existen tres isoformas descritas en los mamíferos, codificadas en cromosomas diferentes: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3, sintetizadas como proteínas precursoras inactivas y con nueve residuos de cisteína en el extremo carboxilo-terminal. A partir de estos precursores se originan las formas maduras activas del factor (López y Ramos, 2008).

El precursor del TGF- $\beta$  consta de 3491 aminoácidos, y son los 122 residuos localizados en el extremo carboxilo-terminal los que constituyen la forma madura. Los 3369 residuos restantes, localizados en la porción amino-terminal, constituyen el llamado péptido asociado de latencia (LAP) (López y Ramos, 2008).

Como parte de su proceso de secreción, el TGF- $\beta$  sufre proteólisis mediada por una endopeptidasa, la cual rompe el enlace peptídico entre el factor maduro y el LAP. El LAP desempeña un papel importante para mediar el plegamiento correcto y la dimerización de las regiones maduras, y es necesario para un procesamiento postransduccional eficiente (López y Ramos, 2008).



El TGF- $\beta$  procesado se secreta como un complejo latente, formado por la asociación no-covalente entre el LAP y la región madura de la molécula. En el complejo latente el TGF- $\beta$  carece de actividad, presumiblemente porque su asociación con el LAP le impide unirse a su receptor. Para que el TGF- $\beta$  se active es indispensable que se disocie del LAP; este proceso puede producirse por varios factores, como cambios de temperatura o de pH. Una vez liberado, el TGF- $\beta$  tiene una vida media corta. El TGF- $\beta$  activo puede sufrir degradación por proteasas y elastasas en el sitio de inflamación (López y Ramos, 2008).

## **IL-2**

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina secretada por células T en respuesta a un estímulo antigénico, y es la principal responsable de la proliferación celular. El gen codificante de esta citocina se localiza en el cromosoma 4, y está formada por 133 aminoácidos (Metcalf, Creswell y Barclay, 2011).

El contacto del MHC-II de una APC con el TCR de un linfocito T y la señal coestimuladora dada por el contacto del B7 con el CD28 genera dos señales importantes en el linfocito T (figura 10): 1) el linfocito T comienza a producir y liberar al ambiente niveles altos de IL-2; 2) el linfocito expresa la cadena alfa del receptor de IL-2, la cual da al receptor de esta citocina una mayor afinidad hacia la IL-2, para así captar la citocina de manera autócrina, o bien la del ambiente (Metcalf, Creswell y Barclay, 2011).

Esta citocina es necesaria tanto para el crecimiento como para la proliferación y diferenciación de los LT.

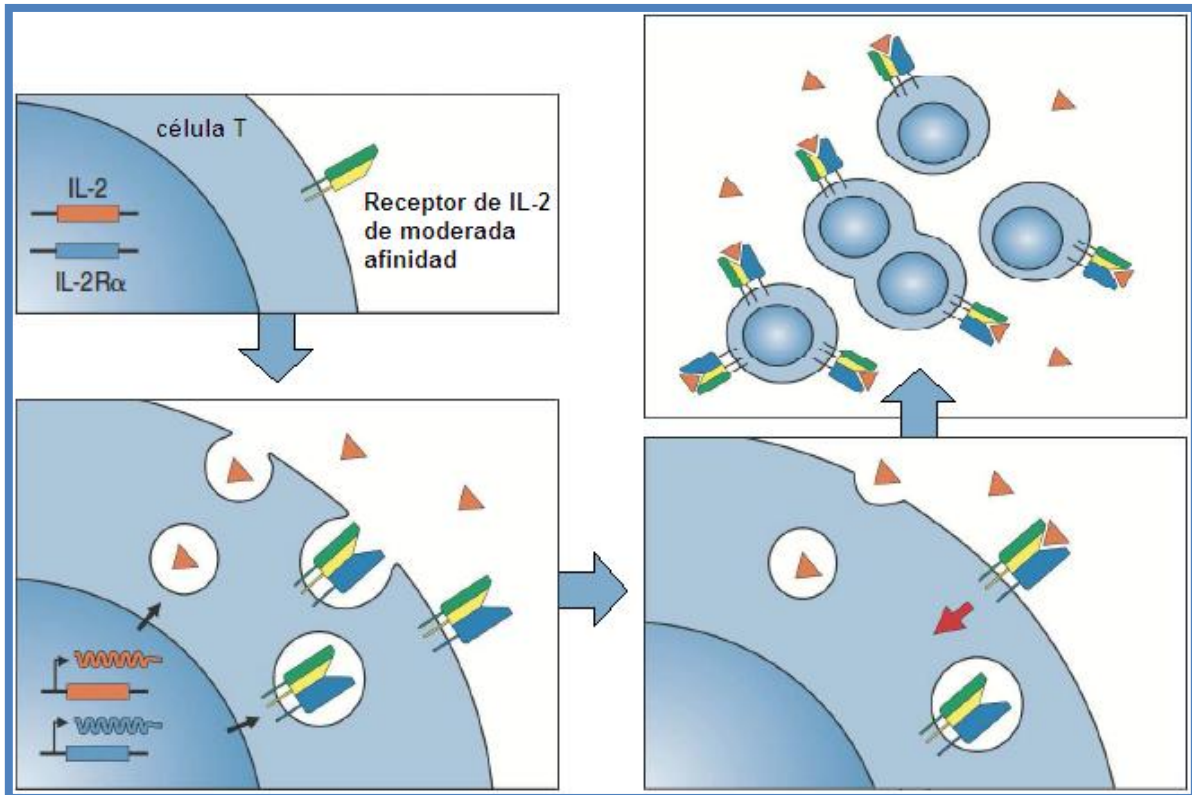


Figura 10. Proceso de reactivación de un linfocito T por parte de una APC. Tomado de: Murphy y col., 2009.

El receptor de la IL-2 es un complejo compuesto de tres subunidades. La cadena alfa (CD25), la cadena beta (CD122) y la cadena gamma (CD132), cada una tiene un papel importante para facilitar la transducción de señales dependientes de la IL-2 (Burchill y col., 2007).

La cadena alfa (IL-2R $\alpha$ ) posee un dominio citoplasmático muy corto y no participa en la transducción de señales; sin embargo, confiere mayor estabilidad a la unión de la IL-2 con su receptor. En contraste, las cadenas beta (IL-2R $\beta$ ) y gamma (IL-2R $\gamma$ ) desempeñan un papel predominante en la transducción de señales. La cadena gamma está acoplada a JAK-3, que participa en el proceso de fosforilación (Burchill y col., 2007).

La cadena beta está conformada por tres regiones: una rica en serina “S”, una región ácida “A” y una región carboxiloterminial “H”. La región S posee dos motivos conservados, box1 y box2, los cuales se acoplan con JAK-1 (Burchill y col., 2007).

En la región A se ubica un residuo de tirosina llamado Tyr-338, indispensable en el reclutamiento de la proteína adaptadora SHC; la región H posee dos residuos de tirosina llamados Tyr-392 y Tyr-510. La unión con la IL-2 genera la activación de JAK-1 y JAK-3, los cuales fosforilan los residuos de tirosina que se encuentran en el extremo citoplasmático de la cadena beta. La fosforilación de Tyr-338 en la región A recluta a la proteína adaptadora SHC; ésta se une a Grb2 y Gab2, llevando a la activación de las vías de señalización de Ras-Raf-MAPK y de PI3/Akt. La fosforilación de Tyr-392 y Tyr-510 en la región H genera el reclutamiento y la activación de STAT5, el cual puede también activarse por Tyr-338. La activación de MAPK y STAT5 inducen la producción de más IL-2, lo que permite a la célula proliferar (figura 11) (Burchill y col., 2007).

La privación de la IL-2 a las células proliferantes por parte de las células Treg les impide no sólo seguir su proceso de proliferación, sino que las priva de una citocina vital en este proceso, generando así su muerte. Esto se debe a que las células Treg poseen una mayor cantidad del receptor con alta afinidad hacia la IL-2, y al competir por esta citocina las células Treg logran captar una gran cantidad de IL-2, privando de ella a las células proliferantes, generando interrupción metabólica y la muerte celular (Burchill y col., 2007).

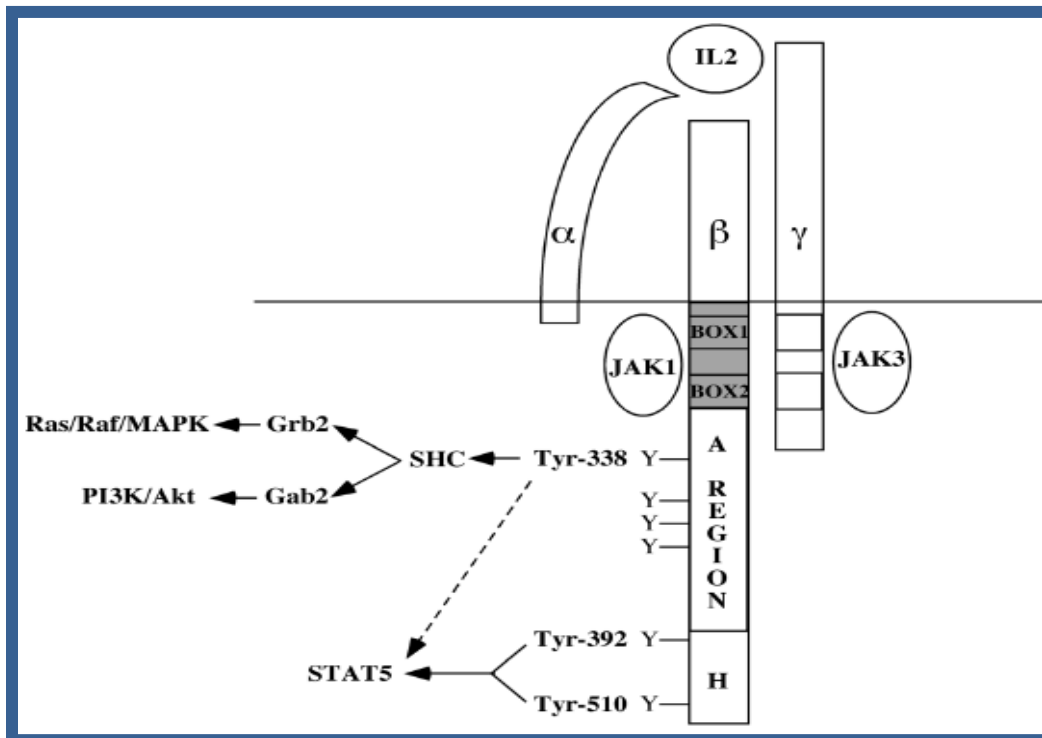


Figura 11. Cascada de señalización de la IL-2. Tomado de: Burchill y col., 2007.

## **Justificación**

Durante la neurocisticercosis se presentan diversos fenómenos mediante los cuales el parásito evade la respuesta inmune, ya sea mediante la producción de moléculas inmunomoduladoras o liberando proteínas que le permiten la inducción de ciertos fenotipos celulares del hospedero que favorecen el establecimiento del parásito.

Los pacientes con NC presentan un aumento de células Treg, pero se desconocen los mecanismos de supresión que ejercen las Treg durante la enfermedad. Sin embargo, el hecho de que las Treg inhiben la respuesta proliferativa de células efectoras y que secretan citocinas inmunosupresoras sugiere que ambos fenómenos podrían estar vinculados entre sí durante la NC. Así, este estudio pretende determinar el papel de las células Treg en el control de la respuesta proliferativa de PBMCs en los pacientes con NC.

## **Hipótesis**

Los linfocitos Treg modulan negativamente la proliferación de las PBMCs durante la NC.

## **Objetivo general**

Medir la respuesta proliferativa *in vitro* de células mononucleares periféricas de pacientes con NC en presencia y ausencia de células Treg.

## **Objetivos particulares**

1. Determinar el porcentaje de células Treg en la sangre y el LCR de pacientes con NC, y compararlo con los valores de sujetos control.
2. Realizar ensayos de proliferación celular *in vitro* de PBMCs de pacientes con NC y determinar los fenotipos celulares proliferantes.
3. Realizar la medición de las citocinas presentes en el plasma, en el LCR y en sobrenadantes de ensayos de proliferación.
4. Eliminar las células Treg de ensayos de proliferación *in vitro* y evaluar los fenotipos celulares proliferantes.

## Materiales y métodos

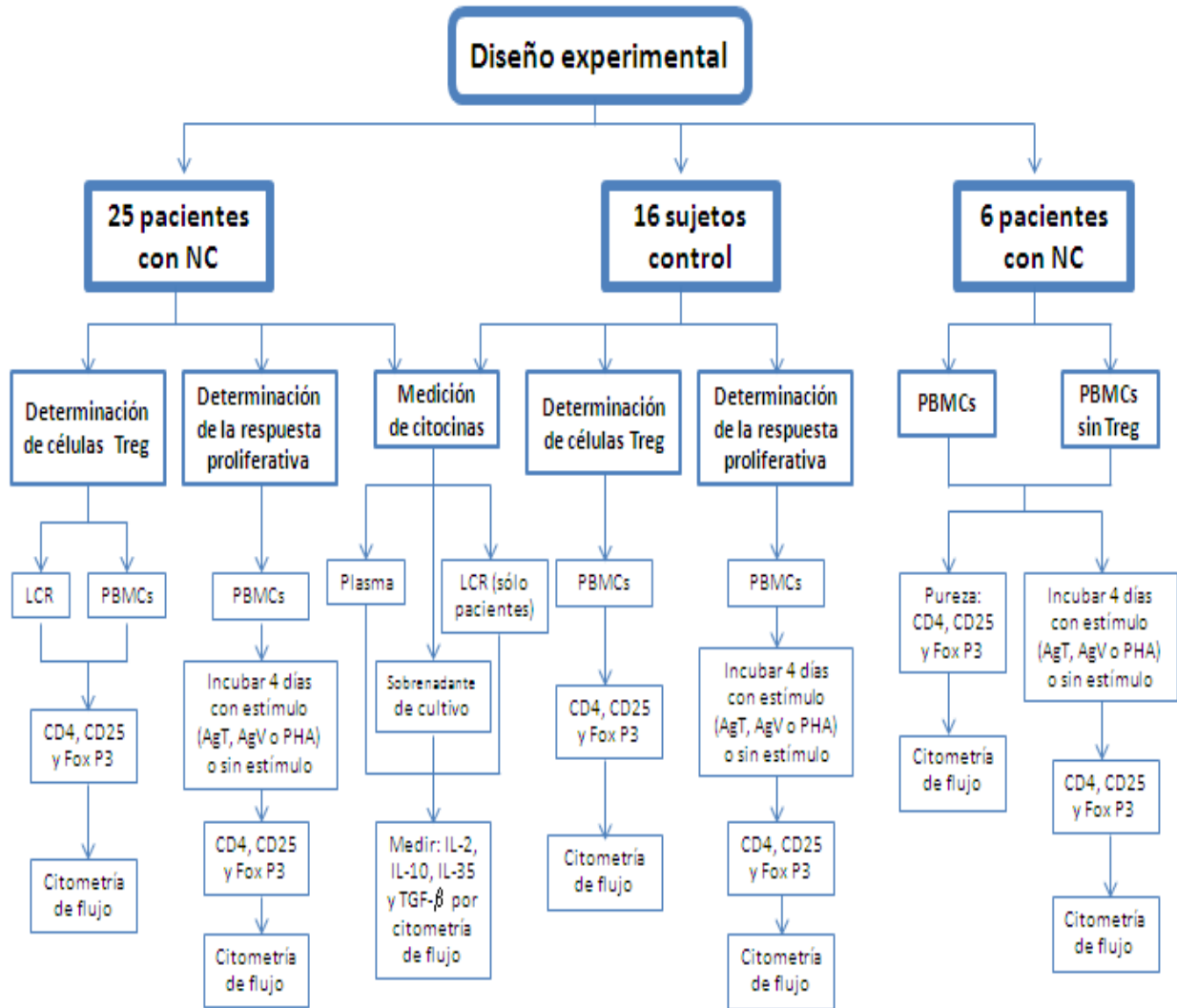


Figura 12. Diseño experimental. En él se muestra el procedimiento realizado con las muestras sanguíneas y de LCR de 25 pacientes con NC, con muestras sanguíneas de 16 controles y con seis muestras sanguíneas de pacientes con NC.

### Muestras de pacientes con NC y sujetos sanos

Como se muestra en la figura 12, se trabajaron 25 muestras de pacientes del Instituto Nacional de Neurología con diagnóstico de NC, de acuerdo con la evaluación clínica. La presencia de uno o más cisticercos en el sistema nervioso central se confirmó por estudios serológicos y de neuroimagen.

Se obtuvieron muestras sanguíneas (aproximadamente 30 mL) con EDTA. La muestra de LCR se tomó sólo cuando el procedimiento fue necesario para el diagnóstico del paciente. Todas las muestras incluidas en este estudio son de pacientes sin tratamiento. Se manejaron 16 sujetos control, para quienes los criterios de exclusión e inclusión fueron: no presentar NC, ni ninguna enfermedad infecciosa en el momento de la toma de muestra y que se encontraran en el rango de edad de los pacientes. A los sujetos control sólo se les tomó una muestra de sangre periférica.

### **Consideraciones éticas**

El presente estudio cumplió todas las normas establecidas en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para la investigación con sujetos humanos, requeridas por las leyes mexicanas y las normas internacionales. También cumplió todos los aspectos éticos considerados en el Reglamento General de Salud para la Investigación Clínica. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (oficio CB/064/11 Protocolo 133/10). Asimismo, se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Los pacientes fueron informados de que las muestras de sangre y LCR obtenidas se utilizarían para este trabajo.

### **Antígenos**

#### **Antígeno total (AgT) de cisticercos de *T. solium***

El antígeno total se obtuvo de cisticercos colectados de músculos de cerdos infectados naturalmente. Los cisticercos se lavaron tres veces con PBS y se cultivaron por tres días con medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, reemplazando el medio cada 24 horas. Este procedimiento permitió eliminar los antígenos del hospedero. Posteriormente, los cisticercos se lavaron, congelaron y maceraron con un mortero. El macerado se centrifugó a 3000 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) por 30 minutos y en el sobrenadante recolectado se determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry.



### **Antígeno vesicular (AgV) de cisticerco de *T. solium***

El antígeno vesicular es el líquido contenido dentro de los cisticercos cuando éstos se encuentran vivos. Éste se obtuvo de cisticercos colectados de músculos de cerdos infectados naturalmente. Los cisticercos se lavaron tres veces con PBS y se cultivaron por tres días con medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, reemplazando el medio cada 24 horas. Posteriormente, los cisticercos se pincharon con una aguja para obtener el fluido vesicular contenido en ellos. El fluido se centrifugó a 1200 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) por 10 minutos, y en el sobrenadante recolectado se determinó la cantidad de proteínas por el método de Lowry.

### **Determinación del fenotipo de células T reguladoras**

Se obtuvieron PBMCs por gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). Por otra parte, las células del LCR se obtuvieron centrifugando a 1200 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) por 15 minutos. Para el análisis del fenotipo de las células Treg se emplearon  $1 \times 10^6$  células/mL y los siguientes anticuerpos monoclonales característicos del fenotipo Treg: rat anti-human Foxp3 PE clona 236A/E7 (isotipo IgG2ak clona eBR2a) intracelular, mouse anti-human CD4 PerCP Cy5.5 clona RPA-T4 (isotipo IgG1k clona P3.6.2.8.1), mouse anti-human CD25 APC clona BC96 (isotipo IgG1k clona P3.6.2.8.1), y como control negativo se utilizaron células sin marcar. Para cada condición se adicionaron los anticuerpos para marcaje extracelular y se incubaron por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se lavaron con PBS con BSA 5% y SFB 1%. Las células que sólo llevan marcaje extracelular se fijaron con 200 µL de paraformaldehído al 2%. Para los marcajes intracelulares se utilizó la técnica de permeabilización adicionando 300 µL de solución Fixation & Permeabilization Buffers (eBioscience®), luego se incubaron a 4 °C por 16-18 horas. Posteriormente se realizó un lavado con Permeabilization Buffers (eBioscience®), seguido de un bloqueo con 20 µL solución de suero de rata (1:10) (eBioscience®), y se incubó durante 60 minutos a 4 °C. Inmediatamente y sin lavar se adicionaron los anticuerpos y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente se lavaron

con Permeabilization Buffers (eBioscience®) y se fijaron con 200  $\mu$ L de paraformaldehído al 2%.

Todos los anticuerpos empleados en este estudio se adquirieron de eBioscience, San Diego, California, y se emplearon a la concentración recomendada por el fabricante. Para el análisis se definió una región de la expresión de los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Las células Treg se definieron como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. El análisis de las muestras se realizó en el citómetro FACScalibur, y para el análisis se utilizó el programa Cytometer Cell Quest Analyses (Becton Dickson).

### **Determinación de la respuesta proliferativa**

Se realizaron ensayos de proliferación estimulando con antígenos parasitarios e inespecíficos. Para determinar el papel de las células Treg se realizaron ensayos simultáneos con PBMCs completas y PBMCs sin Treg.

### **Respuesta proliferativa de PBMCs completas**

Las PBMCs recién aisladas se marcaron con CFSE y se estimularon para observar la respuesta proliferativa. Para realizar el marcaje con CFSE, las PBMCs se llevaron a  $5 \times 10^6$  células en 500  $\mu$ L de PBS con 10% SFB. Posteriormente se adicionó CFSE a una concentración de 5  $\mu$ M diluido en PBS con SFB 10 %, se incubó por 5 minutos a 37 °C y se realizaron tres lavados con 15 mL de RPMI con 10% SFB a 1200 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) durante 10 minutos. Se realizó el conteo celular y se continuó con el experimento cuando las células tenían una viabilidad mayor a 90%. Las células marcadas se estimularon con fitohemaglutinina (PHA-M GIBCO. EUA) (concentración final de 1 % en medio suplementado), con antígeno total de *T. solium* (AgT) (20  $\mu$ g/mL) o con antígeno vesicular de *T. solium* (AgV) (20  $\mu$ g/mL). Para cada condición se utilizaron  $1 \times 10^5$  células. Se emplearon 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York) suplementado con 1 % de antibióticos (Penicilina y estreptomocina a una concentración de 10,000 mg/mL), 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M (Sigma-Aldrich. México) y suero humano AB (10%) (Gibco. México). Las células se cultivaron por 4

días a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub> en placas estériles de 96 pozos. Posteriormente se determinó el fenotipo de las células recuperadas, empleando anticuerpos monoclonales: Foxp3 PE, CD4 PerCP, CD25 APC, mouse anti-human CD19 PE clona H1B19 (isotipo IgG1k clona P3.6.2.9.1) mouse anti-human CD8 APC clona RPA-T8 (isotipo IgG1k clona P3.6.2.9.1). La adquisición de las muestras y el análisis se realizó en el equipo FACScalibur, con el software Cytometer Cell Quest (Becton Dickson).

### **Respuesta proliferativa de PBMCs sin Treg**

La eliminación de las células Treg se realizó con el kit de MACS, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit human. En un primer tiempo se separaron células CD4<sup>-</sup> y CD4<sup>+</sup>. En un segundo tiempo se separaron células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>.

Se obtuvieron células PBMCs aisladas de sangre periférica. Para la primera separación se agregó a las PBMCs el anticuerpo CD4<sup>+</sup> T Biotin-Antibody Cocktail y se incubaron por 30 minutos a 4 °C; este coctel contiene anticuerpos que permiten marcar todas las células excepto a las CD4<sup>+</sup>. Posteriormente se agregó Anti-Biotin MicroBeads. Se lavaron las células con PBS, 0.5% BSA, EDTA 2 mM, centrifugando a 1200 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en 1 mL del búfer de EDTA; la muestra se separó utilizando una columna magnética MACS LD y se lavó tres veces con 1 mL de búfer de EDTA. Al final de esta separación, como se observa en la figura 13, se obtuvieron dos fracciones; la primera correspondió a las células CD4<sup>-</sup>, que se quedaron adheridas a la columna; la segunda consistió en todas las células que no fueron marcadas, es decir, las células CD4<sup>+</sup>, que eluyeron de la columna.

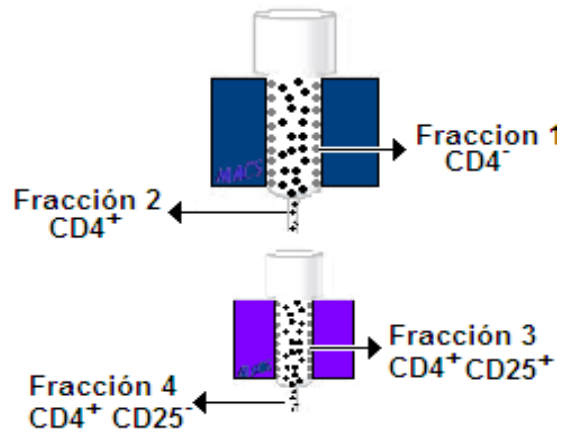


Figura 13. Separación de células a partir de PBMCs, se obtienen las células  $CD4^+$  y  $CD4^-$ . Muestra la obtención de las cuatro fracciones celulares

La siguiente fase de la separación se realizó sólo con la fracción 2 de las células  $CD4^+$ . Para esto, la fracción de células  $CD4^+$  se marcó con  $CD25$  MicroBeads incubando 30 minutos a  $4^\circ C$  (este anticuerpo marca a todas las células  $CD25^+$ ); se lavaron las células con búfer EDTA, centrifugando a 1200 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) durante 10 minutos. Se resuspendieron las células en  $500\ \mu L$  del búfer de EDTA; la muestra se separó utilizando una columna magnética MACS MS y se lavó tres veces con  $500\ \mu L$  de búfer de EDTA; al final de esta separación se obtuvieron dos fracciones: la denominada fracción 3, que comprendió las células  $CD4^+ CD25^+$ , adheridas a la columna, y la fracción 4, que consistió en las células  $CD4^+ CD25^-$ , que eluyeron de la columna.

Para realizar el marcaje con CFSE de estas células se utilizaron sólo las fracciones 1 (que contiene a todas las células mononucleares a excepción de las células  $CD4^+$ ) y 4 (que contenía las células  $CD4^+ CD25^-$ ), se mezclaron y posteriormente se marcaron con CFSE. Para realizar el marcaje con CFSE, las células sin Treg (fracciones 1 y 4) se llevaron a una concentración de  $5 \times 10^6$  células en  $500\ \mu L$  de PBS con 10% SFB. Posteriormente se adicionó CFSE a una concentración de  $5\ \mu M$ , se incubó por 5 minutos a  $37^\circ C$  y se realizaron tres lavados con 15 mL de RPMI con 10% SFB a 1200 rpm (rotor de 30 cm de diámetro) durante 10 minutos. Las células marcadas se estimularon con PHA (concentración 1%), con AgT ( $20\ \mu g/mL$ ) o con AgV ( $20\ \mu g/mL$ ). Para cada

condición se utilizaron  $1 \times 10^5$  células. Se emplearon 200  $\mu$ L de medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos (1%), 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M y suero humano AB (10%). Las células se cultivaron por 4 días a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se determinó el fenotipo de las células recuperadas, empleando los siguientes anticuerpos monoclonales: Foxp3 PE, CD4, CD25 APC, CD19 PE, CD8 APC. La adquisición de las muestras y el análisis se realizó en el equipo FACScalibur, con el software Cytometer Cell Quest (Becton Dickson).

### **Medición de citocinas**

Para analizar la respuesta reguladora se midieron las siguientes citocinas por ELISA: IL-2 (Human IL-2 Ready-SET-Go eBioscience), IL-35 (Human IL-35 Heterodimer BioLegend), IL-10 (Human IL-10 Ready-SET-Go eBioscience) y TGF- $\beta$  (Human TGF- $\beta$  2nd Generation Ready-SET-Go eBioscience). Cada kit se utilizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante y con una sensibilidad de 2 pg/mL para IL-2; 0.13 ng/mL para IL-35; 2 pg/mL para la IL-10 y 8 pg/mL para TGF- $\beta$ .

La medición se realizó en plasma, LCR y sobrenadante de cultivo.

## **Resultados**

### **Características de los pacientes con NC incluidos en el estudio**

Se incluyeron 25 pacientes con NC y 16 sujetos sanos como control. Las características de los individuos incluidos en el presente estudio se muestran en la tabla 1. Como puede observarse, en 12 de los 25 pacientes con NC fue posible obtener una muestra de LCR. En 10 de estas 12 muestras de LCR hubo infiltrado celular.

El diagnóstico de NC se estableció a través de análisis de neuroimagen que evidenciaron la presencia del parásito. Aunado a esto, se determinó la presencia del antígeno de secreción HP10, el cual además de ser confirmativo para el diagnóstico de NC es evidencia de que el cisticerco está en estadio vesicular.

Con respecto a las características generales de las muestras recolectadas, entre los pacientes hubo 16 hombres y 8 mujeres, mientras que en el grupo de control hubo 7 hombres y 9 mujeres. Los pacientes presentaron una edad media de  $46.66 \pm 12.2$  años, y en los controles la edad promedio fue  $40.29 \pm 10.9$  años.

**Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en el estudio**

No. Paciente	Edad	Sexo	No. de parásitos	Localización del parásito	Estadio del parásito	Características clínicas	Hidrocefalia o ventriculomegalia	Celularidad LCR
1	41	F	Múltiples	Ventrículo	Vesicular	Grave	Sí	ND
2	29	F	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Leve	Sí	248 000
3	38	M	Múltiples	ND	Vesicular	ND	ND	ND
4	39	M	Múltiples	ND	Vesicular	Moderado	ND	ND
5	45	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Moderado	No	268 000
6	43	M	Múltiples	Ventrículo	Vesicular	Moderado	Sí	70 000
7	52	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Moderado	No	68 000
8	49	F	Múltiples	Ventrículo	Vesicular	ND	ND	0
9	49	M	Múltiples	Parénquima	Vesicular	ND	ND	ND
10	57	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Grave	Sí	2 780 000
11	40	F	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Moderado	No	ND
12	65	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Moderado	No	ND
13	49	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Leve	Sí	0
14	37	F	Múltiples	ND	Vesicular	ND	ND	570 000
15	57	M	Único	Parénquima	Vesicular	Moderado	No	ND
16	65	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Leve	No	ND
17	32	M	Múltiples	ND	Vesicular	Leve	ND	ND
18	ND	F	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Leve	Sí	ND
19	35	F	Múltiples	Parénquima	Vesicular	Moderado	No	ND
20	ND	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Moderado	ND	ND
21	40	F	Múltiples	ND	Vesicular	Moderado	No	ND
22	33	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Grave	Sí	76 000
23	64	M	Múltiples	Parénquima	Vesicular	Moderado	No	0
24	61	M	Múltiples	ND	Vesicular	Leve	No	214 000
25	ND	M	Múltiples	Subaracnoideo	Vesicular	Grave	No	197 600

Características de los pacientes con NC. Incluye 25 pacientes, de los que se describe edad, sexo, el número de parásitos encontrados, así como su localización y estadio y algunas características clínicas. M: masculino, F: femenino, ND: no determinado.

### Determinación del fenotipo de células T reguladoras en la sangre

En la tabla 2 se muestra el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> presentes en PBMCs de sangre periférica de pacientes y controles. Como se observa, no hubo diferencia significativa en los niveles del fenotipo CD4<sup>+</sup> en los pacientes con respecto a los controles. Por su parte, se observó un aumento en las células Treg fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> en pacientes con NC con respecto a los controles ( $P = 0.0406$ ). En la figura 14 se muestra un ejemplo de cómo se obtuvieron los fenotipos celulares mediante citometría de flujo.

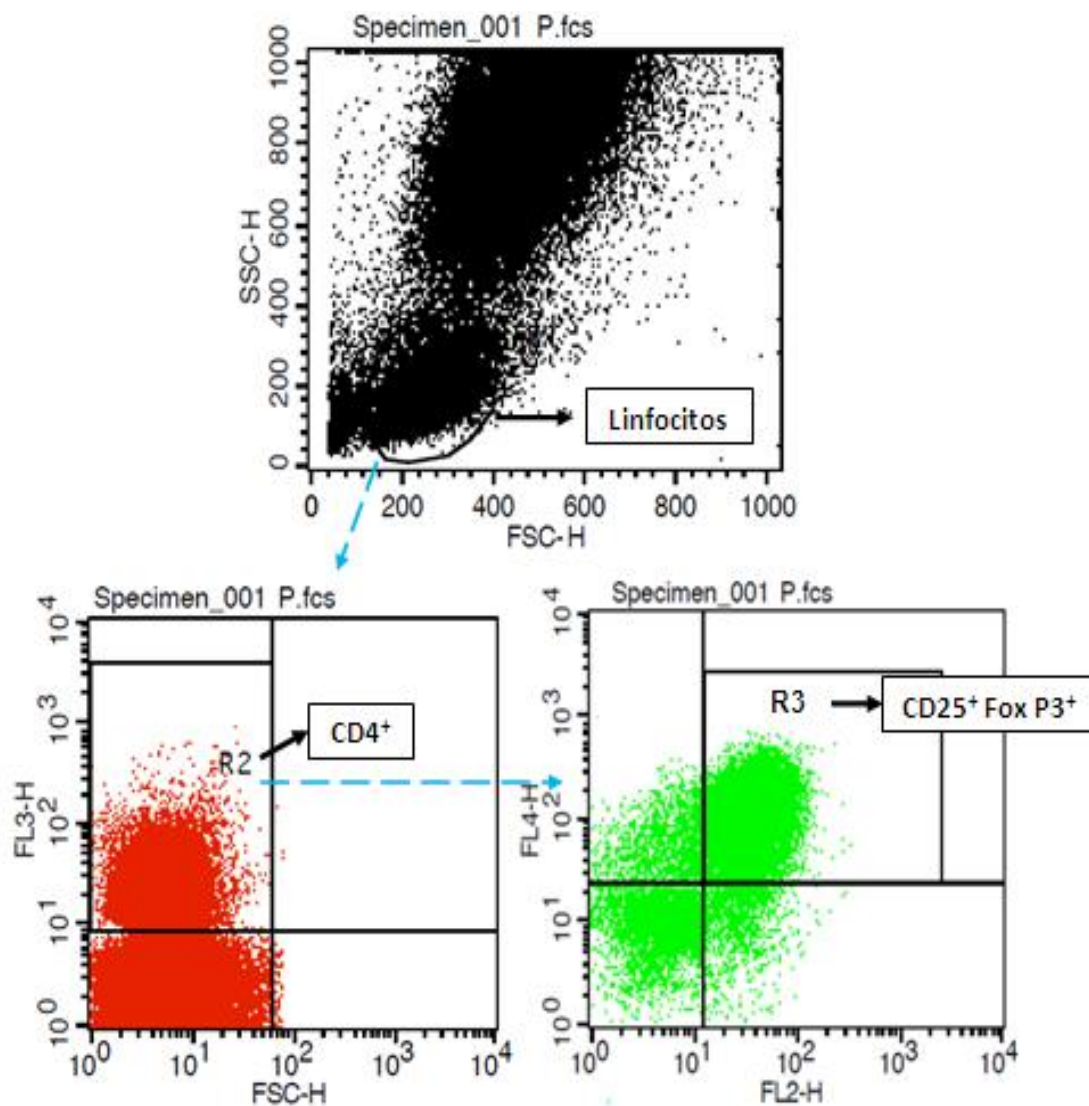


Figura 14. Regiones utilizadas para realizar el análisis por citometría de flujo de las células con fenotipo de Treg, utilizado tanto para células de sangre periférica como para LCR (ejemplo realizado con células de sangre periférica). En FL3 se observan las células marcadas con CD4, en FL2 con FoxP3 y en FL4 con CD25.



**Tabla 2. Porcentaje de células de pacientes con NC con respecto a sujetos control**

Fenotipo	Pacientes con NC	Controles (C)	P
	Sangre		
CD4 <sup>+</sup>	34.9865 ± 17.053	35.0781 ± 10.8695	0.8304
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	4.6504 ± 2.668	2.7228 ± 2.616	<b>0.0406</b>

Porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y Treg ± la desviación estándar presentes en sangre de pacientes con NC con respecto a sujetos control. Obtenido con la prueba paramétrica de Mann-Whitney, donde  $P < 0.05$  se considera significativa.

### Correlación de células Treg del LCR con los niveles de Treg de la periferia en pacientes con NC

Posteriormente se determinó la población linfocitaria en el LCR; el nivel de linfocitos CD4<sup>+</sup> se encontró en el rango de 9.98-71.1%. Entre estos linfocitos CD4<sup>+</sup> se encontró la presencia del fenotipo CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en 4.93% del total de CD4, en promedio. Comparando los niveles de Treg en la sangre y en el LCR se observó que el porcentaje de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> presentó una tendencia de correlación positiva ( $r = 0.6743$ ), aunque no fue significativa estadísticamente ( $P=0.06$ ). Ésta puede observarse en la figura 15.

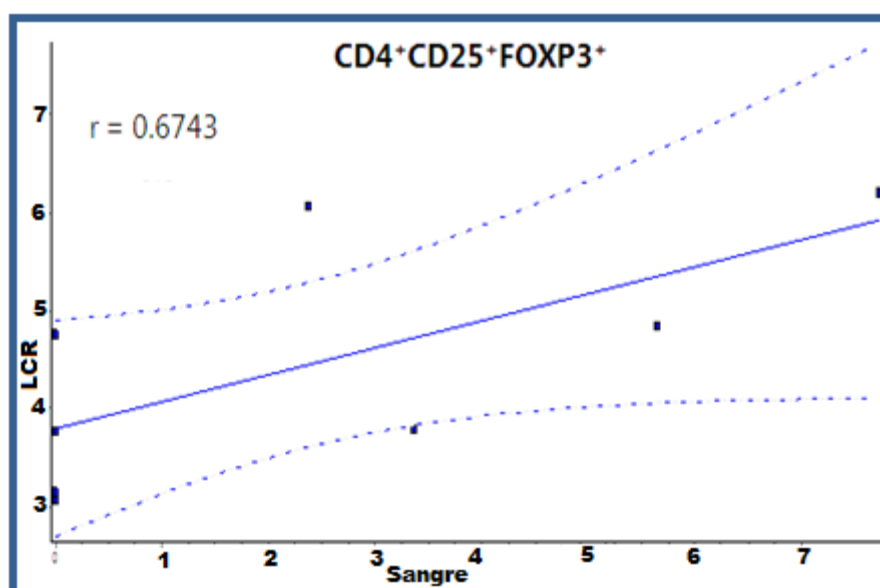


Figura 15. Correlación del porcentaje de células Treg en la sangre con el porcentaje de células Treg en LCR en pacientes con NC. Correlación realizada por la prueba de Pearson, donde  $0 < r < 1$  indica una correlación positiva.

### **Determinación de la respuesta proliferativa**

En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la proliferación de células Treg podría controlar la respuesta efectora. Por tal motivo se determinó el fenotipo de las células después del estímulo antigénico *in vitro*. En la figura 16 se muestra el procedimiento para obtener el fenotipo celular y el análisis para la determinación de la respuesta proliferativa. Como puede observarse en la tabla 3, los pacientes presentaron un aumento significativo en la respuesta proliferativa total de PBMCs cuando se estimuló con antígeno vesicular (AgV) ( $P = 0.0288$ ) y con antígeno total (AgT) ( $P = 0.0407$ ), pero no ocurrió así cuando se estimuló con PHA. Por otra parte, el análisis del fenotipo de células proliferantes no mostró diferencias significativas en las poblaciones CD4<sup>+</sup>, células efectoras (todas aquellas células CD4<sup>+</sup> excluyendo las Treg) y células Treg cuando se estimuló con AgV y AgT.

De forma interesante, cuando se estimularon con PHA, las células de los pacientes mostraron una disminución significativa en la población CD4<sup>+</sup> proliferante. Asimismo, las células Treg proliferantes también se vieron disminuidas, aunque no significativamente.

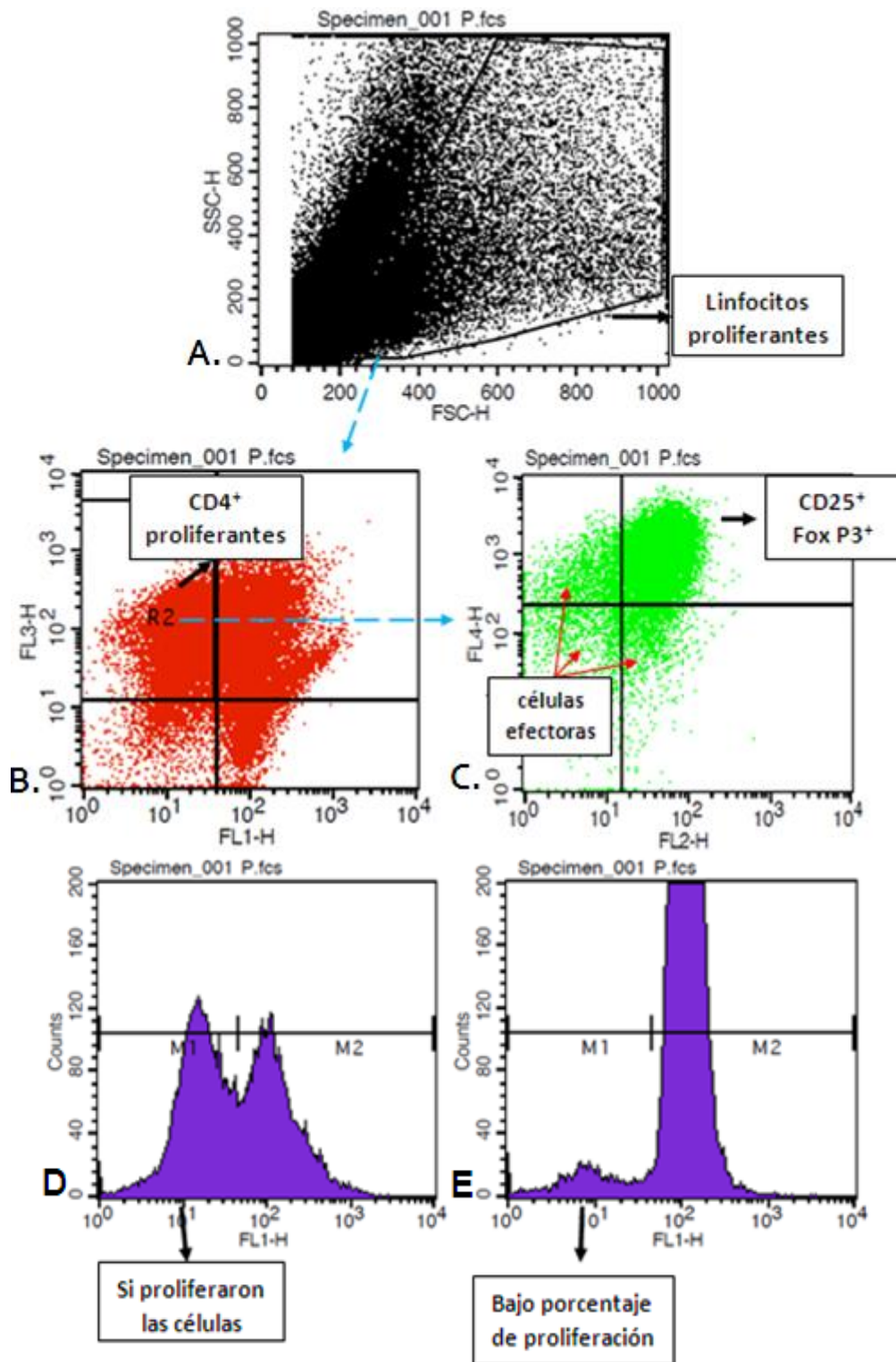


Figura 16. Regiones utilizadas para realizar el análisis por citometría de flujo de las células proliferantes con fenotipo de Treg. En A, se observa la elección de las células proliferantes; debido al proceso, las células tienden a cambiar de tamaño, y por ello la región debe ampliarse. En B, FL1 representa las células teñidas con CFSE y FL3 representa las células marcadas con CD4; el mecanismo mediante el que funciona el CFSE indica que las células del lado izquierdo de la figura son las células proliferantes. En C, FL2 Representa a FoxP3 y FL4 a CD25. En D y E se observa un ejemplo de histograma de proliferación de células. En D las células sí proliferaron, mostrando dos picos importantes. Por otra parte, en E las células prácticamente no proliferaron, observándose sólo el pico inicial.

**Tabla 3. Respuesta proliferativa en pacientes con NC con relación con sujetos control**

<b>Estimulación con antígeno vesicular de <i>T. solium</i></b>					
<b>Grupo</b>	Total	CD4	Efectoras	Treg	Proporción Efec-Treg
<b>Control</b>	4.7906 ± 5.964	1.1687 ± 1.463	0.68270 ± 0.9636	0.3387 ± 0.7592	2-1
<b>Pacientes con NC</b>	23.251 ± 25.511	2.2483 ± 2.082	2.0745 ± 2.011	0.1026 ± 0.1671	21-1
<b>P</b>	<b>0.0288</b>	0.5806	0.3229	0.1028	
<b>Estimulación con antígeno total de <i>T. solium</i></b>					
<b>Grupo</b>	Total	CD4	Efectoras	Treg	Proporción Efec-Treg
<b>Control</b>	8.666 ± 11.194	1.506 ± 1.967	1.3923 ± 1.906	0.1137 ± 0.1093	13-1
<b>Pacientes con NC</b>	23.058 ± 25.717	2.5617 ± 2.881	2.1569 ± 2.634	0.4047 ± 0.3983	5-1
<b>P</b>	<b>0.0407</b>	0.6591	0.2686	0.2226	
<b>Estimulación con PHA</b>					
<b>Grupo</b>	Total	CD4	Efectoras	Treg	Proporción Efec-Treg
<b>Control</b>	44.415 ± 20.708	27.18 ± 20.268	6.8788 ± 7.549	14.6201 ± 16.442	0.5-1
<b>Pacientes con NC</b>	46.1655 ± 31.538	12.18 ± 16.363	5.4223 ± 3.222	5.9361 ± 15.427	0.9-1
<b>P</b>	0.7963	<b>0.0321</b>	0.9999	0.0529	

Respuesta proliferativa con los estímulos de antígenos de *T. solium* e inespecífico (PHA). Se muestra el porcentaje ± la desviación estándar de la proliferación total, sólo de las células CD4, sólo el de las efectoras y sólo el de las Treg. Además se muestra la relación de las células T efectoras con las células Treg. Obtenido con la prueba paramétrica de Mann-Whitney, donde  $P < 0.05$  se considera significativa.

## Medición de citocinas

### Niveles de citocinas en plasma y LCR

Se determinaron los niveles de IL-2, además de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  en el plasma de pacientes y controles. Igualmente, se midieron estas citocinas en el LCR de los pacientes. Como se muestra en la figura 17A, se obtuvieron valores mayores de IL-10 con respecto al control en las muestras de plasma ( $p < 0.05$ ). En la figura 18 se muestran los niveles de IL-2 en plasma sin diferencias entre pacientes y controles. Se encontró la presencia de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  en el LCR, así como la ausencia de IL-2 (figura 19).

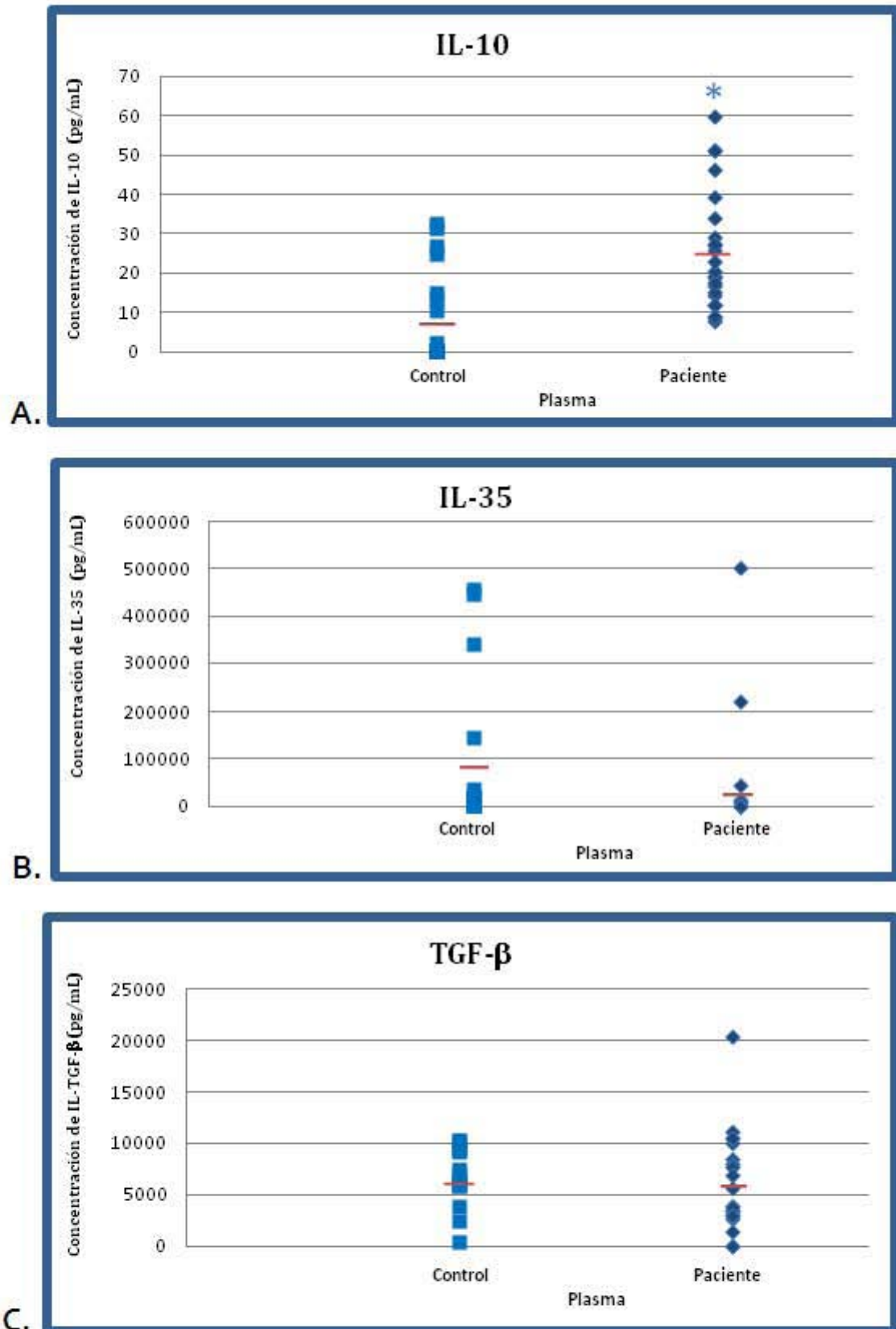


Figura 17. Niveles de citocinas antiinflamatorias presentes en plasma, comparación entre pacientes y controles. En el caso de la IL-10 (A) se observó una diferencia significativa entre grupos (prueba de Mann-Whitney)  $P=0.002$ .

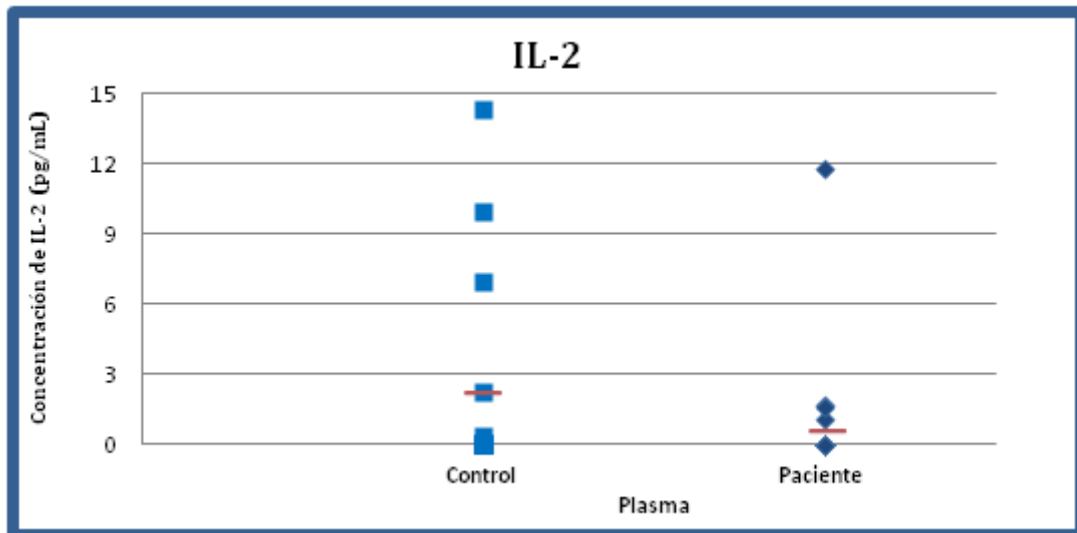


Figura 18. Niveles de IL-2 presentes en muestras de plasma, relación entre pacientes y controles. No se observó diferencia significativa entre los valores que presentaron los pacientes con respecto a los controles.

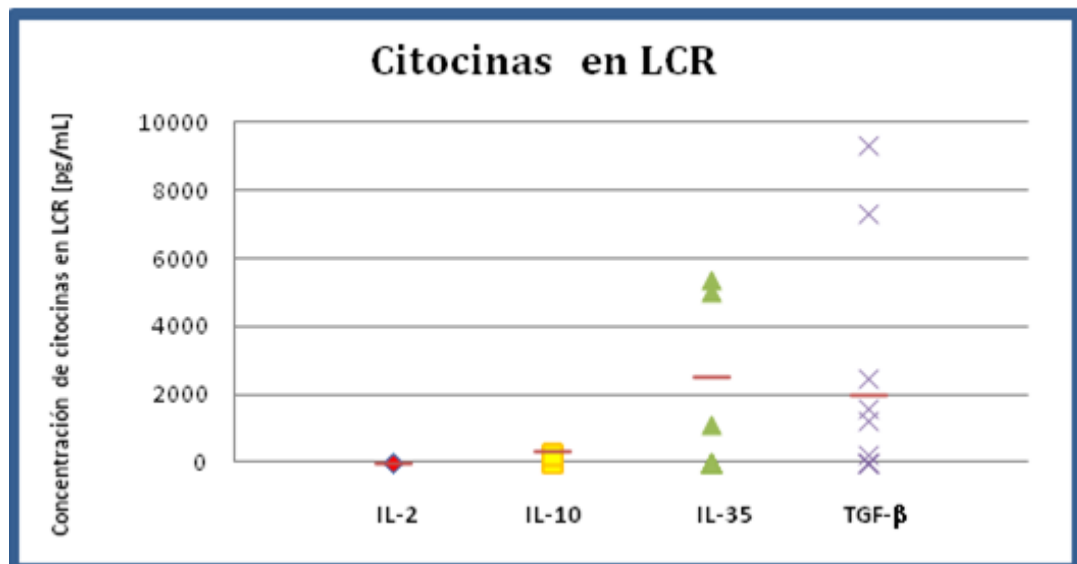


Figura 19. Niveles de citocinas presentes en muestras de LCR de pacientes con NC. Se muestra que no hubo presencia de IL-2, por otra parte, se observó la presencia de citocinas como la IL-10, IL-35 y TGF-β.

### Niveles de citocinas durante la respuesta proliferativa

Los niveles de las citocinas en sobrenadantes de cultivo de PBMCs completas para proliferación fueron determinados en los 25 pacientes y los 16 controles. En la figura 20 se muestra que las citocinas IL-10, IL-35 y TGF-β presentaron niveles similares en pacientes y controles con todos los antígenos analizados. Como se muestra en la figura 21, los niveles de IL-2 no mostraron diferencias entre pacientes y controles con la estimulación con PHA ni con los antígenos de *T. solium*.

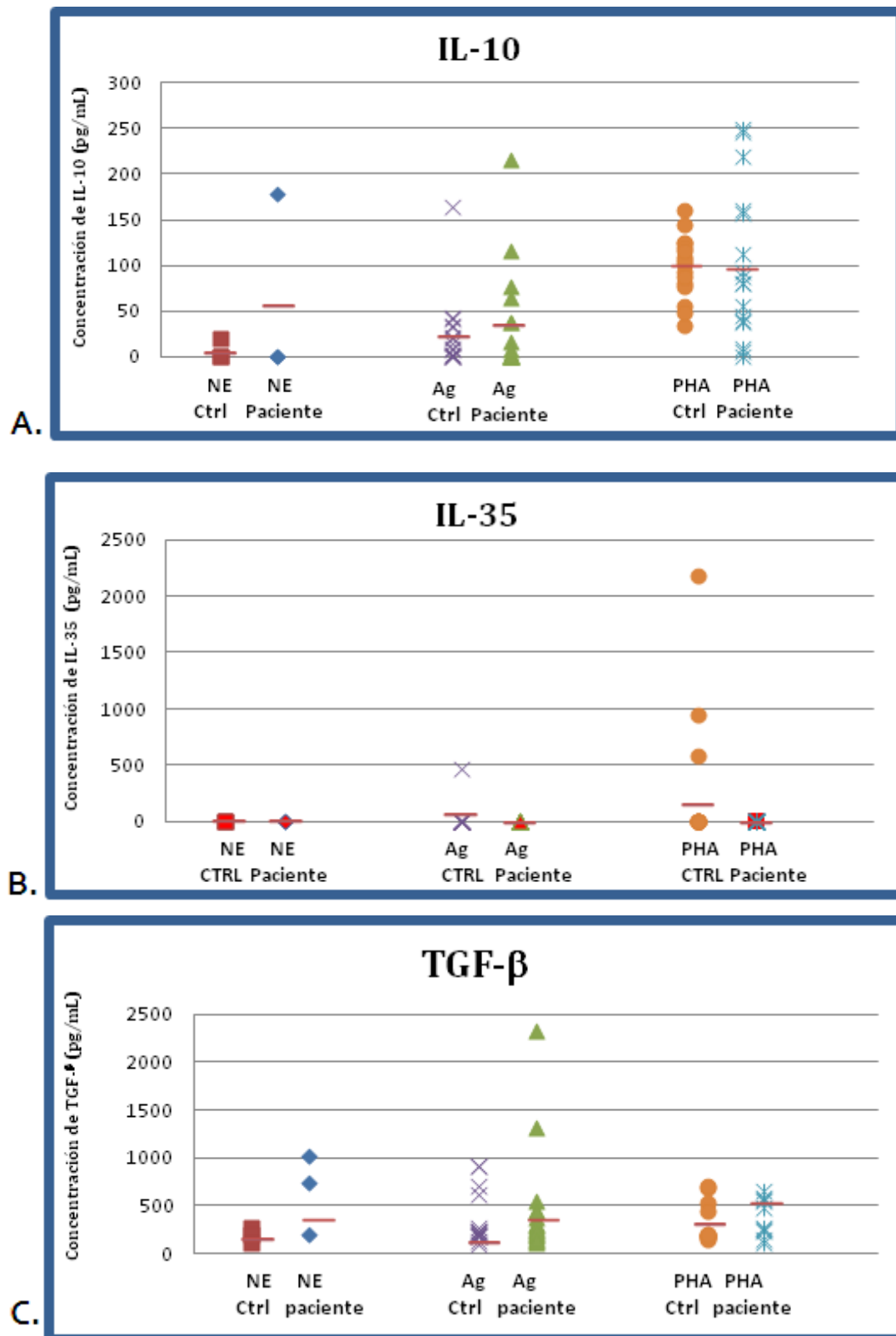


Figura 20. Niveles de citocinas antiinflamatorias en sobrenadantes de cultivo, comparación entre pacientes y controles. En A se muestran los niveles de IL-10, en B se muestran los niveles de IL-35 y en C se muestran los niveles de TGF-β. No se observaron diferencias significativas entre los valores de las citocinas presentes en los sobrenadantes de cultivo. Ctrl: control, Paciente: Paciente con la enfermedad, NE: No estimulado, Ag: estimulado con antígeno de *T. solium*, PHA: grupo estimulado con PHA.

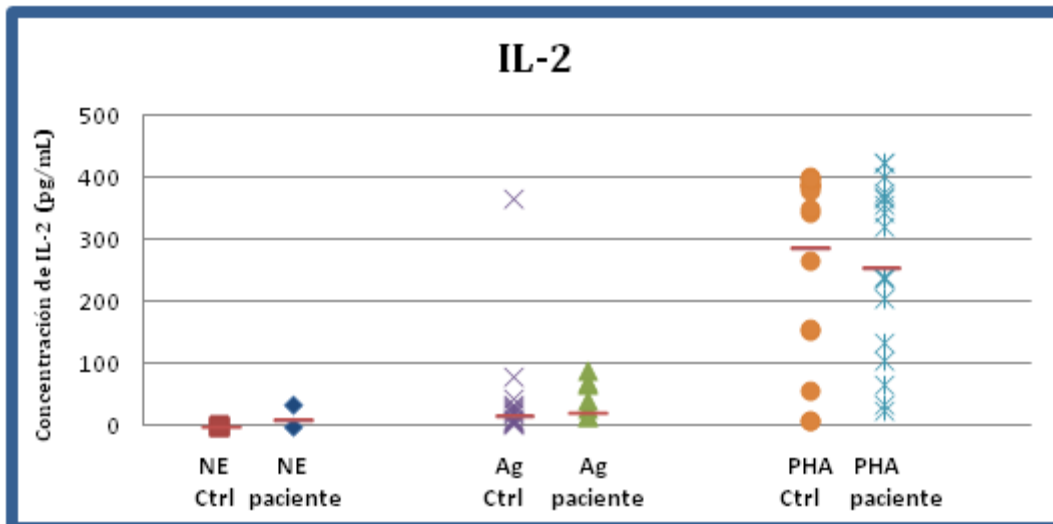


Figura 21. Niveles de IL-2 presentes en muestras de sobrenadante de cultivo, relación entre pacientes y controles. Se muestran del lado izquierdo las células no estimuladas (NE), en el centro las estimuladas con antígeno de *T. solium* (Ag) y a la derecha las estimuladas con el mitógeno PHA (PHA). A pesar de que se observó mayor cantidad de esta citocina el estimular con PHA, no hubo diferencias significativas entre grupos.

### Respuesta proliferativa de PBMCs totales (sin fraccionar) y PBMCs sin Treg (fracciones 1+4)

Se incluyeron seis pacientes con NC, diferentes a los 25 ya descritos, sus características se muestran en la tabla 4. El análisis de neuroimagen mostró la presencia del parásito. Aunado a esto, se determinó la existencia del antígeno de secreción HP10, el cual además de ser confirmativo para el diagnóstico de NC es evidencia de que el cisticerco está en estadio vesicular. Las muestras recolectadas, fueron de cuatro pacientes hombres y dos mujeres, con una edad promedio de 51 años.

Tabla 4. Características de los pacientes de estudio

No. Paciente	Edad	Sexo	No. de parásitos	Localización del parásito	Estadio del parásito	Síntomas actuales	Hidrocefalia o ventriculomegalia
1	44	M	Múltiple	Subaracnoideo	Vesicular y calcificado	Asintomático	Sí
2	48	F	Único	Subaracnoideo	Vesicular	Leve	Sí
3	55	M	Múltiple	Subaracnoideo	Vesicular	Moderado	Sí
4	66	F	Múltiple	Subaracnoideo	Vesicular	Asintomático	Sí
5	43	M	Múltiple	Subaracnoideo y ventricular	Vesicular	Moderado	Sí
6	50	M	Múltiple	Subaracnoideo y ventricular	Vesicular y coloidal	Leve	Sí



Con el objetivo de establecer el papel de las células Treg en la respuesta proliferativa, se realizaron ensayos de proliferación eliminando las células Treg. En la tabla 5 se muestran los porcentajes de proliferación ante diferentes estímulos de PBMCs totales y de PBMCs sin Treg.

El análisis de los pacientes se realizó de forma independiente y, como puede observarse en la tabla 5, al estimular con PHA las PBMCs totales presentaron una mayor respuesta proliferativa con respecto a las PBMCs sin Treg.

En el caso de los ensayos de proliferación, se estimuló con antígenos específicos del parásito (AgT y AgV) y no existieron diferencias en la respuesta proliferativa entre los grupos de células con y sin Treg.

**Tabla 5. Respuesta proliferativa de PBMCs totales y PBMCs sin Treg en pacientes con NC**

<b>Paciente 1</b>						
	Ag total		Ag vesicular		PHA 1:50	
% proliferación	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg
		2.08	6.05	15.28	1.95	1.84
<b>Paciente 2</b>						
	Ag total		Ag vesicular		PHA 1:50	
% proliferación	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg
	22.14	26.45	21.53	22.09	46.28	24.34
<b>Paciente 3</b>						
	Ag total		Ag vesicular		PHA 1:50	
% proliferación	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg
	17.15	4.44	6.71	4.21	41.8	13.67
<b>Paciente 4</b>						
	Ag total		Ag vesicular		PHA 1:50	
% proliferación	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg
	13.94	6.47	32.2	8.36	33.38	8.42
<b>Paciente 5</b>						
	Ag total		Ag vesicular		PHA 1:50	
% proliferación	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg
	6.91	6.27	5.05	11.68	43.78	8.96
<b>Paciente 6</b>						
	Ag total		Ag vesicular		PHA 1:50	
% proliferación	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg	PBMCs	PBMCs sin Treg
	9.8	11.41	9.25	6.81	23.27	7.61

Porcentajes totales de proliferación obtenidos por los dos grupos celulares al estimular con antígeno específico de *T. solium* (AgT y AgV), así como con el mitógeno PHA.

## **Discusión**

La NC es una enfermedad causada por la instalación del estadio larvario de *T. solium* en el sistema nervioso central, lo que genera diversos cuadros clínicos. Existe evidencia de que las células Treg participan en el control del proceso inflamatorio durante esta enfermedad (Adalid-Peralta y col., 2012).

Por otra parte, se sabe que las células Treg participan en el control de la respuesta inmune por diferentes mecanismos que incluyen la secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 (Vignali, Collison y Workman, 2008); la generación de citólisis por moléculas pro-apoptóticas como perforinas y granzimas (Vignali, Collison y Workman, 2008); la inducción de un fenotipo tolerogénico en las células dendríticas mediante la interacción célula-célula (Vignali, Collison y Workman, 2008); la interrupción metabólica a través de la liberación de adenosina y por transferencia de AMPc por contacto célula-célula para generar la supresión de las células T efectoras (Vignali, Collison y Workman, 2008), y por captura del factor de crecimiento IL-2 (Vignali, Collison y Workman, 2008) a través de su receptor CD25, privando a las células proliferantes de esta citocina e induciendo su muerte (Julow, 2004).

Durante la NC se ha descrito que los pacientes en estadios graves muestran una disminución en la respuesta proliferativa antígeno-específica e inespecífica (Chavarria y col., 2006). Paralelamente, existen reportes que demuestran que los pacientes con NC tienen niveles más altos de células Treg con respecto a los sujetos control (Adalid-Peralta y col., 2012). Por ello, se considera que uno de los mecanismos de acción de las células Treg que podrían estar participando en la NC es el control de la respuesta proliferativa. En el presente trabajo se evaluó el papel de las Treg sobre la respuesta proliferativa en pacientes con NC.

### **Determinación del porcentaje de células Treg en la sangre y del LCR de pacientes con NC**

Los resultados de la tabla 2 señalan un aumento de células Treg en PBMCs de los pacientes con NC en comparación con sujetos control y en la figura 16 se muestra una tendencia de correlación positiva ( $r = 0.67$ ) entre el número de

células Treg presentes en la sangre y en el LCR. Esto podría indicar un reclutamiento de células Treg de la periferia al sitio de infección (sangre= 4.65% y LCR=4.93%). A pesar de que la barrera hematoencefálica (BHE) controla el paso de las células inmunes de la periferia al SNC, las células Treg se encontraron en el LCR de los pacientes. Las células endoteliales regulan la transmigración leucocitaria hacia el parénquima cerebral y, por ende, la respuesta inflamatoria (Bernhardi, 2004). La transmigración depende de la interacción leucocito-endotelio a través de varias moléculas de adhesión en el endotelio y en el leucocito y también de moléculas solubles, como citocinas y quimiocinas secretadas por el leucocito, la BHE y las células residentes del cerebro (Pascual-Garvi y col., 2004; Loch-Neckel y Koepp, 2010). En condiciones patológicas, la expresión elevada de citocinas proinflamatorias en el cerebro disminuye la expresión de uniones estrechas en la BHE, produciendo un aumento de permeabilidad y transmigración de células. El aumento de transmigración también podría contribuir al deterioro progresivo de la BHE (Bernhardi, 2004). Cabe destacar que la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio presentaron sintomatología entre moderada y leve, es decir que no presentaron un proceso inflamatorio muy importante, aunado a esto, a los pacientes se les detectaron parásitos en estadio vesicular. Se conoce que el estadio vesicular del parásito es el que genera menor inflamación, esto debido a que en este estadio, el parásito posee habilidades de evasión de la respuesta inmune como son: mimetismo molecular, depresión de la inmunidad celular y, en el caso de la NC, evita alteraciones en la BHE (Imirizaldu y col., 2004). Esto podría justificar el por qué, la correlación realizada y descrita anteriormente es positiva pero no significativa.

En la NC, los parásitos que ingresan en estado vesicular, en el que se encuentran perfectamente viables, desencadenan muy poco o ningún cambio inflamatorio en los tejidos cercanos. Los parásitos pueden mantenerse en este estado durante largos periodos debido a que uno de los mecanismos de evasión del parásito es impedir que haya alteraciones en la BHE, para así evitar la filtración celular y su propia degradación (Muñoz, 2013). Dentro de los mecanismo que utiliza el parásito para evadir la respuesta inmune uno de los más importantes es la liberación de moléculas como el Antígeno B, que es una

paramiosina con propiedades similares a las de las fibronectinas, que posee la habilidad de fijar al complemento y que, además, se conoce tiene capacidad inmunorreguladora (Lima y col., 2004). El mismo parásito expresa glucoproteínas que posiblemente modulen la respuesta inmunológica asociada a otras células (Imirizaldu y col., 2004). Después de un tiempo indeterminado, el parásito se degrada debido a un proceso inflamatorio mediado por citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , las cuales generan modificaciones en la BHE, permitiendo así la infiltración de células de la respuesta inmune. Esta alteración de la BHE puede evidenciarse en los pacientes con NC mediante resonancia magnética al aplicar medio de contraste, observándose imágenes hiperdensas (Lima y col., 2004; García y col., 2011; Muñoz, 2013).

### **Determinación de la respuesta proliferativa**

En cuanto a la caracterización de la respuesta proliferativa en pacientes con NC, se observó que la estimulación con Ags de *T. solium* generó un aumento en la respuesta proliferativa en las PBMCs completas (sin fraccionar) con respecto a los controles (tabla 3). Este resultado coincide con lo reportado en 2006 por Chavarría y col. en pacientes en estadios leves y moderados de la parasitosis. Los ensayos de proliferación *in vitro* se basan en la estimulación de células de memoria que se generan en el primer encuentro con el antígeno; por lo tanto, se espera que los pacientes muestren un mayor porcentaje de proliferación Ag específica, ya que han producido células de memoria contra los antígenos de *Taenia solium*.

Al estimular con PHA se observó una respuesta proliferativa tanto en pacientes como en el grupo control, debido a que la PHA es una lectina; éstas son un grupo de proteínas que reconocen carbohidratos y se caracterizan por su capacidad para combinarse con receptores de membrana (Serke, Serke y Brudler, 1987). Cuando la PHA se añade a un cultivo de linfocitos, interacciona con la membrana linfocítica y estimula la síntesis de ácidos nucleicos, y la célula se convierte en una forma blástica mitóticamente activa (Ruiz y col., 2005). Por esto la PHA es uno de los mitógenos más utilizados como control positivo en los ensayos de proliferación.

Con el fin de caracterizar el tipo de células que proliferaron, se determinó su fenotipo por citometría de flujo. Se midió el nivel de proliferación de células T CD4, de células efectoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup>) y de células Treg. En la tabla 3 se observa que al estimular con antígenos específicos de *T. solium* hay una mayor respuesta proliferativa de PBMCs sin fraccionar de los pacientes con respecto a los controles, probablemente debido a las células de memoria generadas por la infección. En la misma tabla se puede ver una disminución en la proliferación de células CD4<sup>+</sup> en pacientes con respecto a los controles al estimular con PHA. La disminución en los valores de proliferación de células CD4 podría deberse a que los controles presentaron una relación de células efectoras-Treg de 0.5:1, y en los pacientes esta relación fue de casi 1:1 (tabla 3); dado que las células CD4 se componen de la suma de efectoras y Treg, la disminución de una población de células Treg pudo generar la diferencia significativa en niveles de CD4 pero, a su vez, pudo compensarse con el aumento de la otra población y así los totales se mantuvieron casi constantes. En este caso se observó que a pesar de la relación de casi 1:1 de efectoras-Treg en los pacientes, los niveles de Treg son más bajos en pacientes que en controles, esto discrepa con lo encontrado en la tabla 2, ya que se muestra un nivel basal de células Treg en pacientes mayor que en controles, sin embargo, cabe destacar que los niveles encontrados en la tabla 3 son después de un estímulo antigénico y estos porcentajes de proliferación no son significativamente diferentes.

Así, nuestra hipótesis, que asociaba la proliferación de células Treg con la disminución de la respuesta proliferativa total, no fue sustentada por los resultados obtenidos. Por otra parte, es posible que la inhibición de la proliferación al mitógeno pueda deberse a otros factores ya descritos, como el estadio del parásito y la exposición a éste (Sciutto y col., 2007).

### **Medición de citocinas en plasma y LCR**

Con el fin de determinar el nivel de otras citocinas en la NC se midieron el TGFβ, IL-35 e IL-10 en plasma y LCR.

El TGF- $\beta$  es una molécula que participa en el control de diversas funciones celulares, incluyendo la proliferación, el reconocimiento, la apoptosis, la tumorigénesis y la diferenciación celular (López y Ramos, 2008). En la figura 17 se muestra que los pacientes no presentaron un incremento de esta citocina con respecto a los controles en muestras de plasma; sin embargo, sí se observó la presencia de la citocina en el LCR (figura 19). La principal célula encargada de la respuesta inmune en el SNC es la microglía, la cual puede permanecer en un estado quiescente durante largos periodos; por esto, en un sujeto saludable las citocinas no deben estar presentes en el LCR. Sin embargo, la microglía puede activarse tras recibir un estímulo y adquirir funciones similares a las de los macrófagos, como la fagocitosis, la producción de citocinas (principalmente inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), la producción de radicales libres, etc. (González y Toro, 2007). Cuando se presenta un estado de daño o inflamación en el SNC se activa la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias; en este proceso, con el fin de mantener la homeostasis, también se liberan citocinas antiinflamatorias como el TGF- $\beta$  encargadas de controlar el proceso inflamatorio (Caraci, Battaglia y Copani, 2011). La presencia de TGF- $\beta$  en las muestras de LCR sugiere que la respuesta inmune efectora podría estar controlada en el sitio de instalación del parásito. Además, el incremento de la citocina en el sitio de instalación del parásito no necesariamente implica un aumento a nivel sistémico.

La IL-35 fue otra de las citocinas determinadas en este estudio. Es una citocina con dos funciones conocidas: suprime la proliferación de células T efectoras y la conversión de las células T *naïve* en células Treg altamente supresoras (iT<sub>Tr35</sub>) (Collison y col., 2013). En la figura 19 se observa su presencia en el LCR, lo que sugiere un control de la respuesta inmune en el sitio de instalación del parásito, ya que en condiciones homeostáticas esta citocina no se encuentra en el LCR.

Finalmente, también se midió la IL-10. Es una citocina inmunosupresora y antiinflamatoria, indispensable para la homeostasis en un proceso de infección e inflamación; las células Th, monocitos, macrófagos, células dendríticas y Treg

son productores de la IL-10. Esta citocina también se encontró presente en el LCR (figura 19), y en plasma existió una diferencia significativa entre los pacientes con NC y los controles (figura 17).

Sin embargo cabe destacar que para realizar la confirmación de la supresión, debieron medirse otras citocinas aparte de las antiinflamatorias, principalmente aquellas implicadas en el proceso inflamatorio como son IL-6, IL-1 $\beta$ , y TNF- $\alpha$ . También es importante recalcar la utilidad que hubiera representado tener controles en las muestras de LCR, lo cual no se realizó debido a los riesgos que esto implica y a la dificultad para el procesamiento de las muestras.

A pesar de que se carece de un grupo control de muestras de LCR debido a la dificultad de obtener LCR de sujetos sanos, nuestros hallazgos señalan que en los pacientes con NC el LCR presenta citocinas antiinflamatorias, lo cual sugiere que en el sitio de instalación del parásito existe un microambiente antiinflamatorio. En cuanto a la periferia (mediciones en plasma), se observó que la IL-10 se encuentra aumentada; este hecho podría contribuir a la inducción de más células Tr1 (Sky y col., 2013), y a la inducción de un fenotipo tolerogénico en la DC, como ya se ha reportado que ocurre en la NC (Adalid 2013, Hubo y col., 2013).

### **Niveles de citocinas durante la respuesta proliferativa**

En este estudio se determinó el nivel de IL-2 en los sobrenadantes de cultivo para proliferación inespecífica y Ag específica. La IL-2 es una citocina secretada por células T en respuesta a un estímulo antigénico, y es la principal responsable de la proliferación celular (Metcalf, 2011). El mecanismo mediante el cual las células Treg actúan sobre la proliferación celular es la privación de la IL-2 a las células proliferantes. Esto ocurre porque las células Treg poseen una mayor cantidad del receptor con alta afinidad hacia la IL-2, y al competir por esta citocina las células Treg logran captar una gran cantidad de IL-2, privando de esta forma a las células proliferantes de la citocina, generando así la interrupción metabólica y la muerte celular (Burchill y col., 2007). Debido a lo anterior, se esperaba que los niveles de IL-2 fueran bajos.



Sin embargo, en la figura 21 se observa que en las muestras de sobrenadante de cultivo no existió diferencia significativa entre pacientes y controles. Esto puede deberse a que no se observó una disminución en la respuesta proliferativa, por lo que la IL-2 sería captada por las células proliferantes (Hernández-Urzúa y Alvarado-Navarro, 2001).

### **Respuesta proliferativa de PBMCs (sin fraccionar) y PBMCs sin Treg (fracciones 1+4)**

Para determinar qué tan implicadas están las células Treg en la inhibición de la respuesta proliferativa se realizaron ensayos de proliferación en muestras de sangre de pacientes con NC. Los ensayos de proliferación se realizaron con PBMCs completas y PBMCs sin células Treg.

En la tabla 5 se observa que no existió diferencia significativa en cuanto a los porcentajes de proliferación de PBMCs totales y PBMCs sin Treg. La ausencia de células Treg no alteró la respuesta proliferativa, lo que sugiere que durante la NC las Treg no influyen en la respuesta proliferativa de PBMCs (Vignali, Collison y Workman, 2008). A pesar de este hallazgo, es probable que las células Treg estén ejerciendo su efecto a través de otros mecanismos, como los antes mencionados (la inducción de muerte a través de citólisis por moléculas pro-apoptóticas, la inducción de un fenotipo tolerogénico en las células dendríticas y la interrupción metabólica), esto debido a los altos niveles de células Treg detectadas en plasma. Sin embargo, tales mecanismos no se analizaron en este estudio. Además, cabe señalar que este ensayo se realizó en PBMC de sangre periférica, y aunque la inhibición de la respuesta proliferativa en este compartimento parece no estar involucrada, el aumento de Treg en la sangre pudiera estar asociado con mecanismos de supresión que se llevan a cabo en los órganos linfoides (contacto célula Treg-célula dendrítica) o en el sitio de instalación del parásito.

En este experimento no se manejaron muestras de controles sanos, debido a que ya se habían analizado las diferencias entre pacientes con NC y sujetos control. También es importante mencionar que el número de muestras fue muy

pequeño, estos dos aspectos limitan el análisis de estos datos y a su vez las conclusiones del experimento.

Durante la NC se ha visto una disminución en la respuesta proliferativa y en el presente estudio este fenómeno parece no estar asociado a las células Treg. Sin embargo, el aumento en el nivel de Treg en los pacientes con NC podría implicar que éstas tienen un papel en la inducción de un método tolerogénico que permita la supervivencia del parásito, ya que se ha demostrado que el parásito induce células Treg como posible mecanismo de escape, ya que se sabe que moléculas parasitarias promueven en la célula dendrítica un fenotipo tolerogénico que a su vez genera más células Treg (Adalid-Peralta y col., 2013). Así, es posible que el parásito genere un microambiente tolerogénico mediado por las Treg para favorecer su persistencia en el hospedero.

Dentro de las limitaciones del trabajo, una de las más importantes, es que el análisis de las células se realizó principalmente en muestras sanguíneas, y es necesario recalcar que el sitio de instalación del parásito es en el sistema nervioso central por lo que los resultados son el reflejo de lo que está ocurriendo a nivel sistémico más que en órganos y el SNC.

## Conclusiones

Los pacientes con NC estudiados presentaron mayores niveles de células Treg en la sangre que los sujetos control lo que podría significar que hay una participación por parte de las células Treg en el proceso de infección en la NC. El estudio de la respuesta proliferativa en estos pacientes demostró que las células Treg no participan en el control de la respuesta proliferativa de PBMCs *in vitro*. El papel de las citocinas IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$ , producidas por las células Treg tampoco parece estar implicado en el control de la respuesta proliferativa *in vitro*. Por otra parte, en condiciones homeostáticas no existen niveles detectables de citocinas inmunosupresoras en el LCR, por lo que la presencia de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 en el sitio de instalación del parásito sugiere que podría estarse favoreciendo el control de la respuesta inmune o inflamatoria al nivel del SNC.

El estudio presentó diferentes limitantes, como son la falta de controles y un número bajo de pacientes, entre otros. Además, estos pacientes presentan parásitos que se localizan en diferentes zonas del cerebro y diferentes grados de inflamación. El ampliar el número de pacientes permitiría estratificarlos de manera diferente y así poder conocer más acerca de este proceso de control de la respuesta inmune que en gran parte depende del nivel de inflamación o de gravedad que presenta el paciente.

## Referencias

-Adalid-Peralta L, Fragosos G, Fleury A y Sciutto E (2011). Mechanism underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections. *Int. J. Biol. Sci* **7(9)**:1412-1426.

-Adalid-Peralta L, Fleury A, García Ibarra T, Hernandez M, Parkhouse M, Crispín J, Voltaire-Proañó J, Cárdenas G, Fragoso G, y Sciutto E (2012). Human Neurocysticercosis: In vivo Expansion of Peripheral regulatory T cells and their recruitment in the Central Nervous System. *The Journal of Parasitology* **98(5)**:142-148.

-Adalid-Peralta L, Arce-Sillas A, Fragoso G, Cárdenas G, Rosetti M, Casanova-Hernández, Rangel-Escareño C, Uribe-Figueroa L, Fleury A y Sciutto E (2013). Cysticerci Drive Dendritic Cells to Promote *In Vitro* and *In Vivo* Tregs Differentiation. *Journal of Immunology Research* **2013(2013)**: 1-9

-Agapejev S. (2003). Clinical and epidemiological aspects of neurocysticercosis in Brazil: a critical approach. *Arq Neuropsiquiatr* **61(3)**:822-828.

-Antoniv, T e Ivashkiv, L (2011) Interleukin-10-induced gene expression and suppressive function are selectively modulated by the PI3K-Akt-GSK3 pathway. *Immunology* **132(4)**: 567-577.

-Bada M, Arenas-Guzman R, Vergara L, Toussaint S y Pagola P (2013). Cisticercosis. Informe de un caso cutáneo y un caso cerebral. *Medicina Interna de México* **29(1)**:106-111.

-Barrueta L y Salmen (2010). Immune tolerance at 50 years from the Nobel Prize in Medicine and Physiology: A perspective as a mechanism of immune response against pathogens. *Invest Clin* **51(2)**: 159-192.

-Bernhardi R (2004). La Barrera Hemato-Encefálica en la patología del Sistema Nervioso Central: su importancia en la Respuesta Inflamatoria *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria* **42(2)**: 121-130.

-Bhattarai R, Budke C, Carabin H, Proaño J, Flores-Rivera, Corona T, Ivanek R, Snowden K y Flisser A (2012). Estimating the Non-Monetary Burden of Neurocysticercosis in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **6**(2): e1521. doi: 10.1371/journal.pntd.0001521.

-Bocharov G, Luzyanina T, Cupovic J y Burhard L (2013). Asymmetry of cell division in CFSE-based lymphocyte proliferation analysis. *Frontiers in immunology* **254** (4): 1-7.

-Bueno A, Machado L, Livramento JA, Ávila M y Ferreira W (2001). Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Clinical & Experimental Immunology* **126**(3): 304-310.

-Burchill M, Yang J, Vang K y Farrar MA (2007). Interleukin-2 Receptor Signaling in Regulatory T Cell Development and Homeostasis. *Immunol Lett* **114**(1):1-8.

-Caraci F, Battaglia G y Copani A (2011). TGF-beta 1 pathway as a new target for Neuroprotection in Alzheimer's Disease. *Neuroscience & Therapeutics* **17**(4): 237-249.

-Chavarría A, Rober B, Fragoso G, Tapia G, Fleury , Dumas M, Dessein A, Larralde C y Sciutto E (2003). TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and Infection* **5**(2): 1109-1115.

-Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G y Sciutto E (2005). Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology* **116**(5): 271-278.

-Chavarría A, Fleury A, Bobes R, Morales J, Fragoso G y Sciutto E (2006). A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes and Infection* **8**(4): 1082-1089.

- Collison L, Delgoffe G, Guy C, Vignali K, Chaturvedi V, Fairweather D, Satoskar A, García K, Hunter C, Drake C, Murray P y Vignali D (2013). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol* **13**(3); 290-299.
- Del Brutto O (2005). Neurocisticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología* **20**(8): 412-418.
- Estrada, S., Frascheri, L., Siurana, S., Auger, C. y Rovira A. (2012). Neurocisticercosis. Hallazgos radiológicos. *Radiología* doi: 10.1016/ j.rx.2011. 11. 009
- Fleury A, Moreno J, Valdez P, de Sayve M, Becerril P, Larralde C y Sciutto E (2010). Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **4**(8): e805. doi:10.1371/journal.pntd.0000805
- Fleury A, Sciutto E y Larralde C (2012). Neurocysticercosis is still prevalent. *Salud Publica Mex* **54**(6); 632-636.
- Flisser A, Vargas-Prada L y Laclette J (2006). *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia* **1**(2): 24-33.
- Flisser A (2011). Cisticercosis: enfermedad desatendida. *Bol Med Hosp Infant Mex* **68**(3): 138-145.
- García H, Gonzalez A, Evans C y Gilman R (2011). *Taenia solium* cysticercosis. *Europe PMC Funders Group* **362**(9383): 547-556.
- Girolomoni G, Zambruno G y Kanitakis J (2007). Células inmunocompetentes. *EMC-Dermatología* **4**(2): 1-11.
- González J y Toro J (2007). La neuroglia en la respuesta inmune del sistema nervioso central. *Acta Neurol Colomb* **23**(12): 25-30.

-Hernández-Urzúa M y Alvarado-Navarro A (2001). Interleucinas e inmunidad innata. *Rev Biomed* **12**(4): 272-280.

-Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K y Jonuleit H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front. Immunol* **4**(82): 1-14.

-Imirizaldu L, Miranda L, García-Gurtuba I, Gastón I, Urriza J y Quesada P (2004). Neurocisticercosis. Una enfermedad emergente. *Anales Sis San Navarra* **27**(2): 201-209

-Julow J (2004). Iodine-125 brachytherapy of brain stem tumors. *Strahlenther Onkol* **180**(7):449-54.

-Larralde C, Padilla A, Henández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia R, Salvatierra B y Sepúlveda J (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* **34**(2): 197-210.

-Larralde C y de Aluja A (2006). Cisticercosis guía para profesionales de la salud. Fondo de Cultura Económica , México, D.F. Pp:22-30.

- Lima J, Takayanagui O, Garcia L y Leite J (2004). Use of neuron-specific enolase for assessing the severity and outcome of neurological disorders in patients. *Braz J Med Biol Res* **37**(16): 19-26.

-Loch-Neckel G y Koepp J (2010) La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Rev Neurol* **51**(3): 165-174.

-López A y Ramos A (2008). El papel inmunorregulador del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) en las infecciones parasitarias. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* **8**(1): 38-44.

-Metcalf C, Cresswell P y Barclay N (2011) Interleukin-2 signalling is modulated by a labile disulfide bond in the Cd132 chain of its receptor. *Open biology* 1 2:110036. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.110036>

-Moral M, Arenas-Guzmán R, Vergara L, Toussaint S y Grube P (2013). Cisticercosis. Informe de un caso cutáneo y un caso cerebral. *Med Int Mex* 29(1): 106-111.

-Muñoz J (2013). Related aspects to immunopathogenesis and diagnosis in early stages of neurocysticercosis: many questions, few answers. *Neurol Colomb* 29(12): 26-28.

-Murphy K, Travers P y Walport M (2009). *Inmunobiología de Janeway*. Editado por McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, México, D.F. Pp 335-398.

-Nakamura K, Kitani A y Strober W (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+) CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 194(5):629-44.

-Nash T, Mahanty S y Garcia H (2013). Neurocysticercosis- More than a Neglected Disease. *PLOS Neglected Tropical Disease.* 7(4): e1964. doi: 10.1371/journal.pntd.0001964

-Parish C (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Inmunology and Cell Biology* 77(2): 499-508.

-Pascual-Garvi J, González-Llanos F, Prieto-Arribas R, Cerdán S y Roda J (2004). LA barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rec Neurol* 38(6):565-581.

-Quah B, Warren H y Parish C (2007). Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nature Protocols* 2(9): 2049-2056.



- Ruiz V, Boffill M, González O, Masjuan M y Blanco F (2005). Efecto Inmunomodulador de la Fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. Revista Cubana de Investigación Biomédica **24**(1):5-13.
- Saavedra D (2013). CD28 and its role in T cell activation. Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter **29**(4): 359-367.
- Sáenz B, Ruíz-García M, Jiménez E, Hernández-Aguilar J, Suastegui R, Larralde C, Sciutto E y Fleury A. (2006). Neurocysticercosis: clinical, radiologic and inflammatory differences between children and adults. Pediatr Infect Dis **25**(4):801-803.
- Sáenz B, Fleury A, Chavarría A, Hernández M, Crispin J, Vargas-Rojas M, Fragoso G y Sciutto E (2012). Neurocysticercosis: local and systemic immune-inflammatory features related to severity. Med Microbiol Immunol **201**(8):73-80.
- Sakaguchi S. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat. Rev. Immunol. Jul **10**(7):490-500.
- Sakaguchi S. (2011). Regulatory T cells: history and perspective Methods Mol Biol **707**(6)3-17.
- Sciutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A y Larralde C (2007). The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. Parasite Immunology **29**(8): 621-636.
- Serke S, Serke M y Brudler O (1987). Lymphocyte activation by phytohaemagglutinin and pokeweed mitogen: identification of proliferating cells by monoclonal antibodies. Journal of Immunological Methods **99**(2): 167-172.
- Siachoque H, Satisteban N e Iglesias-Gamarra A (2011). Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. Revista Colombiana de Reumatología **18**(2): 203-220.

-Sky N, Britton G, Hill E, Verhagen J, Burton B y Wraith D (2013). Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin 10. *Front. Immunol* **4**(129) 1-13.

-Subramanian S y Cheng G (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol* **32**(1):23-63.

-Valenzuela-Borrayo L (2010). Neurocisticercosis en México, revisión de la literatura. *Revista Médica* **23**(2): 4-8.

-Vergara U (2009). Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. Artículo general. *Cs. Vet* **24** (1): 72-79.

-Viganali A, Collison L, y Workman C (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* **8**(6): 523-532.

-Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort E, Huizinga TW y Torres R (2007). Transient expression of Foxp3 in human activated nonregulatory CD4+ Tcells. *Eur. J. Immunology* **37**(3):129-138.

## **URL**

- Ciclo de vida de *Taenia solium*. Consulta el 13 de septiembre de 2013  
Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/biology.html>

-Distribución geográfica de la cisticercosis según la OMS en 2009. Consultado el 8 de julio de 2014. Tomado de:  
[http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report)

-Facultad de Medicina UNAM. Departamento de Parasitología. Cisticercosis. Consulta el 13 de septiembre de 2013. Tomado de:  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html>