



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

*DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA
ASOCIADA AL TRATAMIENTO DE LA
NEUROCYSTICERCOSIS SUBARACNOIDEA:
IMPLICACIONES PATOGENÉTICAS Y TERAPÉUTICAS*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MÉD. GRACIELA AGAR CÁRDENAS HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DRA. AGNÈS ODILE MARIE FLEURY
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR:

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F., OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó con el apoyo del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Agnès Fleury, como parte de proyectos de investigación apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (S0008-86526 y CB-2008-01) y con el apoyo del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Agradecimientos

A mis queridos padres y hermanos, por todo: las enseñanzas, el amor, el ejemplo de vida, todo lo que hemos compartido y lo que aún nos depara el porvenir.

A mi comité tutorial, Dra. Agnès Fleury, Dra. Gladis Fragoso y Dra. Edda Sciutto, por enseñarme, guiarme y acompañarme durante el doctorado, y por el ejemplo de vida y amistad entrañable.

A mis sinodales de examen de grado, Dr. Juan Pedro Laclette, Dra. Laila Gutiérrez, Dr. Luis Ignacio Terrazas y Dr. Julio Sotelo, por la paciencia en la revisión del manuscrito de esta tesis y los acertados comentarios para mejorarlo.

A mis amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia: Dr. Carlos Larralde, Dr. Raúl Bobes, Dra. Marisela Hernández, Dra. Laura Adalid, Dra. Nelly Villalobos, Dra. Brenda Sáenz, Biol. Gonzalo Acero, M. en C. Rubén Ramírez, Biol. Héctor Palafox, M. en C. Asiel Arce, y a mis compañeros de laboratorio, Dr. René Segura, Biol. Marisol García y M. en C. Jacquelyne Cervantes, por permitirme conocerlos, por la amistad que me ofrecieron y todo lo que compartimos.

A los pacientes del INNN, por participar en el presente estudio, permitirme conocerles y darme la oportunidad de tratar de mejorar sus problemas de salud. Gracias por todo lo que me enseñaron.

Y muy especialmente, a mi entrañable amigo y hermano del alma, QFB Juan F. Rodríguez, por la sincera amistad y la ayuda invaluable, desinteresada y cálida que siempre me has brindado. ¡Mil gracias!

	ÍNDICE
	Página
1. Introducción	1-14
1.1 Definición	1
1.2 Biología del parásito	1-4
1.3 Ciclo de vida	4-6
1.4 Epidemiología	7-8
1.5 Presentación clínica	8
1.6 Clasificación: Neurocisticercosis parenquimatosa y extraparenquimatosa	8-9
1.7 Tratamiento: Fármacos cestocidas, corticoides y otros inmunomoduladores	9-14
2. Antecedentes	15-26
2.1 Heterogeneidad en la neurocisticercosis humana	15-20
2.2 Heterogeneidad en la cisticercosis experimental	20-26
3. Respuesta inflamatoria en neurocisticercosis inducida por la inmunidad	27-41
3.1 Respuesta Th1/Th2	27-36
3.2 Respuesta Th17	36-41
4. Planteamiento del problema	42-43
5. Hipótesis	44
6. Objetivos	44
7. Metodología	45-55
7.1 Descripción de los pacientes	45

7.1.1	Clasificación de los pacientes	45-47
7.1.2	Criterios de inclusión y exclusión	47
7.2	Obtención de células mononucleares de sangre periférica y estimulación con extracto vesicular total de <i>Taenia solium</i>	49
7.3	Obtención de ácido ribonucleico a partir de células mononucleares de sangre periférica	50
7.4	Hibridación de microarreglos de ácido desoxirribonucleico	50-52
7.4.1	Análisis de los resultados de microarreglos	52-54
7.5	Estudio inmunológico de citocinas Th1, Th2 y Th17	55
8.	Análisis estadístico	56
9.	Consideraciones éticas	57
10.	Resultados	58-67
10.1	Descripción de la muestra utilizada en el análisis de microarreglos	58
10.2	Análisis de la expresión diferencial de genes por microarreglos e hipótesis propuesta	58-61
10.3	Descripción de la muestra utilizada en el análisis del perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17	62
10.4	Evaluación de los factores involucrados en la heterogeneidad de la neurocisticercosis	62-64
10.5	Niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 en las células mononucleares periféricas entre pacientes respondedores y no-respondedores	65-66

10.6	Determinación del índice de citocinas Th1, Th2 y Th17 suero/LCR en pacientes respondedores y no-respondedores	66-67
11. Resultados complementarios		68-72
11.1	Impact of <i>Taenia solium</i> neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. Int J Parasitol. 2012;42(2):171-176	68-69
11.2	Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. J Parasitol. 2012;98(1):142-148	69-70
11.3	Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation. Clin Dev Immunol. 2013;98:1468	70-71
11.4	Subarachnoidal neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drugs: a case series. BMC. 2010;10:6	71-72
12. Discusión y conclusiones		73-78
13. Referencias		79-92
14. Anexos		93-132
14.1	Anexo 1: Carta de consentimiento informado	93-94
14.2	Anexo 2: Artículos producidos durante el doctorado	95-122
14.3	Anexo 3: Artículo de tesis	123-132

Resumen

La neurocisticercosis (NC) es una enfermedad causada por el establecimiento de la fase larvaria (cisticerco) de *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC). Aún es una enfermedad endémica en países no desarrollados de Latinoamérica, África y Asia. Una de las principales características del padecimiento es su gran heterogeneidad, clínica, radiológica y de respuesta al tratamiento cestocida-esteroide. La modulación diferencial del fenómeno inflamatorio que acompaña a la enfermedad parece ser uno de los principales factores involucrados en las diferencias clínico-radiológicas observadas. Con respecto al tratamiento cestocida, éste resulta más eficiente cuando los parásitos están localizados en el parénquima o en los surcos que cuando se localizan en el espacio subaracnoideo de la base (SAB) o en los ventrículos (V).

Considerando el panorama anterior, este proyecto fue diseñado para evaluar factores inflamatorios asociados con la respuesta al tratamiento. Para ello, se comparó el perfil de expresión génica por microarreglos en células mononucleares sanguíneas estimuladas con extracto vesicular total de cisticerco entre los pacientes respondedores (NC-R, con disminución $\geq 50\%$ de la carga parasitaria pos-tratamiento) y los no-respondedores (NC-NR, disminución $< 50\%$ de la carga parasitaria pos-tratamiento). El análisis se concentró en el estudio del conjunto génico relacionado con la respuesta inmune.

En total se identificaron en los cinco NC-R 18 genes sobreexpresados relacionados con funciones inmunológicas, y sólo 4 genes en los NC-NR; entre ellos se encuentran genes proinflamatorios (ROR γ C, Sema4A, SLAMF3, SLAMF6), antiinflamatorios (TGFB, TNFRSF25, TNFRS18, SLAMF1, ILF2) e

inmunomoduladores (CXCL2, RUNX3, SLAMF9, TGFBR3). La posible participación de este perfil de expresión génica se confirmó cuantificando el perfil de citocinas en 65 pacientes, tanto NC-R como NC-NR.

Nuestros resultados muestran que el incremento en el nivel de citocinas proinflamatorias Th17 puede estar asociado con una respuesta más eficiente al tratamiento. Éstas son las primeras evidencias que señalan la participación del sistema inmune del hospedero en la destrucción del cisticerco asociada al tratamiento cestocida.

Abstract

Neurocysticercosis is still endemic to most non-developed countries of Latin America, Africa, and Asia. One of the most important characteristics of the disease is a great heterogeneity, both clinical and radiological, and also in its response to treatment.

The differential modulation of the inflammatory phenomenon associated to the disease seems to be a determinant factor involved in this heterogeneity. With regard to the treatment, parasite location is strongly associated to treatment response; in this context, while anti-helminthic drugs (ADH) are generally effective to rapidly destroy parenchymal cysticerci, several AHD cycles are frequently necessary to damage extra-parenchymally located parasites.

Considering these antecedents, the present study was designed to evaluate whether certain differences in the immunological profile of the patients are involved in the diversity of the response to AHD. To this end, global gene expression microarray and a cytokine analysis were made. Responder patients were those showing a radiological reduction to or greater than 50% in the parasite burden following AHD treatment.

Microarray pre- and post-treatment comparisons showed that a total of 18 immune-related genes were up-regulated in the five responder patients with respect the expression profile seen in the four non-responder patients. Up-regulated genes exerted pro-inflammatory (ROR γ C, Sema4A, SLAMF3, SLAMF6), anti-inflammatory (TGF β , TNFRSF25, TNFRS18, SLAMF1, ILF2), or immunomodulatory effects (CXCL2, RUNX3, SLAMF9, TGFBR3). To further explore the causes of the observed heterogeneity in the response to treatment, a

wide ELISA cytokine analysis was performed in serum, PBMC supernatants, and CSF samples from 39 responder and 26 non-responder patients. Responder patients showed higher CSF IL-17A levels ($P = 0.04$) and higher supernatant IL-6 levels ($P = 0.03$) 60 days after treatment. Our results suggest that an increase in pro-inflammatory cytokines may be associated with an efficient response to treatment. These are the first evidences to point out the participation of the immune response in cysticercus destruction mediated by cysticidal drugs.

ABREVIATURAS

Neurocisticercosis (NC)

Subaracnoideo de la base (SAB)

Subaracnoideo de los surcos (SAS)

Respondedor (R)

No-respondedor (NR)

Sistema nervioso central (SNC)

Líquido cefalorraquídeo (LCR)

Aril hidrocarbano (AHR)

Células T reguladoras (Tregs)

Albendazol (ABZ)

Praziquantel (PZQ)

Células mononucleares de sangre periféricas (CMSP)

Hipertensión intracraneal (HIC)

Ácido ribonucleico (ARN)

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

GeneChip RMA (GC-RMA)

Sobrenadante (SN)

Tomografía computarizada (TC)

RNA integrity number (RIN)

1. Introducción

1.1 Definición

La neurocisticercosis (NC), causada por la forma larvaria (metacéstodo) de *Taenia solium*, es la infección por helmintos más frecuente en el SNC (Del Brutto, 2012). La enfermedad se adquiere al ingerir los huevos de *T. solium*, que posteriormente eclosionan en la mucosa intestinal y pasan al torrente sanguíneo, para luego llegar a tejidos como el músculo, el sistema nervioso central y los ojos, donde se transforman en cisticercos (Sotelo & Del Brutto, 2000).

1.2 Biología del parásito

La cisticercosis y la teniasis humanas se originaron hace miles de años, probablemente en el continente africano, como consecuencia del cambio en los hábitos alimenticios de los grupos nómadas, quienes comían los restos de las presas de grandes carnívoros. La parasitosis se estableció en forma definitiva con la domesticación del hospedero intermediario, en especial el cerdo, inicialmente en Asia y luego en el resto del mundo (Larralde & Aluja, 2006; Hoberg et al, 2001).

Las 42 especies de tenia (con tres subespecies) han realizado diferentes saltos interespecie para llegar a su hospedero definitivo, pasando por cánidos, felinos, mustélidos, armadillos y hienas (Hoberg, 2006).

Las primeras descripciones de la teniasis se encuentran en el papiro de Ebers en el antiguo Egipto y en los textos de la medicina ayurveda, 5000 a 1500 años antes de Cristo. Teofrasto, el padre de la botánica, acuñó en Grecia el término 'taenia' para designar a estos gusanos planos intestinales. Rumler realizó

la primera descripción de un caso de NC en 1558 durante la autopsia de una persona que padecía convulsiones, describiendo vesículas llenas de líquido adheridas a la duramadre. En 1792, Unanue reportó el primer caso en América. El primer caso de NC en México fue descrito en 1901, y su estudio se fortaleció en los años cuarenta y cincuenta, con las investigaciones del Dr. Luis Mazzotti en el Instituto de Enfermedades Tropicales, del Dr. Dionisio Nieto en el Instituto Nacional de Neurología y del Dr. Clemente Robles en el Hospital General de México (Larralde & Aluja, 2006).

La tenia es un platelminto (hermafrodita) de la clase *Cestoda*. El cuerpo tiene 2 a 8 metros de longitud y puede vivir de 10 a 20 años dentro del hospedero. Está conformada por una cabeza, un cuello y un cuerpo. La cabeza o escólex es la parte que se adhiere a los tejidos del hospedero (en el caso del ser humano, a la capa mucosa y la muscular del intestino delgado) mediante un rostelo, una doble cadena de ganchos y cuatro ventosas que permiten la succión y fijación al tejido. El cuerpo o estróbilo está dividido en pequeños segmentos independientes acoplados entre sí, llamados proglótidos. Éstos están compuestos en su exterior por ondulaciones de tejido llamadas microtricas, que permiten la absorción de nutrientes, y en su interior por un parénquima de fibras de músculo liso y glucógeno, lo que indica que la glucosa es la principal fuente de energía del parásito (Flisser et al., 2004).

El proceso de estrobilación implica la producción de proglótidos; las unidades inmaduras son proximales al escólex y las maduras o grávidas son las más distales, lo que permite que se desprendan y liberen sus huevecillos. La inseminación ocurre por autoimpregnación dentro del mismo proglótido o por

impregnación de otro proglótido, incluso de diferente estróbilo. Los proglótidos grávidos contienen miles de huevecillos de 20 a 40 μm de diámetro, provistos de múltiples envolturas que les permiten eclosionar y sobrevivir en situaciones adversas (Willms et al., 2003).

El cisticerco es una vesícula semiovalada de 0.6 a 2.5 cm de diámetro; está formado en el exterior por una pared dividida en tres capas: una externa, una media o capa celular pseudoepitelial y una capa interna o reticular. Sobre la pared vesicular se encuentra la superficie tegumentaria, que a través de proyecciones digitiformes llamadas microtricas permite el intercambio de excretas y nutrientes por medio del transportador de glucosa TGTP2 (Rodríguez-Contreras et al., 1998); dependiendo de las condiciones externas, puede utilizar tanto el metabolismo anaeróbico como el aeróbico. El interior está formado por una capa de músculo liso; por los citones subtegumentales, que son células especializadas en la síntesis de proteínas para el tegumento, y por células flama, que constituyen el sistema protonefridial. Todo esto está distribuido en forma desorganizada y sincitial. Se encuentra también un escólex invaginado con cuatro ventosas y un rostelo con dos hileras de ganchos. Entre los antígenos producidos por el cisticerco se han identificado diversas proteínas, incluyendo las de choque térmico, como la HSP 80, HSP 70 y HSP 60; esta última se ha encontrado como producto de secreción-excreción (Vargas-Parada et al., 2001).

Conforme el cisticerco permanece en los tejidos del huésped sin completar su ciclo de vida, es posible identificar cuatro etapas de involución en él: vesicular, coloidal, nodular-granular y nodular-calcificada. En la etapa vesicular, la larva o embrión hexacanto está rodeada por un quiste de aproximadamente 1 cm de

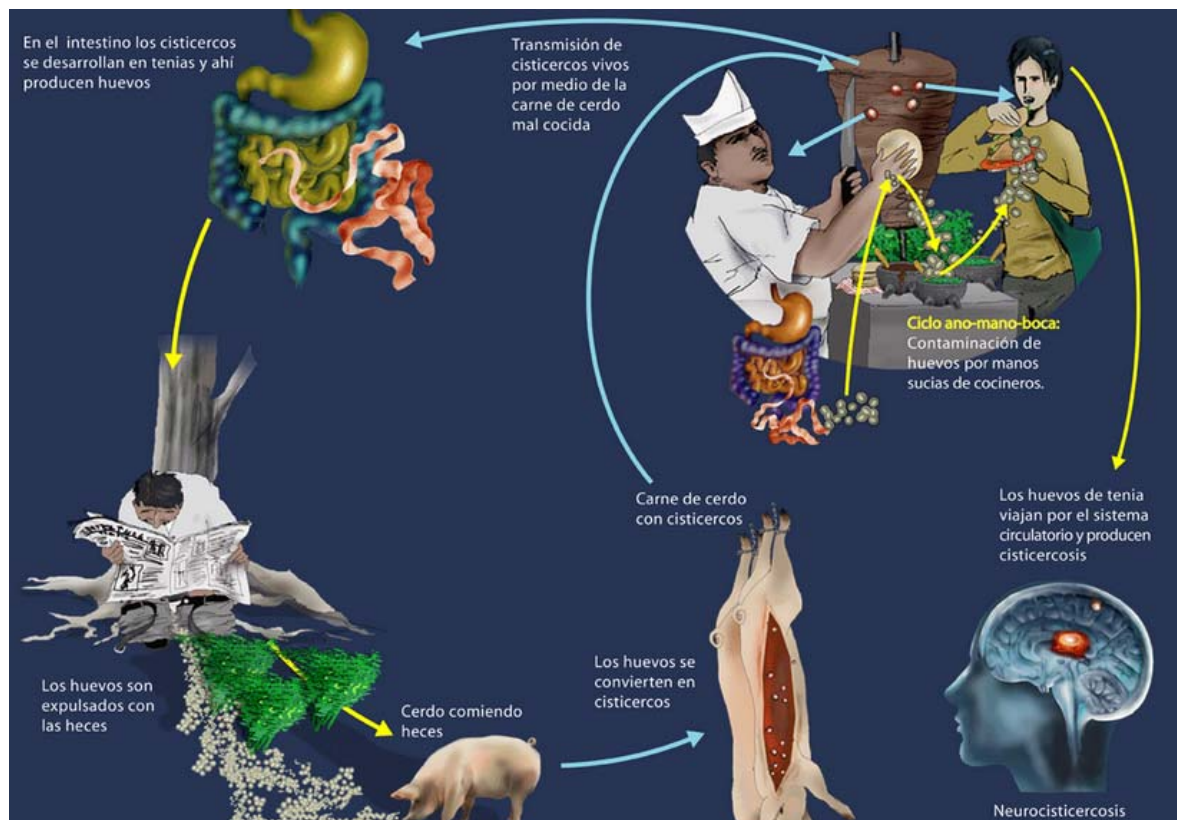
diámetro que contiene líquido transparente y un escólex invaginado de 4 a 5 mm, envueltos por una membrana delgada y translúcida. Después de un tiempo que es muy variado entre hospederos (de días hasta años) empieza la etapa de involución del parásito. El quiste se vuelve coloidal, la pared se hialiniza y el líquido se torna blanquecino, turbio y gelatinoso por el abundante contenido en proteínas y la infiltración de leucocitos polimorfonucleares. En la etapa nodular-granular ya no es posible identificar el escólex por el depósito de colágena alrededor de la pared, producto de la reacción inflamatoria; en el microscopio óptico con la técnica tricrómica de Masson, los remanentes de membrana y el escólex se visualizan en rojo brillante y azul, respectivamente. La etapa final, llamada nodular-calcificada, consiste en la total involución y calcificación del quiste, reduciéndose su tamaño a la mitad, con mínima reacción inflamatoria y gliosis reactiva residual (Larralde & Aluja, 2006).

1.3 Ciclo de vida

En el ciclo biológico del binomio teniasis-cisticercosis, el ser humano funge como hospedero definitivo, ya que aloja al céstodo en su forma adulta. El cerdo es el principal hospedero intermediario, aunque se han reportado otras especies de mamíferos (el hombre puede serlo de forma accidental) capaces de hospedar a la forma larvaria. Dos a tres meses después de iniciada la infección, la tenia adulta, que se encuentra fuertemente adherida al intestino delgado del ser humano por medio del escólex, desprende espontáneamente proglótidos grávidos, de 4 a 5 por día, que son evacuados hacia el exterior junto con las heces; los proglótidos más distales están totalmente diferenciados y contienen un gran número de

huevecillos, alrededor de 50,000 cada uno. Los proglótidos liberan sus huevecillos, los cuales pueden resistir múltiples condiciones adversas. La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevecillos de *T. solium*. En los lugares con deficiente manejo del depósito de excretas, los cerdos pueden ingerir heces contaminadas con huevecillos de tenia. Bajo estas circunstancias, los cerdos desarrollan cisticercosis y se convierten en los hospederos intermediarios; por otro lado, si quienes alojan el parásito adulto tienen malos hábitos de higiene, pueden autoinocularse o contaminar alimentos, lo que propicia la diseminación de la enfermedad al infectar directamente a otros humanos. En el tracto digestivo del hospedero, las oncosferas contenidas en los huevecillos son liberadas por acción de las enzimas proteolíticas y las sales biliares; una vez libres, atraviesan la pared intestinal y por vía hematógica o linfática se diseminan prácticamente a todo el organismo.

Los tejidos que invade con más frecuencia son el músculo estriado, particularmente los maseteros, lumbares, el corazón, la lengua, el diafragma y los intercostales, además del SNC, incluyendo el ojo. En menor grado se disemina al esófago, la grasa perihepática, los pulmones y el tejido celular subcutáneo. El ciclo se completa cuando el ser humano ingiere cisticercos viables con la carne u otros tejidos crudos o mal cocidos; las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, inducen que el protoescólex salga de su envoltura y se fije a la pared intestinal, dando origen al parásito adulto, que después de tres meses de maduración se reproducirá de forma sexual, excretando huevecillos en las heces (Figura 1) (Larralde & Aluja, 2006).



<http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/Galeria.html>

Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* e infección.

T. solium habita únicamente en el intestino delgado del ser humano (hospedero definitivo). A partir de los proglótidos grávidos produce una gran cantidad de huevecillos, que son expulsados al ambiente a través de la materia fecal. El cerdo es el principal hospedero intermediario: se infecta al ingerir las heces humanas que contienen proglótidos o huevecillos de *T. solium*. Los huevecillos tienen el potencial de convertirse en cisticercos, condicionando la cisticercosis porcina. El ciclo de vida se completa cuando el ser humano consume carne infectada con cisticercos. Por otra parte, si un humano ingiere alimentos o agua contaminada con huevecillos del parásito, entonces se convierte en hospedero intermediario accidental, condicionando cisticercosis muscular, ocular o NC.

1.4 Epidemiología

En México, la NC es la causa de 2.4 a 4.3% de las consultas neurológicas en instituciones especializadas (Fleury et al., 2010; Jiménez-Marcial & Velásquez-Pérez, 2004) y representa la primera causa de epilepsia de inicio tardío (Suástegui-Román et al., 1996; Medina et al., 1990). En la población abierta se han realizado estudios epidemiológicos en el medio rural (en los estados de Morelos y Puebla), en los cuales se encontraron prevalencias entre 9 y 9.5% de NC, utilizando como criterio diagnóstico los resultados de tomografía computarizada (TC) (Fleury et al., 2003; Fleury et al., 2006).

Los estudios de prevalencia hospitalaria demostraron que entre 1995 y 2001 la NC fue la novena causa de mortalidad y la quinta de morbilidad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México (Jiménez-Marcial & Velásquez-Pérez, 2004), observándose la mayor prevalencia en la población de adultos jóvenes en edad productiva (Sáenz et al., 2006). Además, en este mismo centro hospitalario la prevalencia global de la infección no se ha modificado estadísticamente desde 1994, aunque disminuyó la prevalencia de los casos graves (con hipertensión intracraneal), probablemente debido a la asistencia médica más temprana (Fleury et al., 2010).

Debido a las características del ciclo de vida, en el que el acceso a heces humanas infectadas por parte del hospedero intermediario es imprescindible, las condiciones de extrema pobreza y bajo control sanitario favorecen que la NC sea endémica en la mayoría de los países de América Latina, África subsahariana y Asia. La NC se ha reportado también en países desarrollados (Stamos et al., 1996) como consecuencia del flujo de inmigrantes de países en donde la

cisticercosis es endémica (Sciutto et al., 2000).

1.5 Presentación clínica

El cuadro clínico de la NC se relaciona estrechamente con la inflamación producida por la respuesta inmunitaria del hospedero, dependiente principalmente del estadio, el tamaño, la cantidad y la localización de los parásitos en el SNC (Fleury et al., 2004; Fleury et al., 2011). De la combinación de estos eventos resulta un cuadro polimorfo de manifestaciones neurológicas, siendo más frecuentes las crisis convulsivas (hasta en 80% de los pacientes sintomáticos), las alteraciones motoras y sensitivas (16%), la hipertensión intracraneal (12%) y el deterioro cognitivo (5%), además de las formas meningíticas o encefalíticas, las cuales son muy raras (Del Brutto, 2012). El curso y la evolución de la enfermedad pueden verse influidos por diversos factores, tanto del hospedero como del parásito y del ambiente (Fleury et al., 2011).

1.6 Clasificación

Neurocisticercosis parenquimatosa

En la forma parenquimatosa, las vesículas se localizan en las zonas más vascularizadas, la sustancia gris cortical y los núcleos subcorticales, aunque en ocasiones también hay vesículas en la sustancia blanca subcortical. Los hemisferios cerebrales son los más frecuentemente afectados; menos ordinariamente los cisticercos alcanzan el cerebelo, el tallo cerebral y la médula espinal (Larralde & Aluja, 2006).

Neurocisticercosis extraparenquimatosa: subaracnoidea-cisternal y ventricular

Constituyen las formas más graves de la enfermedad, dada su frecuente asociación con el desarrollo de hidrocefalia e hipertensión intracraneal. En esta forma, los parásitos se localizan al nivel de las cisternas subaracnoideas de la base (la suprasillar, prepontina y ambiens son las más frecuentemente afectadas) o al nivel de los ventrículos cerebrales. Cuando los parásitos se encuentran en fase vesicular puede llegar a ser difícil identificarlos mediante TC o incluso por secuencias convencionales de resonancia magnética (T1 o T2). En estos casos, secuencias especiales como FIESTA (Fast imaging employing steady-state acquisition) pueden ser de utilidad (Mont'Alverne Filho et al., 2011).

1.7 Tratamiento

Fármacos cestocidas (albendazol y praziquantel)

En el aspecto clínico, actualmente se utilizan dos fármacos cestocidas. El albendazol (benzimidazol) al parecer actúa uniéndose a la β -tubulina del parásito, inhibiendo su polimerización y alterando la captación de glucosa por la membrana del cisticerco, provocando depleción energética (Venkatesan, 1998). La dosis recomendada es 15 mg/kg/d durante una semana (Singhi et al., 2003) o 30 mg/kg/d cuando la localización es subaracnoidea o ventricular (Márquez-Caraveo et al., 2004).

El albendazol (ABZ) se utilizó como fármaco antihelmíntico a partir de 1979, y desde 1987 se demostró su utilidad en el tratamiento de la NC (Del Brutto et al., 1988 (a); Escobedo et al., 1987). Pronto se convirtió en el tratamiento de primera

elección por su eficacia, seguridad y bajo costo, superando a otros medicamentos como el praziquantel (PZQ) (Cruz et al., 1991; Jung et al., 1992; Sánchez et al., 1993). El ABZ tiene un extenso efecto de primer paso por el hígado y es metabolizado rápidamente a sus derivados sulfóxido y sulfona (compuestos de la S-oxidación) (Sotelo et al., 1998). El metabolismo del ABZ es mediado por dos vías enzimáticas microsomales: el sistema de monoxigenación con flavina, que incluye el primer paso de la bioconversión al sulfóxido de ABZ, su metabolito activo; el segundo paso es por el sistema citocromo p450, que lleva a su bioconversión a la albendazol sulfona, su metabolito inactivo (Sotelo et al., 1998; Del Brutto et al., 2006). El sulfóxido de ABZ tiene una concentración sérica muy variable, con una vida media entre 6 a 15 horas y una buena penetración al espacio subaracnoideo. La administración concomitante de esteroides contribuye a reducir la respuesta inflamatoria meníngea e incrementa la concentración plasmática de ABZ hasta en 50% (Sánchez et al., 1993; Sotelo et al., 1998).

El praziquantel (PZQ) es una isoquinolina que actúa dañando los tegumentos del parásito, produciendo parálisis espástica del escólex. La dosis recomendada es 50 mg/kg/d durante 2 semanas, o un esquema acortado en los casos de localización parenquimatosa (López-Gómez et al., 2001). Durante el inicio del tratamiento puede observarse un empeoramiento de la sintomatología neurológica debido a la reacción inflamatoria que acompaña y conduce a la destrucción del parásito.

Tanto el PZQ como el ABZ penetran con poca eficacia en el espacio subaracnoideo; además, el PZQ disminuye su absorción al ser administrado conjuntamente con esteroides (Jung et al., 1990; Juobert et al., 1990), lo que

podría apoyar los resultados poco favorables en el tratamiento de las formas extraparenquimatosas (Fleury et al., 2011; Cohen et al., 1992). Los efectos colaterales del PZQ son poco frecuentes, e incluyen malestar abdominal, náuseas, vómito, mareo y cefalea; en muy raras ocasiones alopecia, rash, leucopenia y alteración de las funciones hepáticas, situaciones que no dependen de la dosis, a tal grado que en trabajos sobre farmacocinética, en donde se analizan interacciones con otros medicamentos, se ha logrado elevar de 50% hasta 4.5 veces la concentración sérica del ABZ sin influir en el reporte de efectos colaterales (Jung et al., 1990).

A pesar del extenso uso de ABZ y PZQ para el tratamiento de la NC, aún no hay consenso sobre su utilidad y eficacia en todas las formas de la enfermedad, debido a la falta de evidencia científica sólida (Román et al., 2000; Del Brutto et al., 2001). En un estudio reciente de meta-análisis se incluyeron ensayos aleatorios que evaluaron los resultados clínicos y el efecto del tratamiento cestocida (ABZ vs. PZQ) en neuroimagen. Se incluyeron once estudios en total; en seis ensayos se asignaron aleatoriamente 464 pacientes con parásitos quísticos (cisticercos vesiculares), y en los cinco restantes se asignaron aleatoriamente 478 pacientes con parásitos coloidales, de localización tanto parenquimatosa como extraparenquimatosa. El tratamiento cestocida (ABZ 15 mg/kg/d o PZQ 50 mg/kg/d) se asoció con resolución completa de las formas vesiculares (44% tratados vs. 19% no tratados, $P = 0.025$) y a un mejor desenlace o resolución de las formas vesiculares y coloidales, y con bajo riesgo de recurrencia de convulsiones (Del Brutto et al., 2006).

Con respecto a la duración del tratamiento, un estudio doble ciego controlado sobre la eficacia del ABZ en el tratamiento de la NC reveló que no hay diferencia entre la administración por 7 o 14 días (Sánchez et al., 1993).

Por otro lado, los esteroides pueden representar la clave para el control de la respuesta inflamatoria durante el tratamiento cestocida.

Existe heterogeneidad en la eficiencia de los fármacos cestocidas (ABZ y PZQ), aun cuando se administren dosis más elevadas de los fármacos (ABZ, 30 mg en lugar de 15 mg/kg/día), reportándose incluso casos de relativa resistencia a tales medicamentos (Cárdenas et al., 2011; Cohen et al., 1992).

En 2002, Mirfazaelian y cols. encontraron un dimorfismo de género en la farmacocinética de ABZ vs. controles; en este estudio se reportó que los pacientes femeninos alcanzaban una concentración sérica menor y presentaban una distribución por volumen sérico disminuida, lo que plantea una disyuntiva en el tratamiento de pacientes con NC.

Corticosteroides y otros inmunomoduladores

Una de las complicaciones más graves en la neurocisticercosis es la intensa respuesta inflamatoria que induce el parásito alrededor de los nervios craneales y los vasos sanguíneos del polígono de Willis, por el efecto de masa que ejercen los quistes gigantes y por la ependimitis y aracnoiditis, que llegan a comprometer la vida; por esta razón, los corticosteroides son fármacos adyuvantes frecuentemente usados para reducir la inflamación y el edema perilesional.

En un estudio de meta-análisis se evaluó recientemente la eficacia de los corticosteroides en la reducción de crisis epilépticas y la persistencia de parásitos

según estudios de neuroimagen. Se incluyeron 13 artículos con 1373 pacientes, y se demostró que el efecto benéfico de los corticoides es cuestionable. Los corticoides solos vs. placebo o ningún fármaco mostraron una reducción de la tasa de recurrencia de crisis a los 6-12 meses (RR 0.46, IC 95%) y la persistencia de parásitos. No hubo diferencias en otras comparaciones, incluyendo la combinación de corticosteroides/ABZ. Todos los ensayos incluidos tuvieron un alto riesgo de sesgo, por lo cual el cuerpo general de pruebas se ponderó de “muy baja” calidad según la evaluación GRADE (Working Group Grades of Evidence) (Cuello-García et al., 2013). Por lo anterior, se requieren ensayos clínicos aleatorizados para evaluar con certeza la utilidad de los esteroides en la disminución de crisis epilépticas.

Por otro lado, la administración prolongada de corticosteroides resulta en efectos secundarios muy conocidos, como diabetes, hipertensión, osteopenia, miopatía, síndrome de Cushing iatrógeno y mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Stanbury et al., 1998). Debemos también considerar la posibilidad de que mediante su efecto inmunosupresor se inhiba o disminuya la respuesta inmune específica contra el parásito, lo que contribuiría a la ausencia de respuesta al tratamiento que presentan más de la mitad de los pacientes con formas SAB (Cruz et al., 1995; Nash et al., 2006). Si bien la utilización de esteroides ha mejorado el pronóstico clínico de los pacientes graves (Suástegui-Román et al., 1996), en ciertos casos la efectividad es parcial y la inflamación en el LCR persiste a pesar de la administración de esteroides. La gravedad de estos pacientes ha llevado a evaluar la utilización de otros inmunosupresores tales como el metotrexato para tratar de controlar el fenómeno neuroinflamatorio, a pesar de

los riesgos que conlleva esta utilización (Mitre et al., 2007; Keiser & Nash, 2003). Aun cuando hubo control de las complicaciones inflamatorias propias de estas formas graves de NC y también disminuyeron los efectos adversos relacionados con el uso crónico de corticosteroides, no se recomienda la administración rutinaria de metotrexato debido a los efectos adversos (toxicidad pulmonar, hepática y hematológica) que obligan a la monitorización frecuente, y ésta no es siempre accesible para pacientes ambulatorios.

2. Antecedentes

2.1 Heterogeneidad en la cisticercosis humana

Una de las características fundamentales de la neurocisticercosis es la gran heterogeneidad a nivel clínico, radiológico e inflamatorio del LCR (Fleury et al., 2004) (Figura 2).

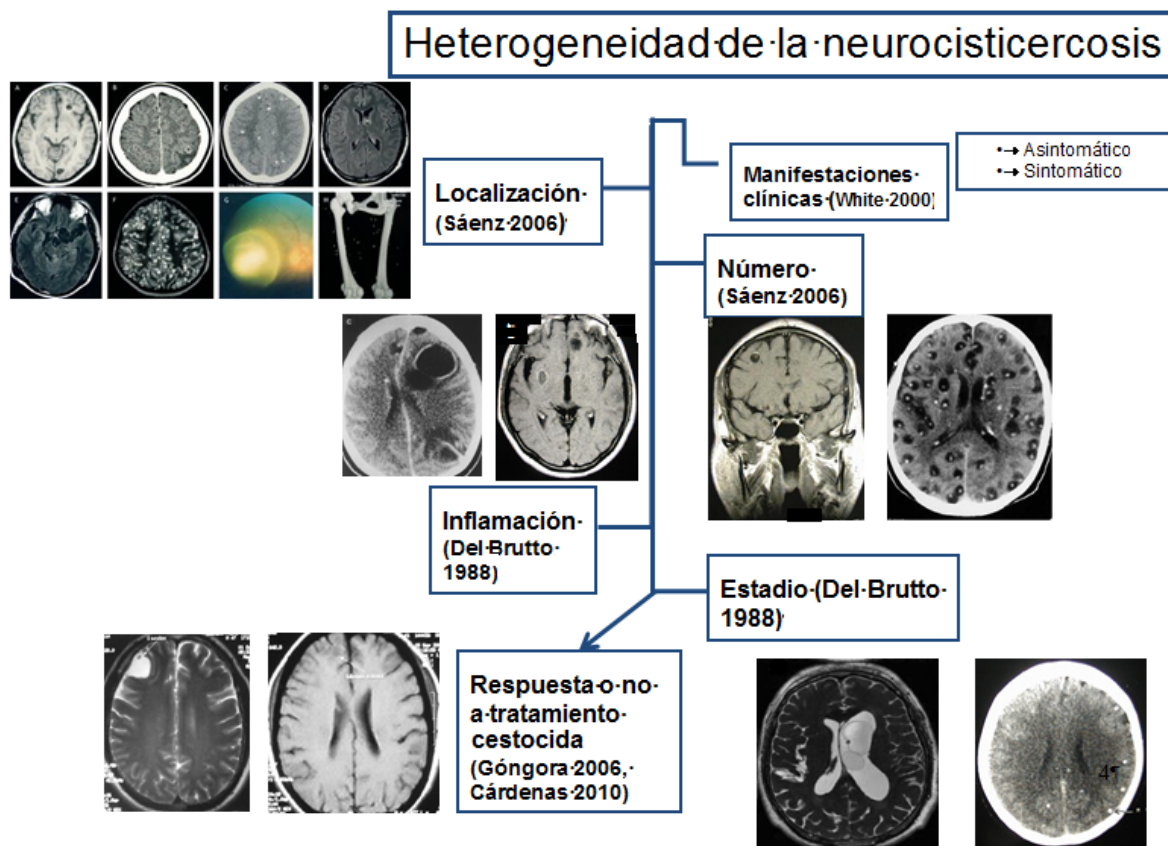


Figura 2. Heterogeneidad en la neurocisticercosis.

Características de la enfermedad que participan en la heterogeneidad:

- Manifestaciones clínicas: sintomáticas o graves, cuando los enfermos desarrollan hipertensión arterial, vasculitis o hidrocefalia, mientras que los asintomáticos o leves pueden presentar cefalea o síntomas inespecíficos.
- Localización de los parásitos: la enfermedad puede afectar el sistema nervioso central (parénquima, espacio intraventricular, subaracnoideo de la base, ojo) o al nivel periférico (sistema musculoesquelético).

- Número de parásitos: pueden observarse parásitos únicos o lesiones múltiples. En esta última condición pueden asociarse con encefalitis cisticercosa.
- Estadio de involución de los parásitos: generalmente, los parásitos vesiculares y calcificados son poco sintomáticos, excepto que los vesiculares produzcan efecto de masa o las formas calcificadas muestren “reactivación” por liberación antigénica, condicionando convulsiones o alteraciones cognitivas.
- Intensidad de la inflamación: aunque el proceso de inflamación (demostrada radiológicamente como captación del medio de contraste) se asocia con la involución del parásito, puede ser contraproducente, condicionando hipertensión intracraneal, crisis convulsivas o alteraciones cognitivas.

La heterogeneidad radiológica se refiere a los parámetros que se observan a través de los estudios de neuroimagen que involucran tanto a la localización de los parásitos (parénquima o subaracnoideo de la base (cisternal o intraventricular), los estadios de evolución del parásito (vesicular, coloidal, calcificado) y el número de cisticercos (únicos o múltiples) (Lerner et al., 2012; Fleury et al., 2011).

Dependiendo de los estadios de involución de los cisticercos, tenemos formas vesiculares, coloidales y calcificadas. Los cisticercos vesiculares son formas viables, activas. En imágenes de TC se observan hipodensos o isodensos en relación con el LCR. A nivel histológico, la pared vesicular se observa translúcida, muestra contenido líquido o fluido vesicular y el escólex se encuentra invaginado. Habitualmente existe poca o ninguna reacción inflamatoria alrededor del parásito. En las formas coloidales o degenerativas existe destrucción del escólex, acumulación de material proteináceo y respuesta inflamatoria perilesional. Estas formas se hacen evidentes en neuroimagen mediante la administración de medio de contraste (Lerner et al., 2012). Histopatológicamente, existe una intensa reacción inflamatoria alrededor del parásito, así como engrosamiento de la pared

vesicular, constituyéndose una cápsula de colágeno. Finalmente, las formas calcificadas representan la forma secuelar del cisticerco. Estas formas pueden observarse fácilmente en estudios de tomografía cerebral sin necesidad de administrar medio de contraste. Histopatológicamente se observa una intensa gliosis y el acúmulo de células gigantes multinucleadas.

La intensidad de la respuesta inflamatoria en el LCR es también muy variable y se evidencia por el incremento de células en el LCR (pleocitosis). Se ha observado que esta respuesta aumenta directamente conforme la cronicidad de la enfermedad. De esta forma, se ha reportado que la meningitis cisticercosa es más frecuente en pacientes con mayor cronicidad de la enfermedad (Cárdenas et al., 2010).

Por otro lado, es sabido que factores propios del parásito podrían también participar en esta heterogeneidad. En diferentes estudios se ha demostrado la existencia de diferencias genéticas y antigénicas entre parásitos de orígenes diferentes (México, Honduras, Tanzania) (Vega et al., 2003; Maravilla et al., 2003; García et al., 2003; Yakoleff et al., 1982).

La existencia de tales diferencias sugiere que esta variabilidad podría relacionarse con diferencias en la patogenicidad del parásito. En un estudio realizado recientemente, se encontró que parásitos recuperados de pacientes con distintas presentaciones radiológicas de NC; es decir, diferentes localizaciones (parénquima vs extraparenquimatoso) y con diferentes estadios de involución (vesicular vs coloidal), presentan variabilidad genética en el gen del citocromo b (Cytb) (Palafox-Fonseca et al., 2013).

Cabe señalar que el gen que codifica para el Cytb se ha utilizado ampliamente para análisis filogenéticos porque la variabilidad de su secuencia resulta apropiada para la comparación de subespecies, especies y géneros (Romaino et al., 2014).

La intensidad de la exposición al parásito podría también tener un papel determinante. En este contexto, se considera que la población rural está mucho más expuesta que la población de zonas urbanas, sobre todo por la falta de agua potable y por el fecalismo a ras de suelo (Fleury et al., 2011).

Evidencias epidemiológicas permiten sostener la posible participación de la exposición durante la infancia (temprana) y frecuente al parásito en la protección del hospedero (Raghava et al., 2010). En este contexto, se ha observado que las manifestaciones clínicas, radiológicas e inflamatorias de la NC se distinguen significativamente entre niños y adultos (Sáenz et al., 2006). En los primeros, la forma más frecuente es un parásito único en estado de degeneración (coloidal), localizado en el parénquima o en el espacio subaracnoideo de los surcos corticales. En los adultos, generalmente sintomáticos, la localización en el espacio SAB o V es la más frecuente, mientras que en los niños esta forma es casi inexistente. Resulta también notable que los niños presenten una prevalencia de NC sintomática significativamente más baja que los adultos, a pesar de tener una mayor exposición al parásito, como indican los datos de seroprevalencia (Chavarría et al., 2003). Esta diferencia en la prevalencia podría ser resultado del lapso existente entre la infección y el principio de la sintomatología.

En relación con los factores genéticos del hospedero, en un estudio de casos y controles realizado en México se reportaron diferencias en haplotipos de

HLA; los pacientes con NC presentaban el antígeno HLA A28 más frecuentemente que los controles, mientras que en los controles el antígeno HLA DQw2 predominó (Del Brutto et al., 1991). Se han reportado también familias con mayor frecuencia de casos de NC que el promedio esperado en la población (Fleury et al., 2006) en condiciones homogéneas de exposición. Estos estudios constituyen una evidencia epidemiológica de la mayor participación de los componentes genéticos en la susceptibilidad a la infección. En la India se realizó un estudio clínico con resonancia magnética contrastada dinámica y se determinaron los niveles de la metaloproteínasa 9, así como el polimorfismo en dicho gen en una comunidad agrícola en 30 personas, 15 de las cuales presentaban NC calcificada con o sin convulsiones. Los hallazgos mostraron que las formas calcificadas presentan edema perilesional que varía entre los pacientes sintomáticos y los asintomáticos, así como una asociación entre polimorfismos del gen de la metaloproteína 9 y presencia de sintomatología (Gupta et al., 2012). Otros polimorfismos reportados son el del gen de TLR4 (Toll-like receptor-4), donde los haplotipos TLR4 Asp299Gly y Thr399Ile se asociaron significativamente con NC y progresión sintomática (Verma et al., 2010), y el del gen de ICAM-1, (polimorfismo K469E), donde los individuos homocigotos EE mostraron un incremento de 5.47 veces en la susceptibilidad para NC (Singh et al., 2014).

Existen diferencias en la forma de presentación de la enfermedad en distintos continentes, que podrían resultar de variaciones genéticas en las poblaciones humanas que prevalecen en los mismos. En América Latina, la localización subcutánea o muscular parece ser poco usual, mientras que la localización en el sistema nervioso central continúa siendo la más común. En

estos casos el parásito se aloja frecuentemente en el espacio SAB y V (Fleury et al., 2011). En Asia y África se reportan con frecuencia casos de cisticercosis subcutánea, y sólo excepcionalmente casos de NC en el espacio SAB o V (Kumar & Mohan, 2012). Sin embargo, en esta diversidad podrían también participar diferencias genéticas entre los parásitos prevalentes, especialmente considerando que en un estudio de variación genética comparativo realizado entre cisticercos procedentes de cerdos infectados de México central y de Madagascar se encontraron polimorfismos a través de RAPDS (Vega et al., 2003).

Con respecto al género, si bien no se han reportado diferencias en la prevalencia de NC entre los sexos (Sotelo et al., 1985), se han documentado diferencias entre las formas clínicas asociadas al sexo. Las mujeres desarrollan en general una inflamación más grave, y la forma encefálica (múltiples parásitos coloidales localizados en el parénquima) es una presentación casi exclusiva de las mujeres jóvenes y de los niños (Rangel et al., 1987; Del Brutto et al., 1988(b); Fleury et al., 2004). Se ha reportado también que, independientemente de la localización del parásito, la reacción inflamatoria es más frecuente e intensa en mujeres (Fleury et al., 2004). En este sentido, también en otras patologías como las respiratorias se ha reportado mayor capacidad inflamatoria y de reclutamiento celular en mujeres que en hombres (Casimir et al., 2013).

2.2 Heterogeneidad en la cisticercosis experimental

Es sabido que el fondo genético del hospedero es relevante para la susceptibilidad tanto a enfermedades infecciosas como no-infecciosas; este hecho se ha

demostrado también en ratones, donde la susceptibilidad y la resistencia se relacionan con el fondo genético.

En relación con la cisticercosis experimental causada por *Taenia crassiceps*, el modelo murino es uno de los más utilizados para estudios inmunológicos y endocrinológicos de esta parasitosis. En la Tabla 1 se indican de forma sucinta las características de las cepas más frecuentemente utilizadas.

Tabla 1. Características de las cepas murinas utilizadas en la cisticercosis experimental.

Referencias	Cepa	Características
Fux et al., 2003	BALB/c	Resistencia a la infección por <i>Toxoplasma</i>
Roggero et al., 2002	BALB/c	Resistencia a la infección por <i>Trypanosoma cruzi</i>
Ciaranello et al., 1974	BALB/cJ	Cambios en los niveles de enzimas para la síntesis de catecolaminas
Pollarf et al., 1982	BALB/cJ	Incremento en los niveles de α -fetoproteína
Shi et al., 1989	BALB/cJ	Reducción en el número de copias del gen Mup-1.5
Fragoso et al., 1998	BALB/cJ	Restringida a la infección por <i>Taenia crassiceps</i>
Potter & Wax, 1981	BALB/cAnN	Alta susceptibilidad al desarrollo de plasmocitomas
Mellor et al., 1985	BALB/cAnN	Pérdida de expresión de la proteína Qa-2
Larralde et al., 1995	BALB/cAnN	Feminización en machos inducida por la infección de <i>Taenia crassiceps</i>
Aldridge et al., 2007		
Sacks & Noben-Trauth, 2002	C57BL/6J	Resistente a infección por <i>Leishmania major</i>
Le Goff et al., 2002	C57BL/6J	Resistente a la infección por <i>Litomosoides sigmodontis</i>

Estudios experimentales realizados en condiciones controladas con el helminto *Taenia crassiceps* en ratones (cisticercosis intraperitoneal) han revelado la complejidad de la interacción entre los sistemas inmunológico y endocrinológico del hospedero y del parásito en la regulación de la infección (Morales-Montor et al., 2001; Morales-Montor et al., 2002). Se demostraron diferencias en la susceptibilidad asociadas con el sexo en este modelo murino, presentando las

hembras mayor cantidad de parásitos que los machos durante las etapas tempranas de la infección (Sciutto et al., 1991). La diferencia se ha explicado por los niveles de estrógeno, que normalmente son más altos en hembras que en machos y que favorecen el crecimiento del parásito (Morales-Montor et al., 2002). Los estrógenos parecen tener acción directa sobre el parásito, favoreciendo su reproducción, además de promover una respuesta Th2 más permisiva para el establecimiento de la parasitosis (Terrazas et al., 1994; Morales-Montor et al., 2004; Morales-Montor et al., 2005; Vargas-Villavicencio et al., 2005). Se reportó en ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos e infectados con *T. crassiceps* que la reproducción parasitaria se favorece por timectomía y orquiectomía, mientras que se restringe por ovariectomía. Además, con experimentos de reconstitución hormonal se observó que el 17- β estradiol incrementa la carga parasitaria. Lo anterior indica un posible efecto depresor de la inmunidad asociado con los estrógenos (Terrazas et al., 1994).

Además, es importante enfatizar que existen diferencias en la permisividad al crecimiento de *T. crassiceps* en distintas cepas de ratones; en este caso, los ratones BALB/cAnN y A/J son más permisivos, mientras que los C57BL/6J son relativamente más restrictivos, pudiendo presentarse una diferencia de hasta 10 veces en el número de parásitos recuperados del peritoneo después de 30 días de infección (Ramírez-Aquino et al., 2011).

En otras cisticercosis, como la causada por *Taenia taeniaformis*, se han reportado también alteraciones en la reproducción de las ratas como consecuencia de alteraciones en los niveles de los esteroides sexuales (Lin et al., 1990).

En relación con la progesterona, evidencias recabadas en este mismo modelo sugieren que está involucrada en la neuroprotección (Vargas-Villavicencio et al., 2005; Vargas-Villavicencio et al., 2006). La interacción inmuno-endócrina parece presentar características particulares según el binomio hospedero-parásito. Así, en otras parasitosis como en la infección por *Chlamydia trachomatis* los estrógenos parecen ser protectores, mientras que la progesterona aumenta la susceptibilidad a la infección (Kaushic et al., 2000).

A continuación se resumen las publicaciones previas sobre cisticercosis experimental (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios de la respuesta inmunológica y susceptibilidad en cisticercosis experimental.

Referencia	Respuesta inmunológica
Sciutto et al., 1991	En cepas consanguíneas de ratones BALB infectados con <i>Taenia crassiceps</i> se encontró diferente susceptibilidad a la infección dependiendo de la cepa. Así, los ratones congénicos BALB/c ($H-2^d$) fueron los más susceptibles, mientras que los BALB/k ($H-2^k$) y BALB/b ($H-2^b$) fueron comparativamente resistentes. Los genes no-H-2 causan una pequeña pero significativa diferencia en la carga parasitaria. Las cepas con alelos recombinantes (KK, Ik, Sd, Dd) también fueron más susceptibles; esto indica que las regiones S y D del complejo $H-2^d$ probablemente están involucrados en el control de la resistencia en la cisticercosis murina. Globalmente, las hembras de todas las cepas fueron más susceptibles que los machos.

-
- Terrazas et al., 1994 En ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos infectados con *T. crassiceps* se observó que la reproducción parasitaria se favorece por timectomía u orquiectomía y se restringe por ovariectomía. Los experimentos de reconstitución hormonal demostraron que el 17- β estradiol incrementa el número de parásitos, mientras que la 5- α dehidrotestosterona es inefectiva. Se observó un posible efecto depresor de la inmunidad asociada a los estrógenos.
- Morales-Montor et al., 2001 La infección por *T. crassiceps* resulta en feminización (aumento de niveles séricos de estradiol y disminución de testosterona y dehidrotestosterona) de ratones machos durante la infección crónica. Al mismo tiempo, se incrementan los niveles de hormona foliculoestimulante y de IL-6. En ratones machos BALB/cAnN, híbridos C57BL/6 x SV129 F₁ e IL-6^{-/-} (C57BL/6 x SV129) se realizaron dos modalidades de depleción de la respuesta inmune: radiación a cuerpo entero y timectomía neonatal, y en ningún caso hubo “feminización”, pero los niveles de hormona foliculoestimulante e IL-6 estaban inhibidos.
- Cuando se restituyó la IL-6 en las tres cepas de ratones utilizadas, se restauró el proceso de feminización.
- Morales-Montor et al., 2002 En ratones BALB/c la administración de fradrozol (un inhibidor de aromatasa) suprime la producción de 17- β estradiol en machos y hembras y se acompaña de una reducción de 70% en la carga parasitaria y normalizó los niveles de IL-6.
- Morales-Montor et al., 2002 En ratones BALB/cAnN de ambos sexos, se demostró que tanto la castración como el tratamiento con testosterona o
-

dehidrotestosterona antes de la infección con *T. crassiceps* disminuye la carga parasitaria en 50 y 70%, respectivamente, mientras que el tratamiento con 17- β estradiol la incrementa hasta 3 veces en ambos sexos comparados con controles. Además, la proliferación específica de esplenocitos y la producción de IL-2 e IFN- γ estuvieron disminuidas en ambos grupos. Lo anterior sugiere un papel protector de los andrógenos, probablemente a través de la estimulación de la inmunidad celular.

Vargas-Villavicencio
et al., 2005

En ratones BALB/cAnN se demostró que el tratamiento con progesterona incrementa la carga parasitaria (*T. crassiceps*) 2 veces en hembras y 3 veces en machos, comparados con controles. La expresión de citocinas Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) se incrementó en ratones infectados de ambos sexos, y el tratamiento con progesterona los redujo a niveles basales. Las citocinas Th1 no se afectaron por la infección pero sí por el tratamiento con progesterona, que incrementó 2 veces la expresión de citocinas Th1 comparada con ratones no infectados, infectados y con ratones tratados con placebo. La infección indujo la expresión de las isoformas A y B del receptor de progesterona en esplenocitos de ratones infectados de ambos sexos. El metabolismo de progesterona a estradiol se demostró por el uso de tamoxifeno, que redujo la carga parasitaria en el 100% de los ratones infectados y tratados con progesterona.

Ramírez-Aquino
et al., 2011

Se realizó un estudio para abordaje genético utilizando el modelo de cisticercosis intraperitoneal murina. Los ratones A/J fueron

permissivos, mientras que los C57BL/6J fueron restrictivos con una diferencia de 10 veces en el número de cisticercos peritoneales recuperados después de 30 días de infección. Los hallazgos de este estudio identificaron al gene C5 del complemento como un posible candidato asociado a la permisividad a la instalación y l crecimiento del cisticerco.

3. Respuesta inflamatoria en NC inducida por la inmunidad

3.1 Respuesta inmune Th1/Th2

El fenotipo de una célula T polarizada diferenciada a partir de precursores indiferenciados (naive) se determina por una compleja interacción entre células presentadoras de antígeno y las células T naive e involucra múltiples factores, incluyendo el microambiente de citocinas dominante, la presencia de moléculas coestimuladoras y una plétora de cascadas de señalización (Figura 4) (Golsby et al., 2006).

Una vez activadas, las células Th comienzan a dividirse y dan lugar a una clona de células efectoras, cada una específica para antígenos de clase MHC I durante la activación de la célula original. Los linfocitos T CD4+ pueden polarizarse a distintos grupos de células Th efectoras. De acuerdo con el fenotipo de citocinas secretadas, entre los grupos más estudiados se encuentran las Th1, Th2 y Th17. Las células Th1 secretan citocinas tales como IFN y TNF, lo que las hace particularmente efectivas en la protección contra infecciones intracelulares por virus, bacterias y otros microorganismos capaces de crecer dentro de los macrófagos; también es determinante en la eliminación de células cancerosas (Kaiko et al., 2008).

Las células Th2 secretan citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que participan en la diferenciación de células B a células plasmáticas para la producción de anticuerpos neutralizantes, así como anticuerpos de clase IgE, relevantes en infecciones por parásitos extracelulares (Golsby et al., 2006; Kaiko et al., 2008). Por otro lado, se ha observado que la IL-4 en conjunto con la IL-13 es capaz de llevar a los macrófagos hacia un estado de activación alternativa.

Las células Th17 se describieron recientemente como una tercera subpoblación de células T cooperadoras, lo cual ha proporcionado nuevos conocimientos sobre los mecanismos relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, así como con la respuesta inmune del hospedero contra la flora microbiana. En este contexto se han descrito efectos tanto protectores como perjudiciales de dicha respuesta durante procesos infecciosos (bacterias de crecimiento extracelular, hongos), particularmente durante las infecciones de la mucosa intestinal en ratones deficientes de IL-17 (Freitas et al., 2009; Miyamoto et al., 2003; Ye et al., 2001).

Asimismo ha cobrado relevancia otro grupo de células T, que pueden actuar directamente sobre las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, inhibiendo a las células dendríticas) o bien indirectamente a través de la secreción de moléculas inhibitorias como las citocinas IL-10 y TGF- β , que modulan la actividad de las células T cooperadoras y suprimen muchas de sus funciones, induciendo tolerancia a antígenos (Kaiko et al., 2008). Otro mecanismo a través del cual las células Tregs actúan es la inducción de muerte celular de las células Th efectoras por supresión de IL-2 o de triptófano.

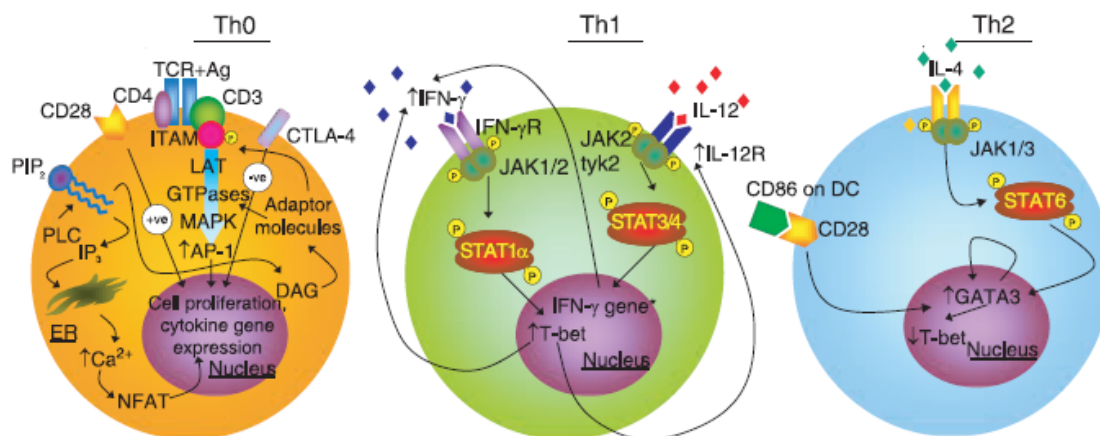


Figura 3. Factores de polarización de células T.

Los receptores de las células T (TCR) en las células naíve (Th0) se unen al antígeno presentado por células presentadoras de antígenos. Esto lleva a la fosforilación de tirosina del receptor inmunológico de tirosina basado en la activación de motivos (ITAMs). Ello induce la liberación de moléculas adaptadoras que resultan en la activación secuencial de las GTPasas, las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el activador de proteína-1 (AP-1), que induce la proliferación de células T (a). En la activación de la actividad, la fosfolipasa C es inducida, rompiendo al fosfatidil inositol bifosfato asociado a membrana (PIP₂) en los segundos mensajeros: fosfatidil inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ induce la liberación de calcio, que resulta en la expresión de citocinas, y el DAG estimula a la proteína cinasa C, que causa activación de las células T vía MAPKs. El tipo de citocinas expresadas es el factor de influencia más importante sobre el fenotipo de desarrollo de células T. Las citocinas se unen a sus receptores en células Th0, activan a la cinasa Janus y las vías de transductores y activadores de la transcripción (JAK-STAT). Las diferentes combinaciones de moléculas JAK y STAT se generan en respuesta a diferentes citocinas e inducen diferentes cascadas de señalización, que conducen al desarrollo de fenotipos específicos de células T. El interferón y la IL-12 inducen JAK1/2, STAT1/3/4 para estimular el factor de transcripción T-beta y la producción de IFN, resultando en una respuesta Th1, mientras que la IL-4 provoca JAK1/3 y STAT6 para activar el factor de transcripción GATA-3, lo que genera una respuesta Th2.

En relación con la cisticercosis, se ha demostrado en el modelo murino de cisticercosis intraperitoneal (*T. crassiceps*) la existencia de una respuesta inmune Th1 temprana, restrictiva del crecimiento parasitario, que cambia hacia una

respuesta Th2 más permisiva en la etapa crónica de la parasitosis (Peón et al., 2013; Terrazas et al., 1999). Este cambio se ha asociado con la presencia de macrófagos alternativamente activados o macrófagos tipo 2 (M2) (Rodríguez-Sosa et al., 2002; Terrazas et al., 2005). Estas observaciones son difícilmente extrapolables a lo que ocurre en la NC, dadas las características particulares del fenómeno inflamatorio en el sistema nervioso central (Trakhtenberg & Golberg, 2011). Con el propósito de favorecer el entendimiento de la relación hospedero-parásito en el compartimento del SNC, se han empleado también infecciones experimentales controladas con *Taenia crassiceps* en ratones. Los resultados indican que la cepa de ratones C57BL/6J tiene la capacidad de destruir tempranamente al parásito, mientras que en la cepa BALB/c la destrucción es más tardía, a pesar de que la reacción inflamatoria es más intensa (Matos-Silva et al., 2012). Estas evidencias permiten sostener que la inflamación local podría tener un papel dual, controlando el establecimiento de nuevos parásitos y a la vez permitiendo o incluso favoreciendo el desarrollo de los parásitos ya instalados. En este último punto, es importante mencionar que hemos encontrado que el TGF- β , citocina abundante en el SNC, podría promover el crecimiento parasitario tanto *in vitro* como *in vivo* (Adalid-Peralta, enviado a publicación). Esto señala la necesidad de caracterizar el fenómeno inflamatorio que acompaña la parasitosis y que pudiera controlar o promover su desarrollo según el tipo de inflamación inducida (Matos-Silva et al., 2012; Meneses et al., 2009).

La cisticercosis porcina afecta primordialmente el sistema musculoesquelético y el SNC. Se ha demostrado en diferentes estudios que las características histológicas de la respuesta inflamatoria son muy similares a las

observadas en la NC humana, con un infiltrado inflamatorio de células mononucleares, eosinófilos, linfocitos B y monocitos/macrófagos en los granulomas que circundan al parásito. Se ha observado también sobreexpresión de CD44; esta glicoproteína está involucrada en las interacciones célula-célula en monocitos/macrófagos, eosinófilos y en astrocitos del sistema nervioso central (SNC) (Londoño et al., 2002; Álvarez et al., 2002). Finalmente, en otros estudios se ha demostrado que la NC en cerdos se asocia con una lesión grave del tejido nervioso, comparable a las observadas en humanos (Sikasunge et al., 2009).

En los humanos, los fenómenos inflamatorios inducidos por inmunidad y asociados con la NC se han descrito en diversos estudios histopatológicos (inflamación que circunda al parásito) (Restrepo et al., 1998; Restrepo et al., 2001; Álvarez et al., 2002) y en el LCR y la sangre (Ostrosky-Zeichner et al., 1996; Bueno et al., 1999; Rodríguez et al., 2000; Chavarría et al., 2003; Bueno et al., 2004; Evans et al., 1998; Chavarría et al., 2005; Chavarría et al., 2006; Sáenz et al., 2012; Adalid-Peralta et al., 2012). En estudios de autopsias se han encontrado diferentes citocinas proinflamatorias (IFN, IL-6 e IL-18), citocinas asociadas a la respuesta Th2 (IL-4, IL-13) y citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β) en el tejido cerebral adyacente al parásito (Restrepo et al., 1998; Restrepo et al., 2001). Además, se han encontrado macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas en la reacción inflamatoria local alrededor del parásito (Álvarez et al., 2002).

En el LCR se encontró un incremento de las citocinas IL-5 e IL-6 en pacientes sintomáticos (Ostrosky-Zeichner et al., 1996; Evans et al., 1998; Rodríguez et al., 2000; Chavarría et al., 2005; Aguilar Rebolledo et al., 2001).

En estudios adicionales realizados en pacientes con parásitos localizados en el espacio SAB (la forma de la infección más grave, y fuente de complicaciones potencialmente fatales) se han encontrado aumentados los niveles de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α (Ostrosky-Zeichner et al., 1996; Aguilar Rebolledo et al., 2001). Los pacientes con NC SAB presentan también altos niveles de IL-10, así como de TGF- β , citocinas inmunorreguladoras que podrían participar en el control de la extensión del fenómeno neuroinflamatorio en la NC (Rodríguez et al., 2000; Chavarría et al., 2005; Adalid et al., 2012).

En dos estudios se observó a nivel sistémico (sangre) que los pacientes asintomáticos con parásitos calcificados presentaban un perfil de citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), mientras que los pacientes sintomáticos presentan niveles aumentados de TNF α , que se correlacionan con la depresión en la capacidad proliferativa específica (Chavarría et al., 2003; Chavarría et al., 2006; Sáenz et al., 2012).

A continuación se describen las principales observaciones sobre la respuesta inmunológica Th1/Th2 en la NC humana (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios de respuesta inmunológica Th1/Th2 en NC humana.

Referencias	Respuesta inmunológica
Ostrosky-Zeichner et al., 1996	En pacientes con NC SAB se observó un incremento en los valores de IgG, IgM e IgE, así como de IL-1 β e IL-6, mientras que los valores de IgA, TNF- α e IFN- γ fueron similares a los controles.
Restrepo et al., 1998	En especímenes cerebrales de pacientes con NC se observaron al menos cuatro formas de respuesta inmunológica: 1) Respuesta de anticuerpos,

-
- células plasmáticas IgM+; 2) Respuesta de células NK; 3) Infiltrado abundante de macrófagos y granulocitos; 4) Intenso infiltrado con predominio de macrófagos y células T. La intensidad y el tipo de inmunidad se relacionaron de algún modo con la viabilidad y localización de los parásitos. En muchas lesiones la respuesta inmune fue proinflamatoria, con predominio de IL-12, mientras que los niveles de IL-4 fueron indetectables.
- Evans et al., 1998 En pacientes con NC sintomática, se observó en el suero un incremento de eotaxina e IL-5 pero no de IL-8, mientras que en el LCR también hubo incrementos de IL-5 e IL-6.
- Bueno et al., 1999 Se realizó mediante citometría de flujo el análisis de siete pacientes con NC y tres pacientes con otras enfermedades. Los pacientes con NC mostraron un alto porcentaje de CD69 en el LCR, así como un porcentaje mayor de células CD45+CD19+ en el LCR y la sangre periférica.
- Rodríguez et al., 2000 Se evaluó la correlación de los niveles de citocinas en el LCR en pacientes con NC y la gravedad de la enfermedad. Los pacientes con NC inflamatoria mostraron altos niveles de IL-5 e IL-10 comparados con los no-inflamatorios.
- Aguilar-Rebolledo et al., 2000 En pacientes pediátricos con NC se determinaron los niveles de diversas citocinas. Todos los pacientes con NC activa mostraron altos niveles de TNF- α , mientras que los niveles de IL-6 fueron en general bajos, tanto en formas activas como inactivas. Sólo dos pacientes con NC SAB activa mostraron altos niveles de IL-6. No se detectaron niveles de IL-5 e IL-12.
- Restrepo et al., 2001 Se estudió mediante análisis histológico e inmunohistoquímico la respuesta inmune en granulomas rodeando a metacístodos de *T. solium*
-

- en ocho especímenes obtenidos por craniotomía. En todos los especímenes el granuloma maduro se asoció con fibrosis, angiogénesis e infiltrado inflamatorio. Los tipos celulares más abundantes fueron células plasmáticas, linfocitos B y T, macrófagos y células mastoides. Las citocinas más prevalentes fueron IFN- γ , IL-18 e inmunosupresoras como TGF- β . También estuvieron presentes citocinas Th2: IL-4, IL-13 e IL-10.
- Medina-Escutia et al., 2001 Se estudiaron pacientes con NC activa que no habían recibido tratamiento cestocida ni corticosteroides. Todos los pacientes que mostraron parásitos únicos y más de la mitad de aquellos que mostraron lesiones múltiples (58%) produjeron ARNm de IL-2, mientras que los pacientes con lesiones múltiples produjeron ARNm de IL-10. En los pacientes con NC activa no inflamatoria no se observaron datos inmunosupresión sistémica.
- Álvarez et al., 2002 Se realizó un análisis histológico e inmunohistoquímico en cinco especímenes cerebrales de pacientes con NC. Se observó actividad proinflamatoria reflejada por permeabilidad de la barrera hematoencefálica, secreción de citocinas proinflamatorias y sobreexpresión de moléculas asociadas a la presentación antigénica. También se observaron citocinas antiinflamatorias y activación de angiogénesis con depósitos de colágeno y formación de cicatriz glial.
- Chavarría et al., 2003 Se analizaron los factores inmunológicos subyacentes al pleomorfismo en NC. Los pacientes con NC se asociaron con una respuesta Th2 (IgG4, IL-4, IL-5, IL-13). Los sujetos procedentes de zonas endémicas pero sin evidencia de NC también mostraron incremento de IgG1, IgG2, IgG4 e IgE, sugiriendo previa exposición a *T. solium*.
- Bueno et al., 2004 Se estudió la respuesta inmune celular en fases inflamatorias y no

inflamatorias de la NC. El LCR de formas inflamatorias mostró un alto porcentaje de HCAM, ICAM y otras moléculas de asociación con respecto al grupo control. En la fase inflamatoria predominaron en el LCR células CD8+ con respecto a fases no-inflamatorias. La producción de citocinas usando antígeno de *T. solium* mostró diferencias entre los pacientes con formas inflamatorias de NC (producción de IL-4/IL-12/TNF- α /ICAM/VCAM) y formas no-inflamatorias (producción de IL-6/IL-10/IL-12/TNF- α /ICAM/VCAM). La respuesta inmunológica en formas inflamatorias fue asociada con Th1.

Chavarría et al., 2005 Se analizó el perfil inmuno-inflamatorio subyacente a la NC. Los casos graves se relacionaron con un incremento de la celularidad en el LCR, así como un incremento de los niveles de subclases de IgG, IL-6, IL-5, IL-10, proteínas y eosinófilos. En mujeres se observó un incremento de IL-6, IL-5 e IL-10.

Chavarría et al., 2006 En este estudio se describió la respuesta inmune periférica de las diferentes formas de NC en población adulta de ambos sexos. Los casos asintomáticos con cisticercos únicos calcificados en el parénquima o SAB mostraron una respuesta predominante Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) con altos niveles de IL-12 en los sobrenadantes de células mononucleares periféricas estimuladas con extracto vesicular total. Los pacientes sintomáticos mostraron depresión de la respuesta inmune específica e incremento de los niveles de las subclases de IgG.

Sáenz et al., 2012 Se estudiaron las características inmuno-inflamatorias locales y periféricas. Los casos de NC con gravedad clínica y radiológica mostraron un incremento de pleocitosis en el LCR. La depresión en la proliferación

periférica se correlacionó negativamente con la pleocitosis y los niveles de TNF- α , mientras que mostraron correlación positiva con los niveles de IL-5 en el sobrenadante.

Adalid-Peralta et al., 2012 Se analizó la frecuencia de células Tregs y su relación con la respuesta proliferativa en pacientes con NC grave y controles. Se observó un incremento significativo de Tregs (CD4⁺CD25^{high}), CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, CD4⁺CD25^{high}CTLA4⁺ y CD4⁺CD25^{high}IL10⁺, así como disminución de células T activadas CD38⁺ y CD69⁺ en pacientes con NC grave en comparación con controles. Se observó una correlación positiva entre los niveles de Tregs locales y periféricos en la NC.

3.2 Respuesta Th17

Las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (Dong, 2008) y la expresión de los receptores de IL-23, IL-23R, CD161 y del CCR6, así como la expresión del factor transcripcional RORC (Kleinscheck et al., 2009; Dong et al., 2008; Cosmi et al., 2008). En este proceso, el TGF- β y la IL-6 son indispensables para la diferenciación Th17, mientras que la expansión y el mantenimiento dependen de la IL-23, producida por células presentadoras de antígeno después de la activación mediante TLR-2 y TLR-4, así como el reforzamiento por otros mediadores tales como PGE2 (Zúñiga et al., 2013).

Por otro lado, se ha observado que tanto las células Th1 como las Th17 son capaces de modular la inmunidad innata. En un estudio se evaluó la importancia funcional de las principales subclases de células T asociadas a la modulación de la respuesta inmune innata en abscesos cerebrales (Holley & Kielian, 2012). Para

este fin, se indujo la formación de abscesos cerebrales en ratones knockout (KO) TCR $\alpha\beta$, los cuales presentaron una marcada incapacidad para el aclaramiento bacteriano en las etapas tardías del absceso cerebral, alteración del reclutamiento de macrófagos y neutrófilos, así como en la expresión de citocinas y quimiocinas. Cuando se realizó una transferencia adoptiva de células tanto Th1 como Th17 en estos ratones KO, se restableció el aclaramiento bacteriano y los infiltrados de células inflamatorias observados en los ratones silvestres. Se observó también que las células Th17 adoptivas transferidas en SNC mostraron plasticidad (cambio a otro fenotipo) y capacidad de inducir secreción de diferentes perfiles de citocinas en macrófagos y en la microglía (Holley & Kielian, 2012). Otros estudios también sugieren la relevancia de las células Th1/Th17 en la inmunidad adaptativa (Ross et al., 2013).

En otras infecciones se ha demostrado que el inflamosoma es capaz de modular las respuestas Th1 y T17, controlando la respuesta inmune adaptativa (van de Veerdonk et al., 2011; Lin et al., 2009).

Relación recíproca entre las células Th17 y Tregs

Como se comentó anteriormente, la generación de células Th17 requiere la presencia de TGF- β ; éste también es requerido para la inducción de Foxp3, factor relacionado con la generación de Tregs. Por otro lado, la presencia de citocinas proinflamatorias como IL-6 producida durante procesos infecciosos inhibe la inducción de células Tregs Foxp3, promoviendo la diferenciación de células Th17 (Barbi et al., 2013) (Figura 3).

Es posible que exista una relación recíproca entre la acción proinflamatoria que induce la respuesta Th17 y la protección inducida por Tregs Foxp3, dado que al nivel molecular los factores de transcripción RORC y Foxp3 pueden unirse entre sí e inhibir sus funciones recíprocamente (Barbi et al., 2013). La IL-2, que participa en la diferenciación y el mantenimiento de las Tregs, inhibe la diferenciación Th17, mientras que la IL-21, que promueve la diferenciación hacia el fenotipo Th17, inhibe la expansión de las Tregs (Bucher et al., 2009). El metabolito de la vitamina A o el ácido retinoico promueven la diferenciación de las células Tregs e inhiben la diferenciación de las células Th17. El receptor aril hidrocarburo (AHR) que se expresa tanto en las Tregs como en las células Th17 puede tener efectos opuestos en la diferenciación de estas células en función del ligando (Singh et al., 2011).

Infecciones parasitarias y respuesta Th17

Los parásitos tienen la capacidad de regular la respuesta inmune del hospedero para su beneficio. En este contexto, exhiben diferentes formas de evadir la respuesta inmune para asegurar su supervivencia: interferencia con el procesamiento antigénico, modulación de las células presentadoras de antígenos e inducción de antiinflamación (Maizels & Yasdanbakhsh, 2003). Así, se ha reportado que diferentes parásitos tienen la capacidad promover la diferenciación de los linfocitos hacia células Th2 y Tregs, además de la liberación de antígenos de secreción en la sangre de los hospederos infectados, eventos que favorecen el control de la inflamación y el desarrollo de los parásitos.

Los pacientes con infecciones por helmintos tales como esquistosomas o filarias muestran una respuesta inmune deficiente hacia los antígenos de los parásitos infectantes. Durante el proceso infeccioso, los helmintos inducen una respuesta predominantemente Th2 con secreción de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales bloquean la respuesta Th1. Es posible que este efecto inmunomodulador radique en la polarización de la respuesta inmune Th1 a Th2, por un lado, y por el otro en la “sobre-regulación” por los antígenos de secreción parasitarios sobre las citocinas inflamatorias IL-23 e IL-17 (Jiang et al., 2006; Meteneou et al., 2011). Adicionalmente, las Tregs se encuentran también asociadas con un efecto antiinflamatorio dado su efecto supresor de la respuesta Th1, Th2 y Th17.

En relación con la infección por parásitos tales como los protozoarios, en un modelo murino de infección por *Trypanosoma congolense* se observó que la infección induce altos niveles séricos de IL-17 y mayor producción de IL-17 por células hepáticas y esplénicas en los ratones BALB/c (altamente susceptibles a la infección) con respecto a ratones de la cepa C57BL6 (relativamente resistentes). De igual forma, la administración de anticuerpos monoclonales anti-IL-17 se asoció con una mayor parasitemia (Mou et al., 2010). En este contexto, la IL-17 puede asociarse con una inflamación excesiva y tener un papel crítico en el desarrollo del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (Mou et al., 2010). En ratones BALB/c infectados con *Trypanosoma cruzi* se detectaron cantidades significativas de células CD4, CD8 y NK productoras de IL-17. *In vivo*, los ratones tratados con anticuerpos anti-IL-17 mostraron mayores datos de gravedad de la enfermedad, como incremento de miocarditis y mortalidad prematura; la

parasitemia sistémica no cambió, pero disminuyó la carga parasitaria en el tejido cardiaco (da Matta Guedes et al., 2010).

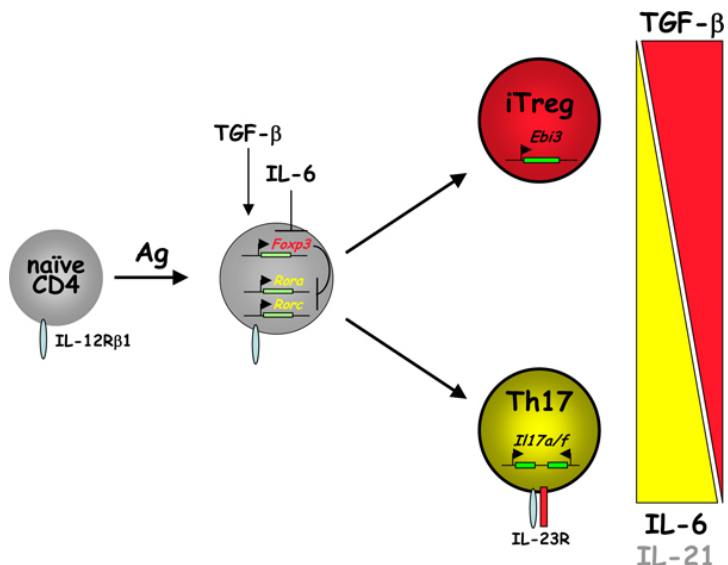
Otros autores reportaron que los ratones deficientes en IL-17A (IL-17A^{-/-}) infectados con *T. cruzi* presentaban menor supervivencia y mayor parasitemia comparada con los controles (Miyazaki et al., 2010).

Por otro lado, en relación con un modelo murino de toxoplasmosis, se demostró en ratones IL17 R^{-/-} que la inducción temprana de neutrófilos es dependiente de la señalización IL-17, siendo estos ratones más susceptibles a *Toxoplasma gondii* que los ratones silvestres (Kelly et al., 2005).

En humanos con infecciones parasitarias aún no se ha dilucidado totalmente el papel de las células Th17 e IL-17; sin embargo, existen algunos indicios sobre su probable importancia. Por ejemplo, en pacientes con enfermedad de Chagas se observó baja expresión de IL-17; es decir, aquellos pacientes con mejor función cardiaca presentaron altos niveles de IL-17, sugiriendo que la expresión de IL-17 puede ser un factor protector para prevenir el daño al miocardio (Magalhães et al., 2013). En niños infectados con *Schistosoma haematobium* que mostraban patología urinaria se encontró un porcentaje significativamente mayor de células Th17 y mayor relación Th17/Treg que en aquellos infectados por esquistosomas pero sin patología urinaria (Mbow et al., 2013).

Además de lo anteriormente mencionado, es importante tener presente que las células T en general presentan una notable plasticidad en los programas de diferenciación hacia células T efectoras (Sundrud et al., 2003), e incluso se ha observado *in vivo* en ratones con el gen Pax5 deletado que aun las células B maduras son capaces de desdiferenciarse hacia células T (Cobaleda et al., 2007).

Estas observaciones remarcan la complejidad de la respuesta inmune y los múltiples factores que en ella influyen.



F1000 Biol Rep. 2009 Jan 21;1:5. doi: 10.3410/B1-5

Figura 4. El desarrollo recíproco de Tregs y Th17 se relaciona con el balance de factores transcripcionales.

El desarrollo recíproco de Th17 y las células T reguladoras (Treg) se efectúa mediante un equilibrio de los factores transcripcionales: Foxp3 y ROR. Inicialmente, las células T CD4 naïve son activadas por antígeno (Ag) en presencia de TGF-β, induciendo la coexpresión de los factores de transcripción Foxp3, RORα y RORγt en precursores tempranos predestinados para la diferenciación hacia Tregs o Th17. Foxp3 se une a los factores α y γt de ROR a través de un motivo en el exón 2, reprimiendo así su actividad transcripcional. En presencia de niveles sostenidos de TGF-β o IL-6, la expresión de Foxp3 y su actividad represiva se incrementan o reprimen, respectivamente, lo que permite la divergencia de las vías para Tregs y Th17.

4. Planteamiento del problema

La NC continúa siendo una parasitosis endémica en nuestro país. A pesar de los grandes adelantos de las últimas décadas en relación con el tratamiento de la NC, hoy en día la morbi-mortalidad atribuible a esta parasitosis es elevada. En particular, cabe destacar la posible resistencia al tratamiento, demostrada en casos clínicos con múltiples parásitos localizados en el espacio SAB o V, en los cuales el tratamiento disponible puede ser insuficiente. Las causas de esta variabilidad no se han dilucidado aún, aunque se ha mostrado que la localización de los parásitos está críticamente involucrada en ella.

La intensidad del fenómeno inflamatorio ha mostrado ser uno de los factores más relevantes implicados en la severidad clínica-radiológica de la enfermedad. El estudio del perfil de expresión génica en las CMSP se justifica considerando la relación existente entre las respuestas inmuno-inflamatorias centrales y las periféricas. En el caso particular de la NC, hemos observado diversas evidencias que sustentan esta relación: los niveles locales (SNC) y periféricos (sangre) de antígeno del cisticerco (HP10) se correlacionan positivamente (Fleury et al., 2007). Existe también una significativa correlación entre los porcentajes de Tregs centrales y periféricos (Adalid Peralta et al., 2012). De igual forma, se han reportado correlaciones negativas entre los niveles de IL-10, el porcentaje de Tregs en el LCR y el nivel de proliferación linfocitaria (Chavarría et al., 2006; Adalid Peralta et al., 2012), lo que indica una relación bidireccional en los sucesos inmunológicos que se desarrollan al nivel central y periférico.

Considerando las limitaciones actuales en el tratamiento de los casos más graves de la NC, así como la asociación de la severidad con el estado inmuno-inflamatorio de los pacientes y la ausencia de conocimiento de los factores componentes de la reacción inmuno-inflamatoria que podrían participar en la respuesta diferencial al tratamiento, decidimos en este proyecto ahondar en el estudio de la reacción inmuno-inflamatoria asociada al tratamiento de la NC SAB. La identificación de los factores inmuno-inflamatorios implicados en la respuesta al tratamiento cestocida-esteroide permitirá proponer tratamientos farmacológicos más eficaces y específicos para considerar el tratamiento de las formas graves y resistentes de NC.

5. Hipótesis

La respuesta al tratamiento cestocida-esteroideo se asocia con un perfil de citocinas periféricas (expresión génica y proteínas) particular.

6. Objetivos

- **Objetivo general**

Identificar el perfil de citocinas periférico (expresión génica y proteína) de pacientes con NC subaracnoidea asociado con la respuesta/no-respuesta al tratamiento cestocida-esteroideo.

- **Objetivos particulares**

1. Clasificar a los pacientes en dos fenotipos relacionados con la respuesta a tratamiento cestocida-esteroideo (respondedores vs. no-respondedores).
2. Evaluar la expresión génica de marcadores inflamatorios en células mononucleares de sangre periférica pre- y post-tratamiento cestocida-esteroideo mediante microarreglos de expresión.
3. Confirmar por ELISA el perfil inmuno-inflamatorio de citocinas asociado con la respuesta al tratamiento.
4. Evaluar las correlaciones entre los perfiles de expresión génica y de proteínas en la periferia (sangre) y la respuesta al tratamiento.
5. Proponer posibles mecanismos inmunológicos asociados con los casos que presenten no-respuesta al tratamiento.

7. Metodología

7.1 Descripción de los pacientes

Se incluyeron en este estudio dos grupos de pacientes, cada uno dividido en dos subgrupos con base en la respuesta o la falta de ésta al tratamiento cestocida-esteroide; todos ellos fueron atendidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el periodo de febrero de 2007 a diciembre de 2010.

Los 9 pacientes del primer grupo se incluyeron de forma prospectiva en el estudio de hibridación de microarreglos. Los 65 pacientes del segundo grupo se incluyeron de forma retrospectiva para consolidar la información generada por los microarreglos.

Las muestras se recolectaron en diferentes tiempos: antes del tratamiento (T0) y al final del tratamiento (T2). Las muestras T2 corresponden a aquellas tomadas entre 8 y 60 días posteriores al tratamiento.

Las células mononucleares se incubaron con extracto vesicular total de cisticercos durante 72 y 120 horas; se extrajo el ARN y se hibridizó en la plataforma de microarreglos Human Gene 1. Posteriormente se confirmaron mediante ELISA los perfiles de citocinas Th1, Th2 y Th17.

El diagnóstico de la NC se realizó con base en los criterios de Del Brutto (Del Brutto et al., 2001). Sólo se incluyeron aquellos con diagnóstico definitivo.

7.1.1 Clasificación de los pacientes

Los pacientes se clasificaron en función de criterios clínicos, radiológicos e inflamatorios de LCR como se presenta a continuación.

a) Clasificación clínica

A través del interrogatorio y de los hallazgos de la exploración física se establecieron dos grupos en relación con la severidad de la presentación clínica:

Grupo leve: aquellos pacientes que se encontraron asintomáticos o con síntomas clínicos diferentes a la hipertensión intracraneal (HIC).

Grupo grave: aquellos pacientes con HIC.

b) Clasificación radiológica

Mediante estudios de neuroimagen (resonancia magnética o tomografía computarizada) se obtuvo información acerca del número, la localización y el estadio de los parásitos, así como sobre la presencia de signos relacionados con la inflamación. Con base en esta información se clasificó a los pacientes de la manera siguiente:

Número de parásitos: único o múltiples.

Localización de los parásitos: parénquima o espacio subaracnoideo de los surcos vs. espacio SAB o V.

Intensidad de la reacción inflamatoria: endodermatitis, aracnoiditis.

Estadio de los parásitos: vivo (vesicular) o muerto (coloidal o calcificado).

c) Clasificación inflamatoria de LCR

En los casos en que el estado clínico del paciente requirió la realización de una punción lumbar, se recabaron los datos de celularidad, proteinorraquia y glucorraquia.

d) Clasificación en relación con la respuesta al tratamiento cestocida esteroide.

Respondedores: aquellos que presentaron una reducción $\geq 50\%$ en el tamaño o el número de parásitos.

No-respondedores: aquellos con reducción < 50% en el tamaño o el número de parásitos.

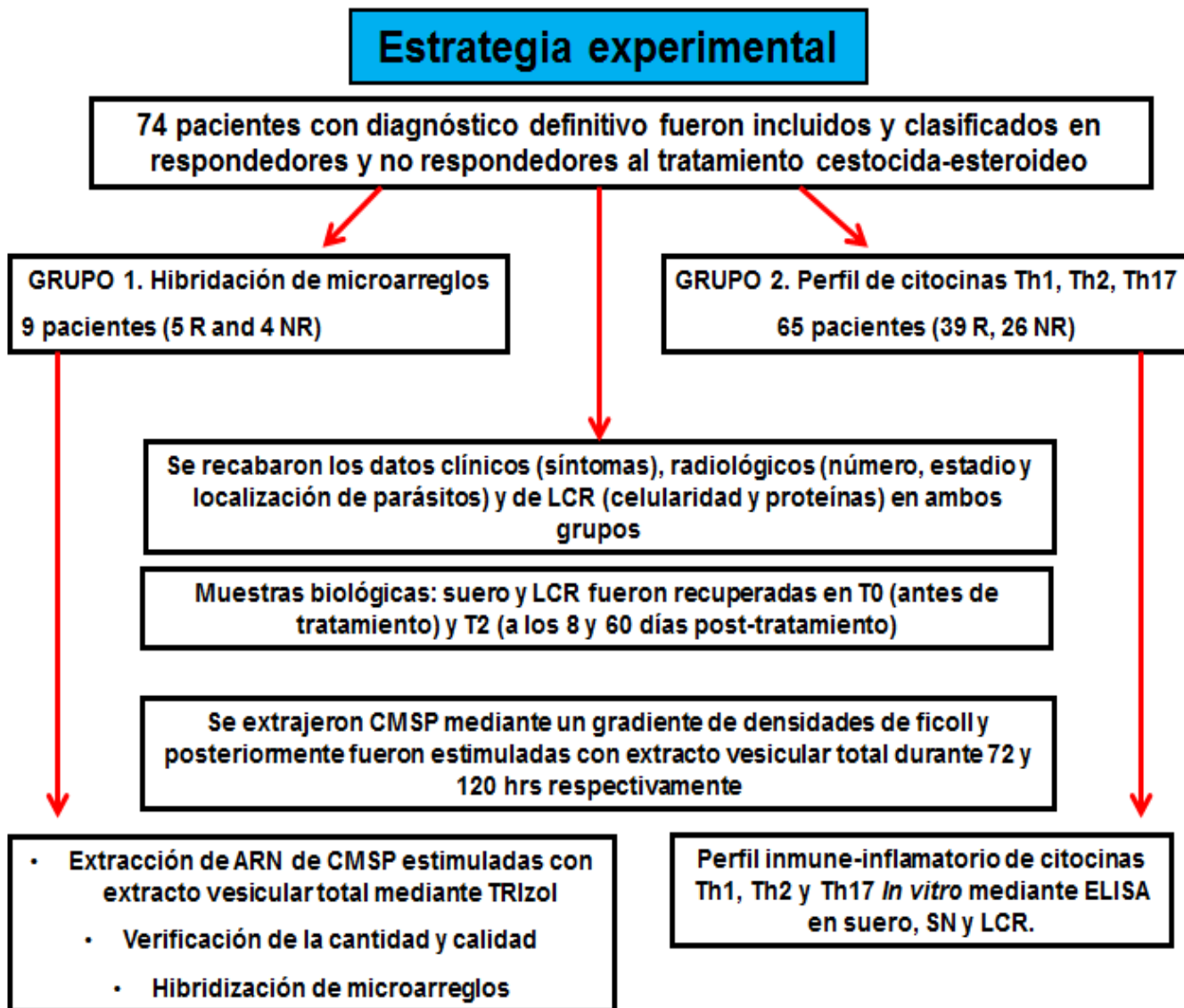
7.1.2 Criterios de inclusión y de exclusión

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 15 años con diagnóstico definitivo de NC de acuerdo con los criterios de Del Brutto et al., 2001.
- Sin tratamiento para la enfermedad en los 6 meses anteriores a la inclusión.
- Aceptación para participar en este estudio mediante la firma de una hoja de consentimiento informado (ver Anexo 1).
- No presentar otras enfermedades inflamatorias, tumorales o infecciosas.

Criterios de exclusión:

- Embarazo.
- No aceptación de consentimiento informado.



7.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica y estimulación con extracto vesicular total de *T. solium*

Se obtuvieron de 10 a 20 mL de sangre venosa periférica de los participantes en un tubo con EDTA. La sangre se diluyó 1:2 con medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Cat. 11875-093) y posteriormente se realizó un gradiente con Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ, USA). Las células mononucleares se obtuvieron después de 30 minutos de centrifugación a $400 \times g$ a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con RPMI y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero humano AB (donado del Banco de Sangre del Centro Médico Siglo XXI, México), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de piruvato (Gibco BRL). Las células mononucleares se estimularon con extracto vesicular total de cisticercos de *T. solium* (35 $\mu\text{g/pozo}$), y se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 en atmósfera humidificada en placas para cultivo de fondo plano de 24 pozos (Costar, Cambridge, Mass.) a una concentración de 2.5×10^6 células por 1000 μL de volumen final por pozo. Las células se recuperaron a las 72 y 120 horas después de la estimulación y se guardaron a -80°C en 1 mL de TRIzol (Life Technologies, cat. 15596-026).

7.3 Obtención de ácido ribonucleico (ARN) a partir de células mononucleares de sangre periférica

En la purificación del ARN de las CMSP se utilizó el método de TRIzol (Life Technologies, cat. 15596-026). Un promedio de 5×10^6 células mononucleares se lisaron con 1 mL de TRIzol; posteriormente se agregaron 200 μ L de cloroformo y se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugaron a $283.413 \times g$ durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se recuperó la parte superior del sobrenadante para depositarla en un tubo Eppendorff de 1.5 mL, al cual se le agregaron 10 μ L de glucógeno y 500 μ L de isopropanol, y se dejó la muestra en incubación toda la noche a -20°C . Luego se centrifugó a $377.325 \times g$ durante 10 min, se procedió a retirar el exceso de isopropanol y posteriormente el pellet se lavó con 1 mL de etanol al 70% a 1500 rpm durante 10 min. Al término se procedió a retirar el etanol y se dejó secar la muestra para posteriormente resuspenderla en 25 μ L de agua libre de ARNasas y ADNasas. Se guardaron 3 alícuotas a -70°C de cada muestra, incluyendo una de 4 μ L para cuantificación y análisis de la calidad del ARN.

La concentración del ARN se determinó por fluoroespectrometría (Nanodrop), y su calidad se verificó mediante electroferogramas (Agilent bioanalyzer) (Figuras 5 y 6).

7.4 Hibridación de los microarreglos de ADN

A partir del ARN recuperado se llevó a cabo la síntesis del ADNc mediante transcriptasa reversa (Superscript II, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ARNc se preparó e hibridó siguiendo las instrucciones del manual de Superarray,

Bioscience Corporation. Brevemente, el ARNc marcado con biotina se preparó por transcripción *in vitro* (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) e hibridizó al microarreglo Human Gene 1.0 st (Affymetrix) (Figura 7); éste contiene 22,000 genes involucrados, que se han encontrado expresados de manera importante en la biología humana, así como en condiciones patológicas. Las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo del fabricante de los microarreglos (Affymetrix, Inc.). A partir de 100-300 ng de ARN se sintetizó una primera hebra de ADN complementario utilizando la transcriptasa reversa Superscript II y los iniciadores (hexámeros al azar), que incorporaron la secuencia del promotor de T7.

La síntesis de la hebra complementaria de ADNc se generó a partir del producto de la reacción anterior, utilizando una ADN polimerasa. El ADN de doble cadena generado se utilizó para generar una hebra de ARNc mediante una reacción de transcripción *in vitro*, donde se obtuvieron múltiples copias de ARN en antisentido. Este ARN se usó como plantilla para una nueva síntesis de ADNc mediante una reacción de transcripción inversa, donde a diferencia de la primera se incorporaron dUTPs. Esta nueva cadena de ADNc se trató con uracil ADN glicosilasa y apurin apirimidin endonucleasa I (APE I), que reconoció específicamente los dUTPs presentes en la hebra, generando fragmentos de 40-70 nucleótidos. Los fragmentos se marcaron utilizando el kit de marcaje patentado por Affymetrix. El ADN marcado se hibridizó a los microarreglos y se incubó a 45°C durante 17 ±1 h. Los microarreglos se lavaron con buffer y se tiñeron con estreptavidina-ficoeritrina; posteriormente se leyeron en un escáner de alta

resolución y el análisis de calidad se realizó utilizando el software Expression Console de Affymetrix.

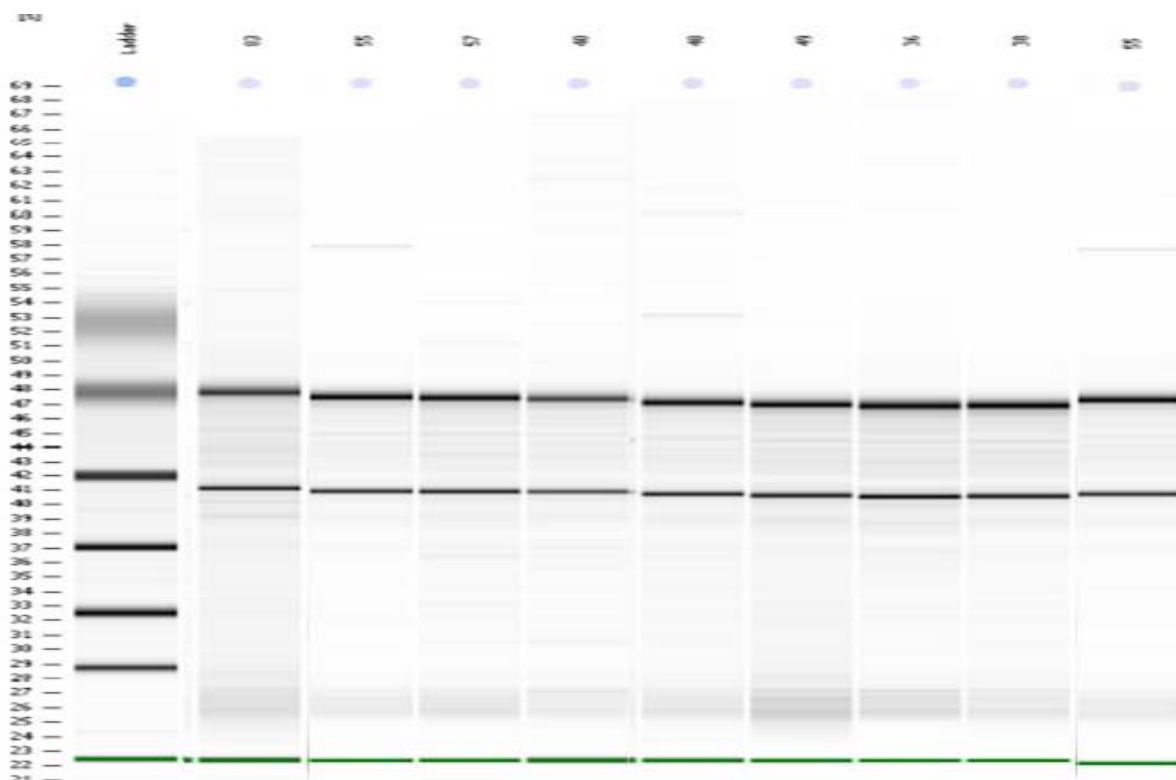


Figura 5. Evaluación y cuantificación de ARN total en el bioanalizador.

Se observan los patrones de las bandas de ARN de las muestras correspondientes a los 9 pacientes incluidos en el análisis de microarreglos.

7.4.1 Análisis de los resultados de microarreglos

El análisis de los datos consistió en dos partes: el preprocesamiento, que involucra un análisis de control de calidad (con el fin de detectar la variación sistemática durante el procesamiento de los microarreglos), y la normalización y sumarización. Una vez que los datos se encontraron en el mismo rango dinámico y eran por lo tanto comparables entre sí pasaron a la parte de detección de genes diferencialmente expresados. Esto se hizo mediante un modelo lineal que permitió especificar los contrastes a analizar (pacientes antes del tratamiento vs. controles, pacientes que respondieron al tratamiento vs. pacientes que no respondieron,

etc.). Esta especificación, que se hizo desde el diseño del modelo, incluyó a todos los microarreglos simultáneamente, lo que redujo la varianza de una comparación pareada.

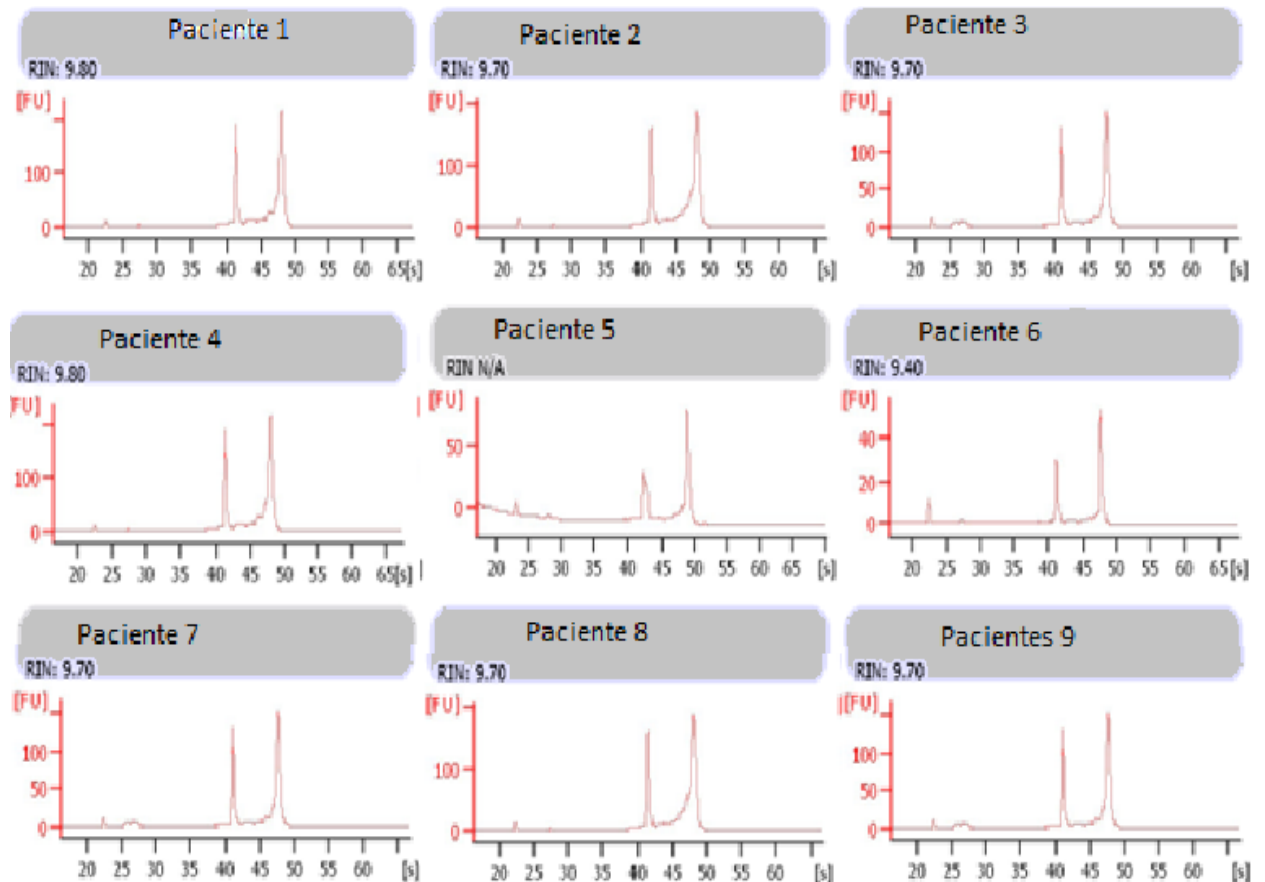


Figura 6. Electroferogramas obtenidos de las muestras de ARN total (Bioanalizador 2100 y ARN 6000 Nano LabChip).

Electroferogramas de los pacientes incluidos en el estudio de microarreglos que muestran niveles de integridad (RIN >7) aceptables para la hibridación.

Número de genes	28,869
Sets de sondas	764,885
Repeticiones por sonda	26

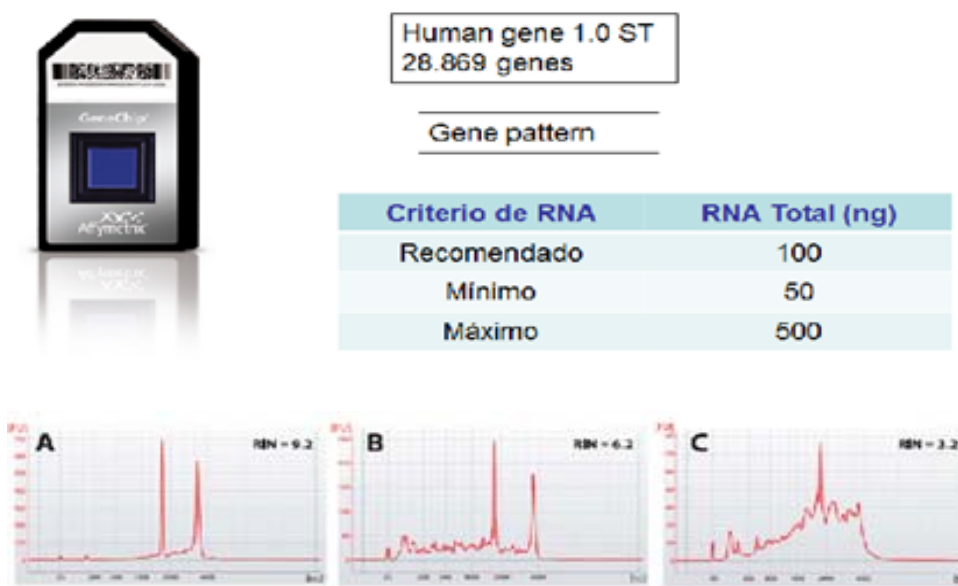


Figura 7. Características generales del microarreglo Human Gene 1.

Consta de 28,869 genes. En el panel inferior se muestran tres diferentes electroferogramas: A) muestra de ARN con alta integridad (RIN: 9.2); B) muestra de ARN de moderada integridad (RIN: 6.8); C) muestra totalmente degradada (RIN3.8).

Para visualizar las diferencias de expresión génica se generaron gráficas de volcán y mapas de calor, que permitieron detectar patrones de expresión respaldados con el estadístico B (*log-odds* de expresión diferencial) y seleccionados con base en el valor del *log fold-change*. Todo este proceso se realizó en forma muy específica al proyecto utilizando **R** (<http://cran.r-project.org/>), Limma y Bioconductor).

7.5 Estudio Inmunológico del perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17

Se utilizó la técnica de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de los niveles de las diferentes citocinas en el suero, el LCR y el sobrenadante en los pacientes incluidos en el estudio.

Se utilizaron entre 10 y 15 mL de sangre venosa periférica en un tubo conteniendo EDTA. La sangre se diluyó 1:1 con medio RPMI 1640 (Gibco BRL, NY) y posteriormente se realizó un gradiente con Ficoll-Hypaque. Las CMSPs obtenidas se cuantificaron y se pusieron en placas de cultivo de 2 a 2.5×10^6 células por pozo en placas de 12 pozos (Costar) y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO_2 al 5%. Las CMSPs fueron estimuladas con 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto vesicular total durante 72 h (IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β , IL-17A, IL-17F, e IL-17AF) y 120 h (IL-4 e IFN- γ). Los ELISAs se realizaron en placas de 96 pozos (Nunc-Immuno plate Maxisorp, Rosekilde, Dinamarca), utilizando kits de ELISA comerciales (BD Pharmigen Cytokine Sets, CA, eBioscience, R&D Duo-Set, UK). El nivel de sensibilidad fue de 9.4 pg/mL para todas las citocinas.

8. Análisis estadístico

Para el análisis de los microarreglos se utilizaron los siguientes paquetes: R y Bioconductor (Gentleman et al., 2004; Gautier et al., 2004; Dessau et al., 2008). Los datos de fondo fueron corregidos y normalizados utilizando el GC-RMA (GeneChip RMA) (Boldstad et al., 2003, Wu et al., 2004). Posteriormente, los genes se clasificaron como diferencialmente expresados de acuerdo con dos principales indicadores estadísticos: el log fold change (log FC), que provee la magnitud de expresión diferencial entre respondedores y no-respondedores, y el estadístico B, un log bayesiano no-paramétrico de posibilidades corregido automáticamente usando la tasa de falsos descubrimientos de Benjamin-Hochberg (FDR), que cuantificó la significancia estadística. Los genes diferencialmente expresados se consideraron significativos con $P < 0.05$ (Benjamin & Hochberg, 1995).

Para el análisis de la respuesta inmunológica por ELISA se construyó una base de datos de todas las variables obtenidas utilizando el programa Excel; los datos se analizaron utilizando el programa SPSS 21 (IBM Inc., Armonk, NY). Se hicieron análisis univariados, expresados como intervalo de confianza, y se utilizó la prueba t de Student o la de Mann-Whitney, según el comportamiento de los grupos en la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se realizaron análisis bivariados (regresión logística), tomando en cuenta las variables posiblemente confusoras (variables de las que se había mostrado influencia en la respuesta al tratamiento en los análisis univariados).

9. Consideraciones éticas

El presente estudio se realizó con apego a las regulaciones de investigación en seres humanos requeridos por las leyes mexicanas (Reglamento General de Salud para la Investigación Clínica) y las normas internacionales (Declaración de Helsinki para investigaciones médicas en seres humanos), quedando manifiesto a través de la firma de hoja de consentimiento informado (Anexo 1).

10. Resultados

10.1 Descripción de la muestra utilizada en el análisis de microarreglos

La edad promedio no difirió significativamente entre los respondedores (23.5 ± 6.3 años) y los no-respondedores (44.1 ± 13.7 años, $P = 0.08$); ni la celularidad en el LCR (R: 12.5 ± 7.7 por mm^3 ; NR: 79.6 ± 93 ; $P = 0.06$). 47% de los pacientes no-respondedores presentaron parásitos en SAB, mientras que 93% de los respondedores los presentaron en SAS ($P = 0.02$) (Tabla 4).

10.2 Análisis de la expresión diferencial de genes por microarreglos e hipótesis propuesta

La comparación entre el perfil de expresión de los pacientes respondedores vs. no-respondedores antes (T0) y después de tratamiento (T2) permitió identificar un conjunto de genes sobreexpresados y subexpresados relacionados con diferentes funciones biológicas, de los cuales nos concentramos en aquellos relacionados con funciones inmuno-inflamatorias (Tabla 5).

Tabla 4. Características generales de los pacientes incluidos en el estudio de microarreglos.

HIC, Hipertensión intracraneal; SAS, subaracnoideo de los surcos; SAB, subaracnoideo de la base; IV, intraventricular; R, respondedor, NR, no-respondedor. Vesículas: múltiples, MV, o única VU;

Tratamiento cestocida-corticosteroide						
Antes (T0)					Después (T2)	
Edad/Sexo	*Tratamiento previo(+/-)	Perfil clínico	Características radiológicas	LCR (#cels/mL)	LCR (#cels/mL)	Evolución clínica
26/♀	-	Cefalea	MV, SAS e IV	67	12	NR
63/♀	-	Cefalea	MV, SAB	18	12	NR
31/♂	-	HIC	MV, SAB	1	20	R
19/♂	-	Cefalea	VU, SAS	18	18	R
28/♂	-	Epilepsia generalizada	VU, SAS	7	7	R
56/♀	+	HIC	MV, SAB	261	27	NR
33/♀	+	HIC	MV, SAB	187	496	NR
42/♂	+	HIC	MV, SAB	16	---	R
44/♂	+	HIC	MV, SAB e IV	27	57	R

*Esteroides y cestocida.

Tabla 5. Genes sobreexpresados significativamente en pacientes con NC, P = 0.05.

Respondedores vs. no-respondedores			
Gen	Función inmunológica	LogFC	B
RORC (RAR-related orphan receptor C)	Factor transcripcional involucrado en la inducción y diferenciación de células Th17 (proinflamatorio)	1.52	3.48
TGFB2 (Transforming growth factor 2)	Regula la proliferación, diferenciación adhesión y migración de diversas células (antiinflamatorio)	0.57	1.25
TGFBR3 (Transforming growth factor receptor III)	Es un potencial regulador negativo de la señalización de TGFβ. Regula negativamente la señalización NFK-β (inmunomodulador)	0.48	2.02
TNFRSF25 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25)	Regula la homeostasis de linfocitos y puede estimular la actividad de NFK-β, regulando la apoptosis celular (antiinflamatorio)	0.54	4.97
Sema4A (semaphorin 4A)	Molécula coestimuladora que incrementa la activación y diferenciación de células T <i>in vitro</i> y potencia la generación de células T antígeno-específicas <i>in vivo</i> (proinflamatorio)	0.63	4.69
IL2RA (interleukin 2 receptor A)	Regula positiva y negativamente la proliferación de células T (inmunomodulador)	0.57	4.58
IL-19 (interleukin 19)	Pertenece a la familia de IL-10 con efectos antiinflamatorios, pero puede unirse al complejo del receptor de IL-20 y producir activación de la señal de transducción y activación del STAT3 (inmunomodulador)	0.52	4.42
RUNX3 (runt-related transcription factor 3)	Necesario para la diferenciación y apropiada función de las células Tregs. RUNX1 y RUNX 3 se relación con la inducción de células Tr17 (inmunomodulador)	0.51	4.26
SLAMF9 (SLAM family member 9)	Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, codifica para la expresión diferencial de receptores de superficie en células hematopoyéticas (inmunomodulador)	1.46	3.87
TNFRSF18 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18)	Incrementa la expresión en células T activadas y se considera que tiene un rol importante en la autotolerancia inmunológica (inmunomodulador)	0.65	3
SLAMF3 (SLAM family member 3)	Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, codifica para la expresión diferencial de receptores de superficie en células hematopoyéticas. Su expresión se encuentra incrementada en la superficie de células T polarizadas a Th17 (proinflamatorio)	0.58	2.69
SLAMF6 (SLAM family member 6)	Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, codifica para la expresión diferencial de receptores de superficie en células hematopoyéticas. Su expresión se encuentra incrementada en la superficie de células T polarizadas a Th17 (proinflamatorio)	0.46	2.67

SLAMF1 (SLAM family member 1)	Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, codifica para la expresión diferencial de receptores de superficie en células hematopoyéticas. Disminuye la producción de células NKT y condiciona retardo en la expresión de moléculas de señalización de activación linfocitaria (antiinflamatorio)	0.46	2.66
SLAMF5 (SLAM family member 5)	Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, codifica para la expresión diferencial de receptores de superficie en células hematopoyéticas. Incrementa la secreción de IFN gamma en células T activadas (proinflamatorio)	0.48	2.59
IL12RB2 (Interleukin 12 receptor beta 2)	Regula positivamente la producción de IFN gamma por células T (proinflamatorio)	0.65	2.42
ILF2 (interleukin enhancing factor 2, NFAT)	Regulador clave de la activación de células T y anergia. Convierte el programa de activación de células T en un programa supresor de Tregs (antiinflamatorio)	2.96	2.55
CXCL2 (Chemokin [C-X-C motif], ligand 2)	Involucrado en la quimiotaxis de células mononucleares, incrementa también la migración de Tregs (inmunomodulador)	2.97	1.55
C1QB (complement component 1 q subcomponent B)	Involucrado en la respuesta inmune innata (proinflamatorio)	1.39	2.41

El log FC describe el cambio cuantitativo de un gen de una condición inicial a una final. El estadístico B describe la probabilidad logarítmica de que un gen dado que se exprese. Las comparaciones entre los perfiles de expresión génica se realizaron antes (T0) y después del tratamiento (T2); estos últimos están en negritas.

10.3 Descripción de la muestra utilizada en el análisis de perfil de citocinas Th1, Th2, Th17

Se incluyeron en total 65 pacientes de forma retrospectiva: 39 respondedores (14 de los cuales tenían tratamiento con corticosteroides al momento de tomar la muestra) y 26 no-respondedores (13 de los cuales tenían tratamiento con corticosteroides). Las muestras de estos pacientes se tomaron de un banco de muestras biológicas que incluyeron sueros, LCR y SN de cultivos de células mononucleares periféricas. La edad promedio fue 44.8 ± 14.7 años en los respondedores y 39.7 ± 11.8 en los no-respondedores ($P = 0.1$). Con respecto a las características del LCR (celularidad y niveles de proteínas) no hubo diferencias entre respondedores y no-respondedores ($P = 0.35$ y $P = 0.61$) (Tabla 6).

10.4 Evaluación de factores involucrados en la heterogeneidad de la neurocisticercosis

Se evaluó la posible participación de múltiples factores en la respuesta al tratamiento, i.e., la localización de los parásitos, la edad y el género del hospedero. La localización (SAB o SAS) a T0 ($\chi^2 = 6.102$, $P = 0.019$) y a T2 ($\chi^2 = 7.550$, $P = 0.007$) fueron estadísticamente diferentes entre respondedores y no-respondedores. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas con la edad ($P = 0.1$) ni al género ($P = 0.6$).

Tabla 6. Características generales de los pacientes incluidos en el estudio de perfil de citocinas Th1, Th2 y Th17.

	Respondedores (N = 37)	No-respondedores (N = 28)	P
Edad (años)	44.7 ± 14.5*	39.9 ± 12	0.1
Género			
• Masculino	27 (57%)	20 (42%)	1
• Femenino	17 (63%)	10 (37%)	
Manifestaciones clínicas			
• Leve	25 (65%)	14 (35%)	0.1
• Grave	19 (53%)	16 (47%)	
Localización de los parásitos (T0)			
• SAS	13 (72%)	5 (28%)	0.005
• SAB	31 (53%)	27 (47%)	
LCR (T0)			
• Glucosa (mg/dL)	43.41 ± 25	36.7 ± 28.6	0.3
• Proteínas (mg/dL)	132.97 ± 251	153 ± 263	0.7
• Células/mm³	73 ± 161	89 ± 126	0.6
LCR (T2)			
• Glucosa (mg/dL)	37.7 ± 21	36 ± 19	0.8
• Proteínas (mg/dL)	03.8 ± 97	224 ± 329	0.06
• Células/mm³	39.8 ± 51	63 ± 74	0.1

*Promedio ± DS.

Considerando estos hallazgos, se realizó un análisis univariado comparando el perfil de citocinas en relación con la localización de parásitos (SAB y SAS) en el suero, el LCR y SN. Se encontraron las siguientes diferencias: en LCR a T0 hubo mayores concentraciones de TGF- β ($P = 0.04$) en el grupo SAB, y en SN a T2 se observaron mayores concentraciones de IL-17AF ($P = 0.04$) e IL-17F ($P = 0.007$) en SAS. No se observaron diferencias en el perfil de citocinas en el suero (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 en SAB vs. SAS NC antes y después del tratamiento.

Suero	TRATAMIENTO				P ₁	P ₂
	Antes (T0)		Después (T2)			
	SAB	SAS	SAB	SAS		
IL-17 A	†19.1 (5.6-32.6)	7.8 (7.8-7.8)	17.3 (7.2-27.5)	14.3 (0-97.3)	0.43*	0.75*
IL-17 AF	69.4 (32.5-106.3)	80.5 (0-178.8)	48 (26.1-69.8)	91.3 (0-206.1)	0.86*	0.42
IL-17 F	63.6 (25.5-101.7)	178.2 (0-481.3)	46.07 (23-69.1)	107.1 (0-254.4)	0.32	0.35
TGF-β	66.4 (15.2-117.7)	70.09 (0-221.2)	123.9 (0-279.9)	22.0 (11-33.0)	0.73*	0.69*
IL-10	67.0 (20.5-113.5)	97.3 (36.7-157.9)	50.3 (0-103.4)	82.9 (20.4-145.5)	0.47	0.38
IFN-γ	16.4 (0-32.9)	29.2 (0-122.7)	22.4 (0-48.8)	10.7 (0-21.6)	0.50	0.44
IL-4	4.5 (3.2-5.8)	5.1 (1-9.2)	6.3 (4.8-7.7)	4.4 (3.01-5.9)	0.61*	0.12
IL-2	3.8 (3.1-4.6)	4.5 (0.09-8.9)	4.6 (2.9-6.4)	4.6 (2.4-6.9)	0.91*	0.99
IL-6	6.7 (3.7-9.8)	6.4 (0-15.2)	7.5 (4.3-10.7)	13.4 (0-35.1)	0.92	0.53
LCR						
IL-17 A	56.2 (0-119.3)	118.3 (0-384.3)	23.8 (13.2-34.4)	34.2 (34.2-34.2)	0.75*	0.41
IL-17 AF	92.9 (39.8-146.0)	135.6 ± 253.7	132.8 (82.2-182.4)	30.5 (0-73.9)	0.21*	0.20*
IL-17 F	63.6 (25.5-101.7)	78.9 (0-241.6)	123.2 (49-197.4)	15.6 (15.6-15.6)	0.52*	0.36
TGF-β	78.7 (31.1-126.4)	17.9 (8.5-27.4)	32.8 (1.3-64.3)	15.6 (15.6-15.6)	0.04*	0.67*
IL-10	127.7 (77.3-178.1)	147.3 (0-323.1)	130.3 (72.3-188.4)	64.7 (0-323.4)	0.75	0.39
IFN-γ	50.5 (23.6-77.5)	140.4 (6.1-274.8)	15.6 (8.8-22.4)	11.2 (0-69.6)	0.07*	0.63
IL-4	3.7 (2.9-4.6)	3.2 (2.9-3.4)	4.1 (3.2-4.9)	3.1 (3.1-3.1)	0.76*	0.94*
IL-2	6.8 (3.8-9.7)	92.4 (0-321.8)	11.1 (7.5-14.7)	4.3 (4.3-4.3)	0.08*	0.34
IL-6	59.6 (17.5-101.7)	8.6 (1.5-15.7)	35.8 (5.2-66.4)	9.2 (9.2-9.2)	0.88*	0.78*
SN						
IL-17 A	40.5 (6.1-75.1)	138 (0-425)	60.9 (0-162.1)	26.9 (0-66.3)	0.88*	0.54*
IL-17 AF	86.2 (42.2-130.1)	181.4 (0-374)	129 (41.4-216.1)	317 (0-641.4)	0.30	0.04*
IL-17 F	72.1 (21.1-123.1)	141 (0-313)	137 (11.3-262.9)	320 (12.7-626.6)	0.24	0.007*
TGF-β	490 (0-1142.1)	147 (0-304)	124 (0-251.5)	84.8 (0-195.9)	0.98*	0.65
IL-10	257 (74.3-439.8)	493 (0-1415)	154 (0-353.2)	146 (0-319.9)	0.62*	0.96
IFN-γ	63 (26.3-99.5)	83 (28.1-138)	21.1 (13.6-28.5)	36.3 (0-78.8)	0.58*	0.42
IL-4	6.6 (1.1-12.1)	5.4 (2.2-8.7)	7.1 (0-14.3)	11.2 (0-30.3)	0.42*	0.94*
IL-2	10 (2.6-17.6)	16.3 (0-40.5)	21.8 (0-46.5)	11.8 (1.3-22.3)	0.40	0.66*
IL-6	1911 (673.5-3147.8)	5265 (0-14932)	3642 (2018-5266)	2766 (0-5605.3)	0.56*	0.54

*Mann-Whitney U, en el resto se aplicó la prueba de Student de dos colas. † Promedio (IC 95%). SAS vs. SAB antes (P₁) y después del tratamiento (P₂).

10.5 Niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 en células mononucleares de sangre periférica entre respondedores y no-respondedores, ajustados por localización

Se realizó un análisis bivariado por regresión binaria tomando en cuenta la localización. Se observaron diferencias significativas en el perfil de citocinas entre los grupos de pacientes respondedores y no-respondedores al tratamiento, tanto en el LCR como en SN. Los R presentaron mayores concentraciones de IL-17AF en el LCR ($P = 0.04$) y de IL-6 ($P = 0.03$) en SN, ambos a T2. En el grupo de R se observó una tendencia de menores niveles de IL-10 ($P = 0.08$) tanto en LCR como en SN a T0, así como mayores niveles de IL-17A ($P = 0.09$) e IFN- γ ($P = 0.06$) a T2 (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Comparación de los niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 en el LCR entre respondedores y no-respondedores.

Tratamiento				
Antes	Respondedor	No-respondedor	<i>P</i> (U)	<i>P</i> (RBL)
IL-17 A	†32.8 (0-74.8)	64.8 (0-166.3)	0.9	0.7
IL-17AF	91.4 (29.9-153.4)	89.6 (9.7-169.6)	0.3	0.8
IL-17F	84.5 (18.33-150.8)	44.8 (22.12-67.6)	0.7	0.2
TGF- β	35.0 (14.2-55.8)	114.4 (24.4-204.5)	0.049	0.1
IL-10	117.1 (46.8-187.4)	170 (79.7-260.3)	0.3	0.08
IFN- γ	69.6 (23.1-116.07)	54.3 (13.4-95.2)	0.9	0.2
IL-4	3.4 (3.02-3.8)	3.9 (2.3-5.5)	0.3	0.5
IL-2	32.7 (0-78.9)	5.2 (3.2-7.2)	0.053	0.2
IL-6	42.8 (0-89.6)	61.9 (1.3-122.4)	0.8	0.9
Después				
IL-17A	23.7 (7.84-39.5)	19.1 (9.4-28.7)	0.57	0.5
IL-17AF	162.9 (85.9-239.9)	80.1 (43.4-108.2)	0.05	0.04
IL-17F	147.3 (32.9-261.7)	70.5 (15.9-125.1)	0.20	0.2
TGF- β	38.5 (0-87.8)	20.6 (8.4-32.8)	0.77	0.3
IL-10	113.7 (44.1-183.2)	150.6 (43.4-257.9)	0.51	0.3
IFN- γ	13.8 (5.4-22.2)	15.2 (2.71-27.6)	0.83	0.4
IL-4	3.9 (2.6-5.2)	4.2 (2.94-5.5)	0.69	0.5

IL-2	10.6 (3.41-17.8)	11.7 (7.8-15.5)	0.75	0.5
IL-6	50.1 (0-107.7)	20.4 (0-48.1)	0.30	0.3

†Promedio (IC 95%). U, análisis univariado (*t* de Student de dos colas o prueba de Mann-Whitney, dependiendo de la normalidad de los datos); RBL, regresión binaria logística (ajuste por localización de los parásitos).

Tabla 9. Comparación de los niveles de citocinas Th1, Th2 y Th17 en SN entre respondedores y no-respondedores.

Tratamiento				
Antes	Respondedor	No-respondedor	P (U)	P (RBL)
IL-17A	†123.6 (0-309.2)	27.6 (12-43.3)	0.2	0.2
IL-17AF	150.8 (35.1-266.5)	85.5 (19.3-151.6)	0.3	0.6
IL-17F	98.2 (18.7-177.6)	86.5 (0-183.9)	0.8	0.4
TGF-β	51.3 (0-106.5)	700 (0-1583.4)	0.1	0.1
IL-10	23.01 (14.2-31.7)	750 (0-1521.1)	0.01	0.08
IFN-γ	64.5 (28.8-100.2)	74.5 (14.8-134.2)	0.9	0.2
IL-4	7.3 (0.8-13.9)	4.0 (1.81-6.2)	0.3	0.2
IL-2	13.9 (1.9-25.9)	9.2 (1.4-17.02)	0.4	0.7
IL-6	2207.7 (613.1-3802.1)	3602.5 (0-8725.7)	0.8	0.1
Después				
IL-17A	82 (0-238.3)	20.6 (8.7-32.5)	0.40	0.09
IL-17AF	175.2 (54.3-296.1)	170.9 (0-344.1)	0.20	0.3
IL-17F	194.5 (31.4-357.6)	187 (0-391.7)	0.95	0.2
TGF-β	128.3 (0-268.7)	88.5 (0-204.05)	0.64	0.3
IL-10	205.4 (0-447.7)	76.9 (0-159.7)	0.62	0.2
IFN-γ	32.3 (12.9-51.7)	15.4 (9.4-21.5)	0.09	0.06
IL-4	7.5 (0-16.7)	9.3 (0-21.3)	0.76	0.3
IL-2	10.6 (5.16-16.07)	29.2 (0-69.8)	0.34	0.3
IL-6	4148.6 (2326.6-5971)	2425 (344.7-4506.6)	0.19	0.03

†Promedio (IC 95%). U, análisis univariado (*t* de Student de dos colas o prueba de Mann-Whitney, dependiendo de la normalidad de los datos); RBL, regresión binaria logística (ajuste por localización de los parásitos).

10.6 Determinación del índice de citocinas Th1, Th2 y Th17 suero/LCR en pacientes respondedores y no-respondedores

Por último, se realizó el cálculo del índice suero/LCR para cada una de las citocinas en respondedores y no-respondedores al tratamiento. Se observó una tendencia a presentar un menor índice de IL-6 en los respondedores, lo que indica mayor concentración de esta citocina en el LCR que en el suero (Tabla 10).

Tabla 10. Índice de citocinas Th1, Th2 y Th17 (suero/LCR) en pacientes respondedores y no-respondedores antes y después del tratamiento

Índice suero/LCR	Respondedores (T0 y T2) (promedio, IC 95%)	No-respondedor (T0 y T2) (promedio, IC 95%)	P
IL-17 A	†0.5 (0.2-0.9)	3.4 (0.9-5.8)	0.1
IL-17 AF	0.7 (0.3-1.08)	1.4 (0.3-2.6)	0.1
IL-17 F	1.5 (0.6-2.4)	1.9 (0.8-3)	0.7
TGF-β	4.4 (0-10.8)	2.1 (0-4.5)	0.4
IL-10	1.5 (0.3-2.7)	1.1 (0-8.3)	0.8
IFN-γ	1.2 (0-2.7)	1.2 (0.1-2.3)	0.9
IL-4	1.3 (0.9-1.6)	1.8 (1.1-2.4)	0.1
IL-2	0.9 (0.3-1.4)	0.5 (0.2-0.9)	0.2
IL-6	0.9 (0.2-1.5)	2.6 (0.9-4.3)	0.059

†Promedio (IC 95%).

En resumen, se detectaron diversos genes en el análisis de microarreglos, varios de ellos proinflamatorios, relacionados con una respuesta Th17, como RORγC, Sema4A, SLAMF3 y SLAMF6, así como otros antiinflamatorios e inmunomoduladores. Estos hallazgos fueron confirmados con la evaluación de los niveles de citocinas en la sangre, el sobrenadante y el LCR de un segundo grupo de pacientes antes del tratamiento (T0) y después de tratamiento: a los 8 días y después de dos meses (T2). Encontramos altos niveles de IL-17AF en el LCR y de IL-6 en SN, ambos a T2 (datos ajustados por la localización de los parásitos); además, aunque no hubo diferencia significativa, se observó una tendencia a menores niveles de IL-10 en el LCR y SN en pacientes respondedores a T0 y altos niveles de IL-17A e IFN-γ a T2.

Estos resultados en conjunto sugieren la participación de un “ambiente” proinflamatorio en la respuesta al tratamiento cestocida-esteroide.

11. Resultados complementarios

Durante la realización del proyecto de doctorado se produjeron cuatro publicaciones adicionales, dos de las cuales fueron producto directo de mi proyecto doctoral (Anexo 2), y cuyos resultados se resumen a continuación:

11.1 Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol.* 2012; 42(2):171-176.

El perfil endocrinológico fue evaluado también en 50 pacientes con NC y 22 controles, encontrándose que los pacientes masculinos presentaron menores concentraciones de estradiol ($P = 0.02$) y DHEA ($P = 0.006$), así como mayores niveles de hormona luteinizante (HL) ($P = 0.02$) que los controles. Igualmente, los niveles de estradiol en pacientes femeninos fueron menores que en los controles ($P = 0.05$).

Los pacientes se clasificaron de acuerdo con la gravedad de su presentación clínica. Los pacientes masculinos con manifestaciones graves mostraron una disminución de las concentraciones séricas de testosterona ($P = 0.007$) e incremento de FSH ($P = 0.05$) con respecto a los pacientes con manifestaciones clínicas no-graves. Por su parte, los pacientes femeninos con cuadro clínico grave mostraron menores niveles de progesterona y androstenediona ($P = 0.03$ y $P = 0.01$, respectivamente) que los controles.

Por otro lado, los pacientes que presentaron formas SAB o V y múltiples parásitos vesiculares mostraron altas concentraciones de IL-1 β en sobrenadante de CMSP estimuladas con TsAg ($P = 0.003$), mientras que en el LCR

predominaron altos niveles de IL-10 ($P = 0.004$) en comparación con pacientes con parásitos en el parénquima cerebral en bajo número.

Las correlaciones inmuno-endocrinológicas mostraron correlación negativa de estradiol e IL-10 en LCR en pacientes masculinos ($r = -0.53$, $P = 0.049$), mientras que en los pacientes femeninos se encontró correlación positiva entre DHEA e IL-1 β en SN ($r = 0.77$, $P = 0.04$) y entre androstenediona e IL-17 A en SN ($r = 0.86$, $P = 0.006$). Estos resultados permitieron, por primera vez, demostrar que la NC puede modificar el microambiente del hospedero, induciendo cambios tanto endocrinos como inmunológicos.

11.2 Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. J Parasitol. 2012; 98(1):142-148

Se estudiaron 19 pacientes con formas graves de NC (SAB) y 10 controles, para estudiar la frecuencia de Tregs y su relación con la respuesta proliferativa de los linfocitos activados y las citocinas expresadas. Se observó un incremento de Tregs periféricas CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺, CD4⁺CD25^{high} CTLA-4⁺ y CD4⁺CD25^{high} IL-10⁺ con disminución células T activadas CD38⁺ y CD69⁺. El incremento de Tregs se acompañó con depresión de la respuesta linfocitaria proliferativa específica y no-específica. De igual forma se investigó la frecuencia de Tregs en LCR en 8/19 pacientes. Los resultados mostraron una significativa correlación positiva entre las poblaciones de Tregs periféricas y locales:

Niveles mayores de IL-10 e IL-6 en el LCR que en el suero ($P = 0.01$) en pacientes con NC, mientras que los niveles de TGF- β en la sangre fueron

mayores que en el LCR ($P = 0.05$). Se observó una tendencia de correlación positiva entre las densidades ópticas del HP10 en LCR con los linfocitos $CD4^+CD25^{high}$ ($r = 0.64$, $P = 0.08$); de igual forma, los niveles de este antígeno se correlacionaron positivamente con los niveles de IL-10 ($r = 0.74$ $P = 0.037$) e IL-6 ($r = 0.79$ $P = 0.002$) en LCR. Los linfocitos $CD4^+CD25^{high}$ de sangre periférica se correlacionaron con las densidades ópticas de HP10 en el suero ($r = 0.47$, $P = 0.046$). En resumen, estos hallazgos sugieren la participación tanto local (LCR) como periférica (sangre) de células Tregs en el control de la neuroinflamación, lo cual podría estar relacionado con una “menor” gravedad de los síntomas clínicos en pacientes con NC SAB; a la vez, también podría participar en la promoción de un microambiente “permisivo” que favorezca la supervivencia del parásito y el desarrollo de neoplasias cerebrales (Del Brutto et al., 1997; Del Brutto et al., 2000; Azad et al., 2003; Herrera et al., 2000). Aún se requieren más estudios para establecer una posible relación causal.

11.3 Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation. Clin Dev Immunol. 2013; 981468

Considerando los hallazgos encontrados en el estudio previo, se decidió ampliar la investigación evaluando la capacidad de los cisticercos de *T. solium* para modular células dendríticas hacia la inducción de células Tregs *in vivo* e *in vitro*.

Se indujeron células dendríticas a partir de monocitos $CD14^+$ en presencia o en ausencia de cisticercos. Las células diferenciadas en presencia del parásito mostraron alta expresión de SLAMF1, B7-H1 y CD205; de igual forma, las células tratadas con dexametasona mostraron disminución de la expresión de CD80,

CD40 y SLAMF1 con respecto a los controles, hallazgos que sugieren que *in vitro* los parásitos promueven la expresión en células dendríticas de moléculas relacionadas con un fenotipo tolerogénico. Dichas células diferenciadas en presencia o ausencia de cisticercos fueron pulsadas o no con antígenos de cisticercos y usadas para estimular linfocitos T CD4⁺. Cuando las células dendríticas fueron pulsadas con los antígenos parasitarios, la expresión de Tregs se incrementó significativamente de 101.2 ± 33 a 273 ± 86.5 ($P = 0.01$) en presencia de antígenos de *T. crassiceps* y a 393.3 ± 38.63 ($P = 0.0002$) con antígenos de *T. solium*.

En los estudios *in vivo* se incluyeron 13 pacientes con NC. Se observó que durante la diferenciación de células dendríticas sólo la IL-10 se incrementó significativamente cuando las células fueron diferenciadas en presencia de dexametasona. Por otra parte, hubo un incremento significativo de moléculas como SLAMF1 y CD205 ($P = 0.05$) en las células dendríticas (CD11c) y de Tregs periféricas en pacientes con NC. Estos resultados confirman los datos observados en el estudio previo y demuestran la relevancia de las Tregs en el control de la respuesta inflamatoria en NC. Tanto en pacientes como en los estudios *in vitro*, los cisticercos son capaces de modular el fenotipo de la célula dendrítica que induce Tregs. Aún faltan estudios complementarios para dilucidar los mecanismos subyacentes.

11.4 Subarachnoidal neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drugs: a case series. BMC Neurol. 2010; 10:16

Se realizó un estudio clínico-radiológico en 6 pacientes con formas de NC SAB. Como se comentó anteriormente, la localización de los parásitos en el sistema

nervioso central es un factor relevante en la respuesta a tratamiento. En este contexto, los parásitos localizados en las cisternas del espacio SAB conllevan a un peor pronóstico tanto clínico como en relación con la respuesta al tratamiento. En esta serie de pacientes hubo persistencia de parásitos viables o vesiculares, documentada por resonancia magnética después de repetidos ciclos de ABZ. Nuestras hipótesis en relación con esta “resistencia” al tratamiento cestocida se basaron en una posible menor penetración del fármaco en el espacio SAB debida a diferencias en la biodisponibilidad entre individuos, previamente reportadas (Jung et al., 2008); también se consideró el papel del uso de corticosteroides para la prevención de las complicaciones inflamatorias asociadas a NC, que podría interferir con la respuesta inmunológica crucial para la eliminación del parásitos, y finalmente la posibilidad de desarrollo de mecanismos de resistencia del cisticerco al ABZ, aunque en humanos esto no se ha reportado. Igualmente, reportamos una serie de tres pacientes en quienes paradójicamente hubo incremento de la carga parasitaria después de haber recibido tratamiento con ABZ; se desconoce la razón por la que este fenómeno puede presentarse en los pacientes con NC, aunque se han descrito eventos similares en humanos con tuberculosis durante el tratamiento antifímico (Kumar et al., 2006) y en un modelo experimental de malaria cerebral (Amante et al., 2007). Estos hallazgos abren un complejo panorama ante la posibilidad de que el parásito aproveche los factores de crecimiento secretados por el hospedero durante el proceso inflamatorio inducido por la misma infección. La secreción de TGF- β y la inducción de Tregs podrían ser determinantes en este fenómeno. Dichas posibilidades están siendo abordadas actualmente en nuestro grupo de trabajo.

12. Discusión y conclusiones

La inflamación local (SNC) y periférica (sangre) se relaciona críticamente con la gravedad de las manifestaciones clínicas en la NC y la eficiencia del tratamiento cestocida-esteroide (Chavarría et al., 2005; Sáenz et al., 2012; Sciutto et al., 2013). Considerando su relevancia en la patología, decidimos ahondar en el conocimiento del perfil inmuno-inflamatorio asociado a la respuesta al tratamiento. Para este propósito incluimos pacientes con NC SAB, la presentación radiológica más frecuentemente resistente al tratamiento cestocida y que requiere la administración simultánea de esteroides. En este conjunto de pacientes se estudió la respuesta periférica, considerando su estrecha comunicación inmunológica con la respuesta en el SNC (Trakhtenberg & Golberg, 2011). Con el propósito de identificar las diferencias de expresión transcripcional entre pacientes respondedores vs. no-respondedores al tratamiento cestocida, se evaluó el perfil de expresión génica en CMSP estimuladas *in vitro* con extracto vesicular total de cisticerco. Estos resultados revelan que los pacientes que respondieron al tratamiento cestocida-corticosteroide presentan sobreexpresados diversos genes involucrados en la respuesta inmune, entre los que desatacan genes proinflamatorios (ROR γ C, Sema4A, SLAMF3, SLAMF6) y antiinflamatorios/inmunomoduladores (TGFB, TNFRSF25, TNFRS18, SLAMF1, ILF2). Algunos de estos genes proinflamatorios se relacionaron con una respuesta Th17. Es posible que la administración coadyuvante de corticosteroides, frecuentemente requerida para evitar complicaciones inflamatorias graves (hidrocefalia, vasculitis, etc.), pudiera estar asociada parcialmente con estos hallazgos (Hu et al., 2009), dado que tales fármacos pueden no sólo modificar la

respuesta Th17 sino también favorecer la expresión de Tregs (Pandolfi et al., 2013).

Estos resultados se suman a los previamente establecidos en los estudios dirigidos a evaluar el perfil inmuno-inflamatorio que acompaña a la NC, que se habían concentrado en el análisis del paradigma Th1/Th2 (Chavarría et al., 2005; Medina-Escutia et al., 2001; Restrepo et al., 2001). El hallazgo de un incremento en el perfil de citocinas Th17 en pacientes respondedores puede estar relacionado con la efectividad en la eliminación de los parásitos. Se sabe que las células Th17 producen tanto IL-17 como IL-2 bajo el efecto de TGF- β , y las citocinas proinflamatorias IL-6 e IL-21 (Cua & Kastelein, 2006; McGeacgy et al., 2007; Veldhoen & Stokinger, 2006), que son altamente inflamatorias y se han relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, así como en la respuesta inmune efectiva contra patógenos tales como *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* (Peck & Mellins, 2010; Matsuzaki & Umemura, 2007). Igualmente, en algunas parasitosis se ha evaluado recientemente el rol de la respuesta Th17; por ejemplo, en la esquistosomiasis (*Schistosoma mansoni*), en un modelo murino se confirmó el efecto de TGF- β y las citocinas proinflamatorias en la inducción de células Th17. Además, en ratones infectados que fueron tratados con TGF- β se observó alta expresión de ARNm en CMSP de IL-6, IL-7, TGF- β y TNF- α , así como un incremento de los niveles plasmáticos de IL-23 e IL-17, lo cual se asoció con una baja carga de parásitos adultos comparados con los controles (Tallima et al., 2009). Estos hallazgos muestran las propiedades multifuncionales del TGF- β , particularmente en la diferenciación de la subpoblación Th17. En otro modelo murino con *Trypanosoma congolense* se

observaron altos niveles de IL-17 en el suero, así como en células hepáticas y esplénicas inmediatamente después de la infección. Además, la aplicación *in vivo* de anticuerpo monoclonal anti-IL-17 se asoció con una mayor parasitemia (Mou et al., 2010). Por otra parte, en relación con la infección por *Toxoplasma gondii* en un ratón IL-17R^{-/-} se demostró que la inducción temprana de neutrófilos es dependiente de la señalización por IL-17; de hecho, estos ratones fueron más susceptibles a la infección que las cepas silvestres. (Kelly et al., 2005). Estos resultados muestran globalmente que la respuesta Th17 puede ser importante para que el hospedero desarrolle una respuesta inflamatoria exitosa, que favorezca la destrucción del parásito promovida por los fármacos cestocidas.

Por otro lado, la participación de las células Treg parece ser crucial en la homeostasis inmunológica; sin embargo, estas células podrían ser inducidas por el parásito como una estrategia que le permitiría establecerse en un microambiente “hostil”. Se ha observado que en pacientes con NC SAB (forma grave de la enfermedad) existe una correlación entre la respuesta periférica (sistémica) y local (SNC) de las Tregs (Adalid-Peralta et al., 2012). De igual forma, se ha observado *in vitro* que los cisticercos incrementan la inducción de Tregs y de moléculas supresoras (SLAMF1, B7-H1 y CD205), efecto que también se observa *in vivo* (Adalid-Peralta et al., 2013).

Otros resultados que surgen de este trabajo de tesis se refieren a la participación de componentes hormonales en la modulación de las formas subaracnoideas de la base, que en general son las más graves e inflamatorias. En este contexto, se observaron cambios significativos en el perfil hormonal de controles normales y pacientes con NC. Estos últimos presentaron disminución de

la DHEA; asimismo, los hombres con NC presentaron bajos niveles de 17β -estradiol y altos niveles de hormona luteinizante. Los pacientes con formas graves de NC presentaron además bajas concentraciones de testosterona con respecto a los controles (Cárdenas et al., 2012). Aunque aún se desconoce si estos resultados son origen o consecuencia de la infección, la segunda opción parece la más probable. En este contexto, se han descrito trabajos que realzan el papel de las hormonas sexuales en el control de otros procesos neuroinflamatorios, dado que las hormonas producidas por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal e hipotálamo-hipófisis-gonadal presentan funciones inmunomodulatorias (Kipp et al., 2012; Verthelyi, 2001).

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten sostener que la resolución radiológica (desaparición de los parásitos) después del tratamiento cestocida en pacientes con NC SAB requiere de componentes inmunológicos concomitantes, predominantemente proinflamatorios de tipo Th17. Encontramos también evidencias de que la respuesta Th17 se encuentra influida por mecanismos inmuno-endocrinológicos complejos del hospedero. Adicionalmente a los datos obtenidos en esta tesis, nuestro equipo de trabajo ha demostrado que el propio parásito promueve un incremento central y periférico de Tregs, que controla la respuesta proinflamatoria y podría participar en la resistencia al tratamiento (Adalid et al., sometido a publicación). Los resultados obtenidos en esta tesis permitirán la búsqueda de nuevos tratamientos antiinflamatorios más específicos que permitan controlar los efectos adversos de la inflamación sin comprometer fuertemente la inmunidad del hospedero para lograr una eliminación eficaz de los parásitos.

En resumen, nuestros hallazgos muestran que una menor respuesta al tratamiento se asocia con un ambiente menos inflamatorio (bajos niveles de IL-17, altos niveles de IL-10, TGF- β) en los pacientes con parásitos localizados en el espacio subaracnoideo de la base. Cabe destacar que estos pacientes “graves” muestran un aumento en el porcentaje de células T reguladoras, aunque no se ha confirmado todavía si este hallazgo se correlaciona con la respuesta al tratamiento.

Por otro lado, la relevancia de la respuesta Th17 en la respuesta inmuno-inflamatoria asociada con la respuesta al tratamiento en NC se puso en evidencia por primera vez. Estos resultados deberán evaluarse más extensamente, y en este sentido planeamos el abordaje de la actividad biológica de citocinas implicadas en la inducción de una respuesta Th17, como IL-12, IL-23p40 e IL-6, en los pacientes con formas graves de NC. Pretendemos en posteriores estudios evaluar, utilizando anticuerpos específicos dirigidos contra estas citocinas, briakinumab, ustekinumab y tocilizumab, aprobados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Yoshida & Tanaka, 2014; Niederreiter et al., 2013), la relevancia de la respuesta Th17 en modelos *in vitro* e *in vivo*, debido a que estos anticuerpos actúan deprimiendo la respuesta inflamatoria. Esperamos con ello confirmar nuestras observaciones preliminares, que sugieren que un ambiente proinflamatorio es necesario para favorecer la destrucción del parásito iniciada por el tratamiento cestocida.

Por otro lado, hay que considerar que la estrategia de intentar “potenciar” una respuesta Th17 no parece conveniente a priori, debido a las siguientes consecuencias: por un lado, el riesgo de generar una respuesta inmuno-

inflamatoria exacerbada o autoinmune, y por otro, la elevada plasticidad de las células Th17; ambas circunstancias dificultan mantenerlas “estables” una vez que se induce su diferenciación, y finalmente la posibilidad hasta ahora cuestionable de inducir células Th17 de memoria (Lindenstrom et al., 2012). A pesar de ello, es interesante comentar que se ha descrito que un adyuvante liposomal catiónico (CAF01) puede cebar tanto respuestas Th1 como Th17 y promover un linaje de potentes células Th1 de memoria (Lindenstrom et al., 2009) y podría eventualmente evaluarse durante el tratamiento de los pacientes con NC. Éstas y otras posibilidades deben estudiarse a profundidad para mejorar las actuales opciones de tratamiento en pacientes con NC SAB.

13. Referencias

- Adalid-Peralta L, Fleury A, García-Ibarra TM, Hernández M, Parkhouse M, Crispín JC, Voltaire-Proañó J, Cárdenas G, Fragoso G, Sciutto E. Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *J Parasitol.* 2012; 98(1):142-148.
- Adalid-Peralta L, Arce-Sillas A, Fragoso G, Cárdenas G, Rosetti M, Casanova-Hernández D, Rangel-Escareño C, Uribe-Figueroa L, Fleury A, Sciutto E. Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013:981468.
- Adalid-Peralta L, Rosas G, Bobes RJ, Cárdenas G, Arce-Sillas A, Meneses G, Fleury A, Hernández B, Hernández M, Laclette JP, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. Transforming Growth Factor B: A host factor specifically recognized by TGF β -like Receptors in *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Cysticerci (En revisión)
- Aguilar-Rebolledo F, Cedillo-Rivera R, Llaguno-Violante P, Torres-López J, Muñoz-Hernández O, Enciso-Moreno JA. Interleukin levels in cerebrospinal fluid from children with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 64(1-2):35-40.
- Albridge JR, Jennette MA, Kunh RE. BALB/cJ male mice do not feminize after infection with larval *Taenia crassiceps*. *J Parasitol.* 2007; 93(1):190-191.
- Álvarez JI, Londoño DP, Álvarez AL, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis. *J Comp Pathol.* 2002; 127(2-3):186-193.
- Amante FH, Stanley AC, Randall LM, Zhou Y, Haque A, McSweeney K, Waters AP, Janse CJ, Good MF, Hill GR, Engwerda CR. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol.* 2007; 171(2):548-559.
- Barbi J, Pardoll D, Pan E. Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunol Rev.* 2013; 252(1):52-77.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics.* 2003; 19:185-193.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B.* 1995; 57: 289-300.
- Bucher C, Koch L, Vogtenhuber C, Goren E, Munger M, Panoskaltasis-Mortari A, Sivakumar P, Blazar BR. IL-21 blockade reduces graft-versus-host disease

mortality by supporting inducible T regulatory cell generation. *Blood*. 2009; 114(26):5375-84.

Bueno EC, Vaz AJ, Oliviera CA, Machado LR, Livramento JA, Mielli SR, Ueda M. Analysis of cells in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis by means of flow cytometry. *Cytometry* 1999; 38(3):106-110.

Bueno EC, dos Ramos Machado L, Livramento JA, Vaz AJ. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). *Acta Trop*. 2004; 91(2):205-213.

Cárdenas G, Jung H, Ríos C, Fleury A, Soto-Hernández JL. Severe cysticercal meningitis: clinical and imaging characteristics. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82(1):121-125.

Cárdenas G, Bahena A, Soto-Hernández JL, Fleury A. A dramatic case of intraventricular cysticercosis. *Arch Neurol*. 2011; 68(6):828-829.

Cárdenas G, Valdez R, Sáenz B, Bottasso O, Fragoso G, Sciutto E, Romano MC, Fleury A. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. *Int J Parasitol*. 2012; 42(2):171-176.

Casimir GJ, Lefèvre N, Corazza F, Duchateau J. Sex and inflammation in respiratory disease: a clinical viewpoint. *Biol Sex Differ*. 2013; 4(1):16.

Chavarría A, Roger B, Fragoso G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. Th2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect* 2003; 5(12):1109-1115.

Chavarría A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso G, Sciutto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol*. 2005; 116(3):271-278.

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

Ciaranello RD, Hoffman HJ, Shire JGM, Axwirod J. Genetic regulation of the catecholamine biosynthetic enzymes II. Inheritance of tyrosine hydroxylase, dopamine-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyl transferase. *J Biol Chem*. 1974; 249(14):4528-4536.

Cobaleda C, Jochum W, Busslinger M. Conversion of mature B cells into T cells. Dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature*. 2007; 449(7161):473-477.

Cohen L, Belec L, Sanson M, Pierrot-Deseilligny C, Signoret JL. Selective sensitivity of cysts to praziquantel and albendazole in a case of cerebral cysticercosis. *Rev Neurol (Paris)*. 1992; 148(1):58-61.

Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, Berrino L, Frambini M, Caproni M, Tonelli F, Lazzeri E, Parronchi P, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from CD161+CD4+Tcell precursor. *J Exp Med*. 2008; 205(8):1903-1916.

Cruz M, Cruz I, Horton J. Albendazole versus praziquantel in the treatment of cerebral cysticercosis: clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991; 85(2):244-247.

Cruz I, Cruz ME, Carrasco F, Horton J. Neurocysticercosis: optimal dose treatment with albendazole. *J Neurol Sci*. 1995; 133(1-2):152-154.

Cua DJ, Kastelein RA. TGF-beta, a "double agent" in the immune pathology war. *Nat Immunol*. 2006; 7(6):557-559.

Cuello-García CA, Roldán-Benitez YM, Pérez-Gaxiola G, Villarreal-Careaga J. Corticosteroids for neurocysticercosis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Infect Dis*. 2013; 17(8): e583-592.

Da Matta Guedes PM, Gutiérrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK, Pavanelli WR, Silva JS. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(2):e604.

Del Brutto OH, Sotelo J. Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis*. 1988;10(6):1075-1087. (a)

Del Brutto OH, García E, Talámas O, Sotelo J. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med* 1988; 148(3):544-546. (b)

Del Brutto OH, Granados G, Talámas O, Sotelo J, Gorodezky C. Genetic pattern of HLA system: HLA A, B, DR and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Human Biol* 1991; 63(1):85-93.

Del Brutto OH, Rajshekar V, White A C Jr, Tsang VC, Nash TE, Takayanagui OM, Schantz PM, Evans CA, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JC, Sarti E, González AE, Gilman RH, García HH. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*. 2001; 57(2):177-183.

Del Brutto OH, Roos KL, Coffey KL, García HH. Meta-analysis: cysticidal drugs for neurocysticercosis: albendazole and praziquantel. *Ann Intern Med*. 2006; 145(1):43-51.

Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Continuum (Minneapolis, Minn)*. 2012; 18(6 Infectious Disease):1392-416.

Dessau RB, Phipps CB (2008) "R"—project for statistical computing. *Ugeskr Laeger* 170:328-330.

Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev*. 2008; 226:80-86.

Escobedo F, Penados P, Rodríguez J, Sotelo J. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch Intern Med*. 1987;147(4):738-741.

Evans CA, García HH, Hartnell A, Gilman RH, Jose PJ, Martínez M, Remick DG, Williams TJ, Friendland JS. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun*. 1998; 66(9):4522-4525.

Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, Larralde C, Sciutto E. Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(8):e805.

Fleury A, Gómez T, Álvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarría A, Carrillo-Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 2003; 22(2):139-145.

Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E. Symptomatic human neurocysticercosis: age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 2004; 251:830-837.

Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yanez O, Pina J, Carrillo-Mezo R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100(6):551-558.

Fleury A, Hernández M, Ávila M, Cárdenas G, Bobes RJ, Huerta M, Fragoso G, Uribe-Campero L, Harrison LJ, Parkhouse RM, Sciutto E. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78(9):970-974.

Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T. Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011; 9(1):123-133.

Flisser A, Viniegra AE, Aguilar-Vega L, Garza-Rodríguez A, Maravilla P, Ávila G. Portrait of human tapeworms. *J Parasitol*. 2004; 90(4):914-916.

Fragoso G, Lamoyi E, Mello RA, Lomeli C, Hernández M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun*. 1998; 66(2):760-764.

Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sônego F, Cunha FQ, Ryffel B. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. *J Immunol*. 2009; 182(12):7846-7854.

Fux B, Rodrigues CV, Portela RW, Silva NM, Su C, Sibley D, Vitor RW, Gazzinello RT. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 2003; 71(11):6392-6401.

García HH, González AE, Evans CA, Gilman RH; Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 2003; 362:547-556.

Gautier L, Cope L, Bolstad DM, Irizarry RA. Affy—analysis of Affymetrix Gene Chip data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004; 20:307-315.

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004; 5:R80.

Goldsby RA, Kind TJ, Osbourne BA, Kuby J. *Immunology*, 5th edn. New York: W.H. Freeman, 2006.

Gupta RK, Awasthi R, Rathore RK, Verma A, Sahoo P, Paliwal VK, Prasad KN, Pandey CM, Narayana PA. Understanding epileptogenesis in calcified neurocysticercosis with perfusion MRI. *Neurology*. 2012; 78(9):618-625.

Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*. 2006; 354(11):1166-1176.

Holley MM, Kielian T. Th1 and Th17 cells regulate innate immune responses and bacterial clearance during central nervous system infection. *J Immunol*. 2012; 188(3):1360-1370.

Hoberg EP, Alkire NL, de Queiroz A, Jones A. Out of Africa: origins of the *Tania* tapeworms in humans. *Proc Biol Sci*. 2001; 268 (1469):781-787.

Hoberg E. Phylogeny of *Taenia*: species, definitions and origins of human parasites. *Parasitol Int*. 2006; 55:S23-S30.

Hu SM, Luo YL, Lai WY. Effects of dexamethasone on expression of Th17 transcription factor ROR γ mRNA in experimental asthma mice. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2009; 25(12):1115-1118.

Jiménez-Marcial ME, Velásquez-Pérez L. Morbidity at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez 1995-2001. *Gac Med Mex* 2004; 140(2):155-62.

Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina MT, Sotelo J. Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol*. 1990; 13(6):559-564.

Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina MT, Sotelo J. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J Clin Pharmacol*. 1992; 32(1):28-31.

Jung H, Cárdenas G, Sciutto E, Fleury A. Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8(5):424-433.

Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008; 123(3):326-328.

Kaushic C, Zhou F, Murrin AD, Wira CR. Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infect Immun*, 2000; 68(7):4207-4216.

Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, Raskin L, Desai B, Faubion WA, de Waal Malefyt R, Pierce RH, McClanahan T, Kastelein RA. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med*. 2009; 206(3):525-534.

Keiser PB, Nash TE. Prolonged perilesional edema after treatment parenchymal neurocysticercosis: Methotrexate as a corticosteroid-sparing agent. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(10):e122-126.

Kelly MN, Kolls JK, Happel K, Schwartzman JD, Schwarzenberger P, Combe C, Moretto M, Khan IA. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immunol*. 2005; 73(1):617-621.

Kipp M, Berger K, Clarner T, Dang J, Beyer C. Sex steroids control neuroinflammatory processes in the brain: relevance for acute ischemia and degenerative demyelination. *J Neuroendocrinol*. 2012; 24(1):62-70.

Kumar BS, Mohan A. Subcutaneous cysticercosis. *Indian J Med Res*. 2012; 136(1):102.

Kumar R, Prakash K, Jha S. Paradoxical response to chemotherapy in neurotuberculosis. *Pediatr Neurosurg*. 2006; 42(4):214-222.

Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico. *Salud Pública Mex*. 1992; 34(2):197-210.

Larralde C, de Aluja A (2006). *Cisticercosis: guía para profesionales de la salud*. Fondo de Cultura Económica, México.

Le Goff L, Lamb TJ, Graham AL, Harcus Y, Allen JE. IL-4 is required to prevent filarial nematode development in resistant but not susceptible strains of mice. *Int J Parasitol*. 2002; 32(10):1277-1284.

Lerner A, Shiroshi MS, Zee CS, Law M, Go JL. Imaging of neurocysticercosis. *Neuroimaging Clin N Am*. 2012; 22(4):659-676.

Lin L, Ibrahim AS, Xu X, Farber JM, Avanesian V, Baquir B, Fu Y, French SW, Edwards JE Jr, Spellberg B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog*. 2009; 5(12):e1000703.

Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, Rosenkrands I, Andersen P. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol*. 2009; 182(12):8047-55. doi: 10.4049/jimmunol.0801592

Lin YC, Rikihisa Y, Kono H, Gu Y. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Exp Parasitol* 1990; 70(3):344-352.

Lindenstrom T, Woodworth J, Dietrich J, Aagaard C, Andersen P, Agger EM. Vaccine-induced th17 cells are maintained long-term postvaccination as a distinct and phenotypically stable memory subset. *Infect Immun*. 2012; 80(10):3533-44. doi: 10.1128/IAI.00550-12

Londoño DP, Álvarez JI, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet Parasitol*. 2002; 109(3-4):249-259.

López-Gómez M, Castro N, Jung H, Sotelo J, Corona T. Optimization of the single-day praziquantel therapy for neurocysticercosis. *Neurology*. 2001; 57(10):1929-1930.

Magalhães LM, Villani FN, Nunes Mdo C, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis.* 2013; 207(4):661-665.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9):733-744.

Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, López-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, Ambrosio J, Kawa S, Flisser A. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol.* 2003; 89(6):1250-1254.

Márquez-Caraveo C, Góngora-Rivera F, Santos Zambrano J, Hernández R, Soto-Hernández JL. Pre-treatment with corticosteroids and a single cycle of high dose albendazole for subarachnoidal cysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004; 75(6):938-939.

Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC, Oliveira AL, Moura VB, Vinaud MC, Oliveira MA, Lino-Junior R de S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* in mice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012; 70(4):287-292.

Matsizaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(12):1139-1147.

Mbow M, Larkin BM, Meurs L, Wammes LJ, de Jong SE, Labuda LA, Camara M, Smits HH, Polman K, Dieye TN, Mboup S, Stadecker MJ, Yazdanbakhsh M. T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. *J Infect Dis.* 2013; 207(1):186-195.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T (H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007; 8(12):1390-1397.

Medina-Escutia E, Morales-López Z, Proaño JV, Vazquez J, Bermúdez V, Navarrete VO, Madrid-Marina V, Lacleste JP, Correa D. Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: lack of immune response. *J Parasitol.* 2001; 87(3):587-590.

Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J. Neurocysticercosis as the main cause of late onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med* 1990; 150(2):325-327.

Mellor AL, Antoniou J, Robinson PJ. Structure and expression of genes encoding murine Qa-2 class I antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(17):5920-5924.

Meneses G, Berzunza M, Becker I, Bobes RJ, Rosas G, Sciutto E, Fragoso G. *Taenia crassiceps* cysticercosis: variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in BALB/c substrains. *Exp Parasitol*

2009; 123(4):362-368.

Metenou S, Dembele B, Konate S, Dolo H, Coulibaly YI, Diallo AA, Soumaoro L, Colibaly ME, Coulibaly SY, Sanogo D, Doumbia SS, Traoré SF, Mahanty S, Klion A, Nutman TB. Filial infection suppresses malaria-specific multifunctional Th1 and Th17 responses in malaria and filarial coinfections. *J Immunol.* 2011; 186(8):4725-4733.

Mirfazaelian A, Dadashzadeh S, Rouini MR. Effect of gender in the disposition of albendazole metabolites in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002; 58(6):403-408.

Mitre E, Talaat KR, Sperling MR; Nash TE. Methotrexate as a corticosteroid-sparing agent in complicated neurocysticercosis. *Clin Infect.* 2007; 44(4):549-553.

Miyamoto M, Prause O, Sjöstrand M, Laan M, Lötval J, Lindén A. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. *J Immunol.* 2003; 170(9):4665-4672.

Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2010; 185(2):1150-1157.

Mont'Alverne Filho FE, Machado Ldos R, Lucato LT, Leite CC. The role of 3D volumetric MR sequences in diagnosing intraventricular neurocysticercosis: preliminary results. *Arq Neuropsiquiatr.* 2011; 69(1):74-78.

Morales-Montor J, Baig S, Mitchell R, Deway K, Hallal-Calleros C, Damian RT. Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization role of IL-6. *J Immunol* 2001; 167(8):4527-33.

Morales-Montor J, Hallal-Calleros C, Romano MC, Damian RT. Inhibition of p-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int J Parasitol* 2002; 32 (11):1379-1387.

Morales-Montor J, Chavarria A, De León MA, Del Castillo LI, et al. Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of female host supremacy paradigm. *J Parasitol* 2004; 90(3):531-546.

Morales-Montor J, Larralde C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology.* 2005; 131(Pt 3):287-294.

Mou Z, Jia P, Khandem F, Uzonna JE. Interleukin-17-mediated control of parasitemia in experimental *Trypanosoma congolense* infection in mice. *Infect Immun.* 2010; 78(12):5271-5279.

Nash TE, Singh G, White AC, Rajshekhar V, Loeb JÁ, Proaño JV, Takayanagui OM, González AE, Butman JA, DeGiorgio C, Del Brutto OH, Delgado-Escueta A, Evans CA, Gilman RH, Martínez SM, Medina MT, Pretell EJ, Teale J, García HH. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology*. 2006; 67(7):1120-1127.

Niederreiter L, Adolph TE, Kaser A. Anti-IL12/23 in Crohn's disease: bench and bedside. *Curr Drug Targets*. 2013; 14(12):1379-84.

Ostrosky-Zeichner L, García-Mendoza E, Rios C, Sotelo J. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch Med Res* 1996; 27(4):513-517.

Palafox-Fonseca H, Zúñiga G, Bobes RJ, Govezensky T, Piñero D, Texco-Martínez L, Fleury A, Proaño J, Cárdenas G, Hernández M, Sciutto E, Fragoso G. Genetic variation in the *Cytb* gene of human cerebral *Taenia solium* cysticerci recovered from clinically and radiologically heterogeneous patients with neurocysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 108(7):914-920.

Pandolfi J, Baz P, Fernández P, Discianni Lupi A, Payaslián F, Billordo L, Fainboim L, Arruvito L. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by dexamethasone. *Clin Immunol*. 2013; 149(3):400-410.

Peck A, Mellins ED. Precarious balance: Th17 cells in host defense. *Infect Immun*. 2010; 78(1):32-38.

Peón AN, Espinoza-Jiménez A, Terrazas LI. Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:498583.

Pollard DR, Woodward B, Gupta K. Strain and sex differences in serum-fetoprotein levels in *Mus musculus*. *Can J Genet Cytol*. 1982; 24(3):343-346.

Potter M, Wax J. Genetics of susceptibility to pristine-induced plasmacytomas in BALB/cAnN: Reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristine induced arthritis. *J Immunol*. 1981; 127(4):1591-1595.

Raghava MV, Prabhakaran V, Jayaraman T, Muliyl J, Oomen A, Dorny P, Vercruyse J, Rajshekhar V. Detecting spatial cluster of *Taenia solium* infections in a rural block in south India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104(9):601-612.

Ramírez-Aquino R, Radovanovic I, Fortin A, Sciutto-Conde E, Fragoso-González G, Gros P, Aguilar Delfin I. Identification of loci controlling restriction of parasite growth in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(12):e1435.

Rangel R, Torres B, Del Brutto O, Sotelo J. Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36(2):387-392.

Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, et al. Analysis of the immune lesion in neurocysticercosis patients: a central nervous system response to helminths appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol* 1998; 89:64-72.

Restrepo BI, Álvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 2001; 69:4554-4560.

Rodríguez-Contreras D, Skelly PJ, Landa A, Shoemaker CB, Lacleste JP. Molecular and functional characterization and tissue localization of 2 glucose transporter homologues (TGTP1 and TGTP2) from the tapeworm *Taenia solium*. *Parasitology*. 1998; 117(Pt 6):579-588.

Rodríguez-Sosa M, Satoskaar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun*.2002; 70(7):3656-3664.

Rodríguez V Jr, de-Mello FA, Magalhães EP, Ribeiro SB, Marquez JO. Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz Med Biol Res* 2000; 33(9):1059-1063.

Roggero E, Pérez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, Serra E, Revelli S, Bottasso. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol*. 2002; 128(3):421-428.

Romano SM, Fazly-Ann ZA, Loo SS, Hafiz MM, Hafiz MD, Iswadi MI, Kashiani P, Rosli MK, Syed-Shabthar SM, Md-Zain BM, Abas-Mazni O. Species identification of Malayan Gaur, Kedah-Kelantan and Bali cattle using polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism. *Genet Mol Res*. 2014; 13(1):406-414.

Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, García H, de Bittencourt PR, Trelles L, Arriagada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-França A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ*. 2000; 78(3):399-406.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(11):845-858.

Sáenz B, Ruíz-García M, Jiménez E, Hernández-Aguilar J, Suastegui R, Larralde C, Sciutto E, Fleury A. Neurocysticercosis: clinical, radiologic and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25(9):801-803.

Sáenz B, Fleury A, Chavarria A, Hernández M, Crispin JC, Vargas-Rojas MI, Fragoso G, Sciutto E. Neurocysticercosis: local and systemic immune-

inflammatory features related to severity. *Med Microbiol Immunol*. 2012; 201(1):73-80.

Sánchez M, Suástegui R, González-Esquivel D, Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic comparison of two albendazole dosage regimens in patients with neurocysticercosis. *Clin Neuropharmacol*. 1993; 16(1):77-82.

Sciutto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: TH-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 1991; 77(3):243-246.

Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*. 2000; 2:1875-1890.

Sciutto E, Cárdenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Larralde C, Fleury A. Human neurocysticercosis: immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes Infect*. 2013; 15(6-7):524-530.

Singh NP, Singh UP, Sing B, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) leads to reciprocal epigenetic regulation of FoxP3 and IL-17 expression and amelioration of experimental colitis. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23522.

Singh A, Singh AK, Sing SK, Paliwal VK, Gupta RK, Prasad KN. Association of ICAM-1K469E polymorphism with neurocysticercosis. *J Neuroimmunol*. 2014 Aug 2. Pii: S0165-5728 (14)00233-1 [Epub ahead of print]

Sikasunge CS, Johansen MW, Phiri IK, Willingham AL 3rd, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol*. 2009; 160(3-4):242-250.

Shi Y, Rodriguez M, Shahan K, Derman E. Subfamily of submaxillary gland-specific Mup genes: chromosomal linkage and sequence comparison with liver-specific Mup genes. *Nucleic Acids Res*. 1989; 203:17(15):6191-6203.

Sotelo J, Guerrero V, Rubio F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch Intern Med* 1985; 145(3):442-445.

Sotelo J, Jung H. Pharmacokinetic optimization of the treatment of neurocysticercosis. *Clin Pharmacokinet*. 1998; 34(6):503-515.

Sotelo J, Del Brutto OH. Brain cysticercosis. *Arch Med Res*. 2000; 31(1):3-14.

Stamos JK, Rowley AH, Hahn YS, Chadwick EG, Schantz PM, Wilson M. Neurocysticercosis: report of unusual pediatric cases. *Pediatrics*. 1996; 98(5):974-949.

Stanbury RM, Grahman EM. Systemic corticosteroid therapy—side effects and their management. *Br J Ophthalmol*. 1998; 82(6):704-708.

Suastegui Román RA, Soto-Hernández JL, Sotelo J. Effects of prednisone on ventriculoperitoneal shunt function in hydrocephalus secondary to cysticercosis: a preliminary study. *J Neurosurg*. 1996; 84(4):629-633.

Sundrud MS, Grill SM, Ni D, Nagata K, Alkan SS, Subramaniam A, Unutmaz D. Genetic reprogramming of primary human T cells reveals functional plasticity in the Th cell differentiation. *J Immunol*. 2003; 171(7):3542-3549.

Tallima H, Salah M, Guirguis FR, El Ridi R. Transforming growth factor-beta and Th17 responses in resistance to primary murine *Schistosomiasis mansoni*. *Cytokine*. 2009; 48(3):239-245.

Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. A role for 17 beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1994; 80(4):563-568.

Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol*. 2005; 35(13):1349-1358.

The comprehensive R Archive Network. <http://cran.r-project.org/>

Trakhtenberg EF, Golberg JL. Immunology. Neuroimmune communication. *Science*. 2011; 334(6052):47-48.

Van de Veerdonk FL, Joosten LA, Shaw PJ, Smeekens SP, Malireddi RK, van der Meer JW, Kullberg BJ, Netea MG, Kanneganti TD. The inflammasome drives protective Th1 and Th17 cellular responses in disseminated candidiasis. *Eur J Immunol*. 2011; 41(8):2260-2268.

Vargas-Parada L, Solís CF, Laclette JP. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitology*. 2001; 122(Pt 5):583-588.

Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, De León-Nava MA, Morales-Montor J. Regulation of the immune response to cestode infection by progesterone is due to its metabolism to estradiol. *Microbes Infect* 2005; 7(3):485-493.

- Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, Morales-Montor J. Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis. *Parasite Immunol.* 2006; 28(12):667-674.
- Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Sciutto E, Larralde C, Fragoso G. Population genetic profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol* 2003; 33(13):1479-1485.
- Veldhoen M, Stockinger B. TGF-beta1, a “Jack of all trades”: the link with pro-inflammatory IL-17 producing T cells. *Trends Immunol.* 2006; 27(8):358-361.
- Venkatesan P. Albendazole. *J Antimicrob Chemother.* 1998; 41(2):145-147.
- Verma A, Prasad KN, Gupta RK, Singh AK, Nyati KK, Rizwan A, Pandey CM, Paliwal VK. Toll-like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 2010; 202(8):1219-1225.
- Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(6):983-993.
- Willms K, Caro JA, Robert L. Ultrastructure of spermatogonia and spermatocyte lobules in *Taenia solium* strobilae (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. *Parasitol Res.* 2003; 90(6):479-488.
- Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *J Am Stat Assoc.* 2004; 99: 909-917.
- Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A, Larralde C. Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J Parasitol.* 1982; 68(1):39-47.
- Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, Schwarzenber P, Shellito JE, Kolls JK. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(3):335-340.
- Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:698313. doi:10.1155/2014/698313
- Zuñiga LA, Jain R, Haines C, Cua DJ. Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol Rev.* 2013; 252(1):78-88.

14. ANEXO 1: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, DF, a ____ de _____ 20____
 Protocolo

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente manifiesto que he sido invitado a participar en el proyecto de investigación sobre ***Determinación de la respuesta inflamatoria asociada al tratamiento de la neurocisticercosis subaracnoidea: Implicaciones patogénicas y terapéuticas***

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.

La neurocisticercosis es una enfermedad frecuente en México, ocasionada por el parásito *Taenia solium*, la cual se transmite por la ingestión de los huevecillos. Una vez ingerido, el parásito se disemina a distintas áreas incluyendo el sistema nervioso central ocasionando diferentes síntomas como epilepsia, parálisis, alteraciones de la sensibilidad e hidrocefalia (acumulación de líquido cefalorraquídeo). El tratamiento de esta patología requiere en muchas ocasiones la colocación de sistemas de derivación ventrículo-peritoneales para drenaje y ameritan hospitalización para el tratamiento de los síntomas y para la erradicación del parásito con albendazol y esteroides.

Diferentes estudios han mostrado en estudios en animales que el estado hormonal de los especímenes favorece la infestación por cisticercos de tenia. Los mecanismos involucrados son por ahora no están completamente dilucidados pero ciertas evidencias sugieren el posible papel de las hormonas: estrógenos y cortisol. La influencia de estos factores hormonales en la neurocisticercosis no ha sido estudiada por el momento aunque estudios previos han mostrado que las mujeres (tal vez por los estrógenos) presentan las formas más graves de la neurocisticercosis presentan asimismo mayor nivel de inflamación. Proponemos en este estudio evaluar la influencia de factores hormonales en la heterogeneidad de la neurocisticercosis.

Para esto se me ha explicado que se me tomarán muestras de sangre y LCR, y así mismo se aplicarán cuestionarios para valorar el nivel de estrés, todo esto con el fin de establecer la influencia de los factores hormonales en la neurocisticercosis, determinando las diferencias que existen en la respuesta inmune en estas patologías.

Por lo anterior, yo: _____
 como paciente o yo
 como

representante legal, en uso de mis facultades, libre, voluntariamente y sin presiones de ninguna índole, declaro que he sido debidamente informado por los médicos investigadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" acerca del procedimiento de tomas de muestras y de las medidas del tratamiento. He recibido información verbal durante la entrevista sobre la naturaleza del propósito, beneficios, riesgos y alternativas de este procedimiento, así como de los medios con el que cuenta el hospital para realizarlo, y otorgo mi consentimiento previamente informado para que me sea realizado el procedimiento.

Hoja 2.

Autorizando lo siguiente:

1. A los médicos, tomar las muestras indicadas de sangre y líquido cefalorraquídeo en los tiempos expuestos en el calendario de tomas de muestras.
2. Comprometerme a estar pendiente de las citas de seguimiento por la consulta externa de este instituto.
3. A las Dras. Agnès Fleury y Graciela Cárdenas Hernández, neurólogas e investigadoras de este Instituto, permiso para realizar los procedimientos y planes terapéuticos mencionados.

El grupo de investigación está particularmente interesado en:

Determinar:

- Si el estado hormonal influye en el tipo de presentación de la neurocisticercosis.
- Así como los posibles mecanismos involucrados.

Sé que mediante la participan en el estudio podré ayudar a responder las preguntas planteadas por los investigadores y de alguna forma ayudar a que otros pacientes se vean beneficiados de los resultados del estudio. Estoy en libertad de terminar mi participación en este estudio en el momento que desee y esto no afecta en la atención de mi padecimiento con los mejores estándares médicos y humanos. He hablado con las Dras. Agnès Fleury y Graciela Cárdenas H, quienes me han aclarado todas mis preguntas, en caso de que me surgiera alguna duda más podré comunicarme con los investigadores a los teléfonos 56063822 extensiones 2550, 2052 o 2014. Con la firma en la línea de abajo acepto participar en el estudio del que se me ha explicado y acepto los riesgos y beneficios que esto implica.

Norma y firma del familiar responsable

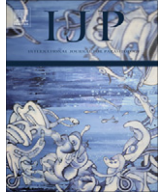
Nombre y firma testigo 1

Nombre y firma testigo 2

Nombre y firma del médico que realizo la discusión de este documento

Nombre y firma del investigador principal.

15. ANEXO 2: ARTÍCULOS PRODUCIDOS DURANTE EL DOCTORADO



Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters

Graciela Cárdenas^a, Ricardo Valdez^b, Brenda Sáenz^c, Oscar Bottasso^d, Gladis Fragoso^c, Edda Scitutto^c, Marta C. Romano^{b,*,1}, Agnès Fleury^{a,c,*,1}

^a Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico

^b CINVESTAV, Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Mexico

^c Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

^d Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2011

Received in revised form 18 November 2011

Accepted 21 November 2011

Available online 26 December 2011

Keywords:

Neurocysticercosis

Taenia solium

Hormones

Cytokines

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC) is a parasitic disease caused by the infiltration of the larval stage of *Taenia solium* in the central nervous system. Clinical presentations are heterogeneous and particularly depend, on the age and gender of the host. We designed a clinical study to evaluate the hormonal changes associated with neurocysticercosis and the relationships between disease heterogeneity, endocrine and immunological status. A total of 50 patients and 22 healthy subjects were included. A precise clinical and radiological description of disease for each patient was recorded. A broad hormonal profile was assessed for each participant and, in a sub-group of patients, immunological features were also evaluated. Compared with controls, all patients had lower dehydroepiandrosterone (DHEA) concentration; male patients also had lower concentrations of 17 β -estradiol and higher concentrations of luteinising hormone (LH). In the clinically severe patients, lower concentrations of progesterone and androstenedione were found in women. Higher concentrations of follicle stimulating hormone (FSH) and lower concentrations of testosterone were found in men when compared with the less clinically severe patients. Significant correlations were found between estradiol and IL-10 in male patients, and between dehydroepiandrosterone (DHEA) and IL-1 β , and androstenedione and IL-17 in female patients. To our knowledge the present study constitutes the first demonstration that the presence of *T. solium* larvae in the central nervous system can modify the host environment by the induction of endocrine and immunological changes. These results provide a stimulating background to analyse the repercussions of these changes on the course of the disease and on patient reproductive health.

© 2012 Australian Society for Parasitology Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human neurocysticercosis (NC) is a parasitic disease caused by the installation of the larval stage of *Taenia solium* in the CNS. NC exhibits a clinically heterogeneous picture ranging from asymptomatic to a severe neurological syndrome (Scitutto et al., 2000; García et al., 2003).

Cysticerci localization in the CNS and the intensity of the inflammatory reaction are two factors clearly related to the clinical severity of the disease (Fleury et al., 2004; Chavarría et al., 2005).

Inflammatory reaction intensity is influenced by the host's sex and age; compared with men, women exhibit a higher inflammatory reaction (Del Brutto et al., 1998; Fleury et al., 2004). Young women more frequently present a severe clinical presentation caused by multiple degenerating cysticerci in the parenchyma (Rangel et al., 1987). The prevalence of damaged cysticerci is significantly higher in women than in men (Romero et al., 2007). Children present a lower NC frequency and a lower frequency of severe forms of the disease (Sáenz et al., 2006). Also, vesicular parasites are more frequent in elderly hosts (Fleury et al., 2004).

Cysticercosis prevalence can be affected by the hormonal status of the host. Castration and pregnancy in pigs increase cysticercosis prevalence (Morales et al., 2002). Once infected, cysticercosis modifies the hormonal levels of pigs with increased concentrations of testosterone and 17 β -estradiol (E2) (Peña et al., 2007). Moreover, in vitro studies have shown that human chorionic gonadotropin (hCG) effectively promotes cysticercal evagination and *T. solium* tapeworm elongation (Díaz-Orea et al., 2007). The finding that

* Corresponding authors at: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México, Insurgentes Sur 3877, Delegación Tlalpan, 14269 Mexico DF, Mexico. Tel./fax: +52 55 5606 3822. (A. Fleury); Dpto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, Apdo. Postal 14-740, 07360 México DF, Mexico. Tel./fax: +52 55 57473 800. (M.C. Romano).

E-mail addresses: mromano@fisio.cinvestav.mx (M.C. Romano), afleury@biomedicas.unam.mx (A. Fleury).

¹ These authors contributed equally to the study and manuscript.

T. solium is also able to synthesise sex steroid hormones adds complexity to the host–parasite interactions (Jiménez et al., 2006; Valdez et al., 2006; Fernández Presas et al., 2008; Romano et al., 2008).

The present study investigated whether hormones involved in reproduction and stress are affected by the presence of parasites in the human brain. Immunological changes accompanying different clinical and radiological forms of human NC were also explored.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Fifty NC patients attending the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) in Mexico City, Mexico and 22 healthy subjects (controls) were recruited between August 2005 and October 2007. The controls were employees of the INNN who did not suffer from any diseases and had not taken any medication.

None of the NC patients had previously received any specific cysticidal treatment or anti-inflammatory drugs (corticosteroids). A venous sample was taken between 7:00 and 10:00 am from each participant. A sample of CSF was also collected from patients who required a lumbar puncture for medical reasons. Cysticercus number, stage and localisation were radiologically defined and the clinical manifestations of all patients were retrieved.

Patients were clinically classified regarding the presence or absence of intracranial hypertension (headache, nausea or vomit and papilledema upon fundoscopic examination), one of the most severe clinical NC presentations. Although other symptoms (for example uncontrolled generalised seizures or chronic meningitis) can also be clinically severe, in this study none of the patients presented such symptoms. For this study, patients with intracranial hypertension were considered as “clinically severe”. Radiologically, patients were classified regarding the presence or absence of multiple vesicular parasites localised in the subarachnoid space at the base of the skull, which represents one of the most severe radiological presentations.

2.2. Ethical considerations

This study fulfilled the research regulations for human beings required by Mexican laws and International regulations as well as ethical aspects considered in the General Rules of Health for Clinical Investigation. The protocol was approved by the INNN Ethical Committee. Patients were instructed on the aims of the study and gave informed consent.

2.3. Hormonal profiles

Shortly after blood collection, serum was separated and maintained at -20°C until required. The concentration of the following hormones was measured by radioimmunoanalysis (RIA) using ^{125}I tracers kits: testosterone (TESTO-CT2), 17β -estradiol (E2, ESTRICTRIA), luteinising hormone (LH) (RIA-gnost hLH), follicle stimulating hormone (FSH) (RIA-gnost hFSH), prolactin (RIA-gnost PROL), cortisol (CORT-CT2), all from CIS-bio International (Gif sur Yvette, France) and dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S, “coat-a-count” kit, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, USA) which were measured in men. E2, progesterone (PROG-CTRIA, CIS-bio International), DHEA-S, LH, FSH, prolactin, androstenedione (A4) (RIAZENco Zentech, Liege Science Park, Belgium) and cortisol concentrations were measured in women. The detection limits were: E2, 8 pg/mL; progesterone, 0.05 ng/mL; cortisol, 4.6 nmol/L; A4, 0.05 ng/mL; testosterone, 0.1 nmol/L; DHEA-S, 5 ug/dL; LH 0.15 mUI/mL; FSH, 0.10 mUI/mL and prolactin, 5 uIU/mL.

2.4. In vitro cytokine titration

A total of 2.5×10^6 of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) per mL per well were stimulated with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of *T. solium* antigen and plated in 12 cluster plates (Costar), and incubated at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. After 48 h (for IL6, IL10, TGF β , TNF α) and 120 h (for IL1 β , IL17, IFN γ), the culture supernatants (SN) were harvested and stored at -80°C until required for cytokine quantification.

Cytokine titration in SN and CSF was determined using a commercial sandwich ELISA kit (BD Pharmingen Cytokine Sets, CA, USA; eBioscience; R&D Duo-Set, UK). Sensitivity levels were 9.4 pg/mL for all cytokines.

2.5. Statistical analysis

All data were recorded in Excel software and analysed using SPSS version 10 software. Quantitative variables were expressed as mean and S.D., or median and 25th–75th percentile values, and compared using the two-tailed Student's *t*, ANOVA, Mann-Whitney or the Kruskal–Wallis tests. Qualitative variables were expressed in percentages and compared using χ^2 . Parametric or non-parametric statistics were employed according to the size of the sample and data distribution. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. General characteristics of patients and controls

Fifty patients participated in this study; 21 women (18–61 years, mean: 37.3 ± 11.8 years) and 29 men (21–65 years, mean: 41 ± 12.5 years). Twenty-two healthy non-NC subjects were also included as controls, 13 women (mean: 35.5 ± 10.1 ranging from 25–52 years) and nine men (mean: 37.1 ± 9.8 ranging from 30–60 years). Age was not significantly different between patients and controls ($P = 0.33$ for men and $P = 0.67$ for women).

Eight women (six patients and two controls) were considered as potentially menopausal based on their clinical story and hormone profiles, and were not considered for the female analysis of LH, FSH, E2 and progesterone. Thereafter, for sex steroid hormone analysis the mean age of female patients was 31.2 ± 7 , while the mean age of female controls was of 32.9 ± 8.8 ($P = 0.58$).

3.2. Clinical and radiological presentation of patients

As shown in Table 1, intracranial hypertension was not present in 31 of the 50 (62%) patients included in this study. Severe radiological presentation with multiple vesicular parasites located in the basal cisterns or in the ventricular space was demonstrated by 27 of the 50 (54%) NC patients. No significant differences between men and women were found regarding clinical or radiological criteria. In addition, clinically severe forms occurred at an age significantly older than the non-severe presentations (mean: 43.9 ± 14.1 versus 36.7 ± 10.3 , $P = 0.04$).

3.3. Differences in hormonal status between patients and controls

As shown in Table 2, male NC patients exhibited significantly lower concentrations of E2 (mean 21 ± 10 versus 30.4 ± 8.2 , $P = 0.02$) and DHEA (mean 132.4 ± 107 versus 251.6 ± 102 , $P = 0.006$), and higher LH concentrations (mean 6.5 ± 11 versus 2.2 ± 2.2 , $P = 0.02$) than healthy controls.

Table 1
Clinical and radiological descriptions of neurocysticercosis (NC) patients included in this study.

	Women (n = 21)	Men (n = 29)	P
Age (years)	7.3 ± 11.8 ^a	41 ± 12.5	0.29
<i>Clinical presentation</i>			
Not severe	12 (57.1) ^b	19 (65.5)	0.57
Severe	9 (42.9)	10 (34.5)	
<i>Radiological presentation</i>			
Not severe	7 (33.3)	16 (55.2)	0.16
Severe	14 (66.7)	13 (44.8)	
Number of cells/mm ³ in the CSF	25.8 ± 38.6	34.9 ± 40.9	0.44

^a Mean ± S.D.^b Number of patients (percentage of patients).**Table 2**
Hormonal differences between neurocysticercosis (NC) patients and healthy controls.

Hormones	Men			Women		
	Patients	Controls	P	Patients	Controls	P
LH (mUI/mL) ^b	6.5 ± 11 ^a	2.2 ± 2.2	0.02	4.6 ± 6.4	7.5 ± 6.7	0.28
FSH (mUI/mL) ^b	7.8 ± 15	4 ± 1.9	0.13	3.6 ± 2.8	3.4 ± 2.3	0.86
Prolactin (uIU/mL)	370.5 ± 373	182 ± 107	0.15	407.6 ± 483	381.1 ± 372	0.87
DHEA (ug/dL)	132.4 ± 107	251.6 ± 102	0.006	95.4 ± 99	158.3 ± 69	0.05
Cortisol (nmol/L)	221.7 ± 208	257 ± 83	0.47	304.6 ± 252	432.4 ± 191	0.13
Estradiol (pg/mL) ^b	21 ± 10.5	30.4 ± 8.2	0.02	46.3 ± 54.2	85.7 ± 78.6	0.15
Progesterone (ng/mL) ^b	ND	ND		1.8 ± 5.7	6 ± 11.7	0.15
Testosterone (nmol/L)	16.4 ± 9.5	17.2 ± 4.9	0.78	ND	ND	
Androstenedione (ng/mL)	ND	ND		0.45 ± 1.3	1.5 ± 2.5	0.19

LH, luteinising hormone; FSH follicle stimulating hormone; ND: not determined.

Bold indicates significant differences ($P \leq 0.05$).^a Mean ± S.D.^b Hormones levels in pre-menopausal women only.

In women, DHEA concentrations were significantly lower in NC patients than in healthy controls ($P = 0.05$). No significant differences were found in the other measured hormones.

3.4. Differences in hormonal concentrations between clinically and radiologically severe and non-severe NC patients

In clinically severe male patients, significantly decreased serum testosterone concentrations (9.7 ± 6 nmol/L versus 19.6 ± 9 nmol/L, $P = 0.007$) and significantly increased FSH concentrations (14.5 ± 26 mUI/mL versus 4.7 ± 2 mUI/mL, $P = 0.05$) were observed compared with non-severe patients (Table 3). Moreover, lower E2 concentrations were detected in severe (16.3 ± 9 pg/mL) than in non-severe patients (23.4 ± 10 pg/mL) albeit non-statistically significant ($P = 0.09$). No significant differences in other hormonal concentrations were found between radiologically severe and non-severe male patients (Table 3).

In women, clinically severe patients exhibited significantly lower progesterone (0.07 ± 0.1 ng/mL) and A₄ concentrations (0.08 ± 0.09 ng/mL) than non-severe patients (3.5 ± 7.9 ng/mL, $P = 0.03$, and 0.74 ± 1.7 ng/mL respectively, $P = 0.01$).

Different hormone concentrations were also found when comparing healthy controls with severe and non-severe patients of both sexes, classified both clinically and radiologically. As shown in Fig. 1, male patients displayed a significant decrease in DHEA and E2 concentrations as clinical severity increased ($P = 0.018$ and $P = 0.015$ compared with controls, respectively). Increased radiological severity in men was also accompanied by a significant increase in LH ($P = 0.038$) and a nearly significant decrease in E2 ($P = 0.07$). In women, a significant decrease in progesterone concentrations was observed as clinical severity increased compared with controls ($P = 0.027$).

No significant correlation was found between CSF cellularity and the studied hormones regardless of patient classification according to sex or disease severity.

3.5. Relation between cytokine profile and NC presentations

As Table 4 shows, radiologically severe NC patients (multiple vesicular parasites located in basal cisterns or ventricles) presented higher IL-1 β concentrations in SN (50 – 127 pg/mL) with respect to non-severe patients (23.4 – 23.4 pg/mL, $P = 0.003$). Radiologically severe patients also exhibited higher IL-10 concentrations in CSF (34 – 225 pg/mL versus 9.4 – 41 pg/mL; $P = 0.004$). No statistically significant differences in the other cytokines were found between severe and non-severe patients.

3.6. Correlations between hormones and cytokines

Correlations between the serum hormonal and cytokine concentrations in SN or CSF were assessed. A significant negative correlation between E2 and IL-10 in CSF was detected in male patients ($n = 14$, $r = -0.53$, $P = 0.049$). Among women, significant positive correlations were observed between DHEA and IL-1 β in SN ($n = 7$, $r = 0.77$; $P = 0.04$) and between A4 and IL-17 in SN ($n = 8$, $r = 0.86$; $P = 0.006$).

No significant correlations were found between other pairwise tested hormones and cytokines.

4. Discussion

In this study, differences between the hormonal profiles (sex-steroid hormones, gonadotropins, prolactin and cortisol) that accompany NC of different clinical and radiological severity were assessed. It is relevant to examine this aspect of NC as the disease

Table 3
Differences in the hormonal levels between clinical and radiological severe and non-severe neurocysticercosis (NC) patients.

Hormones	Radiological			Clinical		
	Severe	Non-severe	<i>P</i>	Severe	Non-severe	<i>P</i>
<i>Men</i>						
LH (mUI/mL)	10 ± 15.8 ^a	3.8 ± 2.4	0.17	9.4 ± 17.3	5 ± 5.7	0.48
FSH (mUI/mL)	11.5 ± 23	5.1 ± 2.4	0.8	14.5 ± 25.9	4.7 ± 2.4	0.05
Prolactin (uIU/mL)	360 ± 151	379 ± 490	0.9	256 ± 172	428 ± 434	0.27
DHEA (ug/dL)	148 ± 128	121 ± 91	0.66	110.4 ± 88	143 ± 116	0.47
Cortisol (nmol/L)	220 ± 198	223 ± 221	0.98	205 ± 190	229 ± 220	0.78
Estradiol (pg/mL)	20.7 ± 13.7	21.2 ± 8	0.89	16.3 ± 9	23.4 ± 10	0.09
Testosterone (nmol/L)	14 ± 11.7	18.3 ± 7	0.25	9.7 ± 5.7	19.6 ± 9	0.007
<i>Women</i>						
LH (mUI/mL) ^b	3.6 ± 6.1	7.8 ± 7	0.11	4.6 ± 6.7	4.4 ± 6.6	1
FSH (mUI/mL) ^b	3.2 ± 2.8	5.4 ± 2	0.2	4.2 ± 2.6	3.0 ± 3.1	0.38
Prolactin (uIU/mL)	360 ± 381	494 ± 664	0.6	582 ± 638	252 ± 229	0.37
DHEA (ug/dL)	104 ± 106	78.9 ± 87	0.6	92.1 ± 109	97.9 ± 96	0.92
Cortisol (nmol/L)	267 ± 250	386 ± 258	0.28	222 ± 269	379 ± 222	0.28
Estradiol (pg/mL) ^b	50.4 ± 69	36 ± 23.8	0.66	50.0 ± 79.4	43 ± 21.1	0.23
Progesterone (ng/mL) ^b	2.7 ± 7	0.1 ± 0.09	0.49	0.07 ± 0.1	3.5 ± 7.9	0.03
Androstenedione (ng/mL)	0.6 ± 1.5	0.1 ± 0.07	0.45	0.08 ± 0.09	0.74 ± 1.7	0.01

LH, luteinising hormone; FSH, follicle stimulating hormone; DHEA, Dehydroepiandrosterone.

Bold indicates significant differences ($P \leq 0.05$).

^a Mean ± S.D.

^b Hormones levels determined only in pre-menopausal women.

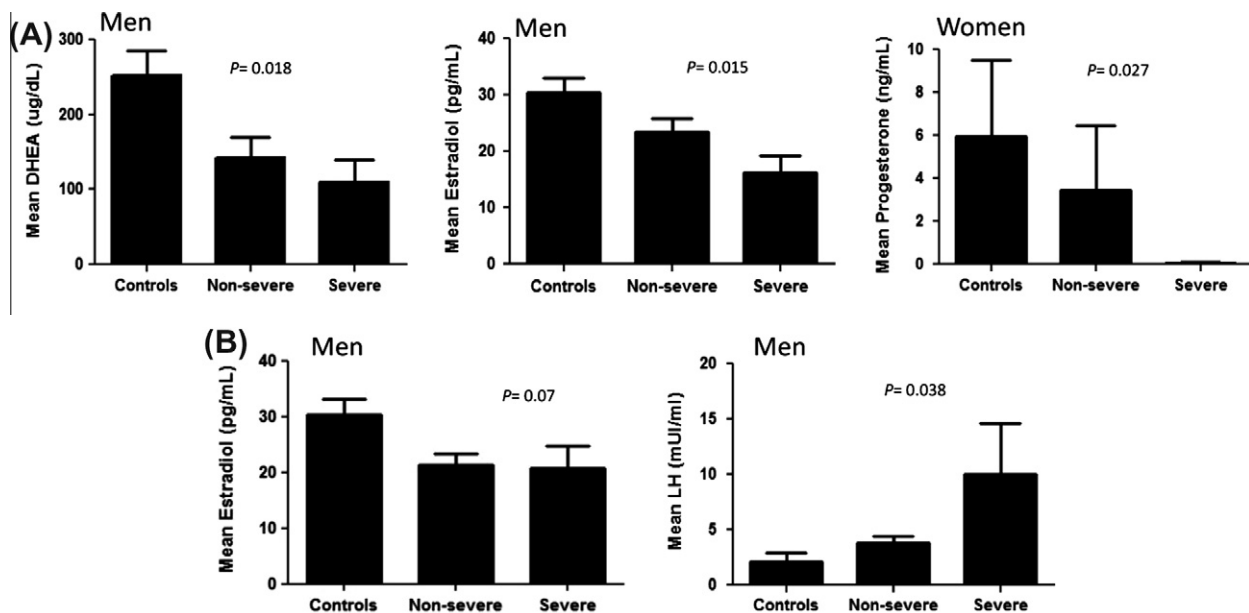


Fig. 1. Dehydroepiandrosterone (DHEA), 17 β -estradiol, progesterone and luteinizing hormone (LH) concentrations in controls and in neurocysticercosis (NC) patients classified by (A) clinical and (B) radiological criteria according to disease severity. Data indicate media ± S.E.M.

affects the CNS, co-exists with clear immune-inflammatory changes, and presents gender- and age-associated differences both in clinical and radiological terms.

Alterations of the hormonal status during infections are not rare. Among the factors that may account for those are stress and infection-associated cytokine release (Papadimitriou and Pfriftis, 2009; Pérez et al., 2009). The stress response is mediated by the stress system that involves the CNS and peripheral organs (Chrousos, 2009). Due to the presence of inflammation, pain and other severe symptoms, neurological diseases cause chronic stress that result in the impaired function of several systems. Disruption of gonadal functions by chronic stress has been described and is the result of central and peripheral actions of hormones, proinflammatory cytokines and adipokines that inhibit the hypothalamus–pitu-

itary–gonadal (HPG) axis at various levels (Kyrou and Tsigos, 2008; Chrousos, 2009). On the other hand, it is also known that chronic stress can have a major impact on different neurological diseases, for example neurodegenerative and mental disorders, and plays a significant role in susceptibility, progress and outcome of these diseases. The hypersecretion of glucocorticoids occurring in these diseases is probably one of the mechanisms involved (Chrousos, 2009; Sotiropoulos et al., 2011). Moreover, in infectious and neurological diseases, alterations of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, the HPG axis, or a direct involvement of gonads or adrenal glands may occur.

Alterations in gonadal steroid production have been described in several parasitic infections and diverse hosts. Changes in E2 concentration have been shown in mice challenged with *Taenia crassi-*

Table 4
Cytokine profile in neurocysticercosis (NC) patients with severe and non-severe clinical and radiological presentation.

Cytokine (pg/mL)	Radiological			Clinical		
	Severe	Non-severe	P	Severe	Non-severe	P
IL-1 SN	88.5 (50–127)(9) ^a	23.4 (23.4–23.4)(4)	0.003	51.2 (31–93)(7)	55.9 (23–676)(6)	0.94
CSF	35.6 (23–49) (14)	23.4 (23.4–23.4) (12)	0.14	35.6 (23–49)(10)	23.4 (23–25) (16)	0.34
IL-6 SN	252 (56–692) (18)	117.8 (21–579)(13)	0.49	98.5 (34–429)(13)	379.9 (51–748) (18)	0.13
CSF	124 (9–243) (14)	14 (9–177)(12)	0.41	38.2 (9–184)(9)	92.0(9–272) (17)	0.44
IL-10 SN	59.6 (9–569)(18)	9.4 (9.4–353)(13)	0.39	9.4 (9.4–592) (13)	36.8 (9–207)(18)	0.77
CSF	69 (34–225) (14)	9.4 (9.4–41) (13)	0.004	54.3 (19–69) (9)	112 ± 158 (18)	0.67
IL-17 SN	19.7 (9–31) (11)	15.8 (10–25)(4)	1	15.7 (10–29) (8)	19.9 (9–26) (7)	0.87
CSF	35.6 (9–85) (13)	9.4 (9.4–9.4)(7)	0.22	13.3 (9–21) (8)	9.4 (9–13) (12)	0.38
IFN- γ SN	45.8 (23–78) (9)	167.4 (58–193)(4)	0.15	48.2 (39–93) (7)	92.8 (23–178)(6)	0.94
CSF	175 (23–207) 14)	23.4 (23–146)(12)	0.23	181.6 (23–207)(10)	23.5 (23–182)(16)	0.45
TGF- β SN	37.6 (9–85) (11)	9.4 (9.4–212)(4)	0.18	20.5 (9–71)(8)	77.5 (9–280) (7)	0.46
CSF	9.4 (9.4–9.4) (13)	9.4 (9.4–9.4) (7)	1	9.4 (9.4–9.4)(8)	9.4 (9.4–9.4) (12)	0.68
TNF- α SN	9.4 (9.4–9.4) (11)	9.4 (9.4–9.4) (4)	0.85	9.4 (9.4–9.4) (8)	9.4 (9.4–9.4) (7)	0.71
CSF	9.4 (9.4–9.4) (13)	9.4 (9.4–9.4) (7)	0.82	9.4 (9.4–9.4) (8)	9.4 (9.4–9.4) (12)	0.77

SN, culture supernatants after specific stimulation of mononuclear cells with *Taenia solium* antigens.

Bold indicates significant differences ($P \leq 0.05$).

^a Median (25–75% percentile values) (number of samples tested).

ceps (Larralde et al., 1995), as well as in *Plasmodium vinckei petterii* infections induced in mice (Barthelemy et al., 2003), in *Ligula intestinalis* infections induced in fish (Trubiroha et al., 2010), and in human filariasis (Mavoungou et al., 2005). Variations in testosterone concentrations have been described in infections with *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* in humans (Barthelemy et al., 2004; Leal et al., 2006; Rey et al., 2007). In addition, ovarian dysfunction was reported in a woman diagnosed with NC (Choudhry S, Mejía J, Bahtiyar G, Mejía J, Sacerdote A., 2009. Endocrine Disruptor Effects of Central Nervous System Cysticercosis; Induction of Polycystic Ovarian Syndrome. Presented at the Endocrine Society 91st Annual Meeting, June 2009, Washington D.C., USA).

The data found in this study point to the involvement of the HPG axis and to a probably primary gonadal failure in NC patients. This latter alteration seems to predominate in men, who showed a decrease in E2 with an increase in LH, together with decreased testosterone and E2 levels, and the increase in FSH detected in severe patients. These alterations may be the result of an inhibitory effect of some molecules participating in the inflammatory reaction that accompanies progression of the disease (Kalyani et al., 2007). For example, significantly higher IL-1 levels in the SN of severe patients can act negatively on testicular function (Tsigos et al., 1999; Garcia et al., 2006). No significant negative correlation between IL-1 and testosterone was found in this study, but this may be due to the small number of patients (six) in which both features were measured. Also, it is possible that the lack of correlation between this cytokine and testosterone may be in part attributed to the fact that cytokines were measured in vitro, when blood immune cells are no longer in their natural environment where they are exposed to steroid concentration changes caused by the disease. On the other hand, decreased testosterone concentrations may be participating in the maintenance of the inflammatory reaction since testosterone is considered an anti-inflammatory hormone, as it reduces co-stimulatory factors expressed by antigen-presenting cells, induces the suppression of inflammatory cytokines (Klein, 2004), and increases the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Liva and Voskuhl, 2001). This is an important result since inflammation is the most critical sign of NC severity. The findings of the present study present new prospects to manage and control the inflammatory response in NC. Decreased E2 levels found in the entire group of male patients in the presence of preserved levels of testosterone may be the consequence of diminished testosterone aromatisation to E2 by the P-450 aromatase enzyme, as aromatisation is influenced by different cytokines (Lambard et al., 2005).

In women, clear involvement of ovarian function (decrease of progesterone and A4 concentrations) was found in severe patients. Considering our results, it could not be ascertained whether NC directly affects the ovarian functions or the HPG axis. However, some findings argue in favour of an HPG axis engagement since changes in ovarian hormones did not correlate with changes in pituitary hormones. Mediators involved in the patients' inflammatory reaction, either local or systemic, may account for suppression of the HPG axis. Support for this premise comes from the correlation of A4-IL-17 found in female patients, and the raised IL-1 β and IL-10 levels registered in SN and CSF, respectively, in the entire group of severe patients. On the other hand, evidence of a direct effect on ovaries is supported by the normal prolactin levels, which suggest that at least part of the pituitary gland was working properly. Additionally, the lack of significant gonadotropin differences between patients and controls may be due to the natural cyclic hormonal variations in women, which introduced a large dispersion in the results. The significant variations in progesterone levels suggest that most NC patients, particularly the severe cases, could present ovulation failure and thus probably be infertile during the active infection.

Regarding the adrenal function, significantly decreased DHEA concentrations were found in both male and female patients together with no significant changes in cortisol levels. Such findings are partly in line with data from patients with leprosy (Leal et al., 2003) and tuberculosis (Botasso et al., 2007). Serum cortisol concentrations found in patients and controls in the present study cannot be considered as basal because non-invasive methods should be employed to obtain these measurements (Romano et al., 2010). However, cortisol levels showed no differences between patients and controls, which at least discard the premise of a profound compromise of the glomerular layer of the adrenal gland. DHEA production may have been affected by cytokines released by immunocompetent cells that can act on the hypothalamus, on the pituitary or even directly on the adrenal glands. A shift in adrenal steroid synthesis, away from adrenal androgens and toward the essential cortisol pathway may occur, as enzymes involved in steroidogenesis are modulated by different cytokines (Herrmann et al., 2002). The link between cytokine and hormone synthesis is illustrated by the positive correlation between IL-1 and DHEA found in women. It is also possible that the normal levels of cortisol are related to the chronicity of the clinical distress experienced by patients (Van den Berghe, 2002). Although information on duration of symptoms before inclusion of the patients in this study was not available, the time between the onset of symptoms and hospital consultation is usually long.

One point deserving attention is the poor association between the hormonal profile and radiological criteria. Instead, results indicate that the clinical criteria of severity are more clearly related to hormonal changes. The poor correlation between clinical and radiological features is striking upon patient examination. In fact, it is common to see patients with a large parasite burden and few symptoms, and patients with a small parasite load but with significant clinical distress when critical cerebral areas are affected. This result could indicate that the ailment caused by the neurological affliction may be more important than the parasitosis itself in the genesis of hormonal alterations.

It is also interesting to note that the most salient differences were recorded in men. Data obtained on female menstrual phases were not consistent enough. However, the clear differences in progesterone concentrations found in the study strongly suggest that the reproductive cycle was altered.

To the best of our knowledge, the present study constitutes the first known demonstration of immuno-endocrine alterations in NC patients. Results of this study show the complex immune-endocrinological relationships that underlie NC pathogenesis, and provide a stimulating background to analyse the repercussion of these changes on the course of the disease and in patient reproductive health.

Acknowledgements

We thank Marisela Hernandez for technical support. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico Grant No: 2006-67444, 2008-86527, and Salud-2007-CO169347. CONACYT was not involved in the study design; collection, analysis and interpretation of data; writing of the report; or in the decision to submit the article for publication.

References

- Barthelemy, M., Vuong, N., Gabrion, C., Petit, G., 2003. Oestrus cycle perturbations and hypotrophy of clitoral glands in malaria-infected female BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 89, 134–140.
- Barthelemy, M., Gabrion, C., Petit, G., 2004. Reduction in testosterone concentration and its effect on the reproductive output of chronic malaria-infected male mice. *Parasitol. Res.* 93, 475–481.
- Botasso, O., Bay, M.L., Besedovsky, H., del Rey, A., 2007. The immune-endocrine component in the pathogenesis of tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 66, 166–175.
- Chavarría, A., Fleury, A., García, E., Márquez, C., Fragoso, G., Sciuotto, E., 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin. Immunol.* 116, 271–278.
- Chrousos, G.P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Rev.* 5, 374–381.
- Del Brutto, O.H., García, E., Talamas, O., Sotelo, J., 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch. Intern. Med.* 148, 544–546.
- Díaz-Orea, M.A., de Aluja, A.S., Erosa, M.L., Gomez-Conde, E., Castellanos Sánchez, V.O., Willms, K., Sciuotto, E., Fragoso, G., 2007. Different effects of chorionic gonadotropin on *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* cysticerci cultured in vitro. *J. Parasitol.* 93, 1518–1520.
- Fernández Presas, A.M., Valdez, R.A., Willms, K., Romano, M.C., 2008. The key steroidogenic enzyme 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (WFU). *Parasitol. Res.* 103, 847–852.
- Fleury, A., Dessein, A., Preux, P.M., Dumas, M., Tapia, G., Larralde, C., Sciuotto, E., 2004. Symptomatic neurocysticercosis: host and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J. Neurol.* 251, 830–837.
- García, H.H., Gonzalez, A.E., Evans, C.A., Gilman, R.H., Cysticercosis Working Group in Peru., 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362, 547–556.
- García, J.M., Li, H., Mann, D., Epner, D., Hayes, T.G., Marcelli, M., Cunningham, G.R., 2006. Hypogonadism in male patients with cancer. *Cancer* 106, 2583–2591.
- Jiménez, P., Valdez, R.A., Romano, M.C., 2006. Metabolism of Steroid Hormones by *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 99, 203–208.
- Herrmann, M., Scholmerich, J., Straub, R.H., 2002. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann. NY Acad. Sci.* 966, 166–186.
- Kalyani, R.R., Gavini, S., Dobs, A.S., 2007. Male hypogonadism in systemic disease. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 36, 333–348.
- Kyrou, I., Tsigos, C., 2008. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones* 7, 287–293.
- Klein, S.L., 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol.* 26, 247–264.
- Lambard, S., Silandres, D., Delalande, C., Denis-Galeraud, I., Bourguiba, S., Carreau, S., 2005. Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 95, 63–69.
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T., Romano, M.C., 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52, 575–580.
- Leal, A.M., Magalhães, P.K., Souza, C.S., Foss, N.T., 2003. Adrenocortical hormones and interleukin patterns in leprosy. *Parasite Immunol.* 25, 457–461.
- Leal, A.M., Magalhães, P.K., Souza, C.S., Foss, N.T., 2006. Pituitary-gonadal hormones and interleukin patterns in leprosy. *Trop. Med. Int. Health* 11, 1416–1421.
- Liva, S.M., Voskuhl, R.R., 2001. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J. Immunol.* 167, 2060–2067.
- Mavoungou, D., Poaty-Mavoungou, V., Ongali, B., Akoume, M.Y., Maka, G., Mavoungou, E., 2005. Hypothalamic-pituitary gonadal axis and immune response imbalance during chronic filarial infections. *Trop. Med. Int. Health* 10, 1180–1186.
- Morales, J., Velasco, T., Tovar, V., Fragoso, G., Fleury, A., Beltrán, C., Villalobos, N., Aluja, A., Rodarte, L.F., Sciuotto, E., Larralde, C., 2002. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 108, 41–48.
- Papadimitriou, A., Priftis, K.N., 2009. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 16, 265–271.
- Peña, N., Morales, J., Morales-Montor, J., Vargas-Villavicencio, A., Fleury, A., Zarco, L., de Aluja, A.S., Larralde, C., Fragoso, G., Sciuotto, E., 2007. Impact of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis on the hormonal levels of free ranging boars. *Vet. Parasitol.* 149, 134–137.
- Pérez, A.R., Bottasso, O., Savino, W., 2009. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. *Neuroimmunomodulation* 16, 96–105.
- Rangel, R., Torres, B., Del Brutto, O., Sotelo, J., 1987. Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 387–392.
- Rey, A.D., Mahuad, C.V., Bozza, V.V., Bogue, C., Farroni, M.A., Bay, M.L., Bottasso, O.A., Besedovsky, H.O., 2007. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. *Brain Behav. Immun.* 21, 171–179.
- Romano, M.C., Valdez, R.A., Hinojosa, L., Gómez, Y., Jiménez, P., 2008. Are hormones relevant for the search and design of anti-parasitic drugs? *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 408–414.
- Romano, M.C., Rodas, A.Z., Valdez, R.A., Hernández, S.E., Galindo, F., Canales, D., Brousset, D.M., 2010. Stress in wildlife species: noninvasive monitoring of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 17, 209–212.
- Romero, R., Saenz, B., Rosetti, F., Perez-Tamayo, R., Fragoso, G., Huerta, M., Arcega-Révilla, R., Larralde, C., Sciuotto, E., Fleury, A., 2007. Human neurocysticercosis: rightward hemisphere asymmetry in the cerebral distribution of a single cysticercus. *J. Parasitol.* 93, 1238–1240.
- Sáenz, B., Ruiz-García, M., Jiménez, E., Saenz, B., Ruiz-García, M., Jimenez, E., Hernandez-Aguilar, J., Suastegui, R., Larralde, C., Sciuotto, E., Fleury, A., 2006. Neurocysticercosis: clinical, radiologic and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25, 80–83.
- Sciuotto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacllette, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2, 1875–1890.
- Sotiropoulos, I., Catania, C., Pinto, L.G., Silva, R., Pollerberg, G.E., Takashima, A., Sousa, N., Almeida, O.F., 2011. Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J. Neurosci.* 31, 7840–7847.
- Trubiroha, A., Kroupova, H., Wuertz, S., Frank, S.N., Sures, B., Kloas, W., 2010. Naturally-induced endocrine disruption by the parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda) in roach (*Rutilus rutilus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 234–240.
- Tsigos, C., Papanicolaou, D.A., Kyrou, I., Raptis, S.A., Chrousos, G.P., 1999. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 1271–1276.
- Van den Berghe, G., 2002. Neuroendocrine pathobiology of chronic critical illness. *Crit. Care Clin.* 18, 509–528.
- Valdez, R.A., Jiménez, P., Cartas, A.L., Gómez, Y., Romano, M.C., 2006. *Taenia solium* cysticerci synthesize androgens and estrogens in vitro. *Parasitol. Res.* 98, 472–476.

HUMAN NEUROCYSTICERCOSIS: IN VIVO EXPANSION OF PERIPHERAL REGULATORY T CELLS AND THEIR RECRUITMENT IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Laura Adalid-Peralta*, Agnes Fleury*, Teresa M. García-Ibarra†, Marisela Hernández‡, Michael Parkhouse‡, José Carlos Crispín§, Jefferson Voltaire-Proaño||, Graciela Cárdenas†, Gladis Fragoso†, and Edda Sciutto*†#

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, México D.F. 14269, México. e-mail: edda@servidor.unam.mx

ABSTRACT: Human neurocysticercosis (NC) is caused by *Taenia solium* larvae lodged in the central nervous system. Most cases occur with no, or mild, neurological symptoms. However, in some patients, neuroinflammation is exacerbated, leading to severe forms of the disease. Considering the critical role of regulatory T cells (Tregs) in balancing inflammation in chronic diseases, their participation in restraining the inflammatory response in NC was explored in the present study. The frequency of Tregs and their relationship with the level of the proliferative response, the level of activated lymphocytes, and the cytokines expressed were determined in severe NC patients compared with those from healthy donors. Significantly increased peripheral Tregs (CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, CD4⁺CD25^{high}CTLA4⁺, and CD4⁺CD25^{high}IL10⁺) and a significant decrease in activated (CD38⁺ and CD69⁺) T cells were observed in 19 NC patients versus 10 healthy subjects. Significantly increased Tregs in NC are accompanied by a depressed specific, and non-specific, lymphocyte proliferative response, and they negatively correlate with activated CD4⁺CD69⁺ lymphocytes. Treg frequencies were also determined in cerebral spinal fluid for 8 of the 19 NC patients. A positive significant correlation between peripheral and local Tregs was observed. Here, we report for the first time data that support the possible contribution of local and systemic Tregs in limiting neuroinflammation in NC.

Acute and chronic inflammation play a significant role in the pathogenesis of many infectious and non-infectious diseases (Zipp and Aktas, 2006; Kellum et al., 2007; Costantino et al., 2008; Infante-Duarte et al., 2008; Sgambato and Cittadini, 2010). Inflammation is the hallmark in a variety of neuropathological diseases. Human neurocysticercosis (NC), caused by *Taenia solium* metacestode larvae located in the central nervous system (CNS), is not an exception (Del Brutto et al., 1988; Sotelo and Del Brutto, 2002; Fleury et al., 2004). Most NC cases occur in developing countries of Latin America, Asia, and Africa (Sciutto et al., 2000; Sotelo and Del Brutto, 2002; García et al., 2003). However, NC prevalence has progressively increased in developed countries of North America and Europe due to immigration from areas of the world where the disease is endemic (Croker et al., 2010; Sorvillo et al., 2011).

Taenia solium enters the host's brain as migratory microscopic oncospheres, where they develop into the metacestode stage (cysticercus) in just a few months, causing neurocysticercosis (Sciutto et al., 2000; Sáenz et al., 2008). Cysticerci diameters are generally 1–2 cm in the brain parenchyma and sulci, but they may exceed 5 cm at the subarachnoid basal cisterns or the Sylvian fissure. It is noteworthy to mention how often such large parasites are able to survive for years without provoking any inflammation (Dixon and Lipscomb, 1961). Neurological symptoms are observed only when an uncontrolled inflammatory response is detected in the cerebral spinal fluid (CSF) (Fleury et al., 2004; Chavarría et al., 2005). One of

the factors critically involved in this heterogeneous inflammatory response is the parasite location within the CNS. Indeed, when the parasite is located in the parenchyma or in the subarachnoid space (SA) of the sulci, most patients exhibit a benign clinical presentation, with low, or almost no, inflammation in CNS. In contrast, when the parasite is located in the SA at the skull base or in the ventricles, it appears to cause severe intracranial hypertension (hydrocephalus), a life-threatening complication associated with an exacerbated inflammatory response, or CSF mechanical obstruction (Fleury et al., 2004), which requires immediate surgical intervention (ventriculo-peritoneal shunt). Due to the strong association between inflammation and NC severity, treatment often combines cysticidal drugs (albendazole, or praziquantel, or both) with corticosteroids (usually prednisone or dexamethasone) to destroy the parasite and moderate the host perilesional inflammatory response (García et al., 2002; Serpa et al., 2006; Jung et al., 2008). Unfortunately, these treatments sometimes fail in completely clearing cysticerci, or controlling inflammation, or both. Furthermore, severe cases sometimes become chronic and may need a prolonged treatment with high doses of corticosteroids, which may cause undesirable side effects (Jung et al., 2008). The development of an inflammatory response in the CNS and its response to treatment widely vary among patients. Several factors, i.e., immune-regulatory mechanisms and hormones, which probably depend on individual features of the affected host, may down-regulate, with differing efficacy, the immune-inflammatory response during NC.

Recently, a novel mechanism to modulate the inflammatory immune response via regulatory T cells (Tregs) was proposed. These anti-inflammatory cells are generated during infectious and non-infectious diseases (Belkaid and Tarbell, 2009). These results prompted the present study, in which CSF and blood specimens from corticosteroid-treated and non-treated NC patients were studied to assess the possible participation of Tregs in controlling brain inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Neurocysticercosis patients: Disease characterization and sampling

Samples from 19 patients at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía and Centro Médico Nacional Siglo XXI in Mexico City with

Received 18 April 2011; revised 18 July 2011, 24 September 2011; accepted 28 September 2011.

* Unidad Periférica para el Estudio de Neuroinflamación del Instituto de Investigaciones Biomédicas en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, México D.F. 14269, México.

† Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

‡ Gulbenkian Institute for Science, Rua Quinta Grande 6, P.O. Box 2780-156, Oeiras, Portugal.

§ Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115.

|| Medical Research Unit for Neurological Diseases, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México D.F. 06725, México.

To whom correspondence should be addressed.

DOI: 10.1645/GE-2839.1

confirmed neurocysticercosis diagnosed by clinical and radiological studies were included in this study. Blood samples were collected from all 19 patients, and about 2 ml of CSF were obtained by lumbar puncture from 8 patients only.

Parameters measured in the peripheral blood are considered as representative of the peripheral compartment, and parameters measured in CSF are considered as representative of the local compartment (where the parasite is located).

Vesicular parasites were observed at the basal cisterns or in the ventricles in 11 patients. Magnetic resonance images (MRI) compatible with the presence of vesicular cysticerci were obtained in 4 patients. Vesicular parasites in the subarachnoid sulci were found in 1 patient, and only calcified parasites could be detected in 3 patients. The 8 patients whose CSF analyses were included in this study had vesicular parasites located in the subarachnoid cisterns at the base of the brain or in the ventricles. Blood samples from 10 healthy subjects were included as controls.

In all cases, NC was diagnosed based on clinical manifestations (seizures, focal deficit, and intracranial hypertension) and radiological studies such as MRI and computed tomography (CT).

Six patients (all males; mean age: 40.4, standard deviation: 8.5) were included without any previous treatment at sampling. Most of them (5/6) had been recently diagnosed and received treatment (corticosteroids + anthelmintic) after sampling. Another 13 patients (9 male and 4 female; mean age: 41.8, standard deviation: 14.9) had received corticosteroids for several weeks for inflammation treatment (particularly hydrocephalus, arachnoiditis, and arteritis) prior to sampling. None of them received anthelmintic treatment near to sampling, although 11 patients had been previously treated with an anthelmintic drug.

Ethical considerations

The present study fulfilled all regulations for research with human subjects required by Mexican law and international regulations. It also complied with all ethical aspects considered in the General Rules of Health for Clinical Investigation. The protocol was approved by the ethics committee at Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, and written informed consent was obtained from all participants. Patients were informed that sera and CSF samples obtained would be used for this work.

Lymphocyte proliferation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were recovered from 10 ml of venous blood from each patient by Ficoll-Hypaque (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, U.K.) following a previously described procedure (Chavarría et al., 2006). After washing, 1.5×10^5 cells were incubated in 200 μ l of RPMI Medium 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York) supplemented with 10% human AB type serum and stimulated with either concanavalin A (Con A), 0.5 μ g/well (Sigma, St. Louis, Missouri), or *T. solium* cysticercal antigen (10 μ g/well) as previously described (Chavarría et al., 2006). A non-symptomatic NC patient was included as a positive control for parasite-specific response, considering the information previously obtained (Chavarría et al., 2006). Cysticercal antigens were obtained from *T. solium*-infected pigs. After 6 days of culture, 1 μ Ci of methyl- 3 H]thymidine (Amersham Life Sciences) was added for 18 additional hr. Cells were harvested onto glass-fiber filter papers, and the amount of incorporated label was measured in a 1205- β spectrometer (Wallac, Oy, Turku, Finland).

Flow cytometry

For flow cytometric analysis, freshly isolated PBMCs or CSF cells were stained with the following monoclonal antibodies: mouse anti-human CD3 FITC (isotype IgG2a, *k*), mouse anti-human CD4-PerCP-Cy5.5 (isotype IgG1, *k*), and mouse anti-human CD25 APC (isotype IgG1, *k*), plus 1 of the following antibodies for intracellular staining, mouse anti-human CD152 PE (isotype IgG2a, *k*), rat anti-human FoxP3 PE (isotype IgG2a, *k*) (eBioscience, San Diego, California), or rat anti-human IL-10 PE (isotype IgG1k) (eBioscience). Cells were prepared for intracellular staining using the BD Cytofix/Cytoperm kit (most antibodies used for staining were purchased from BD Pharmingen, San Jose, California). All antibodies employed in this study were employed using the manufacturer's recommended concentration.

For cytometry analyses, cells were first gated according to CD4 expression and forward-side scatter properties. Treg numbers were defined as the fraction of FoxP3⁺CD25^{high}, CTLA4⁺CD25^{high}, or IL-10⁺CD25^{high} cells among total CD4 T cells. For Tregs detected by the expression of CD4⁺CD25^{high}, cells were gated according to forward and side light-scattering properties. To assess lymphocyte activation, PBMCs were stained with mouse anti-human CD3 FITC (isotype IgG2a, *k*), mouse anti-human CD4-PerCP-Cy5.5 (isotype IgG1, *k*), and mouse anti-human CD8 APC (isotype IgG1, *k*), plus either mouse anti-human CD69 PE (isotype IgG1, *k*) or mouse anti-human CD38 PE (isotype IgG1, *k*). All antibodies used for staining were purchased from BD Pharmingen. Cells were gated according to forward and side light-scattering lymphocyte properties; the frequency of double-positive cells was then determined. Appropriate isotype controls were processed in parallel with all samples.

Cytokines

Cytokine levels in serum from NC patients and healthy donors, and CSF samples from NC patients were measured in a FACSCalibur using Th1/Th2 Cytometric Bead Array Cytokine Kit II (BD eBiosciences Pharmingen), according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed with BD Cytometric Bead Array software. A flow cytometer was calibrated using BD FACSComp and BD CaliBRITE Beads (BD Biosciences Pharmingen). Th1 cytokines were IL-2, IFN- γ , and TNF- α , and Th2 cytokines were IL-4, IL-6, and IL-10. Assay sensitivities were set as follows: IL-2 (2.6 pg/ml), IL-4 (2.6 pg/ml), IL-6 (3.0 pg/ml), IL-10 (2.8 pg/ml), TNF- α (2.8 pg/ml), and IFN- γ (7.1 pg/ml). TGF- β was measured using the human/mouse TGF- β 1 ELISA Ready-SET-Go (eBiosciences). This ELISA includes a heat and acid treatment to measure all TGF- β 1 isoforms. The ELISA was performed in duplicate according to the manufacturer's instructions. Detection limit was 60 pg/ml.

Detection of vasoactive intestinal peptide

It has been observed that the anti-inflammatory vasoactive intestinal peptide (VIP), an endogenous neuropeptide, is produced during neurodegenerative disorders (Delgado et al., 2008). VIP induces a subpopulation of immature dendritic cells that are able to promote the differentiation of Tregs both in vitro and in vivo (Ganea et al., 2006; Gonzalez-Rey et al., 2007). Thus, peripheral and local VIP levels were measured in NC patients to evaluate their possible participation in the development of Tregs. VIP concentrations in serum and CSF samples were measured by ELISA, using a commercial kit (Bachem Peninsula Laboratories, San Carlos, California), following the manufacturer's instructions. Detectable VIP concentrations ranged from 0 to 25 ng/ml.

Detection of HP10 antigen

Parasite secretion antigens are able to modulate the immune system (Zaccone et al., 2008), which, in turn, may promote the expansion of Tregs (van der Kleij et al., 2002). HP10 antigen levels (1 of the best characterized antigens secreted by *T. solium* cysticerci [Fleury et al., 2007]) were measured in CSF and serum samples to analyze their relationship with Treg differentiation. HP10 antigen was detected by ELISA as described previously (Fleury et al., 2007). Briefly, Immulon I plates (Nunc, Rochester, New York) were coated with HP10 monoclonal antibody (10 μ g/ml in 0.07 M NaCl buffered with 0.1 M borate, pH = 8.2) and left overnight at 4 C. Plates were washed 4 times (0.9% w/v NaCl containing 0.05% v/v Tween 20) and blocked (phosphate buffer saline with bovine serum albumin at 1.0% w/v and Tween 20 at 0.05% v/v) for 60 min at room temperature. Undiluted CSF or serum samples (100 μ l/well) were added and incubated for 30 min at 37 C. Bound HP10 parasite antigens were detected with biotinylated HP10 monoclonal antibody 1:4,000 in blocked buffer, and incubated for 30 min at 37 C. Biotinylated antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:4,000; Amersham) in blocked buffer, and incubated for 30 min at 37 C. For color reaction, tetramethylbenzidine (Zymed Laboratories, South San Francisco, California) was used as a substrate. Color reaction was allowed to proceed for 30 min at 4 C in the dark and was stopped by adding 100 μ l of 0.2 M H₂SO₄ (Baker, D.F., México). Optical density (OD) at 450 nm was determined in an ELISA processor (Versamax microplate reader; Molecular Devisable, Sunnyvale, California). All samples were run in duplicate.

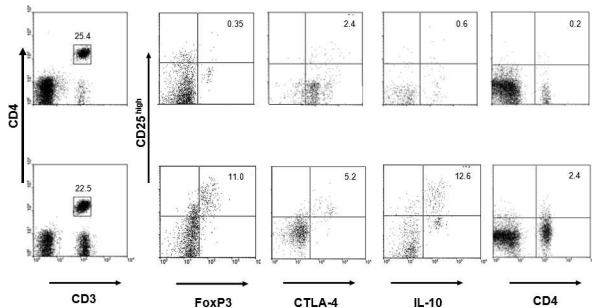


FIGURE 1. Representative FACS staining of regulatory T cells (Tregs) in blood from a healthy subject (top row) and NC patient (bottom row). In order to accomplish the analysis, cells were first gated according to CD4 expression and to forward-side scatter properties, and then FoxP3/CD25^{high}, IL10/CD25^{high}, or CTLA-4/CD25^{high} cells were gated within CD4 population. For quantification of CD4⁺/CD25^{high} Tregs, cells were only gated according to forward and side light-scattering lymphocyte properties. Data are illustrative of 10 healthy subjects (controls) and 19 NC patients.

Statistical analysis

Data were processed in Excel 7.0 (Microsoft, Redmond, Washington) and SPSS 10.0 for Windows (IBM, Seattle, Washington). Variables were described using median values (minimum and maximum). Differences in absorbance values between groups were calculated with the Mann-Whitney *U*-test, and between paired samples with the Wilcoxon test. Non-parametric Spearman test was used to evaluate correlations. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Increased peripheral functional Tregs in NC patients

A significantly higher frequency of regulatory cells (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺, CD4⁺CD25^{high} CTLA-4⁺, and CD4⁺CD25^{high} IL-10⁺) was found in 19 NC patients compared with 10 healthy control subjects (Fig. 1; Table I). As shown in Table I, this increase in regulatory cells was accompanied by a significant decrease in CD4⁺ and CD8⁺ cells expressing the late- (CD69) and early-activation (CD38) markers (Fig. 2).

Additionally, a significant decrease in non-specific proliferative response of mononuclear cells induced by Con A was observed in NC patients compared with healthy controls (Table I). As expected, the parasite-specific response was not observed in control subjects or in NC patients, a finding compatible with a depressed specific proliferative response in NC. Neurocysticercosis did not affect the level of peripheral CD4⁺ and CD8⁺.

Tregs in the cerebral spinal fluid of treated and non-treated NC patients

Table II shows Treg subpopulations and the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ cells in CSF from 8 NC patients. No significant differences were found between treated and non-treated patients, either in Tregs or in lymphocyte levels. The levels of CD4⁺CD25^{high} varied from 2.9 to 70.7%, and CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ varied from 2.0 to 59.2% in CSF from NC patients. A representative cytometry result of regulatory phenotypes detected in patients with higher and lower levels of regulatory cells in CSF is shown in Figure 3.

Tregs in CSF correlate with peripheral levels in NC patients

Treg percent was determined in paired CSF and blood samples from 8 NC patients. In CSF, about 58% of total cells are lymphocytes; among them, 36% are CD4⁺, and 22% are CD8⁺. In addition, 28% of CD4⁺ cells in CSF are CD4⁺CD25^{high}, and 16% are CD25^{high} FoxP3⁺, the latter values being significantly higher than those in peripheral blood (3.8% and 2.0%, respectively). Moreover, local frequencies of CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ were positively correlated with the levels in peripheral blood (*r* = 0.78, *P* = 0.02; and *r* = 0.73, *P* = 0.04, respectively).

A negative correlation between CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ Tregs in CSF (*r* = -0.66, *P* = 0.079) and the levels of activated CD4⁺CD69⁺ peripheral lymphocytes was observed in paired samples from 8 NC patients. A similar correlation was observed between CD4⁺CD25^{high} in CSF (*r* = -0.64, *P* = 0.09) and activated CD4⁺CD69⁺ peripheral lymphocytes, even though these correlations were not significant.

TABLE I. Phenotype of peripheral T cells in corticosteroid-treated and non-treated NC patients, and control, healthy subjects. P1 refers to the statistical comparison between treated and untreated patients. P2 refers to the statistical comparison between the NC patients group (disregarding treatment) and control group.

	NC patients		Total patients	Controls (C)	P1 (T vs. UT)	P2 (NC vs. C)
	Treated (T)	Untreated (UT)				
CD4 ⁺ CD25 ^{high}	1.4 (0.2–21.6)*	1.8 (0.2–13.3)	1.4 (0.2–21.6)	0.5 (0–0.8)	0.90	0.003
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺	1.4 (0.2–11)	2.3 (0.4–7.8)	1.4 (0.2–11)	0.3 (0.1–0.9)	0.52	0.002
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CTLA-4 ⁺	1.7 (0.4–8.6)	3.1 (0.9–8.2)	2 (0.4–8.6)	0.7 (0.1–1.9)	0.32	0.003
CD4 ⁺ CD25 ^{high} IL-10 ⁺	0.9 (0.3–4.7)	2.8 (0.3–12.6)	1.1 (0.3–12.6)	0.3 (0–1.2)	0.24	0.01
CD4 ⁺ CD69 ⁺	0.8 (0.1–1.3)	0.4 (0.1–0.4)	0.4 (0.1–1.3)	1.6 (1.1–3.4)	0.07	0.001
CD8 ⁺ CD69 ⁺	1.2 (0.1–2.9)	0.7 (0.1–2.3)	1.1 (0.1–2.9)	4.6 (0.4–12.6)	0.37	0.01
CD4 ⁺ CD38 ⁺	16.5 (3.2–38.2)	25.7 (7.4–45)	19.4 (3.2–45)	35.4 (27.2–52.6)	0.83	0.001
CD8 ⁺ CD38 ⁺	7.1 (1.7–34)	12.1 (3.1–34)	7.1 (3.2–45)	27.8 (16.1–35.3)	0.90	0.002
CD4 ⁺	22.5 (8.2–51.9)	21.4 (10.4–30.4)	22.5 (8–52)	26.2 (19.2–45)	0.90	0.25
CD8 ⁺	9.2 (3.1–26.7)	12.6 (2.4–24.5)	9.6 (2.4–26.7)	18.4 (3.8–24.3)	0.92	0.19
Con A proliferation†	1.4 (0.7–3.5)	1.8 (0.3–13.3)	1.4 (0.7–4.4)	4.9 (1.3–7.7)	0.52	0.008
Ag proliferation†	1.3 (0.5–3.6)	1.4 (0.9–1.9)	1.3 (0.5–3.6)	0.9 (0.3–1.7)	0.52	0.55

* Median (minimum–maximum) in 13 treated and 6 untreated NC patients and 10 healthy subjects (controls).
 † Lymphocyte proliferative response was expressed as proliferation index (PI) in patients and in controls. PI is presented as cpm-antigen-stimulated cells/cpm-non-stimulated cells.

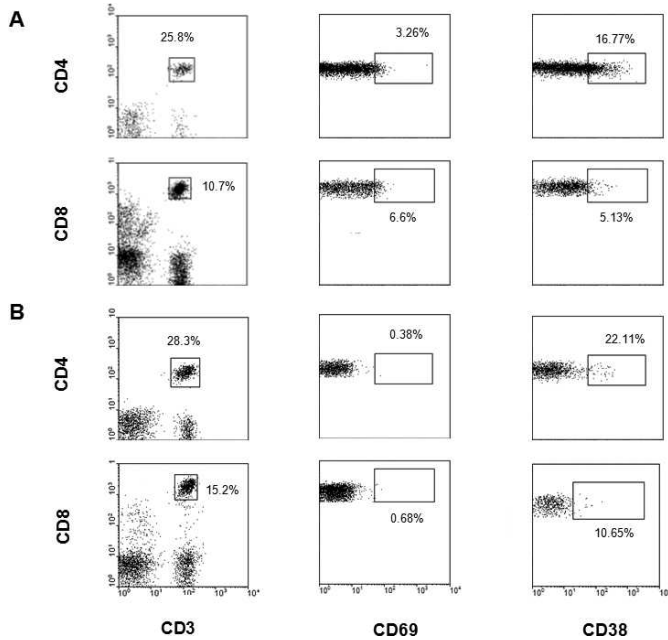


FIGURE 2. Expression of early- (CD69) and late-activation (CD38) markers in CD4⁺ and CD8⁺, peripheral blood T cells from a healthy subject (A) and a NC patient (B). Cells were gated according to forward and side light-scattering lymphocyte properties, and then the frequency of double-positive cells was determined. Data are illustrative of 10 healthy subjects (controls) and 19 NC patients.

Levels of cytokines in CSF and blood from NC patients and their relationship with Tregs

Cytokine levels were measured in paired CSF and blood samples from 8 NC patients. As Table III shows, higher levels of IL-10 and IL-6 were detected in CSF from NC patients than in serum ($P = 0.01$), while higher levels of TGF- β were found in serum compared to CSF ($P = 0.05$). No significant differences were observed between the levels of cytokines in treated versus untreated patients.

Positive correlations were found between peripheral blood (peripheral) and CSF (local) levels of IL-10 ($P = 0.002$), IL-6 ($P = 0.04$), and IL-4 ($P = 0.03$) cytokines. The comparison between peripheral and local levels of different cytokines shows that concentrations of TGF- β in CSF correlate with serum levels of IL-4 ($P = 0.04$), IL-2 ($P = 0.03$), and TNF- α ($P = 0.02$), while IL-10 in CSF correlates with serum levels of IL-4 ($P = 0.03$) and

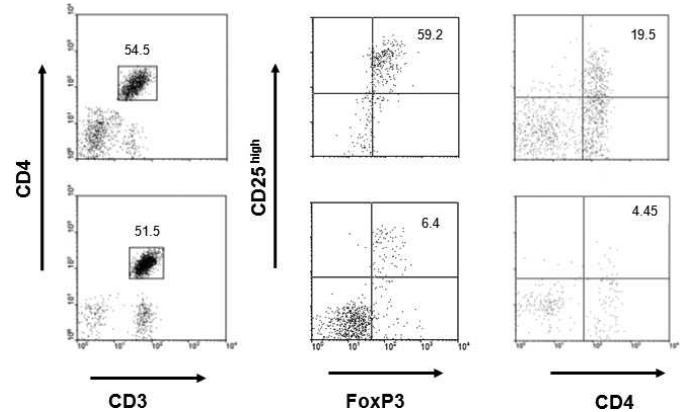


FIGURE 3. Representative FACS staining of regulatory T cells (Tregs) in CSF from 2 NC patients with high (top row) and low (bottom row) Treg frequency. In order to accomplish the analysis, cells were first gated according to CD4 expression and to forward-side scatter properties, and then FoxP3/CD25^{high} cells were gated within CD4 population. For characterizing Tregs expressing CD4⁺CD25^{high}, stained cells were gated according to forward and side light-scattering lymphocyte properties.

TNF- α ($P = 0.03$). No correlations between either local and peripheral Tregs or between CSF and serum cytokines were found.

Parasite factor related to increased Tregs in CSF

HP10 cysticercus-secreted antigen was measured in paired CSF and peripheral blood samples from 8 NC patients. A positive correlation was observed between CD4⁺CD25^{high} cells and CSF HP10 levels, although it was not significant ($r = 0.64$, $P = 0.08$). No correlation was found between serum HP10 level and CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺, either in CSF or in peripheral blood. In CSF from these 8 patients, HP10 levels were correlated with IL-10 ($r = 0.74$, $P = 0.037$) and IL-6 ($r = 0.79$; $P = 0.02$) levels in the same compartment, and with a peripheral Con A proliferative response ($r = 0.75$, $P = 0.08$). Additionally, a positive correlation was observed between serum HP10 levels and both serum ($P = 0.84$, $P = 0.01$) and CSF ($r = 0.90$, $P = 0.002$) IL-10 levels in the 8 paired samples. Serum HP10 levels were also positively correlated with CSF IL-6 ($r = 0.83$, $P = 0.01$) levels in the same paired samples.

However, analysis of the 19 patients showed a positive correlation between serum HP10 level and peripheral frequency of CD4⁺CD25^{high} ($r = 0.47$, $P = 0.046$), but not between serum HP10 level and CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺, either in CSF or in peripheral blood.

TABLE II. Phenotype of T cells in cerebrospinal fluid from corticosteroid-treated and untreated NC patients.

	NC patients			<i>P</i>
	Untreated	Treated	All NC patients	
CD4 ⁺ CD25 ^{high} *	14.5 (2.9–27.4)‡	28.3 (10.8–70.7)‡	27.8 (2.9–70.7)	0.14
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ *	13.2 (2–20)	18.9 (6.4–59.2)	16.7 (2.0–59.2)	0.57
CD4 ⁺ †	35.6 (35.5–62.5)	35.8 (26.4–64.8)	35.7 (26.4–64.8)	1.00
CD8 ⁺ †	19.9 (11.7–20.8)	25.7 (8.3–30.5)	21.8 (8.3–30.5)	0.25
Number of cells/ml	1.3×10^4 (2.7×10^3 – 1.1×10^5)	8.5×10^4 (1×10^4 – 1.1×10^6)	5.8×10^4 (2.7×10^3 – 1.1×10^6)	0.39

* Results expressed as percent of cells within CD4⁺ lymphocytes.

† Results expressed as percent of cells among total lymphocytes.

‡ Median (minimum–maximum) determined in CSF lymphocytes from 3 untreated and 5 treated NC patients.

TABLE III. Cytokines and HP10 antigen levels in CSF and blood samples from paired samples of 8 NC patients.

Molecule	Blood			Cerebrospinal fluid			P1	P2	P3	P4	P5
	Untreated (3)	Treated (5)	All patients (8)	Untreated (3)	Treated (5)	All patients (8)					
IFN- γ	0* (0–47.5)	0 (0–0)	0 (0–47.8)	0* (0–0)	0 (0–29)	0 (0–29)	0.32	0.32	0.65	0.57	0.79
TNF- α	0 (0–26.6)	0 (0–16.8)	0 (0–26.6)	0 (0–0)	0 (0–9.7)	0 (0–9.7)	0.32	0.34	0.17	1.00	0.39
IL-10	16.3 (0–33)	0 (0–318)	8.1 (0–318)	46.1 (30–78.2)	33 (0–734)	39.5 (0–734)	0.14	0.06	0.01	0.79	1.00
IL-6	0 (0–45.2)	17.6 (0–5,000)	8.8 (0–5,000)	98.3 (59.6–181.2)	223.4 (0–5,000)	139.7 (0–5,000)	0.11	0.06	0.01	0.79	0.57
IL-4	7.5 (4.3–22.4)	6.8 (3.0–13.7)	7.2 (3–22.4)	5.8 (5.2–9.9)	3.7 (0–22.3)	4.6 (0–22.3)	0.14	0.68	0.28	0.57	0.25
IL-2	0 (0–27.3)	0 (0–16.1)	0 (0–27.3)	0 (0–0)	0 (0–10.1)	0 (0–10.1)	0.32	0.32	0.18	0.79	0.79
TGF- β	2,800 (1,662.5–6,212.5)	52.9 (0–2,887.5)	1,509.4 (0–6,212)	52.9 (0–4,987.5)	262.9 (0–481.3)	231.8 (0–4,987.5)	0.27	0.09	0.05	0.14	0.79
HP10											
Antigen	0.5 (0.1–0.9)	0.2 (0.1–0.3)	0.3 (0.1–1.3)	0.9 (0.2–1.2)	1.2 (0.1–1.6)	1 (0.1–1.6)	0.14	0.32	0.09	1.00	1.00

* Median (minimum and maximum). Local and peripheral cytokine levels (pg/ml) were compared by Mann–Whitney and Wilcoxon tests: Peripheral vs. local levels in untreated (P1), treated patients (P2), and in all patients, disregarding treatment status (P3), peripheral untreated vs. treated patients (P4), and local untreated vs. treated patients (P5).

Host factors related to elicitation of Tregs

Detectable VIP levels were found in the serum (102.3 ± 69.7) and CSF samples from most patients (37.6 ± 35.6). However, a significant correlation was not observed between CSF or peripheral VIP or Treg subsets.

DISCUSSION

Neurocysticercosis severity is determined mainly by the inflammatory response promoted by the infection. Inflammation ranges from moderate to severe; in most severe cases, an increase in cell count in the CSF is observed. As a consequence of such inflammation, life-threatening neurological complications are frequently observed. Differential control of inflammatory responses may be related to differential extension of Treg recruitment in the CSF.

The present study reports the first evidence of local and peripheral Treg recruitment and expansion in NC patients, which could contribute to the intensity of the inflammatory response. Tregs are reliably defined as CD4⁺ cells with high levels of CD25 and CD25^{high} FoxP3 expression (Wang et al., 2007; Zhang and Zhao, 2007). Levels of CD4⁺CD25^{high} CTLA-4⁺ and CD4⁺CD25^{high} IL-10⁺ in the peripheral blood were also measured. An increase in the frequency of the 4 regulatory cells measured was observed in sera from NC patients compared to controls (Table I). Higher levels of CD4⁺CD25^{high} and CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ Tregs were found in CSF from the 8 patients studied (Table II), which positively correlate with the Treg populations detected in the peripheral blood from these patients. This finding provides the first evidence of the recruitment of Tregs into the CSF in NC patients.

The increase in peripheral and local Tregs is accompanied by a decrease in specific and non-specific proliferative responses, and by a significant decrease in the frequency of early- and late-activated T-lymphocytes in the peripheral blood (Table I). These findings point to the relevance of Tregs in controlling the inflammatory response, most likely induced by cysticerci in the CNS.

Several different regulatory properties have been related to Treg subpopulations, including control of inflammation in various infectious diseases (McSorley et al., 2008; D'Elia et al., 2009). Increased CSF Tregs showed a tendency to negatively

correlate with the expression of the activated CD4 lymphocytes from peripheral blood in paired samples from 8 NC patients, similar to that observed in other studies (Ermann and Fathman, 2003; Bulut et al., 2010). Thus, Tregs are likely to prevent T cell activation by parasite antigens continuously secreted from live cysticerci in these patients. Increased IL-10 and CTL4 expression in CD4⁺CD25^{high} T cells was also found in the blood of these patients, indicating that they may be involved in the suppressor activities of these Tregs (McSorley et al., 2008; Radstake et al., 2009). Since cysticerci are located in the CNS, a compartment with unique immunological features (Griffiths et al., 2007), we hypothesize that neuroinflammatory response in NC may be more tightly controlled in the CNS compared to in the peripheral blood. Indeed, a differential migration of cells to the CNS may depend on the variability between individual patients. This kind of variability should be expected, since so many host factors (gender, age, parasite count, onset time of the disease) are involved in creating the heterogeneous clinical picture observed in NC (Fleury et al., 2004), which, in turn, could be involved in the differential recruitment of Tregs into the CNS. Despite the reported effects of corticosteroids on the inflammatory response, including levels of Tregs and inflammatory cytokines (Okano, 2009), it is important to note that no differences were found between treated and untreated patients in the measured immunological parameters (including recruitment and expansion of Tregs, levels of CD69 and CD38 activation markers in CD4 and CD8 T cells, and specific and unspecific proliferative responses). This finding may indicate that some T-cell activation persists, despite the treatment. It is possible that increased levels of Tregs due to the cysticerci infection override the effects induced by steroid treatment. The wide range of inflammatory parameters measured in each group of patients could also account for the absence of significant changes due to the treatment. The positive correlation observed between HP10 antigen in CSF and sera, and the respective local and peripheral frequency of CD4⁺CD25^{high}, is particularly interesting and raises the possible involvement of HP10 antigen, or other factors secreted by the parasite, in promoting Treg generation/expansion. The absence of a correlation between levels of VIP and peripheral or CSF Tregs may indicate that VIP is not correlated with Treg differentiation, as occurs both in vitro and in vivo in other infectious and non-infectious diseases (Ganea et al., 2006). In addition, the high

correlation found between HP10 antigen and local and peripheral levels of IL-6 supports the possibility that secretions derived from cysticerci, including HP10, enhance IL-6 levels, which, in turn, could promote antigen presentation and a path toward Th17 response. Microenvironmental balances could be determinants for Treg generation; it has been reported that during acute inflammation, IL-6 significantly suppresses TGF- β -induced FoxP3 expression and Treg generation (Bettelli et al., 2006). In the study, increased levels of TGF- β in the peripheral blood were also detected, indicating a possible involvement of TGF- β in the reduced capacity of a peripheral proliferative response (Table III).

The cost-benefit balance of Treg recruitment into CSF in NC patients should be carefully considered. The control of inflammation can relieve severe symptoms, but it may also generate a favorable microenvironment for parasite survival, and it may also promote the growth of malignant cells. Indeed, Tregs are known to promote tolerance to tumors in murine models (Cao, 2010). In this regard, it is of interest to note that correlations have been reported between the frequency of malignant cerebral tumors and NC (Haas et al., 2008).

Overall, the levels of the different Treg phenotypes measured are strongly correlated ($P < 0.001$) and are accompanied by depressed proliferative responses and decreased frequencies of activated T cells, which are all indicators of the anti-inflammatory properties of the Tregs detected and their relevance in controlling the inflammatory response in NC. Manipulation of T-cell populations to reduce inflammation in subarachnoid NC patients is currently under study in order to offer novel, and less harmful, alternatives for more effective patient management.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge Dr. Leslie Harrison from the University of Edinburgh for providing the reagents for the HP10 ELISA test. We thank Dr. Roman Krzysiek from INSERM U764, Institut Paris-Sud sur les Cytokines, France, for his critical comments, and Isabel Pérez Montfort and Juan Francisco Rodríguez for proofreading the English version of this manuscript. This study was supported by DGAPA IN213911, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 46953-M, CB-2008-01, 100708, and S0008-08-01-86527.

LITERATURE CITED

- BELKAID, Y., AND K. TARBELL. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual Review of Immunology* **27**: 551-589.
- BETTELLI, E., Y. CARRIER, W. GAO, T. KORN, T. B. STROM, M. OUKKA, H. L. WEINER, AND V. K. KUCHROO. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**: 235-238.
- BULUT, D., M. SCHEELER, T. WICHMANN, J. BÖRGEL, T. MIEBACH, AND A. MÜGGE. 2010. Effect of protein A immunoadsorption on T cell activation in patients with inflammatory dilated cardiomyopathy. *Clinical Research in Cardiology* **99**: 633-638.
- CAO, X. 2010. Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunologic Research* **46**: 79-93.
- CHAVARRÍA, A., A. FLEURY, R. J. BOBES, J. MORALES, G. FRAGOSO, AND E. SCIUTTO. 2006. A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes and Infection* **8**: 1082-1089.
- , ———, E. GARCÍA, C. MÁRQUEZ, G. FRAGOSO, AND E. SCIUTTO. 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology* **116**: 271-278.
- COSTANTINO, C. M., C. M. BAECHEER-ALLAN, AND D. A. HAFLER. 2008. Human regulatory T cells and autoimmunity. *European Journal of Immunology* **38**: 921-924.
- CROKER, C., R. REPORTER, AND L. MASCOLA. 2010. Use of statewide hospital discharge data to evaluate the economic burden of neurocysticercosis in Los Angeles County (1991-2008). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **83**: 106-110.
- DEL BRUTTO, O. H., E. GARCÍA, O. TALÁMAS, AND J. SOTELO. 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Archives of Internal Medicine* **148**: 544-546.
- DELGADO, M., N. VARELA, AND E. GONZALEZ-REY. 2008. Vasoactive intestinal peptide protects against beta-amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels. *Glia* **56**: 1091-1103.
- D'ELIA, R., J. M. BEHNKE, J. E. BRADLEY, AND K. J. ELSE. 2009. Regulatory T cells: A role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival. *Journal of Immunology* **182**: 2340-2348.
- DIXON, H. B. F., AND F. M. LIPSCOMB. 1961. Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases. Medical Research Council Special Report Series No. 299, Her Majesty's Stationary Office, London, U.K., 58 p.
- ERMANN, J., AND C. G. FATHMAN. 2003. Costimulatory signals controlling regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**: 15292-15293.
- FLEURY, A., A. DESSEIN, P. M. PREUX, M. DUMAS, G. TAPIA, C. LARRALDE, AND E. SCIUTTO. 2004. Symptomatic human neurocysticercosis—Age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *Journal of Neurology* **251**: 830-837.
- , M. HERNÁNDEZ, M. AVILA, G. CÁRDENAS, R. J. BOBES, M. HUERTA, G. FRAGOSO, L. URIBE-CAMPERO, L. J. HARRISON, R. M. PARKHOUSE, AND E. SCIUTTO. 2007. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *The Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **78**: 970-974.
- GANEVA, D., E. GONZALEZ-REY, AND M. DELGADO. 2006. A novel mechanism for immunosuppression: From neuropeptides to regulatory T cells. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **1**: 400-409.
- GARCÍA, H. H., C. EVANS, T. NASH, O. M. TAKAYANAGUI, A. C. WHITE, JR., AND D. BOTERO. 2002. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clinical Microbiological Review* **15**: 747-756.
- , A. E. GONZALEZ, C. A. EVANS, R. H. GILMAN, AND CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* **362**: 547-556.
- GONZALEZ-REY, E., P. ANDERSON, AND M. DELGADO. 2007. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: A new approach for autoimmune therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases* **66**: 11170-11176.
- GRIFFITHS, M., J. W. NEAL, AND P. GASQUE. 2007. Innate immunity and protective neuroinflammation: New emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *International Review of Neurobiology* **82**: 29-55.
- HAAS, J., L. SCHOPP, B. STORCH-HAGENLOCHER, B. FRITZSCHING, C. JACOBI, L. MILKOVA, B. FRITZ, A. SCHWARZ, E. SURI-PAYER, M. HENSEL, AND B. WILDEMANN. 2008. Specific recruitment of regulatory T cells into the CSF in lymphomatous and carcinomatous meningitis. *Blood* **111**: 761-766.
- INFANTE-DUARTE, C., S. WAICZIES, J. WUERFEL, AND F. ZIPP. 2008. New developments in understanding and treating neuroinflammation. *Journal of Molecular Medicine* **86**: 975-985.
- JUNG, H., G. CÁRDENAS, E. SCIUTTO, AND A. FLEURY. 2008. Medical treatment for neurocysticercosis: Drugs, indications and perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **8**: 424-433.
- KELLUM, J. A., I. KONG, M. P. FINK, L. A. WEISSFELD, D. M. YEALY, M. R. PINSKY, J. FINE, A. KRICHEVSKY, R. L. DELUDE, D. C. ANGUS, AND GENIMS INVESTIGATORS. 2007. Understanding the inflammatory cytokine response in pneumonia and sepsis: Results of the genetic and inflammatory markers of sepsis (GenIMS) study. *Archives of Internal Medicine* **167**: 1655-1663.
- MCSORLEY, H. J., Y. M. HARCUS, J. MURRAY, M. D. TAYLOR, AND R. M. MAIZELS. 2008. Expansion of FoxP3⁺ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*. *Journal of Immunology* **181**: 6456-6466.
- OKANO, M. 2009. Mechanisms and clinical implications of glucocorticosteroids in the treatment of allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Immunology* **158**: 164-173.

- RADSTAKE, T. R., L. VAN BON, J. BROEN, M. WENINK, K. SANTEGOETS, Y. DENG, A. HUSSAINI, R. SIMMS, W. W. CRUIKSHANK, AND R. LAFYATIS. 2009. Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One* **22**: e5981.
- SÁENZ, B., J. RAMÍREZ, A. ALUJA, A. ESCOBAR, G. FRAGOSO, J. MORALES, R. PÉREZ-TAMAYO, F. ROSETTI, C. LARRALDE, E. SCIUTTO, AND A. FLEURY. 2008. Human and porcine neurocysticercosis: Differences in the distribution and developmental stages of cysticerci. *Tropical Medicine & International Health* **13**: 697–702.
- SCIUTTO, E., G. FRAGOSO, A. FLEURY, J. P. LACLETTE, J. SOTELO, A. ALUJA, L. VARGAS, AND C. LARRALDE. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* **2**: 1875–1890.
- SERPA, J., L. YANCEY, AND A. WHITE, JR. 2006. Advances in the diagnosis and management of neurocysticercosis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **4**: 1051–1061.
- SGAMBATO, A., AND A. CITTADINI. 2010. Inflammation and cancer: A multifaceted link. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **14**: 263–268.
- SORVILLO, F., P. WILKINS, S. SHAFIR, AND M. EBERHARD. 2011. Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 1–6.
- SOTELO, J., AND O. H. DEL BRUTTO. 2002. Review of neurocysticercosis. *Neurosurgical Focus* **12**: e1.
- VAN DER KLEIJ, D., E. LATZ, J. F. BROUWERS, Y. C. KRUIZE, M. SCHMITZ, E. A. KURT-JONES, T. ESPEVIK, E. C. DE JONG, M. L. KAPSENBERG, D. T. GOLENBOCK, ET AL. 2002. A novel host–parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *The Journal of Biological Chemistry* **48**: 48122–48129.
- WANG, J., A. IOAN-FACSINAY, E. I. VAN DER VOORT, T. W. HUIZINGA, AND R. E. TOES. 2007. Transient expression of FoxP3 in human activated non-regulatory CD4⁺ T cells. *European Journal of Immunology* **37**: 129–138.
- ZACCONE, P., O. T. BURTON, AND A. COOKE. 2008. Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity. *Trends in Parasitology* **24**: 35–42.
- ZHANG, L., AND Y. ZHAO. 2007. The regulation of FoxP3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: Multiple pathways on the road. *Journal of Cellular Physiology* **211**: 590–597.
- ZIPP, F., AND O. AKTAS. 2006. The brain as a target of inflammation: Common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences* **29**: 518–527.

Clinical Study

Cysticerci Drive Dendritic Cells to Promote *In Vitro* and *In Vivo* Tregs Differentiation

Laura Adalid-Peralta,^{1,2} Asiel Arce-Sillas,² Gladis Fragoso,³ Graciela Cárdenas,¹ Marcos Rosetti,³ Didier Casanova-Hernández,² Claudia Rangel-Escareño,⁴ Laura Uribe-Figueroa,⁵ Agnes Fleury,^{1,2,3} and Edda Sciotto^{2,3}

¹ Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, 14269 México, DF, Mexico

² Unidad Periférica para el Estudio de Neuroinflamación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM en el Instituto Nacional de Neurología Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, 14269 México, DF, Mexico

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

⁴ Departamento de Genómica Computacional, Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 México, DF, Mexico

⁵ Unidad de Genotipificación y Análisis de Expresión Affymetrix, INMEGEN, Periférico Sur 4809, Arenal Tepepan, 14610 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Laura Adalid-Peralta; laura.adalid@gmail.com

Received 1 March 2013; Accepted 24 April 2013

Academic Editor: Arnon Nagler

Copyright © 2013 Laura Adalid-Peralta et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Regulatory T cells (Tregs) play a crucial role in immune homeostasis. Treg induction is a strategy that parasites have evolved to modulate the host's inflammatory environment, facilitating their establishment and permanence. In human *Taenia solium* neurocysticercosis (NC), the concurrence of increased peripheral and central Treg levels and their capacity to inhibit T cell activation and proliferation support their role in controlling neuroinflammation. This study is aimed at identifying possible mechanisms of Treg induction in human NC. Monocyte-derived dendritic cells (DC) from healthy human donors, cocultivated with autologous CD4⁺ naïve cells either in the presence or absence of cysticerci, promoted CD25^{high} Foxp3⁺ Treg differentiation. An increased Treg induction was observed when cysticerci were present. Moreover, an augmentation of suppressive-related molecules (SLAMF1, B7-H1, and CD205) was found in parasite-induced DC differentiation. Increased Tregs and a higher *in vivo* DC expression of the regulatory molecules SLAMF1 and CD205 in NC patients were also found. SLAMF1 gene was downregulated in NC patients with extraparenchymal cysticerci, exhibiting higher inflammation levels than patients with parenchymal parasites. Our findings suggest that cysticerci may modulate DC to favor a suppressive environment, which may help parasite establishment, minimizing the excessive inflammation, which may lead to tissue damage.

1. Introduction

Natural (thymic) and inducible regulatory T cells (Tregs) play a pivotal role in maintaining the immune system homeostasis. While natural Tregs are produced in the thymus at any time, inducible Tregs acquire a regulatory function in the context of a given infection or a neoplastic process [1]. A variety of inducible Treg subpopulations mediating their immune suppressive effects by different mechanisms have been reported [2–4]. Disregarding their effectiveness in

controlling inflammation, it is conceivable that Tregs could promote a more permissive environment for parasite establishment [5, 6]. The increased Treg levels found in many different protozoa and cestode infections are consistent with this possibility [7, 8].

The role of Tregs in neurocysticercosis (NC), a parasitic disease caused by the establishment of *Taenia solium* metacestode in the central nervous system (CNS), begins to be explored. Increased central and peripheral Treg levels were observed in severe NC patients. These Tregs seem to

participate in the control of the inflammatory response, since a negative correlation between the percentage of peripheral Tregs and activated CD8⁺ and CD4⁺ T cells, along with a depressed T cell proliferative response, was observed [9]. However, the mechanisms underlying Treg induction in NC are still unknown.

Dendritic cells play a prominent role in Treg induction in the beginning of the immune response to pathogens, either by promoting the conversion of naïve T cells to Treg subpopulations or by expanding the population of preexisting Treg cells [10]. Mature DCs direct conventional CD4⁺ cells to become either specific T helper or T regulatory cell subsets, depending on the affinity of their TCR to the antigen, the strength of the costimulatory signals provided by antigen-presenting cells (APCs), and the cytokine milieu. In addition, the absence of inflammation arrests dendritic cells into an immature or semimature state (iDC), which promotes T cell tolerance by conversion of naïve T cells into Tregs [11]. iDCs are characterized by expressing MHC II, by a high phagocytosis capacity, and by low CD80/CD86 expression. iDCs also produce IL-10, but neither IL-12 nor TNF α [10, 12]. Moreover, it has been proposed that preexisting Tregs can educate iDCs to become tolerogenic, promoting Treg generation [10, 13]. Helminths, as well as other pathogens, may modulate the immune tolerance properties of DCs [14–17].

This study was designed to evaluate the capacity of cysticerci to modulate dendritic cells, driving them to Treg induction, both *in vitro* and *in vivo*.

2. Materials and Methods

2.1. Parasites. *Taenia solium* metacestodes were obtained from naturally infected pigs coming from villages of Guerrero, an endemic region in Mexico. Pigs were euthanized according to ethical animal handling regulations in Mexico. Cysticerci were individually harvested from muscle tissue and maintained in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum and 1% antibiotics (Invitrogen, NY, USA). Cysticerci of *Taenia crassiceps* ORF strain were also used in this study to evaluate their potential to induce iDCs, and therefore Tregs. *T. crassiceps* cysticerci were obtained from infected BALB/cAnN female mice. Parasites were harvested from the peritoneal cavity of stock female mice after 10 weeks of infection.

2.2. Cell Purification and DC Generation in the Presence of Live Cysticerci. Human cells were isolated from buffy coats from blood of healthy donors (Banco de Sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, DF).

A RosetteSep Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail kit was used for CD4⁺ T cell purification (StemCell, Vancouver, Canada). Purified CD4⁺ T lymphocytes including >90% of CD3⁺ CD4⁺ cells were kept frozen at -80°C until used.

Monocyte-derived DCs (MDDCs) were isolated from mononuclear cells from healthy donors using a RosetteSep Human Monocyte Enrichment Cocktail kit (StemCell, Vancouver, Canada). MDDCs were generated as previously

reported [18] with only minor modifications. Briefly, monocytes were plated in Petri dishes (P100) at 5×10^5 cells/mL in 10 mL of RPMI 1640 medium (Invitrogen, NY, USA) containing 10% human AB serum (HSAB) and 1% antibiotics, 20 ng/mL IL-4 (eBiosciences CA, USA), and 100 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (eBiosciences, San Diego, CA, USA) for 8 days. One half of complete medium, including cytokines, was replaced at day 4.

To evaluate the role of cysticerci during DC differentiation, monocytes were cultured as described above, either with or without vesicular *Taenia crassiceps* (40 cysts) or *Taenia solium* (5 cysts) cysticerci per dish. The effect of both cestodes on DC differentiation was tested considering that murine cysticerci may eventually provide a controlled parasite source of purified immune-modulatory components. Dexamethasone at 10^{-7} M was used as a positive control.

2.3. In Vitro Treg Induction with Cysticercal Antigens. Parasite-induced MDDCs were seeded at 2.5×10^4 cell/mL in 1 mL RPMI 1640 medium (Invitrogen, NY, USA) containing 10% human AB serum and 1% antibiotics (Invitrogen, NY, USA). MDDCs were maintained in culture for 24 h. During this period, dexamethasone at 10^{-7} M, which maintains a tolerogenic DC phenotype, was used as control [19]. Parasite-induced DCs were pulsed using $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ of total antigens from *T. crassiceps* cysticerci. *T. crassiceps* antigens were employed considering that *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci share in common more than 98% of the expressed antigens [20]. 1.25×10^5 autologous CD4⁺ T lymphocytes were cocultured for 7 days with MDDCs in RPMI 1640 medium (Invitrogen, NY, USA) containing 10% human AB serum and 1% antibiotics (Invitrogen, NY, USA). Then, the phenotype of regulatory T cells was evaluated by flow cytometry as described below. Supernatants of these cultures were used to evaluate cytokine profile.

2.4. Cell Phenotype. The following combination of antibodies was used to characterize the phenotype of MDDCs: (a) MHC-II FITC (mouse IgG2a k), SLAMF1 PE (mouse IgG1 k), CD11c PerCP-eFluor 710 (mouse IgG1 k), and B7/HL APC (mouse IgG1 k); (b) CD83 FITC, CD80 PE, CD11c PerCP-eFluor 710 (mouse IgG1 k), and CD86 APC (mouse IgG1 k); (c) CD205 FITC (mouse IgG2b k), CD40 PE (mouse IgG1 k), CD11c PerCP-eFluor 710 (mouse IgG1 k), and ILT3 APC (mouse IgG1 k). Inducible regulatory T cell phenotype was assessed using CD127 FITC (mouse IgG1 k), Foxp3 PE (Rat IgG2a k), CD4 PerCp (mouse IgG1 k), and CD25 APC (mouse IgG1 k). Regulatory T cells were intracellularly stained for Foxp3 using the eBiosciences kit (most antibodies used for cell staining were purchased from eBiosciences, CA, USA). All antibodies were titrated for optimal detection of positive populations prior to its use, considering the manufacturer's recommended concentrations.

For cytometry analyses, cells were first gated according to lymphocyte forward and side light-scattering properties. Treg numbers were defined as the fraction of Foxp3⁺ cells among CD4⁺ CD25^{high} cells.

2.5. Cytokines. Cytokine levels in supernatants were measured using the cytometric bead array Cytokine Kit II (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, in an FACSCalibur cytometer. Data were analyzed with the BD Cytometric Bead Array software (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA). Flow cytometer was calibrated using BD FACSComp (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA) and BD CaliBRITE beads (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA). Assay sensitivities were set as follows: IL-2 (2.6 pg/mL), IL-6 (3.0 pg/mL), IL-10 (2.8 pg/mL), TNF- α (2.8 pg/mL), and IFN- γ (7.1 pg/mL). TGF- β were measured using the human/mouse TGF-beta 1 ELISA Ready-SET-Go (eBiosciences, CA, USA). ELISA was performed according to the manufacturer's instructions; detection limit was 60 pg/mL. All samples were run in duplicate.

2.6. DC and Treg Phenotype in NC Patients. Blood samples from 13 patients who attended at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía and Centro Médico Nacional Siglo XXI in Mexico City with confirmed NC diagnosis were included in this study. All samples were taken before any treatment was administered. Eight male (age mean 56.25 ± 3.8 years) and five female (age mean 37 ± 1.6 years) patients were included in this study.

In all cases, NC was diagnosed based on clinical manifestations (seizures, focal deficit, and intracranial hypertension) and radiological studies such as MRI and computed tomography (CT).

Vesicular parasites were observed in most cases (12/13 patients). A solitary cysticercus was seen in 9 patients, and multiple cysticerci in 2 patients; the rest of the patients had calcified and colloidal forms. In seven patients, parasite was located at the subarachnoid space of the base (SAB), while the rest of the patients showed parasites at the cerebral parenchyma (P). Patients with SAB cysticerci exhibited inflammatory traits in cerebral spinal fluid (glucose 30.7 ± 28 mg/dL, proteins 421 ± 407 mg/dL, and 70.7 ± 96.9 cell/mm³). In contrast, patients with parenchymal cysticerci showed no inflammation signs. Blood samples from 5 healthy subjects were included as controls.

2.7. Microarrays. DNA microarrays were used to compare the gene expression profile of mononuclear peripheral cells (PBMCs) from a cohort of 8 NC patients, 40 ± 14 years old. PBMC from all patients were obtained 8 days after cysticidal treatment with albendazole, 30 mg per kg, and concomitant corticosteroid administration. These 8 (4 females and 4 males) patients showed cysticerci in different locations. Cysticerci were established in the subarachnoid basal space or in the ventricles (SAB/IV) in 5 patients and were established in the cerebral parenchyma (P) in 3 patients. When required for patients' followup, CSF was obtained by lumbar puncture at the National Institute of Neurology and Neurosurgery of Mexico City. A mean of 74 cell/mm³ (range 1–261) was found in SAB/IV-NC patients, and a mean of 6.6 cell/mm³ (range 0–18) cells was found in P-NC patients. PBMCs were isolated

and then cultured by 72 h with *T. solium* cysticercal antigens, obtained as previously described [21].

Recovered cells were placed in TRIzol (Gibco, NY, USA) for RNA purification using the RNeasy mini kit (QIAGEN, TX, USA) following the manufacturer's instructions. The amount of obtained RNA was estimated in an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Comparisons were done with respect to parasite location (SAB/IV-NC versus P-NC) using the R-language platform, under the terms of the Free Software Foundations GNU General License (see <http://cran.r-project.org/>). Data were standardized and normalized. All genes were analyzed using the Reactome software (see <http://www.reactome.org/>) to find a possible biological pathway involved.

2.8. Ethical Considerations. The present study fulfilled all regulations for research with human subjects as required by the Mexican law and international regulations. It also complied with all ethical aspects considered in the General Rules of Health for Clinical Investigation. Ethics Committee at Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México approved the protocol. Written informed consent was obtained from all participants. Patients were informed that samples obtained would be used for this work.

2.9. Statistical Analysis. Data were processed in InStat (GraphPad Software Inc., CA, USA). Variables were described using mean \pm SD. Differences between groups were calculated with Students' *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Effect of Cysticerci on Dendritic Cell Phenotype. The semi-mature DC phenotype is associated with tolerance and Treg induction [12]. To evaluate the effect of cysticerci on dendritic cell differentiation, the phenotype of DC generated from CD14+ monocytes either in the presence or absence of vesicular cysticerci after 8-day culture was studied. Dexamethasone (10^{-7} M) was employed as a positive control (Figure 1). The expression of CD83+, as well as the costimulatory (CD80, CD86, CD40, HLA-DR) and regulatory molecules (SLAMF1, B7-H1, CD205, and ILT3) on CD11c+, was measured. As shown in Figure 1, a higher expression of SLAMF1, B7-H1, and CD205 was observed in cells differentiated in the presence of cysticerci. The expression of HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD40, and ILT3 molecules did not differ between control and parasite-driven differentiated DC cells. On the other hand, CD80, CD40, and SLAMF1 were diminished in dexamethasone-treated cells with respect to control (Figure 1). HLA-DR and ILT3 expression did not differ from control at any tested condition (data not shown). Altogether, these results indicate that parasite promotes the expression of molecules related to a DC tolerogenic phenotype.

3.2. Taenia Solium and T. crassiceps Cysticerci Promote In Vitro Regulatory T Cells Differentiation. We investigated whether

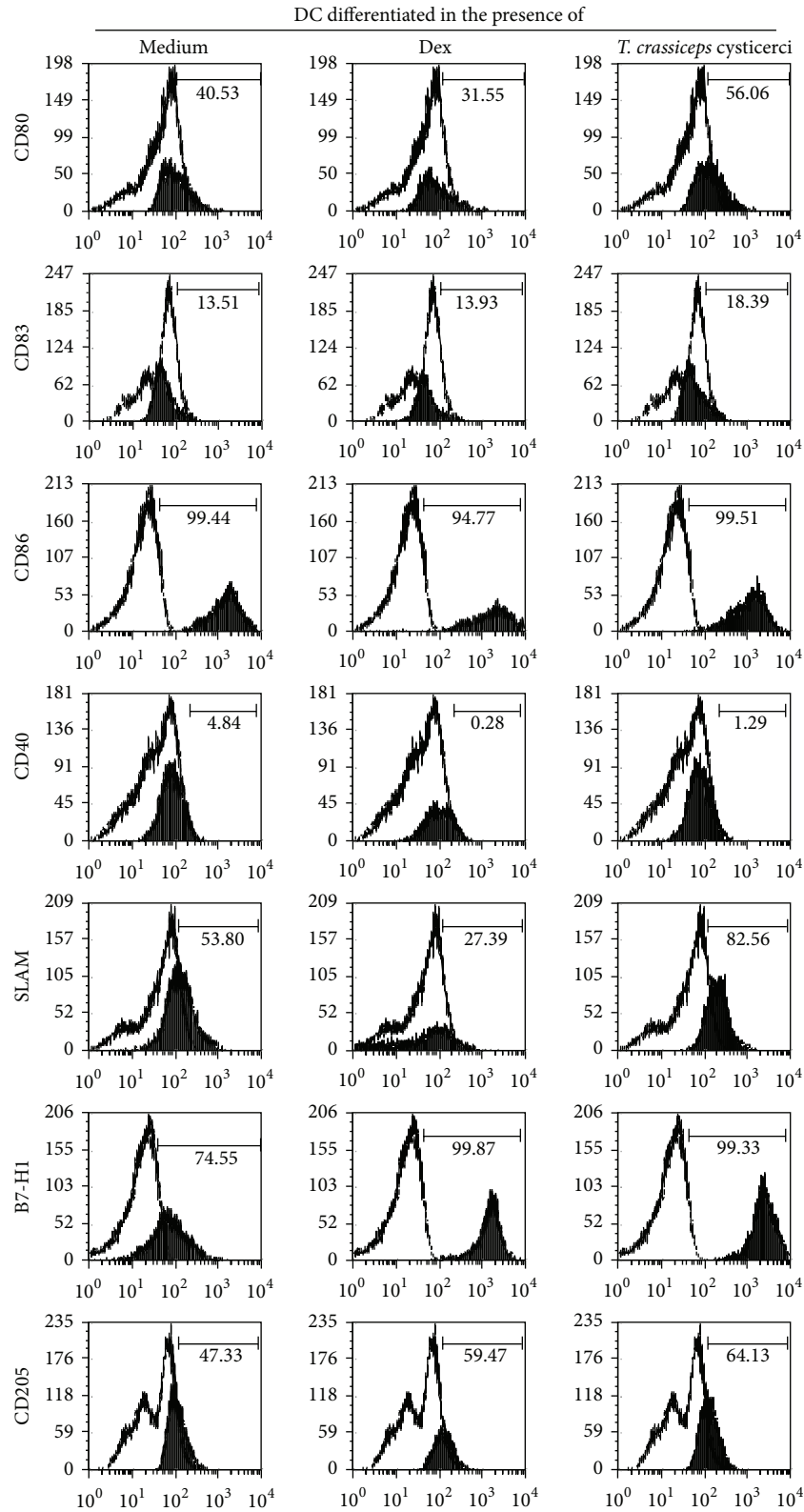
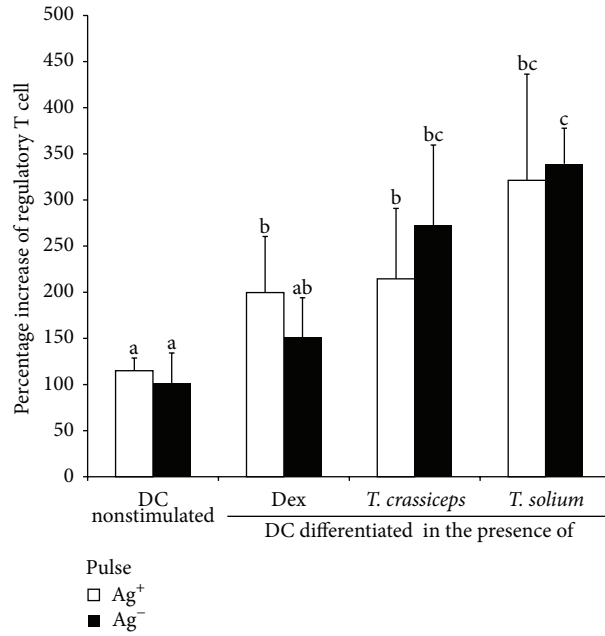
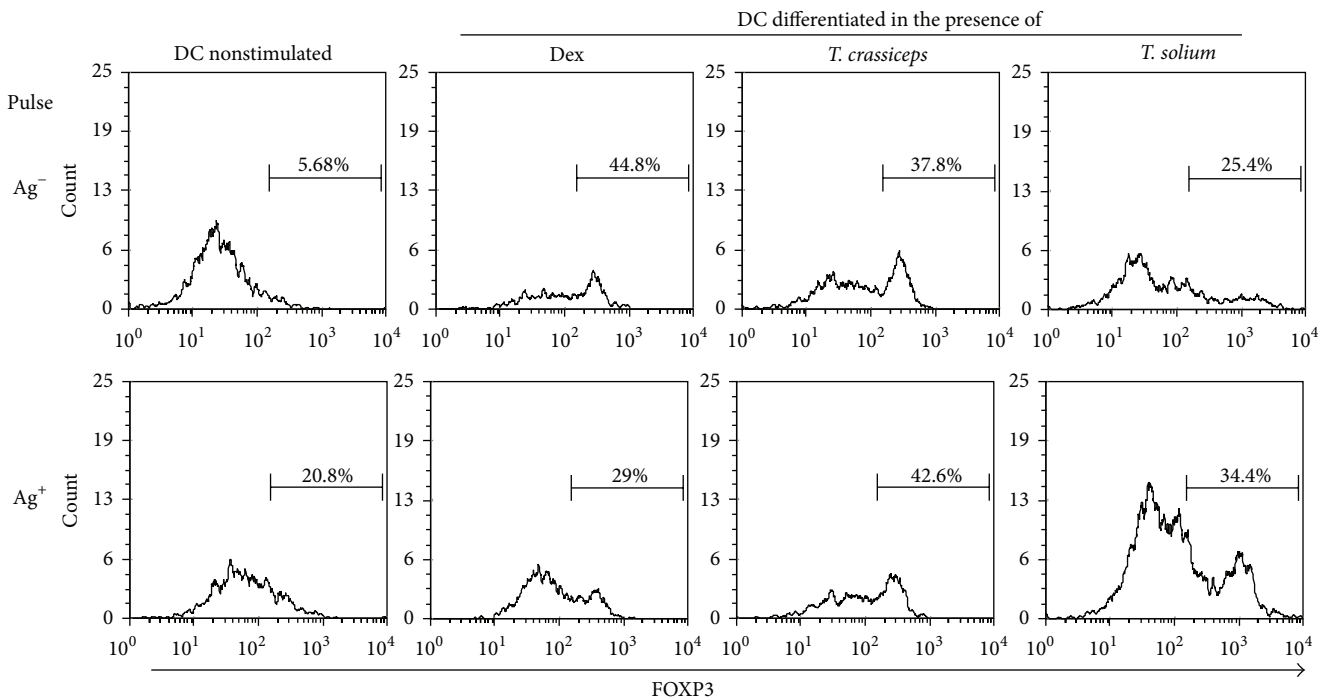


FIGURE 1: Parasite effect on DC differentiation and activation. Monocytes were differentiated to DC in presence of IL-4 and GM-CSF, plus medium or dexamethasone or *Taenia crassiceps cysticerci*. On day 8, the DC phenotype was studied. Representative data of three independent experiments are shown. Expression of CD80, CD83, CD86, CD40, SLAMF1, B7-H1, and CD205 gated on CD11c⁺ cells was analyzed by FACS. The isotype controls are shown in white histograms.



(a)



(b)

FIGURE 2: *In vitro* differentiation of dendritic cells in the presence of *Taenia solium* or *T. crassiceps* cysticerci promotes Treg induction. (a) Increased percentage in Treg cell induction. Percentage was calculated as follows: (percentage of Tregs induced/percentage of basal Tregs) × 100. Different letters indicate significant differences between groups at $P < 0.05$. (b) Representative histograms showing Foxp3 induction within CD4⁺ CD25^{high} cells. Data are representative of three independent experiments.

differentiation *in vitro* in the presence of live cysticerci stimulated the differentiation to CD4⁺ CD25^{high} Foxp3+ Tregs. Human DCs, either differentiated in the presence or absence of cysticerci, were pulsed or not with cysticercal proteins and used to stimulate autologous CD4⁺ T lymphocytes. Seven

days later, the expression of CD25^{high} and Foxp3 within CD4⁺ T lymphocytes was measured. As a positive control of Treg induction, differentiated DCs were treated with dexamethasone (10⁻⁷ M). As shown in Figure 2, cocultivation with cysticerci significantly increased the percentage of CD4⁺

TABLE 1: Levels of cytokines in supernatants from *in vitro* DC differentiation and *in vitro* regulatory T cell induction.

	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-2	TGF- β
DC nonstimulated	0.39 \pm 0.88	3.98 \pm 3.82	3.17 \pm 1.79	>5000	0.34 \pm 0.77	406.50 \pm 191.69
[†] Control medium 10% HSAB	3.55 \pm 0.51	5.78 \pm 1.79	5.12 \pm 1.50	>5000	1.59 \pm 1.41	ND
^b DC differentiation in the presence of						
Dexamethasone	0	3.12 \pm 0.47	30.84 \pm 5.82 ^a	>5000	0	545.17 \pm 289.37
<i>Taenia crassiceps</i>	0.78 \pm 1.75	2.98 \pm 1.75	3.77 \pm 1.76	>5000	0.72 \pm 0.98	341.50 \pm 238.19
<i>Taenia solium</i>	0	4.58 \pm 4.44	7.31 \pm 4.88	>5000	0	436.00 \pm 243.95
Treg induction from naïve CD4 ⁺ cells						
DC nonstimulated, nonpulsed (Ag ⁻)	0.76 \pm 1.31	1.21 \pm 1.07	0.99 \pm 0.93	2.58 \pm 0.70	0.45 \pm 0.78	124.60 \pm 5.35
DC nonstimulated pulsed (Ag ⁺)	0.78 \pm 1.75	2.06 \pm 0.88	1.22 \pm 1.12	2.78 \pm 0.60	0.43 \pm 0.95	93.07 \pm 16.98
Dexamethasone nonpulsed (Ag ⁻)	0.63 \pm 1.26	1.68 \pm 0.34	1.01 \pm 1.18	2.97 \pm 2.02	0.39 \pm 0.78	95.49 \pm 19.66
Dexamethasone pulsed (Ag ⁺)	1.00 \pm 1.74	2.49 \pm 0.36	2.32 \pm 1.36	2.78 \pm 1.10	1.38 \pm 1.27	98.63 \pm 26.39
<i>T. crassiceps</i> nonpulsed (Ag ⁻)	1.23 \pm 2.13	2.09 \pm 0.79	1.02 \pm 1.76	8.15 \pm 1.26	1.31 \pm 1.21	99.22 \pm 31.64
<i>T. crassiceps</i> pulsed (Ag ⁺)	1.26 \pm 1.81	2.18 \pm 0.38	1.44 \pm 0.81	29.34 \pm 46.75	0.43 \pm 0.95	119.80 \pm 42.56
<i>T. solium</i> nonpulsed (Ag ⁻)	4.50 \pm 2.61	2.35 \pm 0.68	1.48 \pm 2.10	56.99 \pm 5.21	12.14 \pm 11.79	111.00 \pm 3.54
<i>T. solium</i> pulsed (Ag ⁺)	1.73 \pm 2.45	2.28 \pm 0.68	1.95 \pm 0.09	11.68 \pm 6.02	6.61 \pm 6.16	78.50 \pm 21.21
Control T cell	1.54 \pm 1.41	1.90 \pm 0.48	1.77 \pm 0.99	2.01 \pm 0.45	0.88 \pm 1.20	101.00 \pm 16.58

^aSignificantly different ($P < 0.05$) compared to nonstimulated DC. ^bHuman AB sera from healthy donors were used in DC differentiation experiments.

[†]Levels of cytokines in the control medium supplemented with 10% HSAB are shown.

lymphocytes coexpressing the CD25^{high} and Foxp3 fraction with respect to non-stimulated DC, from 115 \pm 13.7 to 214.6 \pm 76.3 when cocultured with *T. crassiceps* ($P = 0.04$) and to 321.2 \pm 115 ($P = 0.05$) when cocultured with *T. solium* cysticerci. When DCs were pulsed with parasite antigens, Treg cells were also significantly increased, from 101.2 \pm 33 to 273 \pm 86.5 ($P = 0.01$) with *T. crassiceps*-differentiated DC cells, and to 339.3 \pm 38.6 ($P = 0.0002$) with *T. solium*-differentiated DC cells (Figure 2).

3.3. Cytokine Profile. The levels of induced cytokines were measured in supernatants from *in vitro* DC differentiation after 8 days of culture and from *in vitro* Treg induction after 7 days of culture. During DC differentiation, only IL-10 was significantly increased when cells were differentiated in presence of dexamethasone (Table 1). No difference was observed in the other tested conditions.

3.4. Dendritic Cells and Regulatory T Cells in NC Patients. The *in vivo* effect of parasite products on the phenotype of peripheral DC from NC patients was studied. The percentage of DC and the expression of regulatory (SLAMF1, CD205, and ILT3) and costimulatory molecules (HLA-DR, CD86, and CD40) in CD11c cells in 13 NC patients and 5 healthy subjects was measured. As Table 2 shows, SLAMF1, and CD205 are significantly increased in DC from NC patients from 3.8 to 9.7 and from 4.3 to 21.5, respectively ($P < 0.05$). Moreover, peripheral Tregs are also increased in NC patients from 4.35 to 14.22.

3.5. SLAMF1 Is Downregulated in PBMC from Patients with SAB/IV Parasites. As Table 3 shows, only four immune-related genes of the 32,322 included in the array were found downregulated in severe SAB/IV-NC patients with respect to

TABLE 2: Phenotype of peripheral dendritic and regulatory T cells in NC patients and healthy subjects.

Phenotype	NC patients	Healthy subjects	P
Dendritic cells			
SLAMF1 ⁺ CD11c ⁺	9.65 \pm 5.66	3.80 \pm 1.88	0.045
CD205 ⁺ CD11c ⁺	21.55 \pm 13.64	4.27 \pm 3.12	0.014
ILT3 ⁺ CD11c ⁺	35.01 \pm 27.61	31.48 \pm 28.70	0.813
HLA-DR ⁺ CD11c ⁺	71.47 \pm 19.87	69.05 \pm 12.96	0.805
CD86 ⁺ CD11c ⁺	39.70 \pm 25.87	54.21 \pm 12.45	0.250
CD40 ⁺ CD11c ⁺	7.92 \pm 7.98	2.81 \pm 1.49	0.182
T cells			
CD4 ⁺ CD25 ^{High} FoxP3 ⁺ CD127 ^{-/low}	14.22 \pm 9.08	4.35 \pm 4.26	0.0194
CD4 ⁺ T lymphocytes	30.85 \pm 11.49	43.59 \pm 5.60	0.07

P-NC patients. Among them figures the SLAMF1 gene, whose expressed protein was also found in dendritic cells from non-treated NC patients (Table 2). The other downregulated genes found in these patients were MTOR, NFKB2, and IL12RB2 (Table 3). In these severe SAB/IV-NC patients, TGB2 and IL24 genes were found to be up-regulated.

4. Discussion

Tregs play a pivotal role in modulating the host environment, so parasites may find more appropriate conditions for their establishment and development [7]. It is also possible that Tregs may favor the parasite persistence even when a specific treatment is used to promote the destruction of the parasite [22]. During *Taenia solium* infection, an increase in the levels of regulatory T cells in blood and CSF in NC patients

TABLE 3: Genes differentially expressed in NC patients with respect to the parasite location after 8 days of treatment.

NC caused by cysticerci localized in the subarachnoid base or intraventricular versus parenchymal			
	Genes	Log	B
Downregulated	MTOR	-0.69	0.95
	NFKB2	-0.93	0.78
	SLAMF1	-1.05	2.18
	IL12RB2	-0.81	1.19
Upregulated	IL24	0.82	0.96
	TGFB2	1.06	2.13

The log fold change (Log FC) describes how much a quantity changes from an initial to a final value in a determinate gene. *B* value represents the possibility that the gene is differentially expressed.

has been observed, probably promoted by the parasite for controlling the central inflammatory environment and thus favoring its survival [9]. Increased Tregs in NC patients may result from expanded natural Tregs or may be induced by the parasite. The latter possibility was explored herein. On the other hand, DCs may drive T cell differentiation to regulatory or effector cells, depending on their activation status. In this study, *in vivo* and *in vitro* lines of evidence point to the effect of cysticercal components on the activation of dendritic cells and their impact on promoting T cell differentiation to CD25^{high} Foxp3⁺ CD4⁺ T cells. Indeed, co-cultivation of dendritic cells with either *T. solium* or *T. crassiceps* cysticerci promotes a status that favors the differentiation of peripheral T cells to CD4⁺ Tregs. Comparable results were found when peripheral cells from non-treated NC patients were studied.

The similar effects induced by the presence both of *T. solium* or *T. crassiceps* cysticerci merit some comments. It is well known that both cestodes share multiple antigens [23], a fact that has been exploited to use the murine cysticercal antigens for diagnosis [24, 25].

Parasite-differentiated dendritic cells show no difference with respect to control in the maturation marker (CD83), neither in the costimulatory molecules HLA-DR, CD80, CD86, or CD40; these findings are compatible with an immature dendritic phenotype. In contrast, an overexpression of SLAMF1, B7-H1, and CD205 was observed. The latter two molecules are related to a tolerogenic DC phenotype, as reported in many studies [12, 26]. It is important to note that the expression of SLAMF1, B7-H1, and CD205 was found accompanied by Treg induction in this study, as well. However, their participation in Treg induction remains to be elucidated. This may be particularly relevant since no increase in the two main regulatory cytokines, IL10 and TGF β , was observed in the supernatants recovered during *in vitro* Treg induction (Table 1). An increased expression of SLAMF1 and CD205 in dendritic cells and in CD25^{high} Foxp3⁺ CD4⁺ T cells was observed in NC patients. Both *in vitro* and *in vivo* findings reinforce the relevance of SLAMF1 and CD205

dendritic cells, defining their critical role in T cell immunity regulation [27, 28].

It is also worth noticing the downexpression of SLAMF1 in the group of 8 SAB/IV-NC patients with respect to those patients harboring cysticerci in the parenchyma. This apparent discordance with the *in vitro* results from non-treated NC patients can be traced to differences promoted by *in vivo* or *in vitro* conditions, which may differentially modulate the expression of the SLAM-associated protein (SAP) in lymphocytes. Indeed, the expression of this adaptor SAP protein promotes the inflammatory response, while its absence promotes a regulatory environment [28]. SLAM-family receptors presenting cells ligands carry out important immunomodulatory functions: by one side, they regulate lymphocyte interactions and adhesion [28, 29] as well as a tolerogenic immune profile [11, 12]. Although there is no previous information about the functions of SLAM receptors during NC, the results shown in this study point to their possible participation in modulating the inflammatory response promoted by cysticidal and/or corticosteroid treatments. Changes found in MTOR, IL12RB2, NFKB2, and TGF- β genes match with an immunoregulatory environment. MTOR [30], IL12RB2 [31], and NFKB2 [32, 33] genes, coding for proteins that promote an inflammatory environment, are found downregulated, whilst TGF- β , which promotes a regulatory immune response [7], was up-regulated.

5. Conclusions

Overall, the results shown in this study reinforce our previous findings on the relevance of Tregs in controlling the extent of the inflammatory response in NC patients, and added *in vivo* and *in vitro* lines of evidence that cysticerci may drive a particular dendritic cell phenotype that induces regulatory T cells, even though the mechanisms that underlined this phenomenon remain to be elucidated. Additionally, while the clinical relevance of the promotion of this regulatory environment needs to be evaluated, it is feasible to propose that it could favor parasite survival.

Acknowledgments

This study was supported by CONACYT (CB-2008-01 100708, CB-2011-01 167278 and 86527) and by DGAPA IN213911, Mexico. Juan Francisco Rodríguez proofread the English version of this paper. The authors thank to Marisela Hernández for her technical assistance and Carlos Castellanos Barba for his technical assistance in flow cytometry.

References

- [1] J. F. Heiber and T. L. Geiger, "Context and location dependence of adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell formation during immunopathological conditions," *Cellular Immunology*, vol. 279, no. 1, pp. 60–65, 2012.
- [2] I. Apostolou, A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer, "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen," *Nature Immunology*, vol. 3, no. 8, pp. 756–763, 2002.

- [3] A. N. Akbar, L. S. Taams, M. Salmon, and M. Vukmanovic-Stejic, "The peripheral generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells," *Immunology*, vol. 109, no. 3, pp. 319–325, 2003.
- [4] L. W. Collison, V. Chaturvedi, A. L. Henderson et al., "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 12, pp. 1093–1101, 2010.
- [5] R. M. Maizels, A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M. D. Taylor, and J. E. Allen, "Helminth parasites—masters of regulation," *Immunological Reviews*, vol. 201, pp. 89–116, 2004.
- [6] R. M. Maizels and M. Yazdanbakhsh, "Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms," *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 9, pp. 733–744, 2003.
- [7] L. Adalid-Peralta, G. Fragoso, A. Fleury, and E. Sciuotto, "Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 1412–1426, 2011.
- [8] R. M. Maizels, E. J. Pearce, D. Artis, M. Yazdanbakhsh, and T. A. Wynn, "Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 10, pp. 2059–2066, 2009.
- [9] L. Adalid-Peralta, A. Fleury, T. M. García-Ibarra et al., "Human neurocysticercosis: *in vivo* expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system," *Journal of Parasitology*, vol. 98, no. 1, pp. 142–148, 2012.
- [10] R. A. Maldonado and U. H. von Andrian, "How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells," *Advances in Immunology*, vol. 108, no. C, pp. 111–165, 2010.
- [11] H. H. Smits, E. C. De Jong, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg, "Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity," *Trends in Immunology*, vol. 26, no. 3, pp. 123–129, 2005.
- [12] S. Rutella, S. Danese, and G. Leone, "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age," *Blood*, vol. 108, no. 5, pp. 1435–1440, 2006.
- [13] M. Kornete and C. A. Piccirillo, "Functional crosstalk between dendritic cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in the maintenance of immune tolerance," *Frontiers in Immunology*, vol. 3, article 165, 2012.
- [14] P. Mukherjee and V. S. Chauhan, "Plasmodium falciparum-free merozoites and infected RBCs distinctly affect soluble CD40 ligand-mediated maturation of immature monocyte-derived dendritic cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 84, no. 1, pp. 244–254, 2008.
- [15] M. Segura, Z. Su, C. Piccirillo, and M. M. Stevenson, "Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 7, pp. 1887–1904, 2007.
- [16] D. Van der Kleij, E. Latz, J. F. H. M. Brouwers et al., "A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 50, pp. 48122–48129, 2002.
- [17] C. C. Keller, O. Yamo, C. Ouma et al., "Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: *in vivo* and *in vitro* findings in severe malarial anemia," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 9, pp. 5249–5260, 2006.
- [18] N. Cohen, E. Mouly, H. Hamdi et al., "GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response," *Blood*, vol. 107, no. 5, pp. 2037–2044, 2006.
- [19] G. B. Ferreira, F. S. Kleijwegt, E. Waelkens et al., "Differential protein pathways in 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and dexamethasone modulated tolerogenic human dendritic cells," *Journal of Proteome Research*, vol. 11, no. 2, pp. 941–971, 2012.
- [20] C. Larralde, R. M. Montoya, E. Sciuotto, M. L. Diaz, T. Govezensky, and E. Coltorti, "Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 40, no. 3, pp. 282–290, 1989.
- [21] A. Chavarria, A. Fleury, R. J. Bobes, J. Morales, G. Fragoso, and E. Sciuotto, "A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis," *Microbes and Infection*, vol. 8, no. 4, pp. 1082–1089, 2006.
- [22] A. Verma, K. N. Prasad, S. S. Cheekatla, K. K. Nyati, V. K. Paliwal, and R. K. Gupta, "Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis," *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 200, no. 4, pp. 255–261, 2011.
- [23] E. Sciuotto, G. Fragoso, L. Trueba et al., "Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis," *Parasite Immunology*, vol. 12, no. 6, pp. 687–696, 1990.
- [24] G. C. Arruda, A. D. T. Da Silva, E. M. A. B. Quagliato, M. A. Maretti, and C. L. Rossi, "Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 10, no. 10, pp. 1005–1012, 2005.
- [25] R. H. S. Peralta, A. J. Vaz, A. Pardini et al., "Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis," *Acta Tropica*, vol. 83, no. 2, pp. 159–168, 2002.
- [26] H. Hamdi, V. Godot, M. C. Maillot et al., "Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper," *Blood*, vol. 110, no. 1, pp. 211–219, 2007.
- [27] T. Fukaya, R. Murakami, H. Takagi et al., "Conditional ablation of CD205⁺ conventional dendritic cells impacts the regulation of T-cell immunity and homeostasis *in vivo*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 28, pp. 11288–11293, 2012.
- [28] P. L. Schwartzberg, K. L. Mueller, H. Qi, and J. L. Cannons, "SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 1, pp. 39–46, 2009.
- [29] A. Veillette, Z. Dong, and S. Latour, "Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes," *Immunity*, vol. 27, no. 5, pp. 698–710, 2007.
- [30] J. H. Lee, J. P. Lydon, and C. H. Kim, "Progesterone suppresses the mTOR pathway and promotes generation of induced regulatory T cells with increased stability," *European Journal of Immunology*, vol. 42, no. 10, pp. 2683–2696, 2012.
- [31] F. Sinigaglia, D. D'Ambrosio, P. Panina-Bordignon, and L. Rogge, "Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function," *Immunological Reviews*, vol. 170, pp. 65–72, 1999.
- [32] E. F. Lind, C. L. Ahonen, A. Wasiuk et al., "Dendritic cells require the NF-κB2 pathway for cross-presentation of soluble antigens," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 1, pp. 354–363, 2008.

- [33] D. Artis, S. Shapira, N. Mason et al., "Differential requirement for NF- κ B family members in control of helminth infection and intestinal inflammation," *Journal of Immunology*, vol. 169, no. 8, pp. 4481–4487, 2002.

CASE REPORT

Open Access

Subarachnoidal Neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drugs: a case series

Graciela Cárdenas¹, Roger Carrillo-Mezo¹, Helgi Jung¹, Edda Sciotto², Jose Luis Soto Hernandez¹, Agnès Fleury^{1,2*}

Abstract

Background: Neurocysticercosis (NC) is one of the most frequent parasitic diseases of the central nervous system. Cysticidal drugs, albendazole and praziquantel, are generally effective when parasites localize in the parenchyma. In contrast, parasites lodged in the subarachnoid basal cisterns are less responsive to treatment.

Case Presentation: The clinical and radiological pictures of six Mexican patients non-respondent to cysticidal treatment are presented.

Conclusions: The possible factors involved in the cysticidal non-response are discussed and hints are provided of potentially useful changes to therapeutic protocols.

Background

Taenia solium is a parasite which larvae (cysticercus) may localize in the central nervous system of humans causing neurocysticercosis (NC). Most NC cases occur with little or no neurological symptoms but others may present a variety of non-specific mild clinical symptoms (headache, partial seizures) or severe neurological syndromes with intracranial hypertension and generalized seizures [1].

The introduction of cysticidal drugs, albendazole (ABZ) and praziquantel (PZQ), for the treatment of NC have dramatically improved its prognosis [2]. In Mexico, ABZ is becoming the drug of choice due to its low costs and availability. Parasite localization is one of the main factors involved in the success of the treatment. When cysticerci are lodged in the parenchyma, the use of these drugs allows generally a prompt radiological and clinical improvement in most of the patients although only a modest effect is reported in some cases [3,4]. When the parasites are located in the subarachnoid basal cisterns (SA-NC), the prognosis is more uncertain. Several case series have reported the effectiveness of these drugs in SA-NC treatment [5-7]. However, in our experience and that of others [4], it is a frequent finding that the parasites persist after treatment, even when a high dose of ABZ has been used [8].

In this report, six cases NC-SA patients who are non-respondent to conventional pharmacological treatment and a brief review of literature are described.

Case Presentation

Patient A (Figure 1, A0 to 1A3). A 46-year-old man with one year history of increasing incapacitating frontal headache. Upon admission, bilateral papilledema and upward gaze paralysis were shown. Multiple vesicular cysticerci located in opto-chiasmatic and perimesencephalic cisterns as well as basal meningeal enhancement were observed by magnetic resonance imaging (MRI). Increased cellularity (89 cells/mm³) and anti-cysticercal antibodies (Abs) determined by ELISA were detected in the cerebrospinal fluid (CSF). During one year, the patient received two cycles of ABZ (30 mg/kg/day) and one course of PZQ (50 mg/kg), for eight days, associated to corticosteroids. In the ninth month, he required a ventriculoperitoneal shunt (VPS) due to hydrocephaly. In all of MRIs, which were performed four months after each treatment cycle, most of the vesicular parasites persisted.

Patient B (Figure 1, B0 to 1B3). A 60 year old man with chronic headache. Nine months before hospital admission, headache frequency increased and lower limb motor dysfunction appeared. Neurological examination revealed only papilledema. On MRI, vesicular subarachnoidal NC in posterior fossa was observed. CSF analysis showed an inflammatory profile with abundant

* Correspondence: afeury@biomedicas.unam.mx

¹Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Colonia La Fama, Delegación Tlalpan, México DF, México, CP 14269

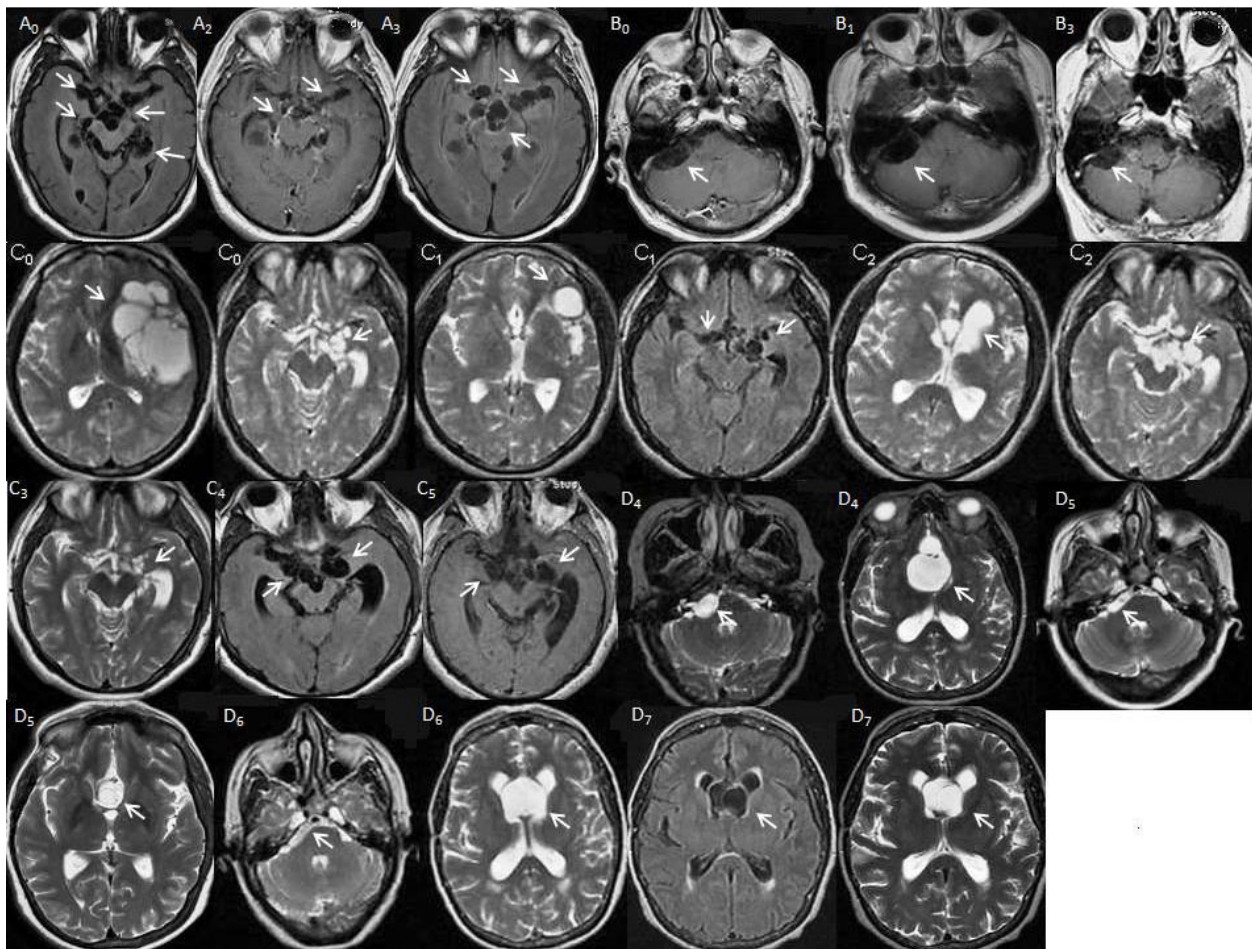


Figure 1 MRI of patients. Letters correspond to each of the patients and numbers corresponds to the moment of the MRI in relation to the number of cysticidal cycles administered (0: basal MRI, 1: after the first cycle, etc.). A0 (MRI T2 FLAIR): vesicular cysticerci in basal cisterns. Decrease (A2, MRI CE, T1) and increase (A3, MRI T2 FLAIR) in parasites. B0 (MRI CE T1): Vesicular parasites in the pontocerebellar angle. B1: Increase of parasite. B3: Persistence of parasite. C0 (MRI T2): Cysticercus in the Sylvian and basal cisterns. C1 (MRI T2, FLAIR): Decrease in Sylvian and persistence of basal cisterns parasites. C2 (MRI T2): Increase of lamina terminalis and basal cisterns parasites. C3 (MRI T2): Decrease of basal cisterns parasites. C4 (MRI CE T1): Increase of basal cisterns parasites and appearance of new ones. C5 (MRI FLAIR): Persistence of parasites. D4 (MRI T2): Parasites in the right pontocerebellar angle and in the lamina terminalis cisterns. D5 (MRI T2): Decrease of parasite volume. D6 (MRI T2): Increase of the lamina terminalis cistern vesicles. D7 (MRI FLAIR, T2): Persistence of vesicles.

lymphocytes and eosinophils. During the year following the diagnosis, he received two courses of ABZ at 30 mg/kg/day during 8 days and one course of ABZ at the same dose, associated with PZQ at 50 mg/kg plus corticosteroids. However, radiological evidence of vesicular parasites was still observed and CSF inflammatory profile and clinical complaints persisted.

Patient C (Figure 1, C0 to 1C5). A 29-year old man with new onset generalized seizures. CT scan showed vesicular NC and he received ABZ plus steroids in the United States of America. Post treatment, progressive motor dysphasia, right sided weakness and intracranial hypertension signs appeared. The patient returned to Mexico. MRI showed vesicular racemose cysticercosis on left Sylvian fissure with displacement of midline

anatomical structures. A second ABZ cycle was administered and although the racemose cyst evinced a substantial reduction, other SA vesicular parasites appeared. During two years this patient received four other courses of ABZ (30 mg/kg/day during eight days) and two combined courses of ABZ and PZQ. These treatments were delivered at the same doses as with the other patients and showed no evidence of parasite eradication.

Patient D (Figure 1, D4 to 1D7). A 65-year-old woman with vomiting, papilledema, gait disturbances, and urinary incontinency. The patient had a 6-year history of chronic headache. On admission, CT scan showed multiple vesicular parasites in the Sylvian fissure with mass effect. A surgical removal of parasites located in the

right Sylvian fissure and opto-chiasmatic cistern was performed. Three months after surgical procedure, a CT scan showed persistence of subarachnoid vesicular parasites in the chiasma and pontocerebellar cistern. CSF analysis revealed an inflammatory profile (20 cells/mm³) with presence of anti-cysticercal Abs. During four years, patient completed seven courses of ABZ (30 mg/kg/day during 8 days) associated to corticosteroids without complete clinical and radiological improvement.

Patient E (Figure 2, E3 to 2E7). A 40-year old man with a one-year-history of increasing headache, in frequency and intensity, associated with sporadic vomiting and generalized seizures. Papilledema and left slight motor weakness were observed on neurological examinations. A CT scan revealed a vesicular racemose cysticercus on the right Sylvian fissure, upon which surgical excision of parasites was performed. Diagnosis of vesicular cysticerci was confirmed by histopathology. Post-treatment, the patient showed clinical improvement, but six months later, motor deficit reappeared. MRI showed recurrence of parasites at the same location and CSF was inflammatory. During the five years following the first surgery, the parasites did not disappear in spite of the administration of seven courses of ABZ and one combined course of ABZ and PZQ with

corticosteroids. Clinically, the patient presents memory loss and corticosteroids side-effects as hyperglycemia and myopathy.

Patient F (Figure 2, F2 to 2F6). A 26-year old man with new onset partial motor epilepsy. His CT scan showed perimesencephalic vesicular parasites and CSF was inflammatory (75 cells/mm³) with specific anticysticercal Abs. During the following five years, the patient received 7 courses of ABZ (30 mg/kg/day during eight days with corticosteroids) and he required the placement of a VPS for hydrocephalus during the fourth year. In spite of the received treatment, vesicular parasites persisted on the last MRI, and CSF was still inflammatory.

Conclusion

This article reports six SA-NC patients in whom parasites relapsed despite repetitive administration of cysticidal treatment. Other non-responsive NC cases have been previously published (Table 1, [9-12]) but including patients that differ in the clinical picture, the parasite localization and cysticidal doses used. Even though the causes of the parasite's persistence, despite the ABZ treatment, are still unknown, multiple host and parasite factors may be involved. The possibility that

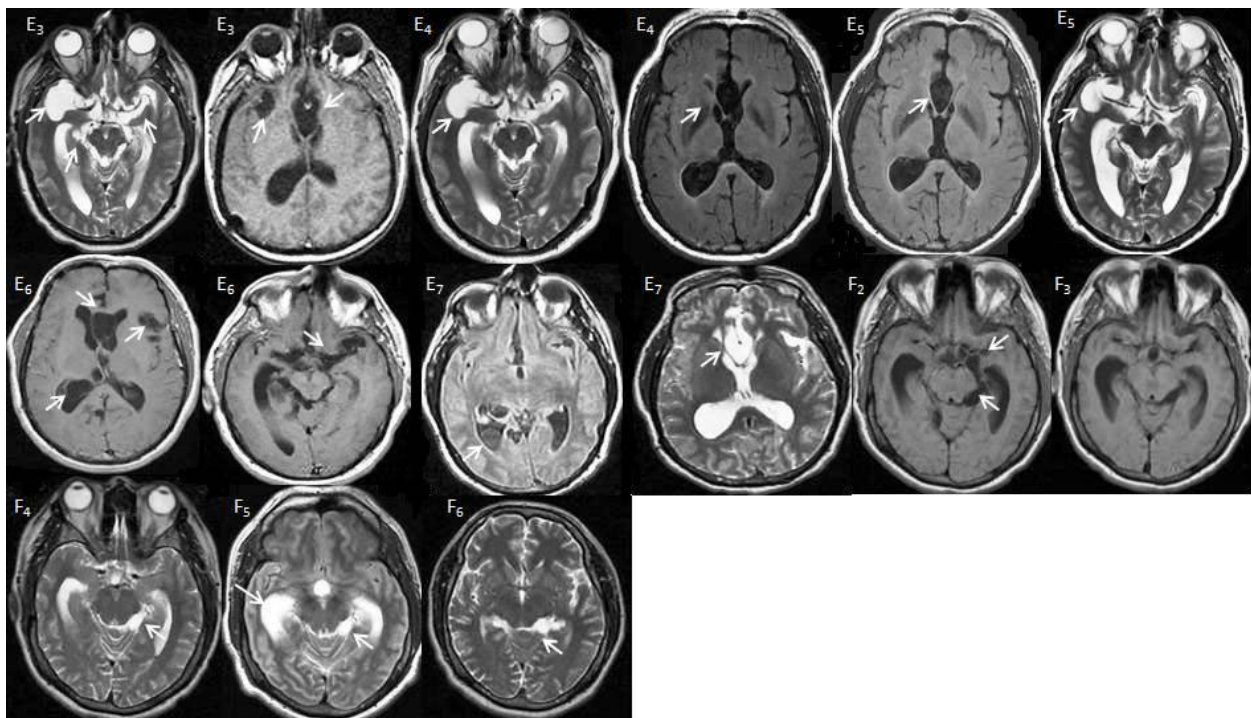


Figure 2 MRI of patients. E3 (MRI T2, T1): Parasites in Sylvian, basal and lamina terminalis cisterns. E4 and E5 (MRI T2, FLAIR): Persistence of some of the parasites. E6 (MRI simple, CE T1): Persistence of lamina terminalis parasites and appearance of new ones. E7 (MRI FLAIR, T2): Persistence of parasites. F2 (MRI T1): Parasites in the crural and ambient cisterns. F3 (MRI T1), F4, F5 and F6 (MRI T2): Persistence of ambient cistern parasites.

Table 1 Previous published cases of non-responder patients to cysticidal drugs.

Patient	Age/Sex	Parasites location	Clinical manifestations	Treatment	Reference
1	26/M†	SA (sulci)	Generalized seizures	PZQ, ABZ	[9]
2	38/F	SA (sulci)	Generalized seizures	PZQ, PZQ + ABZ	[10]
3	44/M	SA (Sylvian fissure)	Generalized seizures	ABZ, ivermectine	[11]
4	69/M	SA (sulci)	Partial seizures	ABZ, ivermectine	[11]
5	45/F	Fourth ventricle	Intracranial hypertension and ataxia	ABZ, ABZ + ivermectine	[11]
6	37/M	SA (sulci)	Partial seizures	ABZ, PZQ + ABZ, ivermectine	[11]
7	38/F	SAb and SA sulci	Seizures, hydrocephalus and motor deficit	ABZ	[12]

†M: male, F: female

the cysticidal drugs differentially affect the parasites according to their developmental stage (radiologically not- definable) could be a factor involved in the non-response observed. It is also possible that the lesser penetration of ABZ in the subarachnoid space could participate in the SA-NC resistance. Another factor involved in this phenomenon could be related to the variability in plasma and CSF ABZ sulphoxide levels among patients due to individual differences in bio-availability [2]. The high levels of corticosteroids used to prevent complications due to severe CSF inflammation may also turn-off key immunological components crucial for the parasite destruction. Finally, although resistance of cysticerci to ABZ in humans has never been reported, it may occur as it has been observed in other related parasites [13-15].

Whatever are the reasons, this scenario clearly points out to the relevance of developing new therapeutic strategies. One approach could be the elaboration of new albendazole formulations in order to improve its bio-availability and therapeutic efficacy [16]. Another approach is the search of new pharmacological alternatives as ivermectine, which seems to destroy cysticerci in patients resistant to cysticercidal drugs [11]. Nitazoxanide and tizoxanide combined with ABZ have also shown promising results albeit in vitro and using another related cestode [17].

Finally, although these non-respondent cases are not the most frequent, their severity should encourage controlled studies to evaluate new forms of medical intervention and management. In particular, fuller understanding of the key elements that participate in controlling the inflammatory response would greatly help in devising new, potent and less harmful ways to prevent severe disease.

Consent

Written informed consent was obtained from the patients for publication of these cases report and any accompanying images. A copy of the written consents is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Acknowledgements

This work was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (grant number S0008- 86527).

Author details

¹Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Colonia La Fama, Delegación Tlalpan, México DF, México, CP 14269.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Inmunología, AP70228, México DF 04510, México.

Authors' contributions

GC has been involved in the acquisition of clinical data and in drafting the manuscript. RCM has been involved in the acquisition of radiological data and in drafting the radiological part of the manuscript. HJ has been involved in the revision of the manuscript critically for important intellectual content. ES has been involved in the revision of the manuscript critically for important intellectual content. JLSH has been involved in the acquisition of clinical data, and in revision of manuscript for important intellectual content. AF participated in the design and coordination of the study, in drafting the manuscript and in its revision for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 8 October 2009

Accepted: 4 March 2010 Published: 4 March 2010

References

1. Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciotto E: Symptomatic human neurocysticercosis—age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 2004, **251**:830-837.
2. Jung H, Cárdenas G, Sciotto E, Fleury A: Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Curr Trop Med Chem* 2008, **8**:424-433.
3. Del Brutto OH, Roos KL, Coffey CS, García HH: Meta-analysis: Cysticidal drugs for neurocysticercosis: albendazole and praziquantel. *Ann Intern Med* 2006, **145**:43-51.
4. Carpio A, Kelvin EA, Bagiella E, Leslie D, Leon P, Andrews H, Hauser WA, Ecuadorian Neurocysticercosis Group: Effects of albendazole treatment on neurocysticercosis: a randomised controlled trial. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008, **79**:1050-1055.
5. Del Brutto OH: Albendazole therapy for subarachnoid cysticerci: clinical and neuroimaging analysis of 17 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997, **62**:659-661.
6. Bandres JC, White AC Jr, Samo T, Murphy EC, Harris RL: Extraparenchymal neurocysticercosis: report of five cases and review of management. *Clin Infect Dis* 1992, **15**:799-811.
7. Proaño JV, Madrazo I, Avelar F, Lopez-Felix B, Diaz G, Grijalva I: Medical treatment for neurocysticercosis characterized by giant subarachnoid cysts. *N Engl J Med* 2001, **345**:879-885.
8. Góngora-Rivera F, Soto-Hernández JL, González Esquivel D, Cook HJ, Márquez-Caraveo C, Hernández Dávila R, Santos-Zambrano J: Albendazole trial at 15 or 30 mg/kg/day for subarachnoid and intraventricular cisticercosis. *Neurology* 2006, **66**:436-438.

9. Cohen L, Belec L, Sanson M, Pierrot-Deseilligny C, Signoret JL: **Selective sensitivity of cysts to praziquantel and albendazole in a case of cerebral cysticercosis.** *Rev Neurol* 1992, **148**:58-61.
10. Chong MS, Hawkins CP, Cook GC, Hawkes CH, Kocen RS: **A resistant case of neurocysticercosis.** *Postgrad Med J* 1991, **67**:577-578.
11. Diazgranados-Sanchez JA, Barrios-Arrázola G, Costal JL, Burbano-Pabon J, Pinzón-Bedova J: **Ivermectin as therapeutic alternative in neurocysticercosis that is resistant to conventional pharmacological treatment.** *Rev Neurol* 2008, **46**:671-674.
12. Rocha MA Jr, Santos JM, Gomes EC, Rocha MA, Rocha CF, Carvalho GT, Costa BS: **Treatment of cerebral cysticercosis with albendazole in elevated dosages.** *Arq Neuropsiquiatr* 2008, **66**:114-116.
13. Sissay MM, Asefa A, Uggla A, Waller PJ: **Assessment of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep and goats owned by smallholder farmers in eastern Ethiopia.** *Trop Anim Health Prod* 2006, **38**:215-222.
14. Equale T, Chaka H, Gizaw D: **Efficacy of albendazole against nematode parasites isolated from a goat farm in Ethiopia: Relationship between dose and efficacy in goats.** *Trop Anim Health Prod* 2009, **41**:1267-1273.
15. Jimenez-Cardoso E, Eligio-García L, Cortes-Campos A, Flores-Luna A, Valencia-Mayoral P, Lozada-Chavez I: **Changes in beta-giardin sequence of *Gardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains.** *Parasitol Res* 2009, **105**:25-33.
16. Mittapalli PK, Yamasani MR, Shashank A: **Improved Bioavailability of Albendazole Following Oral Administration of Nanosuspension in Rats.** *Current Nanoscience* 2007, **3**:191-194.
17. Palomares Alonso F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H: **Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combinations against *Taenia crassiceps* cysts.** *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**:212-218.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:<http://www.biomedcentral.com/1471-2377/10/16/prepub>

doi:10.1186/1471-2377-10-16

Cite this article as: Cárdenas *et al.*: Subarachnoidal Neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drugs: a case series. *BMC Neurology* 2010 **10**:16.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



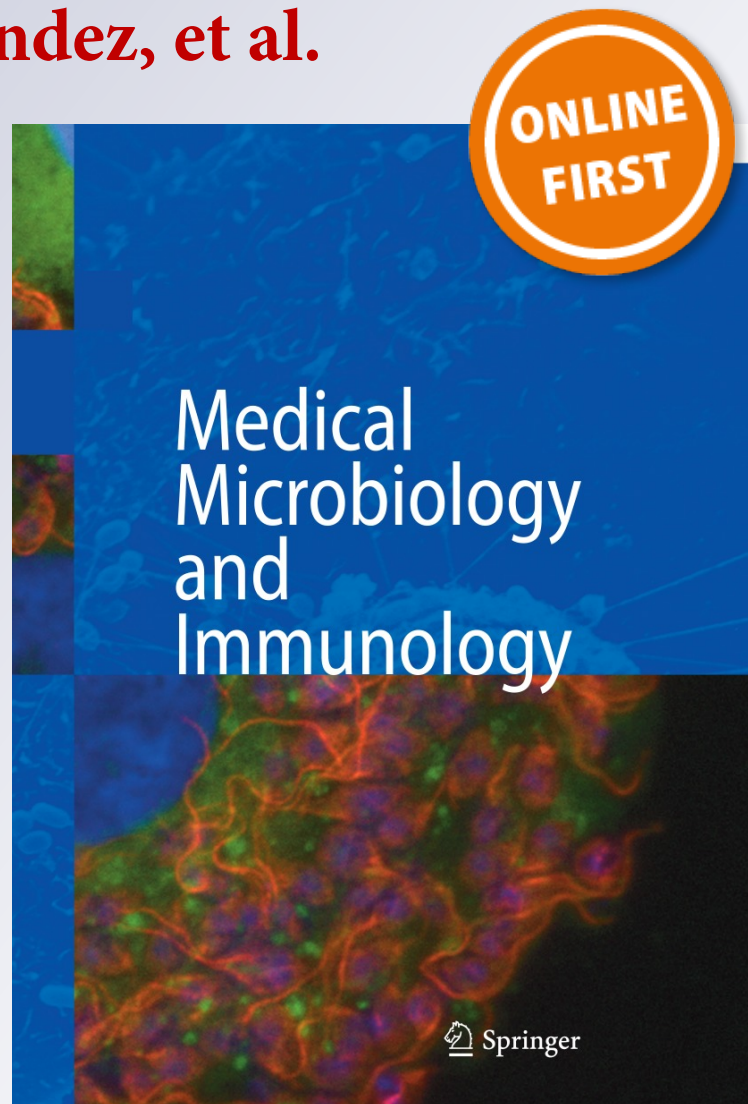
Neurocysticercosis: the effectiveness of the cysticidal treatment could be influenced by the host immunity

Graciela Cárdenas, Gladis Fragoso, Marcos Rosetti, Laura Uribe-Figueroa, Claudia Rangel-Escareño, Brenda Saenz, Marisela Hernández, et al.

Medical Microbiology and Immunology

ISSN 0300-8584

Med Microbiol Immunol
DOI 10.1007/s00430-014-0345-2



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag Berlin Heidelberg. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Neurocysticercosis: the effectiveness of the cysticidal treatment could be influenced by the host immunity

Graciela Cárdenas · Gladis Fragoso · Marcos Rosetti ·
Laura Uribe-Figueroa · Claudia Rangel-Escareño · Brenda Saenz ·
Marisela Hernández · Edda Sciutto · Agnes Fleury

Received: 16 March 2014 / Accepted: 10 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Neurocysticercosis, a clinically and radiologically pleomorphic parasitic disease, is still endemic to most non-developed countries of Latin America, Africa, and Asia. Anti-helminthic drugs (AHD) are generally effective and rapidly destroy parenchymal cysticerci. In contrast, several cycles of AHD are frequently necessary to damage extraparenchymally located parasites. The present study was designed to evaluate whether differences in the immunological profile of the patients is involved in the diversity of the response to AHD. To this end, a global gene expression microarray and a cytokine analysis were made. Responder patients were those showing a radiological reduction greater than 50 % in the parasite burden following AHD treatment. Microarray pre- and post-treatment comparisons showed that a total of eighteen immune-related genes were up-regulated in the five responder patients with respect the expression profile seen in the four non-responder subjects. The function of up-regulated genes exerted pro-inflammatory (ROR γ C, Sema4A, SLAMF3, SLAMF6), anti-inflammatory (TGF β ,

TNFRSF25, TNFRS18, SLAMF1, ILF2), or immunomodulatory effects (CXCL2, RUNX3, SLAMF9, TGFBR3). To further explore the causes of the heterogeneity in the response to treatment, a wide ELISA cytokine analysis was performed in serum, PBMC supernatants, and CSF samples from 39 responder and 26 non-responder patients. Responder patients showed higher CSF IL-17A levels ($P = 0.04$) and higher supernatant IL-6 levels ($P = 0.03$) 60 days after treatment. These results suggest a possible influence of pro-inflammatory cytokines on the response to AHD as observed by radiological methods, and thus the possible participation of the host immunity in the effectiveness of AHD treatment.

Keywords Neurocysticercosis · Immune response · AHD responder · AHD non-responder

Introduction

Human neurocysticercosis (NC), caused by the establishment of the larval stage of *Taenia solium* in the central nervous system, is still an endemic parasitosis in most countries of Latin America, Africa, and Asia [1]. The clinical and radiological picture of NC is highly heterogeneous, as well as its response to the treatment [2]. The cysticerci localization (parenchymal or extraparenchymal) and the intensity of the host inflammatory response against the parasite are important factors related to the severity and prognosis of the disease [3, 4]. When parasites are located in the parenchyma (P), the inflammatory reaction is limited to the areas surrounding the parasite, and the most common symptom is epilepsy. In most of these cases, anti-helminthic (cysticidal) drugs (AHD: albendazole and praziquantel) are quite effective and the cysticerci became calcified or disappeared after a single cycle of AHD treatment.

G. Cárdenas
Department of Infectious Diseases, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico

G. Fragoso · M. Rosetti · B. Saenz · M. Hernández · E. Sciutto
Department of Immunology, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

L. Uribe-Figueroa · C. Rangel-Escareño
Department of Computational Genomics, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

A. Fleury (✉)
Peripheral Unit of Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) at Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía / Clinic of Neurocysticercosis, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico
e-mail: afleury@biomedicas.unam.mx

Table 1 General characteristics of the nine patients included in the microarray analysis

Age/Gender	Previous treatment ^a	Clinical characteristics	Cysticidal therapy			
			Before (T0)		Two months after (T2)	
			Radiological characteristics	CSF (#cells/mm ³)	CSF (#cells/mm ³)	Clinical outcome
26/Female	No	Headache	MC, SAS/IV	67	12	NR
63/Female	No	Headache	MC, SAB	18	12	NR
31/Male	No	ICH	MC, SAB	1	20	R
19/Male	No	Headache	SC, SAS	18	18	R
28/Male	No	Generalized epilepsy	SC, SAS	7	7	R
56/Female	Yes	ICH	MC, SAB	261	27	NR
33/Female	Yes	ICH	MC, SAB	187	496	NR
42/Male	Yes	ICH	MC, SAB	16	ND	R
44/Male	Yes	ICH	MC, SAB/IV	27	57	R

ICH intracranial hypertension, *SAS* subarachnoid of sulci, *SAB* subarachnoid of the base, *IV* intraventricular, *R* responder, *NR* non-responder, *MC* multiple cysticerci, *SC* single cysticercus, *ND* no data available

^a Corticosteroids

In contrast, when cysticerci are located extraparenchymally in the subarachnoid space of the base (SAB), inflammation spreads to the entire subarachnoid space, leading to complications such as vasculitis, arachnoiditis, and hydrocephalus [2, 5]. These severe forms of NC are less susceptible to AHD treatment. Indeed, almost one-third of patients require more than two cycles of AHD treatment to significantly damage the cysticerci [2, 6]. The reasons for this poor responsiveness to the AHD are not yet elucidated [7, 8], although the concomitant administration of corticosteroid to avoid frequent and severe inflammatory complications may be involved. Due to their potent immunosuppressive properties [9], corticosteroids may diminish the exacerbated specific immunity against the parasite. The latter seems to be required in conjunction with AHD to promote parasite destruction.

These observations stress the relevance of studying the immune-inflammatory profile accompanying the differential responsiveness to AHD treatment. The immunological profile varies between asymptomatic parenchymal patients and severe SABNC. A predominant Th2 profile of circulating immune cells (increased IL-4, IL-5, and IL-13) was reported in parenchymal NC. A depressed lymphocyte proliferative response, with CSF pleocytosis, increased IL-6, IL-5, and IL-10 levels in CSF along with an increase in peripheral and central regulatory lymphocytes (CD4+/CD25high/FoxP3+/IL10+) were found in NC patients with extraparenchymal SAB parasites [4, 10–12].

By analyzing genome-wide expression patterns, the present study assessed whether the responsiveness to AHD treatment in patients with severe SABNC was associated with particular immunological features of circulating immune cells.

Materials and methods

Patients

A total of 74 patients who attended at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) in Mexico City from February 2007 to December 2010 were included. Inclusion criteria were as follows: definitive NC diagnosis using the revised criteria of Del Brutto [13], the presence of vesicular parasites, administration of AHD treatment (albendazole, 30 mg/kg/day for 8 days associated with corticosteroids: one week of dexamethasone, 0.3 mg/kg/day, and then prednisone in a tapering schedule), and a clinical follow-up of 4 months or more after the end of the treatment. The number, degenerative stage, and location of all cysticerci were radiologically (CT scan and MRI) defined, and the clinical manifestations of all patients were retrieved from clinical records.

Patients were classified into responder (R) or non-responder (NR) by neuroimaging according to their response to treatment after 4 months of AHD. Patients showing a reduction greater than >50 % in parasite burden were considered as R patients, being NR those in which reduction was ≤50 %.

Two complementary approaches were used: microarray hybridization and cytokine determination. Nine patients were prospectively included (4 NR and 5 R) in the microarray hybridization study. The rationale for this strategy was to use microarray hybridization as a prospective tool, whose findings would be then validated by cytokine assay. Patient demographical, clinical, and radiological characteristics, as well as treatment outcome are summarized in Table 1. Patients were followed-up for at least 4 months after specific AHD treatment. Three venous samples were

taken from each patient: before AHD treatment (T0), after 8 days of treatment, and 2 months after treatment (T2). A CSF sample was also collected from those patients who required a lumbar puncture for medical follow-up. In this group, mean ages were 32.8 ± 10.3 years in R patients and 44.5 ± 17.7 years in NR cases ($P = 0.39$). CSF-cellularity was 13.8 ± 10.08 cell/mm³ in R patients and 133.2 ± 110.8 cell/mm³ in NR ($P = 0.13$). The main parasite location in NR and R was SAB (100 and 60 %, respectively), $\chi^2 = 2.05$ ($P = 0.44$). All NR patients showed multiple parasites. Four R patients had multiple parasites and the remaining case only one.

For cytokine determination, 65 patients were retrospectively included the following: 39 R (14 of them with corticosteroid therapy) and 26 NR (13 of them with corticosteroids therapy) to AHD treatment. The samples from these patients were retrieved from a bank containing serum, CSF and supernatants from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures (SN). Mean ages in this group were 44.8 ± 14.7 years in R and 39.7 ± 11.8 years in NR ($P = 0.1$). Both groups (R and NR) had no differences in sex distribution: Twenty-three were females and 41 males, overall. Among R patients, 72 % showed SAB parasites, with 93 % of NR presented this localization ($\chi^2 = 13.51$, $P = 0.003$). Characteristics of CSF, concentration of cells and protein counts did not differ between R and NR patients ($P = 0.35$ and $P = 0.61$, respectively).

Antigen preparation

Vesicular antigen fraction (TsAg) was obtained from *Taenia solium* cysticerci as previously reported [11]. Briefly, skeletal muscle-derived cysticerci from an infected pig were washed with phosphate-buffered saline solution, homogenized, and centrifuged. The supernatant containing soluble antigens was recovered and calcium-precipitated. Then, the supernatant was filtered under sterile conditions, quantified, and frozen at -20 °C until used.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) culture

Twelve mL of peripheral venous blood were drawn into an EDTA-containing tube. The blood was diluted 1:2 with RPMI medium 1640 (Gibco BRL, Grand Island NY), layered over Ficoll-Hypaque (Amersham Life Sciences, Little Chalfont, UK), and centrifuged at $400 \times g$ for 30 min at room temperature. Plasma was recovered and frozen at -80 °C. PBMC were washed three times with RPMI, suspended in RPMI medium 1640 supplemented with 10 % of human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 ng/mL streptomycin, 1 % nonessential amino acids, and 1 % pyruvate (Gibco BRL). PBMCs were re-stimulated with 35 μ g/well/mL of TsAg per 2.5 million cells,

incubated at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere in 12-well flat-bottom culture plates (Costar, Cambridge, MA).

RNA extraction and microarray hybridization

After collecting PBMCs from culture at 72 and 120 h, cells were homogenized. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocols. The RNA amount and quality was confirmed in an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Deutschland GmbH Hewlett Packard, Strasse 8, 76337, Waldbronn).

RNA was then processed and labeled according to standard target labeling protocols. Samples were hybridized, stained, and scanned by standard Affimetrix protocols for human gene 1.0 expression array (Affimetrix Inc., Santa Clara, CA).

In vitro cytokine titration

Supernatants (SN) from cultured PBMCs stimulated in vitro with TsAg for 72 h were used to detect IL-2, IL-6, IL-10, TGF- β , IL-17A, IL-17F, and IL-17AF, whereas those recovered after 120 h of culture were used to detect IL-4 and IFN- γ . All supernatants were harvested and stored at -80 °C until use for cytokine quantification. Cytokines in serum and CSF from all patients were evaluated by a commercial sandwich ELISA kit (BD Pharmingen Cytokine Sets, CA; eBioscience; R&D Duo-Set, UK). The sensitivity level was 9.4 pg/mL for all tested cytokines.

Statistical analysis

A low-level analysis of microarray hybridization results was performed using R and several Bioconductor packages. [14–16]. Data were background-corrected using GC-RMA [13], and quantiles were normalized [17, 18]. RMA performs background correction, quantile normalization, and also summarizes the probe level information without requiring information from the MM probes. GeneChipRMA (GC-RMA) is an improved form of RMA that is able to use the sequence-specific probe affinities of GeneChip probes to attain more accurate gene expression values. After normalization and background correction, genes were classified as differentially expressed according to two main statistics: the log fold change, which provided the magnitude of differential expression between responder and non-responder groups, and the B-statistic, a nonparametric Bayes log posterior odds that was automatically corrected for multiple comparisons using Benjamin-Hochberg false discovery rate (FDR) [19], which quantified statistical significance. Differential gene expression was considered to be significant if $P < 0.05$.

ELISA data were expressed as median with 95 % confidence interval, and compared using the two-tailed Student's *t* or Mann–Whitney test, based on their behavior in the Kolmogorov–Smirnov test. As parasite location was significantly associated with the response to treatment (SAB NC are less responsive), the univariate analysis was adjusted by this variable. Qualitative variables were expressed in percentages and compared using the χ^2 distribution. Statistically significant differences were considered at $P < 0.05$. All data were recorded in Excel software (Microsoft Co., Redmond, WA) and analyzed using the SPSS version 21 software (IBM Inc., Armonk, NY).

Results

Generating a global immunological hypothesis from microarrays

Patients who exhibited a radiological response to AHD treatment showed several immunological genes up-regulated, both pre- and post-treatment (Table 2). As shown in Table 2, the up-regulated genes have pro- or anti-inflammatory functions, as well as immunomodulatory roles. Most of them exhibited a fold change ranging from 1.38 to 2.88. Only the CXCL2 (Chemokine[C–X–C motif] ligand 2) and the ILF2 (interleukin enhancer binding factor 2) displayed a high fold change of 7.84 and 7.78, respectively. Both genes are involved in immunoregulation processes. With regard to down-regulated genes, this was the case for CD5L (FC 1.44, *B* 5.77) (T0) and TGFB2 (FC 1.06, *B* 2.13) (T2).

Findings from Table 2 made clear that several genes (RORC, RUNX3, SLAMF3, SLAMF6) involved in Th17 response, as well as others displaying anti-inflammatory and immunomodulatory roles, were up-regulated in responder patients.

Evaluating factors possibly involved in the heterogeneity of treatment response

Considering that NC is a heterogeneous disease and several factors may partake in the differing treatment response (parasite location, host age and sex), we evaluated whether these factors could be involved in the heterogeneity of treatment response. The parasite location (SAB or SAS) at T0 ($\chi^2 = 6.102$, $P = 0.019$) and at T2 ($\chi^2 = 7.550$, $P = 0.007$) was statistically different between R and NR patients. Additionally, some cytokines were significantly different between patients with SAB- and SAS-located parasites: TGF- β in CSF at T0 ($P = 0.04$) and IL-17AF ($P = 0.04$) and IL-17F ($P = 0.007$) in SN at T2 (data not shown). No differences were found regarding age ($P = 0.1$) and gender ($\chi^2 = 0.489$, $P = 0.6$).

Differential cytokine profile of peripheral immune cells between R and NR patients

Tables 3 and 4 show significant differences in the cytokine profile between R and NR groups in SN and CSF samples. Responder patients showed higher CSF IL-17A levels ($P = 0.04$) and higher SN IL-6 levels ($P = 0.03$) at T2. Nonsignificant statistical trends were also found: responder patients showing lower IL-10 levels ($P = 0.08$) both in CSF and SN at T0, and a tendency on SN IL-17A ($P = 0.09$) and IFN- γ ($P = 0.06$) at T2.

No significant differences in serum cytokine levels between R and NR patients were observed (data not shown). Parallel analyses comparing cytokine levels between patients with and without corticosteroid treatment before AHD revealed no statistical differences (data not shown).

Determination of cytokine serum/CSF index in responder and non-responder patients

Lastly, we calculated a serum/CSF index for each cytokine according to the response to treatment. While a low IL-2 index was found in NR patients, decreased IL-17A, IL-17AF, IL-2, and IL-6 indexes were seen in R cases. Differences between R and NR patients remained insignificant, although a tendency of lower ratio of IL-6 in R patients was observed ($P = 0.059$).

Discussion

Peripheral and local inflammation is critically related to NC severity and to its prognosis after AHD treatment [3, 4, 20, 21]. Thus, this study was designed to explore the immunoinflammatory features related to the response or the lack of response to AHD treatment. Based on the current knowledge on the close communication between peripheral and central immunity [22], the gene expression pattern of PBMCs specifically stimulated in vitro was used to identify differences in the transcription profile of NC patients responding to AHD with respect to those who failed to do so.

Unexpectedly, responder patients to AHD showed up-regulation only in 18 genes involved in several immune functions (Table 2), which include pro- and anti-inflammatory, as well as some immunomodulatory functions. The overexpression of several Th17 genes (RORC, RUNX3, SLAMF3, SLAMF6) in responder patients points out to the possible relevance of this inflammatory pathway in the responsiveness to the treatment.

CD5L, an immunological gene, was found down-regulated in R with respect to NR patients. CD5L has been

Table 2 Genes significantly over-expressed in responder respect non-responder NC patients to AHD treatment

Responder versus non-responder				
Gene	Immune function	Fold change	<i>B</i>	
CXCL2 (Chemokine [C-X-C motif], ligand 2)	Involved in mononuclear cell chemotaxis and increase in Treg migration (IMM)	7.84	1.55	
ILF2 (interleukin enhancing factor 2, NFAT)	A key regulator of T cell activation and anergy, it converts the acute T cell activation program into the suppressor program of Tregs (ANTI-IN)	7.78	2.55	
RORC (RAR-related orphan receptor C)	Transcription factor involved in the induction of T-helper 17 cell differentiation (PRO-IN)	2.88	3.48	
SLAMF9 (SLAM family member 9)	A subfamily of the immunoglobulin superfamily. Encodes differentially expressed cell-surface receptors of hematopoietic cells (IMM)	2.75	3.87	
C1QB (subcomponent B)	Involved in the innate immune response (PRO-IN)	2.62	2.41	
IL12RB2 (Interleukin 12 receptor beta 2)	It regulates positively T cell and IFN production (PRO-IN)	1.57	2.42	
TNFRSF18 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18)	Increased expression upon T cell activation. Thought to play a key role in dominant immunological self-tolerance (ANTI-IN)	1.57	3	
Sema4A (semaphoring 4A)	It enhances T cell activation and differentiation in vitro and potentiates the in vivo the generation of antigen-specific T cells (PRO-IN)	1.55	4.69	
SLAMF3 (SLAM family member 3)	A subfamily of the Igs superfamily. It encodes cell-surface receptors of hematopoietic cells and promotes Th17 differentiation (PRO-IN)	1.49	2.69	
TGFB2 (Transforming growth factor 2)	It regulates the proliferation, differentiation, adhesion, and migration of several cells (ANTI-IN)	1.48	1.25	
TNFRSF25 (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25)	It regulates lymphocytes homeostasis. It can stimulate NF-kappa B activity, regulating cell apoptosis (ANTI-IN)	-1.06	2.13	
IL2RA (interleukin 2 receptor A)	It regulates lymphocytes homeostasis. It can stimulate NF-kappa B activity, regulating cell apoptosis (ANTI-IN)	1.45	4.97	
IL19 (interleukin 19)	Negative and positive regulation of T cell proliferation (IMM)	1.44	4.58	
RUNX3 (runt-related transcription factor 3)	It belongs to the IL-10 family, and can bind to the IL-20 receptor leading to STAT3 activation (IMM)	1.43	4.42	
RUNX3 (runt-related transcription factor 3)	Required for differentiation and function of Tregs. Associated with Thr17 induction of (IMM)	1.42	4.26	
TGFB3 (Transforming growth factor receptor III)	A potential negative regulator of TGFβ signaling. It negatively regulates NFK-β signaling (IMM)	1.39	2.02	
SLAMF5 (SLAM family member 5)	It belongs to the Igs superfamily, encoding cell-surface receptors on hematopoietic cells and enhancing IFNγ production by T cells (PRO-IN)	1.39	2.59	
SLAMF1 (SLAM family member 1)	It belongs to the Igs superfamily. It encodes cell-surface receptors on hematopoietic cells and decreases NK-T cell production (ANTI-IN)	1.38	2.66	
SLAMF6 (SLAM family member 6)	It belongs to the Igs superfamily encoding cell-surface receptors on hematopoietic cells and Th17 promotion (PRO-IN)	1.38	2.67	

Differences are expressed as fold changes (FC). Statistical significance was based on the log odds for differential expression assessed by the Bayes log posterior odds, the B-statistic (*B*)

Gene expression profiles before treatment (T0) and post-treatment (T2), the latter ones in bold letters

IMM immune-modulatory, *PRO-IN* pro-inflammatory, *ANTI-IN* anti-inflammatory

reported to be up-regulated in T cells upon activation, inducing stable human Th17 development by promoting IL23R expression and a sustained STAT3 activation [23]. Although little is known on the regulation of the CD5 gene expression, it is possible that after enhanced expression

during T cell activation, an ensuing down-regulation can occur after cognate ligand binding, as is the case of other co-stimulatory proteins [24].

To extend the microarray findings, further studies were performed based on the evaluation of cytokine levels in R

Table 3 Comparison of CSF cytokine levels between responder and non-responder NC patients

CSF (T0)	Responder (Mean, IC 95 %)	Non-responder (Mean, IC 95 %)	<i>P</i> (U)	<i>P</i> (BLR)
IL-17A	32.8 (0–74.8)	64.8 (0–166.3)	0.9	0.7
IL-17AF	91.4 (29.9–153.4)	89.6 (9.7–169.6)	0.3	0.8
IL-17F	84.5 (18.33–150.8)	44.8 (22.12–67.6)	0.7	0.2
TGF- β	35.0 (14.2–55.8)	114.4 (24.4–204.5)	0.049	0.1
IL-10	117.1 (46.8–187.4)	170 (79.7–260.3)	0.3	0.08
IFN- γ	69.6 (23.1–116.07)	54.3 (13.4–95.2)	0.9	0.2
IL-4	3.4 (3.02–3.8)	3.9 (2.3–5.5)	0.3	0.5
IL-2	32.7 (0–78.9)	5.2 (3.2–7.2)	0.053	0.2
IL-6	42.8 (0–89.6)	61.9 (1.3–122.4)	0.8	0.9
CSF (T2)	Responder (Mean, IC 95 %)	Non-responder (Mean, IC 95 %)	<i>P</i> (U)	<i>P</i> (BLR)
IL-17A	23.7 (7.84–39.5)	19.1 (9.4–28.7)	0.57	0.5
IL-17AF	162.9 (85.9–239.9)	80.1 (43.4–108.2)	0.05	0.04
IL-17F	147.3 (32.9–261.7)	70.5 (15.9–125.1)	0.20	0.2
TGF- β	38.5 (0–87.8)	20.6 (8.4–32.8)	0.77	0.3
IL-10	113.7 (44.1–183.2)	150.6 (43.4–257.9)	0.51	0.3
IFN- γ	13.8 (5.4–22.2)	15.2 (2.71–27.6)	0.83	0.4
IL-4	3.9 (2.6–5.2)	4.2 (2.94–5.5)	0.69	0.5
IL-2	10.6 (3.41–17.8)	11.7 (7.8–15.5)	0.75	0.5
IL-6	50.1 (0–107.7)	20.4 (0–48.1)	0.30	0.3

Statistical significant results are in bold

U univariate analysis (either two-tailed Student's *t* or Mann–Whitney test, depending on the normality of the data); BLR binary logistic regression (adjustment by parasite location). Cytokine levels were measured in a minimum of 16 and a maximum of 45 CSF samples from the total population of 65 patients (samples were non-paired)

versus NR NC patients (Tables 3, 4). After adjusting for parasite location, R patients showed higher CSF IL-17A and SN IL-6 levels at T2. Also, although differences were nonsignificant, R patients showed lower IL-10 levels both in CSF and SN at T0, along with higher SN IL-17A and IFN- γ levels at T2. In line with this, R patients had a trend of a lower IL-6 serum/CSF value, likely due to a higher local IL-6 production in these patients.

Collectively, these findings show that a pro-inflammatory environment is related to treatment responsiveness. In this context, corticosteroid administration in NC patients, likely to modify the Th17 response [25] and promote Treg cell development [26], may be involved in this regard. Despite this possibility, it is noteworthy that corticoid administration was not clearly linked to treatment unresponsiveness: In the microarray group, 50 % (2/4) of corticosteroid-treated patients were treatment responders, and in the ELISA group 52.8 % (14/27) belong to this category.

To date, the knowledge of the immune profile in NC patients had been focused on the Th1/Th2 paradigm [10, 27, 28]. In the present work, a third type of T-helper lymphocytes, the IL17-producing CD4+ T cell subset, seems to be involved in the response to AHD treatment. Indeed, RORC, RUNX3, SLAMF3, and SLAMF6, all genes

involved in the Th17 response, were up-regulated in R patients. Such data fit well with the higher CSF IL-17AF and IL-6 levels seen in these patients before and after AHD treatment, respectively.

Th17 cells producing IL-17 and IL-2 may be promoted by TGF- β and inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-23 [28–31]. Their role in the resistance to AHD treatment needs to be fully elucidated, since other cytokines not yet evaluated in NC may participate in the Th17 functional phenotypes [32].

To the best of our knowledge, the effect of inflammatory status, particularly Th17 phenotype, on the response to treatment has not been studied in *Taenia solium* infection or in other parasitic diseases, although some studies have shown the role of Th17 response in the pathogenesis of certain parasite diseases. Particularly, several findings demonstrated that pro-inflammatory cytokines have an important role in parasitic infections; in fact, increased serum IL-6, IFN- γ , IL-17A, and CRP levels have been found in hydatidosis patients [33]. On the other hand, in *Trypanosoma cruzi*-infected IL-17A-deficient mice, a lower post-infection survival rate and higher parasitemia were observed. The expression of other cytokines, like IFN- γ , IL-6, and TNF- α was lower in deficient mice [34]. It has also been

Table 4 Comparison of SN-cytokine levels between responder and non-responders NC patients

SN (T0)	Responder (Mean, IC 95 %)	Non-responder (Mean, IC 95 %)	P (U)	P (BLR)
IL-17A	123.6 (0–309.2)	27.6 (12–43.3)	0.2	0.2
IL-17AF	150.8 (35.1–266.5)	85.5 (19.3–151.6)	0.3	0.6
IL-17F	98.2 (18.7–177.6)	86.5 (0–183.9)	0.8	0.4
TGF- β	51.3 (0–106.5)	700 (0–1,583.4)	0.1	0.1
IL-10	23.01 (14.2–31.7)	750 (0–1,521.1)	0.01	0.08
IFN- γ	64.5 (28.8–100.2)	74.5 (14.8–134.2)	0.9	0.2
IL-4	7.3 (0.8–13.9)	4.0 (1.81–6.2)	0.3	0.2
IL-2	13.9 (1.9–25.9)	9.2 (1.4–17.02)	0.4	0.7
IL-6	2,207.7 (613.1–3,802.1)	3,602.5 (0–8,725.7)	0.8	0.1
SN (T2)	Responder (Mean, IC 95 %)	Non-responder (Mean, IC 95 %)	P (U)	P (BRL)
IL-17A	82 (0–238.3)	20.6 (8.7–32.5)	0.40	0.09
IL-17AF	175.2 (54.3–296.1)	170.9 (0–344.1)	0.20	0.3
IL-17F	194.5 (31.4–357.6)	187 (0–391.7)	0.95	0.2
TGF- β	128.3 (0–268.7)	88.5 (0–204.05)	0.64	0.3
IL-10	205.4 (0–447.7)	76.9 (0–159.7)	0.62	0.2
IFN- γ	32.3 (12.9–51.7)	15.4 (9.4–21.5)	0.09	0.06
IL-4	7.5 (0–16.7)	9.3 (0–21.3)	0.76	0.3
IL-2	10.6 (5.16–16.07)	29.2 (0–69.8)	0.34	0.3
IL-6	4,148.6 (2,326.6–5,971)	2,425 (344.7–4,506.6)	0.19	0.03

Statistical significant results are in bold

U univariate analysis (either two-tailed Student's *t* or Mann–Whitney test, depending on the normality of the data); BLR binary logistic regression (adjustment by parasite location). Cytokine levels were measured in a minimum of 13 and maximum of 36 SN samples from the total population of 65 patients (samples were non-paired)

demonstrated that *Toxoplasma* antigens stimulate NK cells to produce IL-17, by a mechanism dependent on the presence of accessory cells and the production of cytokines like IL-6, IL-23, and TGF β [35]. In *Schistosoma haematobium*-infected children with bladder pathology, the Th17/Treg ratio was significantly higher in symptomatic infected children compared with asymptomatic infected children [35], while in a murine model of *Schistosoma japonicum* infection, *S. japonicum* antigens preferentially induced the simultaneous generation of both Th17 cells and other CD4 + subset cells, producing inducing (TGF- β , IL-6, IL-21, and IL-23) and inhibitory cytokines (IFN- γ and IL-4) as the infection progressed. In spite of this complex immunological scenario, the development of severe murine schistosomiasis correlates with high IL-17 levels [36].

Overall, our results point-out to the possible relevance of some Th17 inflammatory features in the success of AHD treatment in NC patients. Although our study exhibits limitations (particularly with respect to the sample size, the heterogeneity of the disease and the classification criteria), this work provides the first piece of evidence in this regard. Given the heterogeneous picture of the human NC, additional studies are required to expand these findings as well as to appraise the possible role of additional factors

influencing the response to AHD (i.e., CSF albendazole sulfoxide levels, parasite antigenic burden, and endocrine status). This will help to improve the treatment of severe extraparenchymal SAB patients.

NCBI-National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

CXCL2 (chemokine [C-X-C motif], ligand 2), ID: 2920, OMIM: 139110.

ILF2 (interleukin enhancer binding factor 2), ID: 3608, OMIM: 603181.

RORC (RAR-related orphan receptor C), ID: 6097, OMIM: 602943.

SLAMF9 (SLAM family member 9), ID: 89886, OMIM: 608589.

C1QB (subcomponent B), ID: 713, OMIM: 120570.

IL12RB2 (interleukin 12 receptor beta 2), ID: 3595, OMIM: 601642.

TNFRSF18 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18), ID: 8784, OMIM: 603905.

Sema4A (semaphoring 4A), ID: 64218, OMIM: 607292.

SLAMF3 (T-lymphocyte surface antigen LY-9 or SLAM family member 3), ID: 4063, OMIM: 600684.
 TGFB2 (transforming growth factor 2), ID: 7042, OMIM: 190220.
 TNFRSF25 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25), ID: 8718, OMIM: 603366.
 IL2RA (interleukin 2 receptor alpha), ID: 3559, OMIM: 147730.
 IL19 (interleukin 19), ID: 29949, OMIM: 605687.
 RUNX3 (runt-related transcription factor 3), ID: 864, OMIM: 600210.
 TGFBR3 (transforming growth factor receptor III), ID: 7049, OMIM: 600742.
 SLAMF5 (SLAM family member 5), ID: 8832, OMIM: 604513.
 SLAMF1 (SLAM family member 1), ID: 6504, OMIM: 603492.
 SLAMF6 (SLAM family member 6), ID: 114836, OMIM: 606446.

Acknowledgments The authors thank Professor Oscar Bottasso and Professor José Luis Soto-Hernández for their critical revision of this manuscript, and the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas of the UNAM. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant #86527. The English version of this manuscript was proofread by Juan Francisco Rodríguez.

Conflict of interest None.

Ethical standard This study fulfilled all research regulations for human beings required by Mexican laws and international regulations. The Ethical Committee of the INNN approved this protocol. The patients were instructed about the aim of the study and signed informed consent letters.

References

- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C (2000) *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2:1875–1890
- Fleury A, Carrillo-Mezo R, Flisser A, Sciutto E, Corona T (2011) Subarachnoid basal neurocysticercosis: a focus on the most severe form of the disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9:123–133
- Suastegui Roman RA, Soto-Hernandez JL, Sotelo J (1996) Effects of prednisone on ventriculoperitoneal shunt function in hydrocephalus secondary to cysticercosis: a preliminary study. *J Neurosurg* 84:629–633
- Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E (2004) Symptomatic human neurocysticercosis: age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 251:830–837
- Chavarria A, Fleury A, García E, Márquez C, Fragoso C, Sciutto E (2005) Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 116:271–278
- Bustos JA, Pretell EJ, Llanos-Zavalaga F, Gilman RH, Del Brutto OH, García HH, Cysticercosis Working Group in Peru (2006) Efficacy of a 3-day course of albendazole treatment in patients with single neurocysticercosis cyst. *Clin Neurol Neurosurg* 108:193–194
- Cárdenas G, Carrillo-Mezo R, Jung H, Sciutto E, Hernández JL, Fleury A (2010) Subarachnoidal neurocysticercosis non-responsive to cysticidal drug: a case series. *BMC Neurol* 10:16. doi:10.1186/1471-2377-10-16
- Diazgranados-Sánchez JA, Barrios-Arrázola G, Costa JL, Burbano-Pabon J, Pinzón-Bedoya J (2008) Ivermectin as a therapeutic alternative in neurocysticercosis that is resistant to conventional pharmacological treatment. *Rev Neurol* 46:671–674
- Guilpain P, Le Jeune C (2012) Anti-inflammatory and immunosuppressive properties of corticosteroids. *Presse Med* 41:378–383
- Chavarria A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E (2003) Th2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect* 5:1109–1115
- Chavarria A, Fleury A, Bobes RJ, Morales J, Fragoso G, Sciutto E (2006) A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes Infect* 8:1082–1089
- Adalid-Peralta L, Fleury A, García-Ibarra TM, Hernández M, Parkhouse M, Crispin JC, Voltaire Proaño J, Cardenas G, Fragoso G, Sciutto E (2012) Human neurocysticercosis: in vivo expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *J Parasitol* 98:142–148
- Del Brutto OH, Rajshekhar V, White AC Jr, Tsang VC, Nash TE, Takayanagui OM, Schantz PM, Evans CA, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JC, Sarti E, Gonzalez AE, Gilman RH, García HH (2001) Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 57:177–183
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5:R80
- Gautier L, Cope L, Bolstad DM, Irizarry RA (2004) Affy: analysis of Affymetrix Gene Chip data at the probe level. *Bioinformatics* 20:307–315
- Dessau RB, Pipper CB (2008) “R”—project for statistical computing. *UgeskrLaeger* 170:328–330
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on bias and variance. *Bioinformatics* 19:185–193
- Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F (2004) A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Assoc* 99:909–917
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 57:289–300
- Sáenz B, Fleury A, Chavarria A, Hernandez M, Crispin JC, Vargas-Rojas MI, Fragoso G, Sciutto E (2012) Neurocysticercosis: local and systemic immune-inflammatory features related to severity. *Med Microbiol Immunol* 201:73–80
- Sciutto E, Cárdenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Larralde C, Fleury A (2013) Human neurocysticercosis: immunological features involved in the host's susceptibility to become infected and to develop disease. *Microbes Infect* 15:524–530. doi:10.1016/j.miuncinf.2013.03.007
- Trakhtenberg EF, Goldberg JL (2011) Immunology. Neuroimmune communication. *Science* 334:47–48
- de Wit J, Souwer Y, van Beelen AJ, de Groot R, Muller FJ, Klaasse Bos H, Jorritsma T, Kapsenberg ML, de Jong EC,

- van Ham SM (2011) CD5 costimulation induces stable Th17 development by promoting IL-23R expression and sustained STAT3 activation. *Blood* 118:6107–6114. doi:[10.1182/blood-2011/05-352682](https://doi.org/10.1182/blood-2011/05-352682)
24. Linsley PS, Bradshaw J, Urnes M, Grosmaire L, Ledbetter JA (1993) CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. *J Immunol* 150:3161–3169
25. Hu SM, Luo YL, Lai WY, Chen PF (2009) Effects of dexamethasone on intracellular expression of Th17 cytokine interleukin 17 in asthmatic mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao* 29:1185–1188
26. Prado C, Gomez J, Lopez P, de Paz B, Gutierrez C, Suarez A (2011) Dexamethasone up regulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity. *Immunobiology* 216:386–392
27. Medina-Escutia E, Morales-Lopez Z, Proaño JV, Vazquez J, Bermudez V, Navarrete VO, Madrid-Marina V, Lacleste JP, Correa D (2001) Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: lack of immune suppression. *J Parasitol* 87:587–590
28. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM (2001) Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 69:4554–4560
29. Cua DJ, Kastelein RA (2006) TGF-beta, a “double agent” in the immune pathology war. *Nat Immunol* 7:557–559
30. McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ (2007) TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell mediated pathology. *Nat Immunol* 8:1390–1397
31. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells. *Immunity* 24:179–189
32. Lee Y, Awasthi A, Yosef N, Quintana FJ, Xiao S, Peters A, Wu C, Kleinewietfeld M, Kunder S, Hafler DA, Sobel RA, Regev A, Kuchroo VK (2012) Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells. *Nat Immunol* 13:991–999
33. Mezioug D, Touil-Boukoffa C (2012) Interleukin-17A correlates with interleukin-6 production in human cystic echinococcosis: a possible involvement of IL-17A in immunoprotection against *Echinococcus granulosus* infection. *Eur Cytokine Netw* 23:112–119
34. Miyazaki Y, Hamano S, Wang S, Shimanoe Y, Iwakura Y, Yoshida H (2010) IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 185:1150–1157
35. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Shy D, Stumhofer JS, Hunter CA (2010) IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* 184:1776–1783
36. Wen X, He L, Chi Y, Zhou S, Hoellwarth J, Zhang C, Zhu J, Wu C, Dhese S, Wang X, Liu F, Su C (2011) Dynamics of Th17 cells and their role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1399. doi:[10.1371/journal.pntd0001399](https://doi.org/10.1371/journal.pntd0001399)