



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Relevancia de polimorfismos del gen C5 del complemento en las diferencias clínicas de la Neurocisticercosis Humana

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Presenta:

Marcela Villegas Castañeda

Tutora Principal:

**Dra. Gladis del Carmen Fragoso González
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

Comité tutorial:

**Dra. Edda Sciutto Conde
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. José Iván Sánchez Betancourt
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM bajo la Dirección de la Dra. Gladis Fragoso González.

Este proyecto contó con el apoyo de CONACyT, que otorgó una beca para la realización de los estudios de doctorado a Marcela Villegas (Número de Beca 204552), así como el financiamiento para su realización (FOSISS-272519).

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada para la realización de los estudios de posgrado.

A mi tutora la **Dra Gladis Fragoso**, le agradezco el apoyo y la confianza invaluable, mil gracias por sus conocimientos, su paciencia, serenidad, tiempo y amabilidad, por aceptarme en su grupo de trabajo, en ese momento en que todo mi mundo estaba por los suelos, sé que gracias a usted está mi historia como estudiante de posgrado culmina con buen fin,

A la **Dra Edda Sciutto** muchas gracias por todo el aporte hecho a este trabajo por el bien recibimiento en el laboratorio, fue muy grato conocerla, gracias por el trato siempre cálido y amable, fue una gran experiencia conocer a todo su grupo de investigación

Al Dr. **Iván Sánchez** por sus aportaciones al trabajo de investigación

A la **Dra. Agnes Fleury**, gracias por el apoyo para conseguir las muestras de experimentación, pero sobre todo por compartir su conocimiento

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones para mejorar el escrito

A Dra. **Jacquelyne Cervantes**, **Dr. Rene Segura**, **Dra, Andrea Toledo** quienes me brindaron apoyo técnico para la realización de la fase experimental.

A todos mis compañeros del CIATEJ en Guadalajara en donde di mis primeros pasos en el mundo de la biología molecular, me llevo de todos ellos mucho aprendizaje pero sobre todo gratos recuerdos, gracias a Yessi, Priscila, Mari, Ulises, Torito(Carlos), Gladis, Carlos Hirales, Chuck, Mónica, Perla, Lalo, Titi, Karen.

Al Dr. Jorge Ramón Padilla del posgrado de ciencias biomédicas del CUCS, ya que con usted inicie el entendimiento y comprensión de este fascinante mundo de la genética molecular.

“Si consigo ver más lejos es porque me he aupado a hombros de gigantes”

Isaac Newton

DEDICATORIAS

A mis dos pequeñas, **Xanat Violeta y Kenia Kaná** quienes hoy son esa energía vital que motiva muchas de mis acciones, mis hijas adoradas gracias por soportar a esta mamá tan estresada, a veces tan impaciente y tan complicada, ustedes imprimen una enorme alegría a mi vida, este logro es también por y para ustedes, hijas mías, las amo.

A mi papá **Francisco E. Villegas**, por todo el apoyo desde el inicio de esta etapa y en todas los proyectos he decidido emprender, tengo claro que sin tu apoyo papa, no lo hubiese logrado, gracias por estar en momentos tan difíciles como cuando sentí que ya no podía continuar, gracias por todo el apoyo económico y moral, gracias por ser y estar para mí y mi hija, tú afecto y amor lo has demostrado con ese apoyo tan incondicional, con esos consejos llenos de serenidad cuando me pongo tan estresada, mil gracias por el resto de mi vida.

A mi mamá **Micaela E. Castañeda**, muchas gracias también por el apoyo.

A mi hermana **Donaji Villegas**, porque me has apoyado tantas veces con el cuidado de mi pequeña Violeta, gracias

A mi compañero **Francisco Javier Villegas Cerón**, por estar a mi lado en todo este tiempo y sobre todo en los estudios de doctorado, cuando las cosas se han puesto difíciles has seguido en este barco sin desertar, sé que aguantar el estrés de una estudiante no es fácil y tú lo has hecho, tu apoyo moral y soporte económico fueron vitales, muchas gracias.

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento del estadio larvario de *Taenia solium* en el sistema nervioso central. La cisticercosis murina por *T. crassiceps* se ha utilizado como modelo experimental de cisticercosis, considerando que comparte antígenos y algunas características de la relación hospedero parásito con *T. solium*. En este modelo experimental, el componente del complemento 5 (C5) se ha relacionado con la permisividad a la infección. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo estudiar la participación en la NCC humana de algunos polimorfismos en el gen que codifica al componente del complemento 5 y/o el factor asociado al receptor de TNF1 (TRAF1), ambos genes adyacentes localizados en el cromosoma 9q33–34.

Se estudiaron dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la región intergénica TRAF1 / C5 (rs10818488 A> G, rs3761847 G> A) y tres SNPs en C5 (rs17611 C> T, rs992670 G> A y rs25681 G> A) por primera vez en una población mexicana y se estudió su asociación con rasgos clínicos y radiológicos relacionados con la gravedad de la NCC (celularidad del LCR, localización de los parásitos en sistema nervioso central, número de cisticercos en SNC, grado de degeneración del parásito, presencia de epilepsia). En un estudio anidado de casos y controles, solo el SNP TRAF1 / C5 rs3761847 [A> G] tuvo relevancia en la progresión de NCC. Este SNP se asoció significativamente con epilepsia y mostró una tendencia de asociación con la celularidad del LCR.

Al analizar los haplotipos de forma independiente se encontró un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los SNP de TRAF1 y C5. Para los SNP C5, el haplotipo CAA se encontró asociado con la localización del parásito y la celularidad del LCR. En los SNP de TRAF1, los haplotipos GA y AG se encontraron asociados con la celularidad del LCR y AG con epilepsia.

Los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis sustentan la participación de los SNP de TRAF1 / C5 en el riesgo de desarrollar NCC grave en la población mexicana.

Palabras clave: Neurocisticercosis, polimorfismos genéticos, componente C5 complemento, asociación de SNP, TRAF1/ C5

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a parasitic disease caused by the establishment of the larval stage of *Taenia solium* in the central nervous system. Murine cysticercosis by *T. crassiceps* has been used as an experimental model of cysticercosis since it shares many clinical and antigenic traits with other cestodes, including *T. solium*. In this experimental model, the complement component 5 has been linked to permissiveness to infection. Thus, this work is aimed to study the possible relevance in human NCC of polymorphisms of the genes coding for the complement component 5 (C5) and/or TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1), which are adjacent to each other on chromosome 9q33–34.

Two single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the intergenic *TRAF1/C5* region (rs10818488 A>G, rs3761847 G>A) and three SNPs in *C5* (rs17611 C>T, rs992670 G>A y rs25681 G>A) were studied for the first time in a Mexican population and associated with clinical and radiological traits related to NCC severity (cell count in the cerebral spinal fluid [CSF cellularity], parasite location in the brain, number of brain parasites, parasite degenerating stage, and epilepsy). In a nested case-control study, only the *TRAF1/C5* rs3761847 [A>G] SNP had relevance in NCC progression. This SNP was significantly associated with epilepsy and showed a tendency of association with CSF cellularity.

When analyzing haplotypes, a strong linkage disequilibrium was found between the *TRAF1* and *C5* SNPs; thus, these haplotypes were studied independently. For *C5* SNPs, the CAA haplotype was found associated with parasite location and CSF cellularity. For *TRAF1* SNPs, the GA and AG haplotypes were found associated with CSF cellularity, and AG with epilepsy.

Overall, these findings support the participation of *TRAF1/C5* SNPs in the risk to develop severe NCC in the Mexican population.

Keywords: neurocysticercosis, genetic polymorphism, C5 complement, TRAF1, association, SNP, TRAF1/C5

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PAG
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	2
1.2 Neurocisticercosis	2
1.3 La respuesta inflamatoria en la Neurocisticercosis	4
1.4 El complemento como componente de la respuesta innata	6
1.5 C5a y sus receptores	7
1.6 Complemento y parasitosis	11
1.7 La genética de las enfermedades complejas	12
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Rasgos genéticos en la Cisticercosis	15
2.2 Neurocisticercosis y algunas rasgos genéticos	16
2.3 Cisticercosis por <i>Taenia crassiceps</i>	18
2.4 C5 como gen candidato asociado a la restrictividad de la infección por <i>Taenia crassiceps</i> en un modelo murino	19
2.5 Gen TRAF1	20
2.6 Modelos de herencia para las enfermedades multifactoriales y poligénicas	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. HIPOTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos Específicos	24

6. MATERIAL Y METODOS	24
6.1 Muestras de pacientes con neurocisticercosis	24
6.2 Extracción y purificación de ADN genómico de casos	25
6.3 Evaluación del rendimiento de la extracción	25
6.4 Evaluación de la integridad del ADN	25
6.5 Selección de polimorfismos y localización	25
6.6 Iniciadores y sondas TaqMan™ para la determinación de los genotipos	28
6.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la determinación de los genotipos	30
6.8 Ensayos de ELISA para la determinación de la concentración de C5a en suero	30
6.9 Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	31
7.1 Características clínicas	32
7.2 Frecuencias genotípicas y alélicas en la población de estudio para los SNP´s en TRAF1 y C5	33
7.3 Relevancia de los SNP´s en TRAF1 y C5 estudiados en las características clínico-radiológicas en pacientes con NCC	34
7.4 Análisis de Haplotipos de SNP´s en C5 y TRAF1	48
8. DISCUSION	79
9. CONCLUSIÓN	84
10. LITERATURA CITADA	85
11. ANEXO	92

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		PAG
Cuadro 1	Efectos de C5a en la actividad de distintos tipos celulares	9
Cuadro 2	Características y localización cromosómica de los polimorfismos en estudio	28
Figura 1	Determinación de un fenotipo complejo	15
Figura 2	Localización de los polimorfismos en estudio en la región génica	27
Figura 3	Secuencias contexto de los iniciadores y sondas marcadas para la identificación de los polimorfismos	29
Figura 5	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 en la variable localización del parásito	50
Figura 6	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 en la variable localización del parásito	51
Figura 7	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 en la variable localización del parásito	52
Figura 8	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 en la variable localización del parásito	53
Figura 9	Análisis por modelo de herencia dominante y aditivo de los haplotipos de C5 con la variable número de parásito	56
Figura 10	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable número de parásitos....	57
Figura 11	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable número de parásitos.	58
Figura 12.	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable número de parásitos	59
Figura 13.	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 con la variable celularidad	63

Figura 14	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable celularidad	64
Figura 15.	Análisis por modelo de herencia recesivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable celularidad	65
Figura 16.	Análisis por modelo de herencia aditivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable celularidad	66
Figura 17	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 con la variable deterioro del parásito	69
Figura 18	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable deterioro del parásito.	70
Figura 19	Análisis por modelo de herencia aditivo y recesivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable deterioro del parásito	71
Figura 20	Análisis por modelo de herencia dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable deterioro del parásito	72
Figura 21	Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 con la variable epilepsia	75
Figura 22	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable epilepsia	76
Figura 23	Análisis por modelo de herencia dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable epilepsia	77
Figura 24	Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable epilepsia	78

ÍNDICE DE GRAFICAS

	PAG	
Grafica 1	Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC con parenquimatosa y extraparenquimatosa	49
Grafica 2	Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC con un solo parasito o múltiples parásitos	55
Grafica 3	Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC con alta y baja celularidad	62
Grafica 4	Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC con parásitos deteriorados o no deteriorados	68
Gráfica 5	Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC sin epilepsia y con epilepsia	74

INDICE DE TABLAS

		PAG
Tabla 1	Perfil clínico de los pacientes incluidos en el estudio	32
Tabla 2	Frecuencias genotípicas y alélicas en la población de pacientes mexicanos con NCC	33
Tabla 3	Comparativo de las frecuencias alélicas de la población en estudio con diagnóstico de NCC y las frecuencias reportadas por el proyecto 1000 genomas	34
Tabla 4	Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NCC parenquimatosa y extraparenquimatosa y equilibrio de Hardy-Weinberg	35
Tabla 5.	Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación al riesgo de NCC parenquimatosa o extra parenquimatosa	36
Tabla 6	Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NCC y un solo parásito o múltiples parásitos y equilibrio de Hardy-Weinberg	38
Tabla 7.	Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación al riesgo de NCC con parásito único o parasitosis múltiple.	39
Tabla 8	Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NCC alta celularidad y baja celularidad y equilibrio de Hardy-Weinberg.	41
Tabla 9	Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación a la baja o alta celularidad en LCR en pacientes con NCC	42
Tabla 10.	Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NCC con parásitos deteriorados y no deteriorados y equilibrio de Hardy-Weinberg	44

Tabla 11	Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación a la degradación del parásito en pacientes con NCC	45
Tabla 12	Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con epilepsia y equilibrio de Hardy-Weinberg	46
Tabla 13	Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación a la presentación de epilepsia en pacientes con NCC	47
Tabla 14	Análisis de regresión logística para la determinación del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo a la localización en pacientes con NCC.	54
Tabla 15	Análisis de regresión logística para la determinación del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo al número de parásitos en pacientes con NCC.	60
Tabla 16	Análisis de regresión del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo a la celularidad en pacientes con NCC.	67
Tabla 17	Análisis de regresión del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo al deterioro del parásito en pacientes con NCC.	73
Tabla 18	Análisis de regresión del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 en pacientes con NCC con epilepsia y sin epilepsia.	79

1. INTRODUCCIÓN

La Neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento de larvas de *Taenia solium* en el sistema nervioso central (SNC). Esta es una parasitosis que frecuentemente afecta la salud humana en países en vías de desarrollo (Sciutto et al., 2000). *T. solium* es la causa del 30% de los casos de epilepsia tardía en muchas zonas endémicas donde hay cerdos en libertad que cohabitan con las personas y deficiencia en instalaciones sanitarias. La cisticercosis y neurocisticercosis por *T. solium* fue considerada por la OMS en 2010 como una de las enfermedades tropicales desatendidas (OMS, 2015). Aunque la cisticercosis ha sido considerada erradicable, se mantiene endémica en la mayoría de los países de Latinoamérica, Asia y África, donde amplios sectores de la población continúan viviendo en una situación de alta marginación social. México no es la excepción: según datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) –que atiende enfermos de todo el país–, la frecuencia de pacientes con presencia de cisticercos en el sistema nervioso central atendidos en esa institución, no se ha modificado entre 1994 y 2004 (Fleury, Moreno Garcia, et al., 2010). Además en dos estudios realizados en comunidades rurales se encontró que la mayor parte de la población ha tenido contacto con el parásito (presencia de anticuerpos específicos y proliferación positiva), sin embargo solo en aproximadamente un 9% el parásito se establece en el SNC causando NCC, y la gran mayoría de los casos cursan sin sintomatología (Fleury et al., 2003; Fleury et al., 2006). De la población infectada que desarrollan la enfermedad, los pacientes pueden presentar desde síntomas leves como cefaleas hasta un cuadro clínico muy grave que compromete la vida del paciente (Fleury et al., 2016). Factores del hospedero, del parásito y ambientales podrían estar desempeñando un papel importante en el pleomorfismo de la presentación clínica. Al respecto de la participación de factores del hospedero, diferentes evidencias señalan la participación de factores genéticos del individuo en la diferencias de susceptibilidad a la infección. Estudios en población humana así como en el modelo murino experimental de cisticercosis han permitido avanzar hacia la identificación de posibles regiones genéticas involucradas (Caratachea, 2007). En particular utilizando el modelo murino experimental de cisticercosis por *Taenia crassisepe*, se ha identificado una región cromosómica asociada a la permisividad a

la infección (Aquino et al., 2011). Este trabajo de tesis se diseñó con el propósito de conocer su relevancia en las diferentes presentaciones clínico-radiológicas de pacientes NCC.

1.1. Ciclo biológico de *Taenia solium*

El humano es el huésped definitivo, la forma adulta del parásito establece en el intestino delgado adhiriéndose a la mucosa intestinal desde donde se desarrolla hasta alcanzar su madurez sexual, se auto-fecunda produciendo una gran cantidad de huevos alojados en segmentos llamados proglótidos que son liberados con las heces. Los huevos y los proglótidos que se eliminan en las heces pueden contaminar el ambiente cuando se practica el fecalismo a ras de suelo. El cerdo, animal coprófago puede ingerir los huevos al consumir heces de los portadores de tenias (Fleury et al. Capítulo II cistymex, <http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1-gene.html#capitulo2>). En los cerdos los huevos eclosionan al ser parcialmente digeridos en el estómago, liberando las oncosferas, las cuales atraviesan la pared intestinal y se desarrollan en cisticercos afectando diversos tejidos como músculo esquelético, sistema nervioso o tejido subcutáneo dando origen a la llamada cisticercosis porcina (García et al., 2002). El ciclo de vida continua cuando el humano ingiere carne de cerdo mal cocida e infectada con cisticercos, los cuales evaginan y se establecen en el intestino delgado desarrollándose el estado adulto. El humano también puede adquirir la cisticercosis al ingerir los huevos de alimentos contaminados con material fecal de un individuo teniástico o por autoinfección. En los humanos los cisticercos pueden encontrarse en diversos tejidos, incluyendo el sistema nervioso central, localización en la que causa la neurocisticercosis humana (Sciutto et al., 2013).

1.2. Neurocisticercosis

La neurocisticercosis es definida como la enfermedad causada por el establecimiento de larvas de *T. solium* en el sistema nervioso central. La enfermedad presenta una gran variedad de formas clínicas que dependen del número de parásitos, de sus localizaciones, así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria del huésped (Sciutto et al., 2013). El parásito puede

encontrarse en distintos grados de evolución, cisticercos vesiculares, coloidales y calcificados. Los primeros son cisticercos viables aparentemente sin ningún grado de daño, mientras que los cisticercos coloidales presentan ya un grado de daño posiblemente causado por la respuesta inflamatoria. Los cisticercos calcificados se consideran cisticercos muertos que han quedado en los tejidos como parte del proceso inflamatorio (DeGiorgio, Medina, Duron, Zee, & Escueta, 2004).

Las convulsiones son uno de los síntomas comúnmente encontrados y ocurren hasta en el 75% de los pacientes. Se ha informado que las convulsiones pueden comenzar hasta después de 30 años de haber ocurrido la primera infección (del la Garza et al., 2005; Garcia, Del Brutto, & Cysticercosis Working Group in, 2005; Scharf, 1988). Nash et al., (2006) en un estudio de cohorte sugieren que las lesiones calcificadas pueden ser un foco de activación de convulsiones, pues en pacientes con antecedentes de convulsiones y serología positiva el 36% tuvo una recurrencia de convulsiones y en la mitad de ellos se demostró edema perilesional e inflamación en una o más calcificaciones (Nash et al., 2008). Las hipótesis en la génesis de las convulsiones incluyen factores como la disfunción en la barrera hematoencefálica, en donde la inflamación dirigida a quistes en degeneración causa una permeabilidad vascular anormal provocando disfunción en la excitabilidad cortical y convulsiones agudas. No se sabe aún como estos efectos agudos contribuyen al desarrollo del trastorno epiléptico focal y crónico. Hay posibles mecanismos aditivos pueden ser inflamación cerebral temprana y/o continua, astrogliosis reactiva, daño celular y aumento de la disfunción de la barrera hematoencefálica, que contribuye aún más a la inflamación haciendo una especie de circuito de retroalimentación positiva (Nash et al., 2015).

El síntoma más grave en los pacientes con NCC causado por el aumento de presión intracraneal es la hidrocefalia. Aproximadamente afecta el 25% de los casos y se manifiesta principalmente con náuseas, vómitos y alteraciones de la agudeza visual. Otros síntomas son los déficits neurológicos focales, síntomas psiquiátricos, accidentes cerebrovasculares y la muerte súbita (del la Garza et al., 2005; Scharf, 1988; White, 2000). Algunos estudios reportan tasas de mortalidad de hasta el 2.2 % (Scharf, 1988; Sorvillo et al., 2004).

En la NCC podemos distinguir dos formas típicas de la enfermedad, la parenquimatosa y la extra-parenquimatosa. La presentación parenquimatosa cursa usualmente con convulsiones que pueden ser controladas con medicamentos antiepilépticos. Ocasionalmente los parásitos pueden crecer y producir un efecto de masa. La infección extra parenquimatosa puede causar hidrocefalia por obstrucción mecánica del drenaje de líquido cefalorraquídeo (Garcia et al., 2002).

El diagnóstico de NCC no puede ser basado solamente sobre elementos clínicos (no hay ningún síntoma patognomónico); para el diagnóstico se requiere del uso de neuro imágenes, también de pruebas serológicas que pueden representar un apoyo en el diagnóstico aunque pueden tener baja sensibilidad y especificidad por lo tanto no resultan óptimas (Garcia et al., 2002). Los resultados de los estudios radiológicos pueden ser difíciles de interpretar, teniendo a veces dudas diagnósticas confundiendo con astrocitoma, enfermedad metastásica, malformaciones arteriovenosas, tuberculosis y otras etiologías infecciosas por tanto en conjunto con las pruebas serológicas se crea una batería para el diagnóstico diferencial (Moskowitz & Mendelsohn, 2010). El criterio epidemiológico puede contribuir al diagnóstico, conociendo si el paciente ha tenido contacto el parásito, o en individuos que viven en áreas donde la cisticercosis es endémica o bien un historial de diversos viajes o estancias a áreas endémicas de la enfermedad (Garcia et al., 2002). La tomografía computarizada (TC) es considerada el mejor método para detectar calcificaciones mientras que la resonancia magnética es más sensible para identificar parásitos localizados en los ventrículos y en el espacio subaracnoideo (DeGiorgio et al., 2004).

1.3. La respuesta inflamatoria en la Neurocisticercosis

El conocimiento de la respuesta inmunológica en la cisticercosis es relevante para entender los mecanismos que el hospedero desarrolla ante el parásito y la modulación de estos por el propio parásito.

El resultado de estas interacciones pudiera culminar en el éxito de la infección, el desarrollo de la enfermedad o la destrucción del parásito (Chavarría y Sciutto, 2006). La información de otros cestodos en conjunto con lo que se ha estudiado en la NCC sugiere que los cisticercos viables modulan activamente el sistema inmune del

hospedero para evadir su destrucción (Flisser, 1994; White, Robinson, & Kuhn, 1997). Cuando el parásito empieza a degenerarse pierde su capacidad de modular la inflamación e inmunidad contra el mismo. Diversos estudios han analizado la respuesta local inflamatoria alrededor del cisticerco cuando se localiza en cerebro. Las características de los hallazgos están fuertemente influenciadas por el estado degenerativo del parásito. Cuando el parásito es viable (estado vesicular) la respuesta inflamatoria es escasa, compuesta principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Escobar, Aruffo, Cruz-Sanchez, & Cervos-Navarro, 1985). En el estado coloidal el parásito está degenerando, el infiltrado inflamatorio es intenso con una abundante presencia de células NK, macrófagos y células T, así como también una respuesta de anticuerpos (IgM+). Las principales citocinas presentes son IL-2, IL-6, IL-12, TGF- β e IFN- γ , tendiendo hacia una respuesta inflamatoria Th1 (Restrepo, Llaguno, Sandoval, Enciso, & Teale, 1998) también hay una intensa gliosis así como proliferación de la microglía (Escobar et al., 1985). En el estado granular el infiltrado alrededor del parásito muestra células plasmáticas, hay también linfocitos B y T, macrófagos y mastocitos, hay citocinas Th1 pero también existe la presencia de citocinas Th2 como IL-4, IL-13 e IL-10 (Restrepo et al., 2001).. En el 2003, Chavarría et al., realizaron un estudio en donde los pacientes fueron estratificados de acuerdo a la descripción clínica y radiológica de NCC (moderada, media y severa). Los autores señalan que el nivel de inflamación o la celularidad del líquido cefalorraquídeo (LCR) se asocia con la severidad de la enfermedad. Además los pacientes “severos” presentaron altos niveles de proteínas, eosinófilos, IL-5, IL-10, IgG1, IgG2, IgG3 e IgE comparados con otros pacientes. Con respecto a la localización del parásito una clara respuesta inflamatoria en el líquido cefalorraquídeo se observó en pacientes con cisticercos localizados en el espacio subaracnoideo (SA) de la base o intraventricular y muchos de ellos mostraron severa sintomatología, parásitos vesiculares así como un incremento de IL-5, IL-6 e IL-10. En contraste pacientes con cisticercos localizados en el parénquima tuvieron niveles bajos de citocinas y celularidad en el LCR (Chavarría et al., 2003) la respuesta inflamatoria quedándose más bien localizada en el propio parénquima cerebral.

En modelos experimentales de neurocisticercosis murina se ha observado que la fase aguda de la enfermedad se asocia a una respuesta mixta Th1/Th17 acompañada de altos niveles de IL10, mientras que la fase tardía de resolución se asocia a un perfil Th2 (Moura et al., 2016).

Otros estudios han encontrado que también los ratones infectados por *T. crassisepe* desarrollan una respuesta tipo Th1 durante las fases tempranas de la infección y después eventualmente desarrollan una respuesta Th2 que está asociada también al aumento en las cargas parasitarias (Terrazas, Bojalil, Govezensky, & Larralde, 1998).

1.4. El complemento como componente de la respuesta innata

El complemento es una parte central de la inmunidad innata que sirve como primera línea de defensa en el huésped contra agentes externos o células alteradas (Ricklin, Hajishengallis, Yang, & Lambris, 2010). Este sistema se compone de proteínas plasmáticas o de membrana expresada en la superficie celular producidas principalmente en hígado y opera en diferentes tejidos y en la circulación (Kolev, Le Friec, & Kemper, 2014). La forma de acción se caracteriza por desencadenar una cascada para la opsonización de patógenos, con la liberación de componentes inflamatorios que ayudan a las células del sistema inmune a combatir la infección y mantener la homeostasis. El sistema del complemento puede desencadenarse por tres vías distintas: clásica, lectinas y alternativa, todas conducentes a una vía terminal común (Merle, Church, Fremeaux-Bacchi, & Roumenina, 2015). Recientemente, se ha descrito una vía más de activación nombrada vía extrínseca de las proteasas (Huber-Lang et al., 2006). Independientemente de cómo se active la cascada, lleva a la generación de una de las moléculas efectoras más importantes C5a, que es generada a partir de la enzima C5 convertasa, quien escinde C5 en C5a y C5b, se C5b se une a C3b e inicia la formación del complejo de ataque de membrana lo cual conduce a la lisis celular y la destrucción bacteriana (Ricklin & Lambris, 2007; Ward, 2004). Una diferencia de la vía extrínseca de las proteasas es que la escisión de C3 y C5 es directa y se da por una serie de enzimas proteolíticas como calicreína y trombina (Huber-Lang et al., 2006; Thoman, Meuth, Morgan, Weigle, & Hugli, 1984), quienes pueden directamente activar y escindir a C5 para

producir C5a biológicamente activo, en ratones genéticamente deficientes en C3 en los que la convertasa de C5 no se forma. Los productos finales de activación del complemento C3a, C4a y C5a también se definen como anafilotoxinas por su capacidad de activar la degranulación de mastocitos, basófilos neutrófilos. De estos C5a es el mediador más eficaz de la degranulación de leucocitos y representa una de las moléculas inflamatorias más potentes durante las respuestas inmunes (H. Lee, Whitfeld, & Mackay, 2008). El complemento interactúa con los receptores tipo Toll (TLR's) (Hajishengallis & Lambris, 2010) y tiene un papel importante en la regulación de la inmunidad humoral (Carroll & Isenman, 2012). Su regulación está dada por el factor H y properdina para la vía alterna, el inhibidor de C1 y la proteína de unión a C4b para la vía clásica y la vía de las lectinas. Hoy en día se sabe que el complemento como parte de la inmunidad innata está presente y se produce cercano al sistema nervioso central. Las neuronas, astrocitos y microglia han mostrado producir complemento y expresar sus receptores. El rol del complemento en el sistema nervioso central es considerado dual ya que puede tener efectos neurotóxicos o neuroprotectores dependiendo del nivel de su activación, el sistema del complemento se mantiene bajo control por reguladores que evitan su sobreactivación que conduce a daños en los tejidos y enfermedades autoinmunes. Los reguladores se pueden agrupar en fase líquida: factor H, properdina para la ruta alterna, inhibidor de C1 y proteína de unión a C4b para la ruta clásica, para ciertos ligando el factor H también puede regular la vía clásica mediada por C1q (Shastri, Bonifati, & Kishore, 2013).

En la presentación de patologías que involucren bacterias, hongos o virus, cuando algunos de sus componentes están alterados o existe deficiencia de los mismos, se ha observado una notable alteración en la inflamación.

1.5. C5a y sus receptores

La espectroscopia por resonancia nuclear magnética muestra la estructura de la molécula humana de C5a, se trata de un monómero que presenta cuatro alfa hélices, las cuales se yuxtaponen en una topología anti paralela, que estabilizada por tres puentes bisulfuro (Cys21-Cys47), (Cys22-Cys54) y (Cys34-Cys55) y se conectan por tres enlaces peptídicos. La cola carboxilo terminal es de forma flexible

(Zhang, Boyar, Toth, Wennogle, & Gonnella, 1997; Zuiderweg & Fesik, 1989; Zuiderweg, Nettesheim, Mollison, & Carter, 1989).

En la parte de los bucles 1 y 2 y en la porción C terminal de la molécula se une a su receptor (C5aR). Anticuerpos neutralizantes para C5a han implicado la región Lys20-Arg37 como un importante sitio de unión a receptor (Monk, Scola, Madala, & Fairlie, 2007). C5a es considerada una anafilotoxina, un fragmento derivado clásicamente por proteólisis de la convertasa de C5 (enzima que contiene C3b más C4b y C2a) que da origen a C5a y C5b, la molécula de C5a es rápidamente metabolizada en el suero y la superficie celular por carboxipeptidasas que remueven una arginina C-terminal para formar C5a des Arg, quien tiene una reducida acción (H. Lee et al., 2008). Hace un tiempo se ha sugerido que existen enzimas independientes del complemento como la trombina, la elastasa de neutrófilos y la serin proteasa de macrófagos que tienen una actividad C5 convertasa y se sugiere puede ser otra vía de escisión de la molécula C5 (Foley et al., 2016; Leung & Morser, 2016). En un trabajo realizado por (Huber-Lang et al., 2006) en un modelo murino C3 deficiente y C3 suficiente con daño pulmonar inflamatorio observaron que la trombina tiene actividad de C5 convertasa generando un residuo de C5a funcionalmente activo y señalándolo como un mecanismo compensatorio cuando la vía de la coagulación o el complemento son perturbados en ratones C3 deficientes.

C5a es uno de los péptidos inflamatorios más potentes potencia la actividad de diversos tipos celulares. Dependiendo del tipo celular, C5a puede conducir la señalización a diferentes resultados incluyendo la fagocitosis, de granulación producción de moléculas reactivas de oxígeno, liberación de enzimas de gránulos, retraso o aumento de apoptosis producción de citocinas o quimiocinas así como quimiotaxis (H. Lee et al., 2008). C5a recientemente ha mostrado participar en procesos como la modulación de la expresión de varias citocinas en distintos tipos celulares (Laudes et al., 2002; Riedemann, Guo, Sarma, et al., 2002), así como provocar una reducida apoptosis en neutrófilos, pero mejorarla en timocitos en casos de sepsis (Guo et al., 2000; Riedemann, Guo, Laudes, et al., 2002). También aumenta la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y puede activar la vía de la coagulación (Guo et al., 2002). Aunque no está claro si C5a puede regular a las células dendríticas, se conoce que en modelos murinos de sepsis inducida, C5a

puede inducir la migración del tipo celular IL-12+DC de la cavidad peritoneal a la sangre periférica y a los linfonodos. Además IL-12+DC induce la expansión de linajes patogénicos IFN- γ +Th1 e IL-17+Th17 en sangre periférica y linfonodos (Ma N, 2013).

Cuadro 1. Efectos de C5a en la actividad de distintos tipos celulares

TIPO CELULAR	ACTIVIDAD
NEUTRÓFILOS	Quimiotaxis, fagocitosis, degranulación de enzimas, retraso de la apoptosis
EOSINÓFILOS	Aumento de la degranulación de enzimas, quimiotaxis
BASÓFILOS	Aumento en la secreción de histamina
MASTOCITOS	Secreción de histamina
CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES	Quimiotaxis
MACRÓFAGOS/MONOCITOS	Quimiotaxis
TIMOCITOS	Potencia la apoptosis
ENDOTELIO	Vasodilatación, liberación de quimiocinas
HEPATOCITOS	Mejora la regeneración
MICROGLIA	Quimiotaxis

Hay dos receptores de alta afinidad conocidos que se unen a C5a; C5aR (CD88) y C5L2 (GPR77). C5aR pertenece a la familia de receptores rodopsina acoplados a la proteína G con siete segmentos transmembranales; C5L2 es similar pero no está acoplado a una proteína G; ambos genes están localizados en el cromosoma 19 vecino uno con el otro (Gerard, Hodges, Drazen, Weller, & Gerard, 1989; H. Lee et al., 2008). La secuencia de C5L2 muestra una identidad cercana a C5aR (58%) y a C3aR (55%) (D. K. Lee et al., 2001). C5a y C5a des Arg han sido reportados como ligando de C5L2 (Cain & Monk, 2002).

El papel funcional de los receptores está íntimamente asociado al tipo celular en el que se expresa. C5aR, inicialmente se pensó que se expresaba principalmente en leucocitos como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células dendríticas y

mastocitos, hoy se sabe que C5aR está expresado en amplio espectro de células tanto inmunes como no inmunes (H. Lee et al., 2008). Las células no inmunes que pueden expresar el receptor incluyen células vasculares endoteliales, cardiomiocitos, astrocitos, oligodendrocitos, sinoviocitos, condrocitos articulares, células mensangiales glomérulo renales, células de kupffer y hepatocitos estimulados, células del epitelio bronquial, queratinocitos, ovarios y testículos (Gasque et al. 1995; Lacy et al., 1995 ; Gavriilyuk et al., 2005; Lee et al.,2001; Ohno et al., 2000;Laudes et al. 20002; Okinaga et al., 2003; Otto et al., 2004 Niederbichler et al. 2006; Rahpeymai et al., 2006). C5L2 es expresado en menor cantidad tanto en células inmunes como no inmunes ,en inmunes como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas inmaduras (Ohno et al. 2000; Gao H, et al. 2005;Kalant et al. 2005; Chen et al. 2007) y algunas células no inmunes como adipocitos fibroblastos de piel así como glándula adrenal, cordón espinal, tiroides, hígado, pulmón, bazo, cerebro y corazón, aunque de este receptor aún no se elucidan todas las respuestas biológicas que pueda tener en los distintos tipos celulares en que expresa (H. Lee et al., 2008). Pero se puede mencionar algunos efectos de este receptor en células no inmunes por ejemplo cuando el receptor de C5a se expresa en células mesangiales glomerulares humanas in vitro, este puede tener un papel en la mediación del daño glomerular promoviendo la proliferación y la producción de citocinas y factores de crecimiento (Braun & Davis, 1998), en células de tejido subcutáneo o adiposas, se ha demostrado que la expresión del receptor C5L2 puede ser un receptor funcional que media la estimulación de proteínas acetilación, mediando a su vez la estimulación de la síntesis de triacilgliceridos (Kalant et al., 2005), en células de Kupffer y células estrelladas o células perisinusoidales, C5a induce la liberación de prostanoïdes y mejoraron la liberación de IL-6 dependiente de LPS. C5a mejoró la actividad de glucógeno fosforilasa y por tanto la producción de glucosa en células perisinusoidales, además C5a también puede mejorar la transcripción del gen de la proteína de fase aguda tipo 2 α 2-macroglobulina indirectamente en hepatocitos al aumentar la liberación de IL-6 (Schieferdecker, Schlaf, Jungermann, & Gotze, 2001). Se han encontrado cantidades elevadas de C5a en el suero de pacientes con enfermedades inflamatorias. La sobre o sobreexpresión de C5a está implicada en modelos experimentales de enfermedades inflamatorias tales como artritis

reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso, enfermedad obstructiva pulmonar, psoriasis o gingivitis entre algunas (H. Lee et al., 2008; Monk et al., 2007).

1.6. Complemento y parasitosis

El complemento ha sido estudiado desde hace un par de décadas como un factor de resistencia del hospedero a la infección por algunos helmintos. El papel activo de estas proteínas en la infección por helmintos se ha reportado en trabajos como el realizado por Kassis and Tanner (1977) los cuales en un modelo murino de infección con *Echinococcus multilocularis* demostraron la participación de las proteínas del complemento en la infecciones hidatídicas, en donde primero por experimentos *in vitro* demostraron la actividad lítica del complemento en los protoescolex del parásito. Para examinar el efecto del complemento *in vivo* establecieron un modelo de infección hidatídica secundaria con ratones a los que se les bloqueó la actividad del complemento con factor de veneno de cobra (FVC) y luego inoculados con protoescolex de *E. multilocularis*, los niveles del complemento y el crecimiento del parásito fueron medidos a lo largo del curso de la infección. Como lo esperaban los animales con el bloqueo del complemento desarrollaron una infección fuerte con altas cargas de quistes, mientras que las ratas no infectadas mantuvieron niveles normales de títulos de complemento en el curso del estudio. Por otro lado los animales que fueron inoculados con escólex de *E. multilocularis* tuvieron niveles altos significativos de complemento al día 3 post-infección y regresaron a títulos normales el séptimo día post-infección, tanto los ratones no infectados como los muy infectados tenían niveles idénticamente normales de complemento en el mismo tiempo. Las ratas infectadas y depletadas con el factor de veneno de cobra como se esperaba tuvieron niveles más bajos que los normales de complemento para el tercer día de infección pero este agotamiento fue seguido por un aumento en los títulos para el día 7 y un lento declive al día 30, para luego elevarse significativamente nuevamente al día 60. Estos resultados sugieren que los protoescolex son susceptibles a la acción del complemento y podría esperarse que el número de larvas que sobreviven al ambiente rico en completo dependa del ambiente peritoneal del hospedero. El tamaño de la infección hidatídica secundaria puede además depender del número de protoescolex que escapan a la destrucción de esta línea de defensa temprana del hospedero. La intensidad del aumento

temprano en los niveles del complemento está relacionada a la brusquedad del cambio desde el estado normal al patológico (Kassis & Tanner, 1977).

En otros cestodos, Davis y Hammerberg (1990), probaron la evasión del complemento por *Taenia taeniaformis* en estadios tempranos en un modelo de infección murino. Sus resultados indican que aunque la vía de activación alternativa del complemento es significativa para supervivencia de *T. taeniaformis* el efecto de este proceso no está directamente relacionado con la lisis por el complejo de ataque de membrana. Además C3 puede atacar el tegumento de las oncosferas recién activadas. Pero cuando intentaron detectar deposición de C5 en la superficie del parásito usando un anticuerpo reactivo contra la proteína no existió evidencia de esto. Ratones C5 deficientes B10D2 son moderadamente resistentes al desarrollo de larvas *T. taeniformis* y hay diferencias muy pequeñas en su resistencia al parásito cuando son tratadas con factor de veneno de cobra. Esto en contraste con algunos otros estudios en donde ratones con la cascada del complemento intacta, cuando son tratados con factor de veneno de cobra son mucho más susceptibles a la infección. Esto entonces indicaría que los reportes previos que atribuyen resistencia a la depleción del complemento por tratamiento con FVC, el nivel de C3 puede ser una consecuencia aditiva de inhibición en la acción de ambas opsoninas C3 y C5a. Mientras que la comparación de la resistencia entre ratones C5 deficientes tratados y no tratados con FVC, refleja solo efectos no significativos de la presencia o ausencia de la opsonina de C5. Los resultados sugieren que C5 y otras proteínas de la secuencia terminal del complemento están involucradas en la inmunidad innata contra *Taenia taeniformis*. Además la supervivencia de las oncosferas activadas *in vitro* en un suero normal más la ausencia de algún daño detectable en la membrana, no se debe a la formación del MAC en la fase soluble o en las superficies estructural de las oncosferas, aunque las lesiones líticas en la membrana larval pueden directamente resultar en la muerte del parásito (Davis & Hammerberg, 1990).

1.7. La genética de las enfermedades complejas

En general el término complejo se reserva para aquellos fenotipos influenciados por múltiples loci (poligénico) así como también por factores ambientales.

Estos loci pueden contener una o más variantes de nucleótido sencillo o polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP), que constituyen la base de la gran variedad de biomoléculas que se producen y son la causa bioquímica subyacente de gran parte de la diversidad heredada en las características físicas y fisiológicas de los individuos y también en susceptibilidades relativas a diversas enfermedades y trastornos.

En diversas enfermedades comunes como diabetes, hipertensión o cáncer existen múltiples factores genéticos y ambientales que influyen en el riesgo de afectación del individuo. La importancia de los factores hereditarios en estos trastornos es grande, por ejemplo en la masa ósea se ha comprobado que la herencia explica entre el 50 y el 80% de la variabilidad. Algunos otros ejemplos incluyen la enfermedad de Alzheimer, la esclerodermia, el asma, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la osteoporosis, las enfermedades del tejido conectivo, las enfermedades renales, las enfermedades autoinmunes entre algunas (Hunter, 2005). Esto contrasta con el patrón de herencia mendeliana de las enfermedades monogénicas, en el que la presencia o ausencia de alelos en los individuos por lo general predice completamente la presencia o ausencia de la enfermedad (aunque la gravedad o edad de la aparición pueda variar).

Para las enfermedades genéticamente complejas, los alelos de riesgo son menos deterministas y probabilísticamente más (la presencia de un alelo de alto riesgo puede aumentar solo ligeramente el riesgo de la enfermedad). Además se ha propuesto que estos alelos débilmente penetrantes pueden estar presentes en alta frecuencia (> 1%) en la población (Chakravarti, 1999; Lander & Schork, 1994; Risch, 2000).

Existen enfermedades hereditarias clásicas, que se deben a la mutación de un gen sin embargo, buena parte de las enfermedades más prevalentes son en realidad el resultado de la combinación de factores hereditarios, ambientales más otras causas como penetrancia incompleta, heterogeneidad genética, y un fondo genético que consiste en múltiples genes con efecto menor, modificadores del fenotipo (Newton-Cheh & Hirschhorn, 2005).

Para estudiar la influencia genética en la resistencia o susceptibilidad a cierto rasgo, una estrategia se basa en realizar estudios de asociación de ciertos loci en

moléculas polimórficas involucradas con algún fenómeno de interés con diferentes rasgos cuantitativos (QTL's). Estos estudios se pueden realizar tanto en modelos de la infección como en la propia población humana. En este proceso se realiza un escaneo de una población dada y se analiza en conjunto con el fenotipo de interés (por ejemplo el nivel de resistencia contra una determinada infección). Si el fenotipo de estos individuos se conoce, el genotipo puede ser estadísticamente trazado por un mapa de ligamiento genético. De esta manera es posible localizar genes de interés que representan pequeñas regiones genómicas sobre un mapa genético (Wilfert & Schmid-Hempel, 2008).

Otro tipo de aproximación son los estudios llamados estudios de asociación que por lo general utilizan diseño de casos y controles (aunque también se utilizan basados en familias). En este diseño las frecuencias de los alelos o genotipos en el sitio de interés se comparan en poblaciones de casos y controles; una mayor frecuencia en los casos se toma como evidencia de que el alelo o genotipo se asocia con un mayor riesgo de enfermedad. La conclusión usual de tales estudios es que el polimorfismo que se está probando o bien afecta el riesgo de enfermedad directamente o es un marcador de alguna variante genética cercana que afecta el riesgo de enfermedad (Hirschhorn, Lohmueller, Byrne, & Hirschhorn, 2002). Cuando se utiliza el enfoque de genes candidatos se comienza con la selección de un gen candidato putativo basado en su relevancia para una enfermedad (rasgo) que es investigado. Es seguido por la evaluación y la selección de polimorfismos, por lo general polimorfismos etiqueta de nucleótido sencillo (SNPe), estos pueden tener una consecuencia funcional, afectar la regulación de genes o sus productos de proteínas. Finalmente, la variante del gen se verifica mediante su asociación al riesgo de la enfermedad por la observación de la ocurrencia en sujetos prueba al azar (casos) y sujetos control, se evalúa la asociación con enfermedad para dar un pronóstico o diagnóstico y ser en el futuro un potencial biomarcador (Patnala, Clements, & Batra, 2013).

También se pueden utilizar modelos murinos, una vez conociendo un gen de interés, se utilizan ratones knockout para una característica determinada que evidencien la influencia particular de ese gen sobre el fenotipo estudiado. Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia

individual a distintas enfermedades se da por los SNP's, y en menor grado por inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos, debido a que el genoma humano no es una estructura pasiva; al contrario, el ADN está expuesto a alteraciones que pueden dar como resultado la aparición de enfermedades o modificar la susceptibilidad a las mismas, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción) en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas (Bectticher *et al.*, 1995;Lin *et al.*, 2003), una variante genética puede incrementar sustancialmente el riesgo varios cientos de veces pero si por ejemplo un portador nunca llega a retarse con el antígeno o requiere un polimorfismo adicional en un gen diferente para tener un efecto funcional entonces la primera variante no tendría relevancia clínica, en este sentido debe reconocerse que para el estudio de estas enfermedades la epidemiología genética debe proveer una mejor comprensión de las interacción biológicas entre las determinantes genéticas (Burgner, Jamieson, & Blackwell, 2006), entonces en un fenotipo complejo se espera que los tamaños del efecto de los alelos implicados varíen de indiscernible, mínimo a grande y significativo, solo se espera que unos pocos alelos contribuyan con gran magnitud al efecto y por tanto podrían ser detectados con los enfoques genéticos actuales (Marian & Belmont, 2011).

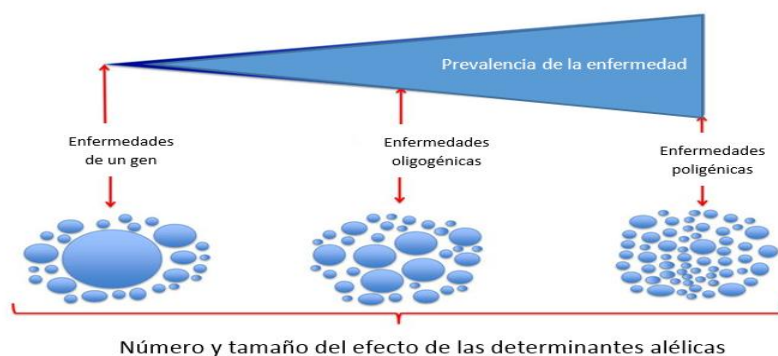


Figura 1. Determinación de un fenotipo complejo, modificado de A.J. Marian, M.D, 2012

2. ANTECEDENTES

2.1 Rasgos genéticos en la Cisticercosis

Una característica de muchas infecciones humanas es que solo una proporción de los individuos expuestos desarrolla clínicamente la enfermedad por ello se ha considerado a los factores hereditarios que pueden tener un papel dominante en esta variación interindividual (Chapman & Hill, 2012). Se asume que las enfermedades complejas comunes son la consecuencia del efecto combinado de muchos polimorfismos frecuentes en la población, por lo cual para los estudios de estas enfermedades un enfoque puede ser elegir un gen candidato, identificar algunos de sus polimorfismos y analizar si los alelos de esos loci polimórficos se asocian con un rasgo fenotípico determinado o con la frecuencia de una enfermedad (Newton-Cheh & Hirschhorn, 2005). Gracias al avance tecnológico actualmente existen otros enfoques que involucran el análisis de cientos de polimorfismos al mismo que permiten identificar regiones de máxima asociación.

2.2 Neurocisticercosis y algunos rasgos genéticos

En la NCC, como en otras enfermedades ciertas observaciones permiten pensar que el rasgo genético ancestral tiene una atribución en la patogenia. En particular la enfermedad parece expresarse de manera diferencial en distintas poblaciones del mundo por ejemplo en la población africana y asiática la presentación parenquimatosa es la más común y la localización subaracnoidea es muy poco frecuente (G. Singh, 1997), mientras que en población latinoamericana la subaracnoidea es mucho más común (Fleury et al., 2004). Si bien las diferencias entre el parásito entre continentes podrían explicar estas observaciones diferencia entre factores del hospedero también podrían estar involucrados (Fleury, Escobar, Frago, Sciutto, & Larralde, 2010).

Otras evidencias que sustentan el rol de factores genéticos en la susceptibilidad a esta enfermedad, es un estudio realizado en comunidades endémicas, rurales en México en donde se evidencio que los niños nacidos de madres con Neurocisticercosis múltiple tienen mayor probabilidad de tener NCC múltiple que los niños nacidos de madre no afectada de NCC o afectadas por un solo parásito.(Fleury et al., 2006). Así mismo en la población mestiza mexicana se ha demostrado que individuos que portan un alelo de HLA-A28 está asociado a un riesgo relativo más alto de padecer NCC parenquimatosa, mientras que el alelo

HLA-DQ2 se asocia a una disminución de este riesgo, puntualizando que los autores refieren a estas variantes en relación a la resistencia o susceptibilidad a NCC, que es diferente a la severidad de la inflamación o relacionada a la presentación de epilepsia (Del Brutto, Granados, Talamas, Sotelo, & Gorodezky, 1991). Otro factor genético de la respuesta innata estudiado para verificar su asociación con Neurocisticercosis es el codificado por los receptores tipo Toll (TLR's). Los receptores tipo Toll son moléculas centrales en la inmunidad innata pues controlan múltiples vías de señalización. Son proteínas altamente conservadas, existen varios estudios que han reportado el cambio de expresión de diferentes TLR's en nervios o asociados a tejidos/células durante la infección, el trauma o enfermedades autoinmunes. Mishra et al. (2006)(Mishra, Mishra, & Teale, 2006) encontraron incrementada la expresión de TLR1-9 después de la infección con *Mesocestoieds corti* en un modelo murino de NCC. Observaron un patrón diferencial de expresión para estas moléculas en neuronas, epéndimo y microglía / macrófagos. Más interesante aun fue que las células endoteliales y los neurofilamentos de la materia blanca cerebelar de los ratones infectados mostraron una sobre regulación de proteínas de TLR7 y TLR8. Entonces esto sugiere que los TLR's y su regulación pueden tener un rol complejo en la NCC así como en otras infecciones parasitarias del sistema nervioso central. Basado en estos reportes (Verma et al., 2010) estudiaron la asociación entre polimorfismos del TLR4 (Asp299Gly, Thr399Ile) bajo un modelo recesivo y la presencia de NCC en general y NCC asintomática de comunidades rurales en India, que se dedicaban a la crianza de cerdos en condiciones de poca tecnificación, bajo la hipótesis de que la variación genética en este gen puede estar asociada al desarrollo de la enfermedad sintomática. Identificaron un incremento en el riesgo de NCC en pacientes que tenían la variación Asp299Gly ($p < 0.001$; OR, 4.57; 95% CI 2.60-8.04) y Thr399Ile ($p < 0.003$; OR 3.39; 95% CI 1.52-7.56) respectivamente. Observaron también una alta prevalencia significativa para los alelos de Gly e Ile (23.3 vs 8.0% y 9.6 vs 3.7 % respectivamente) en pacientes con NC, estas variaciones fueron asociadas a la presentación asintomática. Otro estudio de las mismas variaciones en TLR's realizado en población de infantes africanos, encontró significativamente asociados

estos dos polimorfismos con la patogénesis severa por malaria pero con baja mortalidad (Ferwerda et al., 2007).

2.3. Cisticercosis por *Taenia crassiceps*

En el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps* se ha observado que se presentan diferentes grados de resistencia y susceptibilidad a la infección asociados a factores inmunológicos, sexuales y genéticos (Fragoso et al., 1998; Sciutto et al., 1991). Con respecto a los factores genéticos se ha reportado que el fondo genético de diferentes cepas de ratones, está asociado a la restrictividad en la instalación y crecimiento del parásito. Así cepas BALB/cAnN, CD1 y DBA/2J son altamente permisivas al crecimiento del parásito, mientras que cepas de fondo C57BL/6J y BALB/cJ son más restrictivas (Fragoso et al., 2006). Utilizando un animal transgénico se determinó que el gene Q9 que codifica a la proteína Qa-2 (una molécula no clásica del complejo principal de Histocompatibilidad) está relacionada con la restrictividad al crecimiento del parásito (Fragoso et al., 2008). Por otro lado (Alonso-Trujillo, Rivera-Montoya, Rodriguez-Sosa, & Terrazas, 2007) condujeron un estudio para delimitar la participación del óxido nítrico en la resistencia o susceptibilidad en una infección experimental murina con *T. crassiceps*, utilizando cepas susceptibles BALB/c y cepas resistentes STAT6 ^{-/-}BALB/c. Después de la infección el tipo silvestre BALB/c desarrollo una fuerte respuesta Th2, con altos niveles de IgG1, IgE, IL-5, IL-4 y niveles discretos de óxido nítrico (NO) permaneciendo susceptibles a la infección por *T. crassiceps*. En contraste ratones similarmente infectados BALB/c tratados con N^ω-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME un inhibidor de la NO sintasa) montaron una respuesta inmune similar pero con bajos niveles de NO y albergaron casi 100% más parásitos que los ratones tratados con L-NAME.

Otro gen promisorio que podría estar asociado a la restrictividad de la infección parasitaria, es el gen C5 del complemento. En efecto un estudio reportado por (Ramirez-Aquino et al., 2011) utilizando un conjunto de cepas congénicas recombinantes, encontró un locus en el cromosoma 2 murino denominado TCCR1 (*Taenia crassiceps* restrictive locus 1), relacionando este locus al componente 5 del complemento y la protección temprana a la infección por *T. crassiceps*.

2.4 C5 como gen candidato asociado a la restrictividad de la infección por *Taenia crassiceps* en un modelo murino

Para ayudar a la disección de los caracteres complejos se utilizan modelos murinos, este es ampliamente aceptado debido a sus cortos tiempo de reproducción, al conocimiento de su secuencia genética, además se sabe con cierta exactitud que genes o regiones son homologas al genoma humano. En el contexto de la cisticercosis se ha utilizado la infección con *T. crassiceps* como un modelo experimental de la cisticercosis en humanos causada por *Taenia solium*. Un grupo de investigación canadiense, generó un conjunto de cepas congénicas recombinantes (CCR) denominadas AcB y BcA (Fortin et al., 2001) a partir de líneas parentales A/J y C57BL/6J. Este panel de cepas fue desarrollado por retrocruzamiento limitado entre las dos líneas singénicas de interés y subsecuentemente por el apareamiento hermano-hermana, de esta forma se crearon paneles, uno contiene la fracción del genoma C57BL/6J sobre fondo genético A/J (AcB y otro conteniendo una fracción de A/J sobre fondo genético C57BL6J (panel BcA). Estos paneles han sido herramientas potentes para la disección de componentes genéticos complejos asociados a diferentes trastornos y enfermedades. Cabe señalar que entre las diferentes cepas de ratones evaluadas en la cisticercosis experimental murina destacan la cepa A/J(A), la DBA/2J, la C57BL/6J, A/J y DBA/2J estas dos últimas son cepas cuyo fenotipo es permisivo al crecimiento del parásito, mientras que C57BL/6J es restrictiva (Fragoso et al., 1996). Considerando estas diferencias fenotípicas de la cepa A y B6 Ramírez-Aquino et al., (2011) utilizó este panel de cepas congénicas recombinantes como herramienta de disección genética y búsqueda de loci asociados a la restrictividad al crecimiento del parasito de *T. crassiceps* en el modelo murino cisticercosis. En este estudio, se identificaron dos loci asociados con la restrictividad al crecimiento del parasito, uno localizado en el cromosoma 2 (Tccr1) y otro en el cromosoma 19 (Tccr2). El ligamiento máximo se asoció con un marcador que se localiza a 29.7 MB y fue previamente asociado con el gen que codifica el componente hemolítico del complemento (Hc), localizado aproximadamente a 5 Mb de distancia río abajo. El hallazgo fue verificado por genotipificación del panel completo de cepas congénitas recombinantes así como evaluando la restrictividad a la cisticercosis de la F2,

confirmando que la cepa DBA/2J es deficiente en C5 mientras que la AcB55 es C5 suficiente y no tiene esta delección.

2.5. Gen TRAF1

El factor asociado al receptor de TNF 1 (TRAF1) es una proteína con actividad E3 ligasa ubiquitina, intracelular con una actividad en la señalización con el receptor del receptor del factor de necrosis tumoral (RTNF) y receptores tipos toll (TLR) del sistema inmune (Bradley & Pober, 2001; Chung, Park, Ye, & Wu, 2002; Inoue et al., 2000; Kim et al., 2016), TRAF1 es bien conocida como una molécula adaptadora que regula la activación de NF- κ B y JNK (Carpentier & Beyaert, 1999; S. Y. Lee & Choi, 2007). La familia de proteínas TRAF consiste en seis miembros que están implicadas en la transducción de señales intracelulares por varios miembros de la superfamilia del receptor de TNFR y de la interleucina-1 (IL-1), incluyendo TNFR1, TNFR2, CD30, CD40, receptor de IL-1 y Toll tipo 4 (McHugh, 2017; Vallabhapurapu & Karin, 2009) como proteína adaptadora del TRAF2 participa en la activación clásica del factor de transcripción NF- κ B y en el reclutamiento de linfocitos (Bradley & Pober, 2001; S. Y. Lee & Choi, 2007), TRAF1 es el único miembro de la familia TRAF que carece del dominio dedo RING N terminal, es una proteína de andamiaje que participa en la señalización de TNFR2 en células T así como regulador negativo o positivo mediante interacción directa con TRAF2, que también se ha identificado como regulador pro-apoptótico en muerte celular neuronal (Lu et al., 2013; Wang, Mayo, Korneluk, Goeddel, & Baldwin, 1998). TRAF1 fue la primera proteína identificada como proteína de unión a el TNRF2 (TNF receptor tipo 2). A pesar de las funciones celulares de TRAF1 aún no son bien comprendidas cuando se comparan con otros miembros de la familia, diversos estudios han indicado que participa en la señalización en TNFR2 en células T como un regulador negativo vía interacción directa con TRAF2. También estudios recientes describen un rol de regulador positivo de esta proteína río debajo de TNFR2, GITR, 4-1BB, LMP1 y CD30 asociado con TRAF2 (Greenfeld et al., 2015; Nocentini & Riccardi, 2009; Sabbagh, Pulle, Liu, Tsitsikov, & Watts, 2008). Este gen localizado en el cromosoma 9 humano ha sido implicado en enfermedades de curso inflamatorio crónico. En estudios de asociación de genoma completo se ha encontrado asociación a mayor riesgo en

pacientes con artritis reumatoide de SNP's en TRAF1. Uno de estos SNP's es rs3761847 en la región intrónica 5' del gen, este SNP además está en desequilibrio de ligamiento con otro SNP rs2900180 localizado en la región intergénica entre TRAF1 y C5 (Plenge et al., 2007). Cuando Abdul y col.(2017) analizaron el papel funcional de estos polimorfismos en sujetos sanos y con artritis reumatoide encontraron que TRAF1 se expresa en niveles muy bajos en linfocitos en reposo, la reducción de la proteína TRAF1 fue significativamente menor en células T CD8 que en CD4 en células de sujetos sanos con el genotipo de riesgo (GG). Además vieron los monocitos y las células T de seres humanos sanos que tienen una mutación en TRAF1 expresan menos TRAF1 pre-mRNA y proteínas siguientes a la activación. La expresión reducida de TRAF1 hace que los monocitos sean hipersensibles a las respuestas inflamatorias inducidas por LPS, consistente con el papel de estos SNP's en las enfermedades inflamatorias (Abdul-Sater et al., 2017) .

Por otro lado autores como Cheng y col. (2016) han propuesto que esta proteína podría ser un marcador serológico de inflamación en pacientes con artritis reumatoide activa ya que encontraron concentraciones serológicas significativamente mayores en pacientes con AR (35.9+-51.2 pg/mL) que en personas sanas (12.5+-8.6 pg/mL), correlacionado positivamente con los títulos de anticuerpos antiglicosa 6-fosfato isomerasa y factor reumático (Cheng et al., 2016). Este gen hasta ahora no ha sido implicado en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades infecciosas.

2.6. Modelos de herencia para las enfermedades multifactoriales y poligénicas

Los patrones de herencia se pueden clasificar en función de dos criterios, por un lado cuando los genes se localizan en los autosomas, se habla entonces de herencia autosómica mientras que si los genes se encuentran en los cromosomas sexuales la herencia será ligada al sexo, por otro lado en función de las de las copias necesarias para que se desarrolle la enfermedad , en los organismos diploides cada célula somática contiene dos copias de cada cromosoma y dos copias de cada gen entonces se habla de herencia dominante o recesiva, la primera de ellas se dará cuando la presencia de la mutación en una de los dos copias del gen es suficiente para que el individuo que la presente este enfermo. En cambio en

el segundo caso es necesario que la mutación este en las dos copias para que la enfermedad se de. Las enfermedades causadas por mutaciones en un solo gen generalmente se heredan en un patrón simple, dependiendo de la ubicación del gen y si se necesitan una o dos copias normales del gen. Esto se conoce como herencia mendeliana, pero las enfermedades multifactoriales no siguen un patrón definitivamente mendeliano, algunos rasgos o características muestran una variación continua, un rasgo o fenotipo no se pueden dividir fácilmente en categorías claras, en muchos de estos casos el fenotipo final es el resultado de una interacción entre factores genéticos e influencias ambientales (Genetic, The New York-Mid-Atlantic Consortium for, & Newborn Screening, 2009). En efecto todos los rasgos genéticos son complejos debido a que aunque existan individuos fenotípicamente similares estos no llevan la misma carga de alelos en los locus, además que la regulación de la expresión y función genética es en multicapas, indicativo de la complejidad de los determinantes en los fenotipos complejos (Marian, 2012), para el estudio de las enfermedades multifactoriales se aplican modelos estadísticos de segregación(dominante, recesivo, codominante), que determina el patrón de transmisión y su consistencia con la segregación mendeliana (Sun, 2017). Estos patrones de transmisión permiten una aproximación y pueden proporcionar evidencia para predecir riesgos de recurrencia para familiares o grupos poblacionales.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neurocisticercosis es una enfermedad pleomórfica con un amplio espectro en su presentación clínico-radiológica. Algunos pacientes que se infectan pueden destruir silenciosamente al cisticerco, sin presentar una sintomatología que amerite consulta con el médico, mientras que otros desarrollan una enfermedad que puede tener una presentación clínico-radiológica benigna (cisticercos únicos localizados en el parénquima cerebral y con un cuadro clínico leve) o bien una presentación severa (cisticercos múltiples localizados en el espacio subaracnoideo de la base y/o intraventriculares, con una intensa reacción inflamatoria a su alrededor y con un cuadro clínico grave). La respuesta inmuno-inflamatoria juega un papel esencial tanto en el establecimiento del parásito como en la evolución de la enfermedad. Estudios previos han señalado que la infección por *Taenia solium* está determinada

por rasgos genéticos complejos. Utilizando el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps* se identificó que el gene C5 de complemento participa de manera crítica en el control de la infección y reproducción del cisticerco. Dentro de las primeras fases de la respuesta inflamatoria el complemento juega un papel crítico, ya que la activación del mismo conlleva al desencadenamiento de la respuesta de células del sistema granulocítico-fagocítico endotelial, cuyos productos de su activación inician la respuesta inflamatoria.

El componente C5 de complemento cuando es fraccionado por la C5 convertasa genera dos fragmentos; C3a que forma parte del complejo de ataque a la membrana y C5a que tiene funciones quimiotácticas y de anafilatoxina. Adicionalmente se ha observado que el receptor de C5a (que se expresa en macrófagos, neutrófilos, células dendríticas) tiene una colaboración con vías de señalización de TLR, modulando la respuesta inflamatoria. Por otro lado se han encontrado polimorfismos en la región TRAF1/C5 que se asocian con niveles incrementados de C5a circulante, así como en la intensidad de la respuesta inflamatoria en población humana con artritis. Este panorama claramente señala la relevancia de estudiar estos polimorfismos en la región genética en pacientes con NC en población mestiza-mexicana enferma para comparar si aquellos que tienen una presentación más inflamatoria o menos inflamatoria tienen algún tipo de asociación.

Identificar las variantes genéticas que influyen el pleomorfismo de la enfermedad es un paso fundamental hacia el esclarecimiento de la participación de genes, sus interacciones y sus productos, también podrían ayudar a esclarecer determinantes de la susceptibilidad en la NCC, este conocimiento integrado con otras pruebas pudiese ser potencialmente traducido en estrategias profilácticas/terapéuticas más eficaces o medicina personalizada.

4. HIPOTESIS

Algunos polimorfismos en la región génica TRAF1/C5 se asocian con diferencias en la presentación clínica y a la evolución de la neurocisticercosis humana.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Identificar en muestras de pacientes con diagnóstico de NC, las variantes rs17611, rs25681, rs992670, rs10818488 y 3761847 polimórficas de la región TRAF1/ C5 del complemento y su asociación con la severidad del proceso inflamatorio clínicamente categorizado.

5.2 ESPECÍFICOS

Evaluar la relevancia de los polimorfismos o haplotipos en la región TRAF/1 C5 del complemento y su probable asociación, en pacientes con NCC con características más severas o menos severas de inflamación medida en función de la localización y número de parásitos, fase o estadio de degradación del parásito, y número de células o celularidad en LCR.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño de este estudio es de casos y controles anidado con cohorte. A continuación se describen algunas de las características del grupo de estudio y las consideraciones para determinar las variables en estudio.

6.1 Muestras de Pacientes con neurocisticercosis

Se incluyeron 200 muestras sanguíneas de pacientes que asisten a la consulta externa de neurocisticercosis en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) que fueron diagnosticados con Neurocisticercosis a través de estudios de Imagen (Tomografía Axial Computarizada y Resonancia Magnética nuclear) y eventualmente estudios serológicos (presencia de anticuerpos y del antígeno de secreción HP10 de *Taenia solium*) por médico del propio Instituto. Todos los pacientes tienen un expediente clínico, con datos demográficos, historia clínica y estudios de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea, y estudios de niveles de glucosa y celularidad en el líquido cefalorraquídeo) además del consentimiento informado. La información colectada de los expedientes clínicos para la caracterización de la enfermedad fue número de cisticercos (único o múltiple),

estadio del cisticerco (vesicular, granular, calcificado), localización (parenquimatosa o extra parenquimatosa). Cabe señalar que con base a los hallazgos de imagen y número de células en LCR los médicos tratantes establecen el criterio, si el paciente presenta una respuesta muy inflamatoria o poco inflamatoria.

Las etapas degenerativas del parásito se determinaron con base en las neuroimagenes de TC y RM; 1) vesicular cuando el parásito es viable que se determina cuando hay una señal parecida al fluido cerebroespinal dentro de un quiste visible, 2) coloidal cuando el líquido del quiste es turbio y hay una intensa reacción inflamatoria en el parénquima circundante siempre y cuando la localización permitiera visibilizarlo y 3) calcificado cuando los restos del parasito aparecen como granuloma mineralizado. Existieron pacientes en estadios denominados mixtos en los que era visible parásitos en distintos estadios. También de los estudios radiológicos se colectó la siguiente información: cantidad de lesiones, única cuando en las imágenes era visible un solo parásito independiente de la localización o estadio, múltiple si las imágenes daban evidencia de más de un parásito en cualquiera de sus estadios o localización. Para la ubicación se denominó parenquimatosa cuando el o los parásitos están localizados en cualquier lugar dentro del parénquima cerebral o surcos corticales, mientras que la localización extra parenquimatosa fue cuando el o los parásitos estaban en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo, ventrículos, fisura de Silvio o médula. Se presentaron casos mixtos en donde los pacientes presentaban parásitos tanto en el parénquima como extra-parénquima. En los pacientes con sospecha de localización extraparenquimatosa se realizó una punción lumbar para coleccionar líquido cefalorraquídeo (LCR) en donde se realizó un conteo celular. La celularidad del LCR es un indicador de la intensidad de la reacción inflamatoria en NCC, se califica un LCR como inflamatorio cuando el numero células excede 5 cel / mL, mientras que un LCR que excede tres veces este punto es considerado muy inflamatorio (> 15 células) (Chavarria *et al.*, 2005)

Otro grupo de 58 muestras sanguíneas de pacientes, se obtuvo de una población rural de Cuentepec, estado de Morelos. Estos sujetos fueron diagnosticados por TC de cráneo en el marco de un estudio epidemiológico de NCC (Fleury *et al.*, 2006).

Los sujetos que resultaron con una lesión compatible con NCC, fueron evaluados neurológicamente (practicado por la Dra. Agnes Fleury, neuróloga del INNN) y se estableció que los pacientes presentaban una NCC de presentación asintomática. Los estudios de imagen aunados a los estudios serológicos soportaron las bases para determinar que eran sujetos con NCC.

Criterios de inclusión: Se incluyeron aquellas muestras que contaran con los criterios de fenotipificación completos.

6.2 Extracción y purificación de ADN genómico de casos

De la sangre obtenida en tubos Vacutainer® con EDTA, se tomó una alícuota de 200 µL y se utilizó para la extracción de ADN genómico el kit DNeasy Blood & Tissue de QUIAGEN™, con el procedimiento de lisado de acuerdo a las especificaciones del fabricante, eluyendo el material genético en 200 µL.

6.3 Evaluación del rendimiento de la extracción

El ADN purificado y conservado a temperatura de refrigeración (4 ° C) se cuantificó tomando 2 µL por cada muestra con un espectrofotómetro Epoch™ Biotek a 260 nm de longitud de onda y el software Gen 5; se consideró una muestra con una buena extracción y pureza cuando el límite inferior del contenido sea ≥ 1.8 de la relación de Densidad Óptica a 260/280.

6.4 Evaluación de la Integridad del ADN

Se corrieron cada una de las muestras del ADN en geles de agarosa a una concentración de 0.8 % con Gel red™ como agente intercalante junto con un buffer de carga, en una solución de TAE 1X pH 8.1 (agua destilada, Tris, ácido glacial acético, Na₂EDTA-2H₂O 2 mM) a un voltaje de 90 V durante 35 min.

6.5 Selección de polimorfismos y localización

Para seleccionar los polimorfismos en la región génica se tomaron como referencia aquellos que al menos tienen un estudio de asociación con alguna enfermedad de origen inflamatorio en otras poblaciones distintas a la mestiza-mexicana y con

Cuadro 2. Características y localización cromosómica de los polimorfismos en estudio

ID	Tipo de SNP y localización	Variación	MAF
rs17611	Chr.9: 123769200 Missense	C/T I802V	T=0.4048/2027
rs25681	Chr.9:123780005 Sinónima	A/G Y544Y	A=0.4058/2032
rs992670	Chr.9: 123781770 Intron	A/G	G=0.4093/2050
rs3761847	Chr.9:123690239 TRAF1 variante de 5 prime UTR	A/G	G=0.4609/2308
rs10818488	Chr9: 9:123705087 TRAF1 variante en región reguladora	A/G	A= 0.47

6.6 Iniciadores y sondas Taq man™ para la determinación de los genotipos

El ensayo para la genotipificación fue mediante el uso de sondas TaqMan™ prediseñadas con marcaje VIC y FAM, además de contar con un quencher en el extremo 3', más los dos iniciadores específicos diana. Los ensayos son ensayos de genotipificación prediseñados por

Assay ID: C__2359571_1_ RS Number: rs25681,

Assay ID: C__2783640_10 RS Number: rs3761847,

Assay ID: C__2783655_10 RS Number: rs10818488,

Assay ID: C__2783709_10 RS number: rs992670,

Assay ID: C__11720402_10 RS Number: rs17611.

Figura 3. Secuencias contexto de los iniciadores y sondas marcadas para la identificación de los polimorfismos.

Assay ID	Assay Mix Concentration	Reporter 1 Dye	Reporter 1 Concentration (µM)	Reporter 1 Quencher	Reporter 2 Dye	Reporter 2 Concentration (µM)	Reporter 2 Quencher	Forward Primer Concentration (µM)	Reverse Primer Concentration (µM)	Context Sequence	Am
C__2359571_1_	40x	VIC	8	NFQ	FAM	8	NFQ	36	36	CTGCTGTCTGTTCTCCTGTGACGAT A G TAATAGACCAGAAAGTCGGGATGAAG	
C__2783840_10	40x	VIC	8	NFQ	FAM	8	NFQ	36	36	TCTGTGGGTCCCTTCTCTCCCTCC A G G CCTCAATACCACTCTCTACCTG	
C__2783655_10	40x	VIC	8	NFQ	FAM	8	NFQ	36	36	GGCCAATGAGCAAGTGGGAGTGAGG A G C C A A A G T G A G G C T T G G A T C T G G T A	
C__2783709_10	40x	VIC	8	NFQ	FAM	8	NFQ	36	36	TGCAATAGGGATGTTGCTCAGCTA C A G G A A T T G G A C A G G C A A G A T G G A T T	
C__11720402_10	40x	VIC	8	NFQ	FAM	8	NFQ	36	36	TGCTTACCAGTGTTTGAATGCCA C T G C C T T G A A T T C C C A G G T G T A G A	

6.7 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la determinación de los genotipos

La reacción se llevó a cabo con la siguiente mezcla de reacción: 2X TaqMan™ master mix 7µL, Solución de trabajo 20X, 0.70 µL, 20 ng de ADN de muestras problema y 4.3 µL agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final de 15 µL. Se utilizó un termociclador Rotorgene Q (Quiagen) con las siguientes condiciones de reacción pre incubación 60° C durante 30 seg, incubación 95° C durante 10 min, ciclado en 40 ciclos en dos etapas, una de desnaturalización a 95° C 15 seg y otra de hibridación elongación 60° C 1 min. La determinación del genotipo se hizo mediante el análisis de la curva de amplificación según la fluorescencia emitida.

6.8 Ensayos de ELISA para la determinación de concentración de C5a en suero

Se utilizaron el kit comercial Human C5a Platinum ELISA (Affymetrix-eBioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. La microplaca del kit está previamente sensibilizada con un anticuerpo específico anti-C5a. Se realizó una curva estándar de 7 diluciones dobles seriadas donde la concentración máxima fue de 5 ng/µL. Las muestras de suero fueron pre diluidas (dilución 1:25) y agregadas a cada pozo por duplicado, incubándolas 120 min con agitación (400rpm), seguido se agregó biotina conjugada incubando 60 min, después se adicionó estreptavidina incubando nuevamente 60 min, entre cada paso hubo seis lavados con buffer provisto por el kit., cuando se agregó TMB a cada pozo el color fue monitoreado a una densidad óptica de 650 nm con un espectrofotómetro Epoch 2 (Biotek™), la reacción enzima-sustrato fue detenida por la adición de un solución de paro y el cambio de color fue cuantificado (a una longitud de onda de 450 ± 2 nm. La concentración de las muestras fue determinada por la comparación de la densidad óptica de la curva estándar (curva de regresión logística de 5 parámetros).

6.9 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos del total de muestra (población mestiza-mexicana de pacientes con NCC) se calculó la frecuencia alélica y genotípica, el equilibrio de Hardy-Weinberg por el test exacto. Para las variables de respuesta como localización, número de parásito, celularidad y la magnitud de la asociación se calculó la OR (razón de momios u *odds ratio*) y el intervalo de confianza (IC) 95% utilizando un modelo de regresión logística condicional con el software SPSS (IBM™ statistics, versión 23.0.0), en donde se consideró al sexo y la edad del paciente como covariable. La interacción de la covariable sexo puede ser más fuerte para estadio del parásito, celularidad y la edad para variables como estadio y número de parásitos.

El desequilibrio de ligamiento (LD) y los haplotipos se determinaron con el software de Haploview 4.2 (Broad Institute), el OR y el IC para los haplotipos construidos, se determinó con un modelo de regresión logística condicional con el software SPSS. La construcción de intervalos de confianza se realizó con 95% coeficiente de confianza. Además se probaron modelos de herencia para determinar si las variantes génicas y haplotipos pueden tener algún riesgo atribuible al patrón de herencia, al ser dominantes, recesivos o codominantes bajo aproximaciones bayesianas y utilizando el programa SNP Analyzer™ 2.0 (Yoo, Lee, Kim, Rha, & Kim, 2008).

7 . RESULTADOS

7.1 Características clínicas

Se partió de una muestra de 258 sujetos, de los cuales no se incluyeron en el estudio 18 debido a que no cumplieron con el estándar de calidad de ADN requerido para la amplificación (integridad, concentración) o bien no se contó con la información del expediente clínico. Los sujetos se clasificaron de acuerdo a los siguientes criterios: estado del parásito (vesicular, granular, calcificado), número de parásitos (único o múltiple), localización (parenquimatosa cuando están localizados en parénquima o Subaracnoideo, cerebral sulcus; extraparenquimatosa cuando

están en cisternas de la base o ventrículos, silviano, médula) y celularidad en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (alta celularidad ≥ 15 células/mm³, baja celularidad < 15 células/mm³, sin celularidad =0). En la Tabla 1 se muestran las características clínico-radiológicas de las muestras en estudio.

Tabla 1. PERFIL CLÍNICO DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Característica	Categoría	N
Género	Hombres	110
	Mujeres	106
Estadio del parasito	Vesicular	88
	Coloidal	20
	Calcificado	56
	Dañados (Coloid+Calcif)	76
	Mixto	48
	ND	4
Numero	Único	63
	Múltiple	145
	ND	7
Localización	Parenquimatosos	88
	Extraparenquimatosos	69
	Mixto	48
	ND	8
Celularidad en LCR	Alta ≥ 15 cel por mm ³	79
	Baja < 15 cel	83
	ND	53

ND: no determinada

7.2 Frecuencias genotípicas y alélicas en la población de estudio para los SNP's en TRAF1 y C5.

La tabla 2 muestra los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas de la población en estudio, destacando que estas frecuencias son las primeras reportadas en relación a la patología de neurocisticercosis de la región TRAF1/C5 y con el análisis de asociación, cuando se comparan las frecuencias obtenidas en este estudio con datos de poblaciones con otra ancestría obtenidos del proyecto de 100 genomas humanos (Tabla 3), se destaca que para el rs17611 y rs25681 las frecuencia del alelo menor no son concordantes con lo ya reportado para la población mexicana migrante de los ángeles (MXL), la cual podría ser equiparable en ancestría. Mientras que para los otros SNP las frecuencias son similares en proporción a los datos reportados.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas en la población de pacientes mexicanos con NC

	Frecuencia genotípica n (%)			Frecuencia alélica (%)	
	CC	CT	TT	C	T
17611	59(25.21)	96(41.02)	79(33.76)	0.46	0.54
	AA	AG	GG	A	G
25681	75(31.51)	118(49.57)	45(18.90)	0.56	0.44
	AA	AG	GG	A	G
992670	89(37.51)	111(46.63)	38(15.96)	0.61	0.39
	AA	AG	GG	A	G
10818488	27(11.63)	109(46.98)	96(41.37)	0.35	0.65
	AA	AG	GG	A	G
3761847	105(44.49)	98(41.52)	33(13.98)	0.65	0.35

Tabla 3. Comparativo de las frecuencias alélicas de la población en estudio con diagnóstico de NC y las frecuencias reportadas por el proyecto 1000 genomas.

Población:	rs17611		rs25681		rs992670		rs10818488		rs3761847	
	T	C	A	G	A	G	A	G	A	G
Mestiza-M-NC	54	46	56	44	61	39	35	65	65	35
TODAS	40	60	41	59	59	41	47	53	54	46
AFR	3	97	3	97	48	52	64	36	39	61
AMR	50	50	50	50	56	44	40	60	60	40
EAS	57	43	57	43	76	24	50	50	52	48
EUR	46	54	46	54	53	47	43	57	57	43
MXL	49	51	49	51	57	43	41	59	59	41
PEL	59	41	59	41	62	38	40	60	61	39

TODAS: general de acuerdo al proyecto de 100 genomas, AFR: población africana, AMR: americana, EAS: asiática, EUR: europea, MXL: mexicanos de los Ángeles, PEL: población peruana de Sudamérica.

7.3 Relevancia de los SNP's en TRAF Y C5 estudiados en las características clínico-radiológicas de pacientes con NCC.

La tabla 4 describe las frecuencias encontradas en el grupo de estudio al analizar la variable localización del parásito, en donde se observa que el rs17611 (P 0.0074) se encuentra en desequilibrio Hardy-Weinberg (H-W), mientras que en los otros polimorfismos las frecuencias genotípicas observadas son compatibles con el equilibrio de HW ($p > 0.05$). En la tabla 5 se realizó un análisis de regresión logística condicional para determinar si las variantes de riesgo se asocian al riesgo de padecer NCC parenquimatosa o extraparenquimatosa siendo esta última el fenotipo asociado a un mayor daño patológico al paciente y mayor inflamación, además este análisis se hizo para descartar probables variables de confusión como la edad y sexo de los pacientes y permitir hacer la asociación de manera más objetiva. Se observa que ninguno de los polimorfismos está asociado al riesgo en este fenotipo, además ni el sexo ni la edad fueron significativas estadísticamente ($p > 0.05$) al análisis.

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NC parenquimatosa y extraparenquimatosa y equilibrio de H-W

	N	Frecuencia genotípica, n (%)				p	HWE	alelo Menor	MAF	Frecuencia alélica, n (%)		p
		C/C	C/T	T/T	N/N					C	T	
rs17611												
Parenquima	90	22(24.44)	40(44.44)	28(31.11)	3	0.9275	0.0074	C	0.464	84(46.7)	96(53.3)	
Extraparen	122	34(27.87)	45(36.89)	43(35.25)	3					113(46.3)	131(57.7)	0.9625
rs25681												
Parenquima	93	28(30.11)	46(49.46)	19(20.43)	1	0.5333	0.8259	G	0.435	102(54.8)	84(45.2)	
Extraparen	123	39(31.71)	64(52.03)	20(16.26)	2					142(57.7)	104(42.3)	0.6719
rs992670												
Parenquima	92	31(33.70)	44(47.83)	17(18.48)	1	0.3611	0.8399	G	0.399	106(57.6)	78(42.4)	
Extraparen	124	47(37.90)	58(46.77)	19(15.32)	2					152(61.3)	96(38.7)	0.5853
rs10818488												
Parenquima	90	14(15.56)	42(46.67)	34(37.78)	3	0.1856	0.6827	A	0.353	70(38.9)	110(61.1)	
Extraparen	120	10(8.33)	58(48.33)	52(43.33)	5					78(32.5)	162(67.5)	0.3375
rs3761847												
Parenquima	92	35(38.04)	39(42.39)	18(19.57)	1	0.0526	0.4126	G	0.356	109(59.2)	75(40.8)	
Extraparen	122	57(46.72)	53(43.44)	12(9.84)	4					167(68.4)	77(31.6)	0.1630

P^a: es la probabilidad de que la desviación del equilibrio H-W (HWE) pueda explicarse por casualidad con un test exacto de H-W. p^b: es el valor de asociación de alelos dado por el estadístico de Chi-cuadrada. MAF: frecuencia del alelo menor

Tabla 5. Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación al riesgo de NCC parenquimatosa o extra parenquimatosa

SNP	Par N (%)	ExPar N (%)	OR(95% CI)	P
C5 rs17611(C>T)				
TT	28(31.11)	43(35.25)	1 (referencia)	
CT	40(44.44)	45(36.89)	1.485(0.672-3.280)	328
CC	22(24.44)	34(27.87)	1.032(0.506-2.103)	931
C5 rs25681 (A>G)				
AA	28(30.11)	39(31.71)	1 (referencia)	
AG	46(49.46)	64(52.03)	1.186(0.601-2.343)	623
GG	19(20.43)	20(16.26)	0.949(0.395-2.283)	907
C5 rs992670 (A>G)				
AA	31(33.70)	47(37.90)	1 (referencia)	
AG	44(47.83)	58(46.77)	1.097(0.561-2.145)	786
GG	17(18.48)	19(15.32)	0.987(0.413-2.358)	976
TRAF1 rs10818488 (G>A)				
GG	34(37.78)	52(43.33)	1 (referencia)	
AG	42(46.67)	58(48.33)	1.309(0.674-2.544)	427
AA	14(15.56)	10(8.33)	0.666(0.248-1.788)	420
TRAF1 rs3761847 (A>G)				
AA	35(38.04)	57(46.72)	1 (referencia)	
AG	39(42.39)	53(43.44)	1.062(0.542-2.079)	861
GG	18(19.57)	12(9.84)	0.552(0.220-1.384)	205

Análisis por modelo de regresión logística condicional, ajustado por edad y sexo. P-valor< 0.05 significativo

La Tabla 6 muestra el análisis respecto al fenotipo número de parásitos (único vs múltiples), en donde se considera que el fenotipo más inflamatorio es en donde existen múltiples parásitos, tres SNP's se encuentran en desequilibrio de H-W (rs17611 $p=0.0076$, rs992670 $p=0.0496$, rs3761847 $p=0.0478$), mientras que el resto se encuentran en equilibrio. En el análisis de regresión logística para el fenotipo de número de parásitos (tabla 7) se observa que existe un polimorfismo (rs376841) con tendencia a la asociación, es de resaltar que la variable sexo no mostró diferencia estadística significativa ($p>0.05$), a diferencia de la edad que sí fue estadísticamente significativa en el análisis ($p<0.05$).

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NC y un solo parásito o múltiples parásitos y equilibrio de H-W

	N	Frecuencia genotípica, n (%)				HWE	Alelo menor	AF	Frecuencia alélica, n (%)		p ^b
		C/C	C/T	T/T	N/N				C	T	
rs17611											
Único	67	21(31.81)	22(33.33)	23(35.32)	0	0.0076	C	0.467	64(48.50)	68(51.49)	0.633
Múltiple	149	35(23.48)	64(42.95)	50(33.55)	5				134(44.96)	164(55.03)	
rs25681											
Único	67	23(34.32)	28(41.79)	16(23.88)	0	0.1677	G	0.438	74(55.22)	60(44.77)	0.722
Múltiple	153	47(30.71)	83(54.24)	23(15.03)	2				177(57.84)	129(42.15)	
rs992670											
Único	66	26(39.39)	26(39.39)	14(21.21)	1	0.0496	G	0.413	78(59.09)	54(40.90)	0.7865
Múltiple	154	55(35.71)	77(50.0)	22(14.28)	4				187(60.71)	121(39.28)	
rs10818488											
Único	64	9(14.06)	27(42.18)	28(43.75)	3	0.4054	A	0.353	45(35.15)	83(64.84)	0.997
Múltiple	150	15(10.0)	75(50.0)	60(40.0)	4				105(35.0)	195(65.0)	
rs3761847											
Único	67	28(41.79)	25(37.31)	14(20.89)	0	0.0478	G	0.376	60(44)	39(55)	0.3276
Múltiple	151	68(45.03)	67(44.37)	16(10.59)	3				3(67.21)	32(78)	

P^a: es la probabilidad de que la desviación del equilibrio H-W pueda explicarse por casualidad con un test exacto de H-W. p^b: es el valor de asociación de alelos dado por el estadístico de Chi-cuadrada. MAF: frecuencia del alelo menor

Tabla 7. Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación al riesgo de NCC con parásito único o parasitosis múltiple

SNP	Único N (%)	Múltiple N (%)	OR(95% CI)	<i>P</i>
C5 rs17611(C>T)				
TT	23(35.32)	50(33.55)	1 (referencia)	
CT	22(33.33)	64(42.95)	1.219(0.556-2.674)	0.621
CC	21(31.81)	35(23.48)	0.842(0.374-1.896)	0.678
C5 rs25681 (A>G)				
AA	23(34.32)	47(30.71)	1 (referencia)	
AG	28(41.79)	83(54.24)	1.410(0.672-2.961)	0.364
GG	16(23.88)	23(15.03)	0.629(0.252-1.571)	0.321
C5 rs992670 (A>G)				
AA	26(39.39)	55(35.71)	1 (referencia)	
AG	26(39.39)	77(50.0)	1.438(0.688-3.008)	0.334
GG	14(21.21)	22(14.28)	0.962(0.386-2.400)	0.934
TRAF1 rs10818488 (G>A)				
GG	28(43.75)	60(40.0)	1 (referencia)	
AG	27(42.18)	75(50.0)	0.776(0.275-2.186)	0.631
AA	9(14.06)	15(10.0)	1.413(0.684-2.918)	0.35
TRAF1 rs3761847 (A>G)				
AA	28(41.79)	68(45.03)	1(referencia)	
AG	25(37.31)	67(44.37)	0.419(0.161-1.094)	0.076
GG	14(20.89)	16(10.59)	1.037(0.497-2.167)	0.922

Análisis por modelo de regresión logística condicional, ajustado por edad y sexo.

En la Tabla 8 se muestran las frecuencias genotípicas, alélicas y equilibrio de H-W con respecto a la celularidad presente en LCR, se observa que el rs17611 se encuentran en desequilibrio de H-W (p 0.0067) mientras que el resto se encuentran en equilibrio. Con respecto a las diferencias en genotipos observados y frecuencias alélicas, no se encontraron datos estadísticamente significativos. En el análisis de regresión logística condicional (tabla 9) el genotipo CT del rs17611 tiene una tendencia a mostrar significancia estadística hacia la protección, mientras en el rs3761847 los alelos GG muestran una tendencia a la significancia estadística para la disminución de la celularidad, traducido como un efecto protector, es de notar que en el análisis de las covariables sexo y edad, la primera mostró significancia estadística en todos los polimorfismos($p < 0.05$), mientras que la segunda no.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NC alta celularidad y baja celularidad y equilibrio de Hardy-Weinberg

	N	Frecuencia genotípica, n (%)				HWE	Alelo Menor	MAF	Frecuencia alélica, n (%)		
		C/C	T	T/T	N/N				P ^a	C	T
rs17611											
Baja cel	110	24(21.8)	49(44.5)	37(33.6)	3	0.0067	C	0.433	97(44.1)	123(55.9)	.8749
Alta cel	85	23(27.0)	27(31.7)	35(41.1)	1				37(42.9)	49(57.1)	
rs25681											
Baja cel	113	37(32.7)	60(53.1)	16(14.1)	0	0.6159	G	0.404	134(59.3)	92(40.7)	.9199
Alta cel	85	31(36.4)	40(47.06)	14(16.4)	1				102(60.0)	68(40.0)	
rs992670											
Baja cel	112	42(45.6)	52(56.5)	18(19.5)	1	0.956	G	0.367	136(60.7)	88(39.3)	.4569
Alta cel	85	37(29.8)	38(30.6)	10(8.0)	1				112(65.9)	58(34.1)	
rs10818488											
Baja cel	109	11(10.09)	54(49.54)	44(40.37)	4	0.5711	A	0.326	76(34.9)	142(65.1)	.4537
Alta cel	83	7(8.43)	35(42.17)	41(49.40)	3				49(29.5)	117(70.5)	
rs3761847											
Baja cel	112	47(41.96)	50(44.64)	15(13.39)	1	0.6517	G	0.321	144(64.3)	80(35.7)	.2163
Alta cel	84	45(53.57)	32(38.10)	7(8.33)	2				122(72.6)	46(27.4)	

P^a: es la probabilidad de que la desviación del equilibrio H-W pueda explicarse por casualidad con un test exacto de H-W. p^b: es el valor de asociación de alelos dado por el estadístico de Chi-cuadrada. MAF: frecuencia del alelo menor.

Tabla 9. Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación a la baja o alta celularidad en LCR en pacientes con NCC

SNP	Baja cel N (%)	Alta cel N (%)	OR(95% CI)	<i>P</i>
C5 rs 17611(C>T)				
TT	37(33.6)	35(41.1)	1 (referencia)	
CT	49(44.5)	27(31.7)	0.509(0.247-1.049)	0.067
CC	24(21.8)	23(27.0)	0.894(0.411-1.945)	0.777
C5 rs25681 (A>G)				
AA	37(32.7)	31(36.4)	1 (referencia)	
AG	60(53.1)	40(47.06)	0.595(0.302-1.171)	0.133
GG	16(14.1)	14(16.4)	0.733(0.299-1.801)	0.499
C5 rs992670 (A>G)				
AA	42(45.6)	37(29.8)	1 (referencia)	
AG	52(56.5)	38(30.6)	0.743(0.384-1.439)	0.379
GG	18(19.5)	10(8.0)	0.650(0.262-1.611)	0.352
TRAF1 rs10818488 (G>A)				
GG	44(40.37)	41(49.40)	1 (referencia)	
AG	54(49.54)	35(42.17)	0.626(0.324-1.211)	0.163
AA	11(10.09)	7(8.43)	0.548(0.188-1.601)	0.272
TRAF1 rs3761847 (A>G)				
AA	47(41.96)	45(53.57)	1 (referencia)	
AG	50(44.64)	32(38.10)	0.576(0.297-1.120)	0.104
GG	15(13.39)	7(8.33)	0.381(0.135-1.076)	0.069

Análisis por modelo de regresión logística condicional, ajustado por edad y sexo.

La tabla 10 muestra las frecuencias genotípicas, alélicas y equilibrio de H-W para la degradación del parásito, en donde los pacientes más inflamatorios son aquellos que tienen parásitos no deteriorados; en este análisis los polimorfismos están en equilibrio de H-W y en las frecuencias alélicas no existe diferencia estadística significativa ($P>0.05$). En la tabla 11 cuando se analizan por el modelo de regresión logística condicional tampoco existió diferencia estadística significativa en la asociación al riesgo con las variantes en estudio, además las covariables sexo o edad no tuvieron significancia estadística ($p>0.05$).

En la tabla 12 se muestra el equilibrio de H-W para la variable epilepsia en donde se observa desequilibrio de H-W en el rs17611 ($p=0.0127$), mientras que en la frecuencias alélicas hay una diferencia estadística significativa en el rs3761847 ($p=0.0222$). Con respecto a las frecuencias para los otros polimorfismos no existió diferencia estadística significativa ($P>0.05$). En el análisis de regresión logística (tabla 13) para esta variable no hubo diferencias estadísticas significativas en ningún polimorfismo para la asociación al fenotipo.

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con NC con parásitos deteriorados y no deteriorados y equilibrio de Hardy-Weinberg

	N	Frecuencia genotípica, n (%)				HWE	Alelo menor	MAF	Frecuencia alélica, n (%)		p
		C/C	C/T	T/T	N/N				C	T	
rs17611											
No deterio	93	23(24.7)	41(44.0)	29(31.1)	0	0.1206	T	0.438	87(46.8)	99(53.2)	0.275
Deterior	79	16(20.5)	32(40.5)	31(39.2)	5				64(40.5)	94(59.5)	
rs25681											
No deterio	95	28(29.4)	52(54.7)	15(15.7)	0	0.378	A	0.417	108(56.8)	82(43.2)	0.516
Deterior	81	29(35.8)	40(49.3)	12(14.8)	2				98(60.5)	64(39.5)	
rs992670											
No deterio	94	35(37.2)	46(48.9)	13(13.8)	1	0.6498	G	0.379	116(61.7)	72(38.3)	1.00
Deterior	82	31(37.8)	40(48.7)	11(13.41)	4				102(62.2)	62(37.8)	
rs10818488											
No deterio	92	9(9.7)	47(51.0)	36(39.1)	3	0.277	A	0.341	65(35.5)	119(64.7)	0.568
Deterior	79	7(8.8)	37(46.8)	35(44.3)	4				51(32.3)	107(67.7)	
rs3761847											
No deterio	95	42(44.2)	41(43.16)	12(12.6)	0	0.6498	G	0.336	125(65.8)	65(34.2)	0.820
Deterior	80	37(46.25)	34(42.5)	9(11.2)	3				108(67.5)	52(32.5)	

P^a: es la probabilidad de que la desviación del equilibrio H-W pueda explicarse por casualidad con un test exacto de H-W. p^b: es el valor de asociación de alelos dado por el estadístico de Chi-cuadrada. MAF: frecuencia del alelo menor.

Tabla 11. Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación a la degradación del parásito en pacientes con NCC

SNP	Deteriorado N (%)	No Deteriorado N (%)	OR(95% CI)	P
C5 rs 17611(C>T)				
TT	31(39.24)	29(31.18)	1 (referencia)	
CT	32(40.51)	41(44.09)	1.446 (0.644-3.247)	0.372
CC	16(20.25)	23(24.73)	2.444(0.942-6.342)	0.660
C5 rs25681 (A>G)				
AA	29(35.80)	28(29.47)	1(referencia)	
AG	40(49.38)	52(54.74)	1.377(0.694-2.962)	0.425
GG	12(14.81)	15(15.79)	2.09(0.787-6.287)	0.182
C5 rs992670 (A>G)				
AA	31(37.80)	35(37.23)	1 (referencia)	
AG	40(48.78)	46(48.94)	1.158(0.545-2.458)	0.703
GG	11(13.41)	13(13.83)	1.729(0.574-5.207)	0.331
TRAF1 rs10818488 (G>A)				
GG	35(44.30)	36(39.13)	1(referencia)	
AG	37(46.84)	47(51.09)	1.373(0.643-2.931)	0.413
A	7(8.86)	9(9.78)	1.542(0.432-5.502)	0.504
TRAF1 rs3761847 (A>G)				
AA	37(46.25)	42(44.21)	1(referencia)	
AG	34(42.50)	41(43.16)	1.018(0.478-2.172)	0.962
GG	9(11.25)	12(12.63)	1.549(0.488-4.916)	0.458

Análisis por modelo de regresión logística condicional, ajustado por edad y sexo

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas de pacientes con epilepsia y equilibrio de Hardy-Weinberg

	N	Frecuencia genotípica, n (%)				HWE	Alelo menor	MAF	Frecuencia alélica, n (%)		
		C/C	C/T	T/T	N/N	p			C	T	p
rs17611											
sin epilepsia	99	28(28.28)	35(35.35)	36(36.36)	2	0.0127	C	0.352	91(45.95)	107(54.04)	0.9511
epilepsia	82	19(23.19)	37(45.12)	26(31.70)	2				75(45.73)	89(54.26)	
rs25681		A/A	A/G	G/G					A	G	
sin epilepsia	100	35(35)	51(51)	14(14)	1	0.628	G	0.418	121(60.50)	79(39.50)	0.319
epilepsia	84	25(29.76)	43(51.19)	16(19.04)	1				93(55.35)	75(44.64)	
rs992670		A/A	A/G	G/G					A	G	
sin epilepsia	101	43(42.57)	44(43.56)	14(13.86)	1	1	G	0.383	130(64.35)	72(35.64)	0.1601
epilepsia	83	27(32.53)	42(50.60)	14(16.86)	1				96(57.83)	70(42.16)	
rs10818488		A/A	A/G	G/G					A	G	
sin epilepsia	97	9(9.27)	43(44.32)	45(46.39)	4	0.611	A	0.352	61(31.44)	133(68.55)	0.1059
epilepsia	82	11(13.41)	43(52.43)	28(34.14)	3				65(39.63)	99(60.36)	
rs3761847		A/A	A/G	G/G					A	G	
sin epilepsia	98	51(52.04)	36(36.73)	11(11.22)	3	0.4206	G	0.349	138(70.40)	58(29.59)	0.022
Epilepsia	84	29(34.52)	41(48.80)	14(16.66)	5				99(58.92)	69(41.07)	

p^a: es la probabilidad de que la desviación del equilibrio H-W pueda explicarse por casualidad con un test exacto de H-W. p^b: es el valor de asociación de alelos dado por el estadístico de Chi-cuadrada. MAF: frecuencia del alelo menor.

Tabla 13. Análisis de polimorfismos de región TRAF1/C5 y su asociación a la presentación de epilepsia en pacientes con NC

SNP	Sin epilepsia N (%)	Epilepsia N (%)	OR(95% CI)	P
C5 rs17611(T>C) DUDA				
TT	36(36.36)	26(31.70)	1(referencia)	
CT	35(35.35)	37(45.12)	1.322(0.590-2.959)	0.498
CC	28(28.28)	19(23.17)	0.274(0.022-3.493)	0.319
C5 rs25681 (A>G)				
AA	35(38.04)	25(27.17)	1(referencia)	
AG	43(46.73)	51(55.43)	1.306(0.521-3.272)	0.569
GG	14(15.21)	16(17.39)	1.074(0.452-2.550)	0.871
C5 rs992670 (A>G)				
AA	43(42.57)	27(32.53)	1(referencia)	
AG	44(43.56)	42(50.60)	1.314(0.528-3.268)	0.557
GG	14(13.86)	14(16.86)	0.910(0.374-2.218)	0.836
TRAF1 rs10818488 (G>A)				
GG	45(46.39)	28(34.14)	1(referencia)	
AG	43(44.32)	43(52.43)	0.531(0.184-1.535)	0.243
AA	9(9.27)	11(13.41)	0.629(0.323-1.227)	0.174
TRAF1 rs3761847 (A>G)				
AA	51(52.04)	29(34.52)	1(referencia)	
AG	36(36.73)	41(48.80)	2.258(0.849-6.00)	0.103
GG	11(11.22)	14(16.66)	1.186(0.456-3.08)	0.727

Análisis por modelo de regresión logística condicional, ajustado por edad y sexo

7.4 Análisis de haplotipos de SNP en C5 y TRAF1

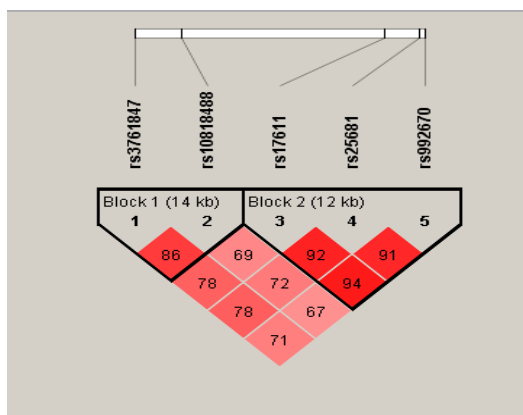
Con el software Haploview se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento (LD) de los tres polimorfismos en C5 y los dos de TRAF1 de acuerdo a cada una de las variables de respuesta estudiadas: localización, número de parásitos, celularidad, estadio y epilepsia. También se utilizó el software SNPAnalizer que permitió a través de una aproximación bayesiana generar modelos de herencia para haplotipos infiriendo que cada individuo tiene dos haplotipos para la región determinada, el materno y paterno. Se encontró la formación de dos bloques, uno entre los polimorfismos de C5 y otro entre TRAF1 con un alto valor de desequilibrio de ligamiento (LD), entre ellos no hubo un valor de LD significativo.

En el análisis de Haplotipos para la variable localización (Grafica 1, A), se observa la formación de dos bloques con valores significativos de LD ($r^2 > 0.8$), se destaca que en el bloque 2(C5) el valor del LD es muy alto ($r^2 = 94$), en comparación con el bloque 1(TRAF1) ($r^2 = 86$), advirtiéndose que este grupo de polimorfismos son heredados en conjunto. En el gráfico 1 (B) se observa la frecuencia de los haplotipos por bloque, siendo el haplotipo más frecuente TAA(0.505) para C5 y AG(0.608) para TRAF1 los cuales se toman como haplotipo de referencia por tener la frecuencia más alta, cuando se analizó la significancia de los haplotipos con la prueba de Chi-cuadrada, la combinación CAA del bloque 2(C5) es estadísticamente significativo ($P = 0.04$) en comparación con las otras combinaciones, indicando que este haplotipo puede tener asociación al fenotipo de localización del parásito. Esto es coincidente cuando se compara con el análisis de los haplotipos bajo el modelo de herencia aditivo y dominante en C5 (figura 5) en donde el haplotipo CAA muestra asociación significativa. Para TRAF1 (figura 7 y 8) no hubo algún haplotipo que demostrara asociación en los análisis de haplotipos bajo algún modelo de herencia aunque el haplotipo AG mostró una tendencia de asociación en el modelo dominante ($p = 0.06$). Sin embargo se realizó un estudio que tomara como covariables al sexo y la edad de los pacientes, a través de un análisis de regresión logística condicional que se muestra en la tabla 14; en donde se observa que de acuerdo a los haplotipos formados por los SNPs en C5, el haplotipo CGA tiene un significancia estadística ($P = 0.04$) lo que lo permite asociar al riesgo de localización extraparenquimatosa, otro

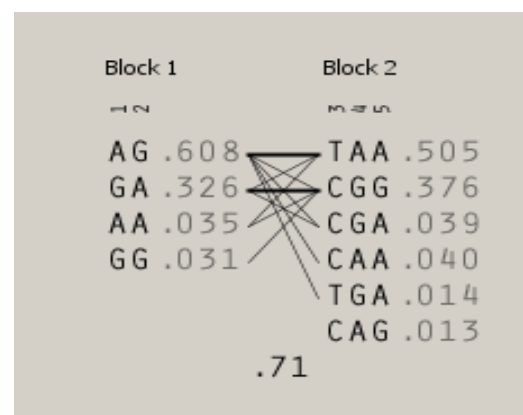
haplotipo con una tendencia a la significancia fue CAA ($p=0.054$). En esta misma tabla se observa que los haplotipos en TRAF1 no tienen significancia estadística por tanto no es atribuible algún tipo de asociación para el fenotipo en este estudio y es concordante con los otros análisis realizados.

Grafica 1. Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NC con parenquimatosa y extraparenquimatosa

A)



B)

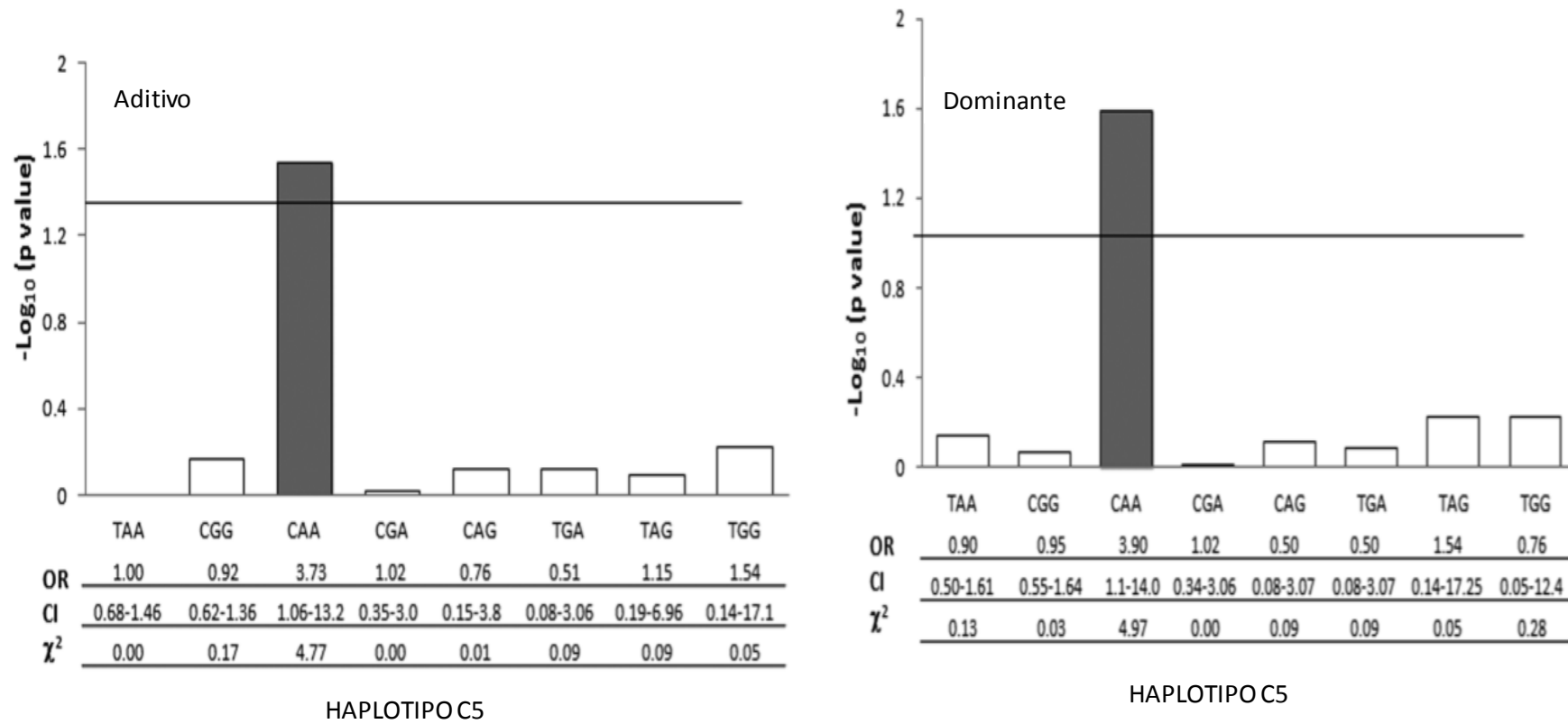


C)

	Chi cuadrada	<i>P</i>
Block 1		
AG	3.517	0.0607
GA	2.487	0.1148
AA	0.004	0.9515
GG	1.170	0.2794
Block 2		
TAA	0.011	0.918
CGG	0.85	0.3565
CAA	4.184	0.0408
CGA	0.28	0.5966
TGA	0.178	0.6735
CAG	0.355	0.5515

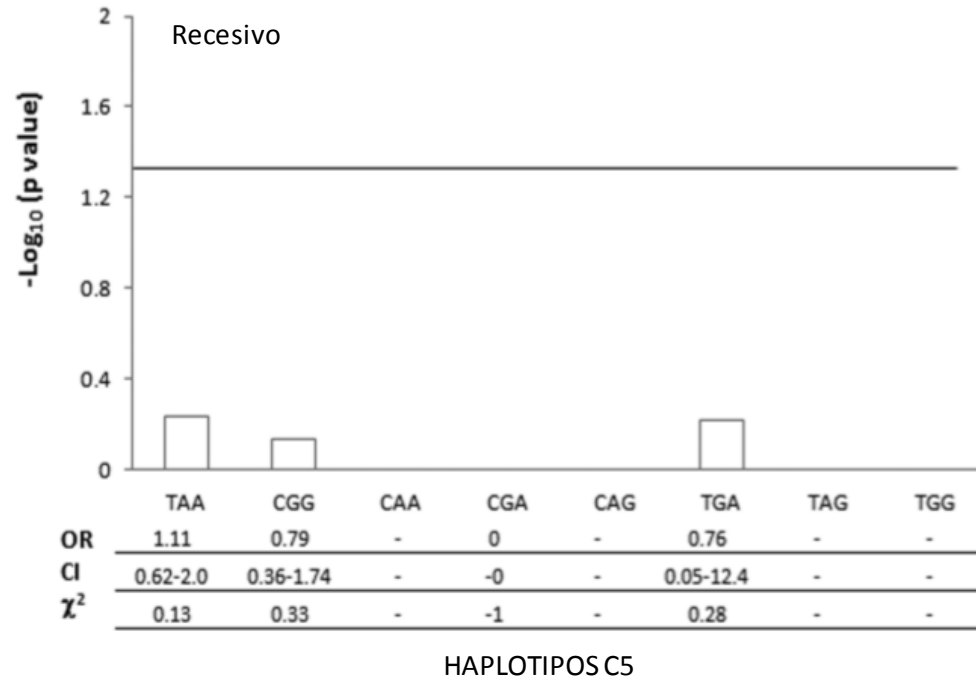
A) Los rombos del bloque representan el desequilibrio de ligamiento entre SNP, los valores de r^2 se informan dentro de los recuadros; el diamante más oscuro corresponde a un fuerte nivel de desequilibrio y rosa débil bajo nivel. B) muestra los haplotipos formados, su frecuencia y la comparación interbloques, C) nivel de significancia estadística de los haplotipos formados por el software Haploview con la prueba de chi-cuadrada por bloque ($P < 0.05$ significativo).

Figura 5. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 en la variable localización del parásito



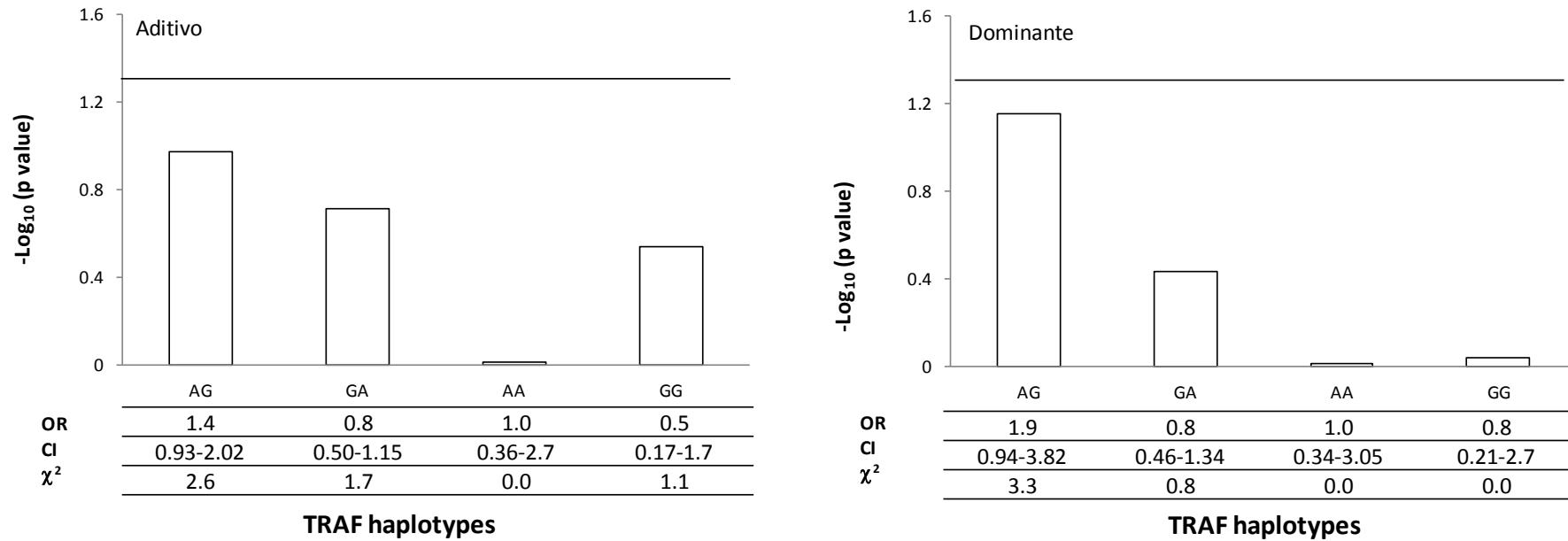
La barra horizontal muestra el nivel de significancia. $-\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

Figura 6. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 en la variable localización del parásito



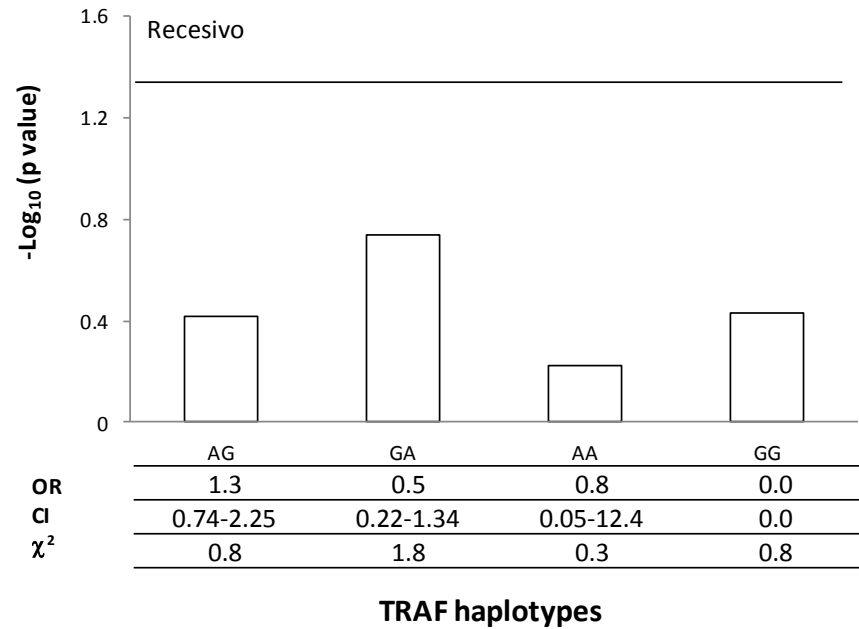
La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

Figura 7. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 en la variable localización del parásito



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. $-\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

Figura 8. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 en la variable localización del parásito



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. $-\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

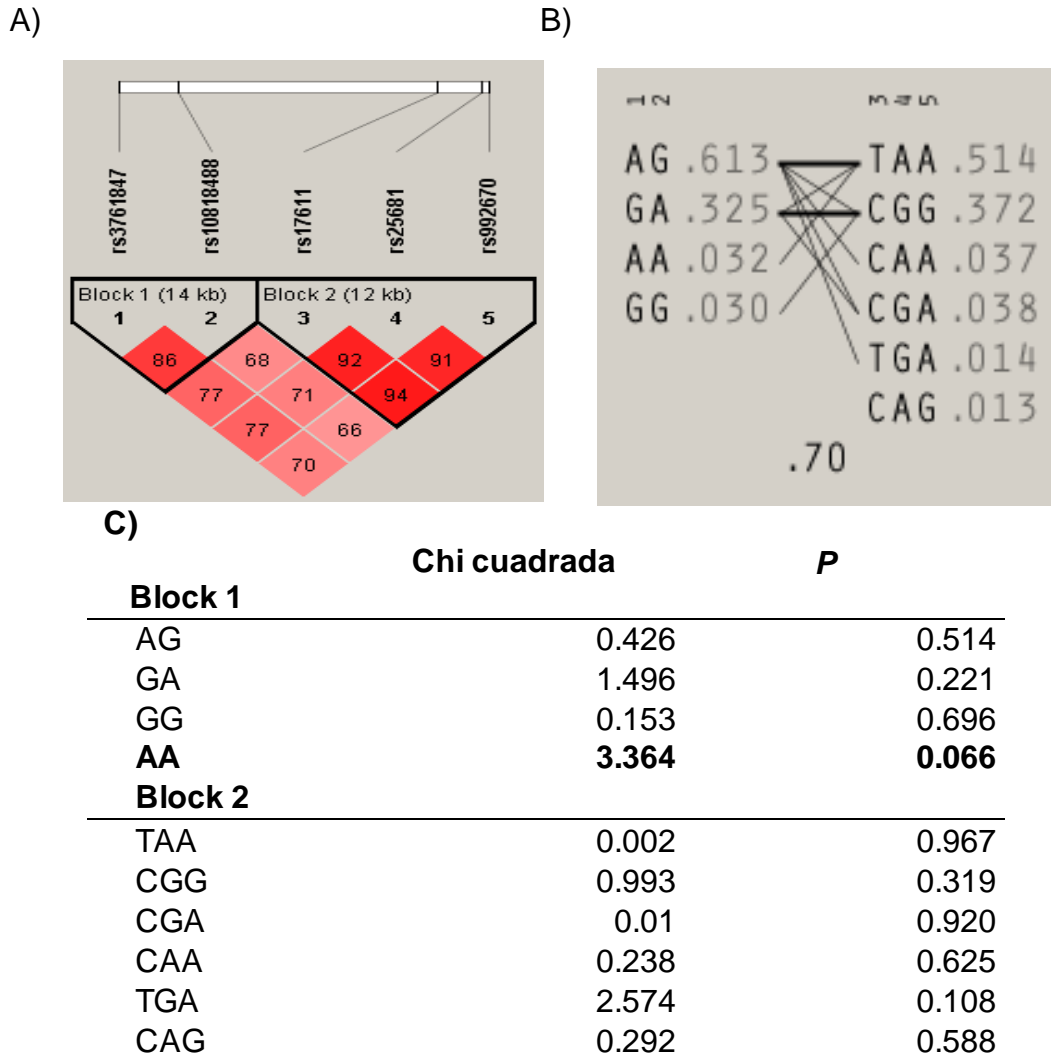
Tabla 14. Análisis de regresión logística para la determinación del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo a la localización en pacientes con NC

Haplotipos	Par N (%)	Extrapar N (%)	R(95% IC)	<i>P</i>
C5 (rs17611-rs25685-rs992670)				
TAA	430(50.3)	297(50.8)	1(Referencia)	
CGG	306(35.7)	234(40.1)	1.163(0.876-1.543)	0.296
CAA	49(5.7)	10(1.8)	1.541(0.993-2.392)	0.054
CGA	38(4.4)	20(3.4)	1.530(1.005-2.329)	0.047
TGA	14(1.7)	7(1.2)	0.936(.586-1.496)	0.782
CAG	9(1)	10(1.7)	1.280(0.824-1.988)	0.273
TRAF1(rs3761847-rs10818488)				
AG	275(64.7)	161(55.8)	1(referencia)	
GA	125(29.5)	106(36.7)	1.209(0.818-1.786)	0.830
AA	15(3.5)	10(3.4)	1.272(0.818-1.786)	0.341
GG	8(2.3)	12(4.1)	1.095(0.643-1.867)	0.684

Análisis de regresión logística condicional. $P < 0.05$ significativo

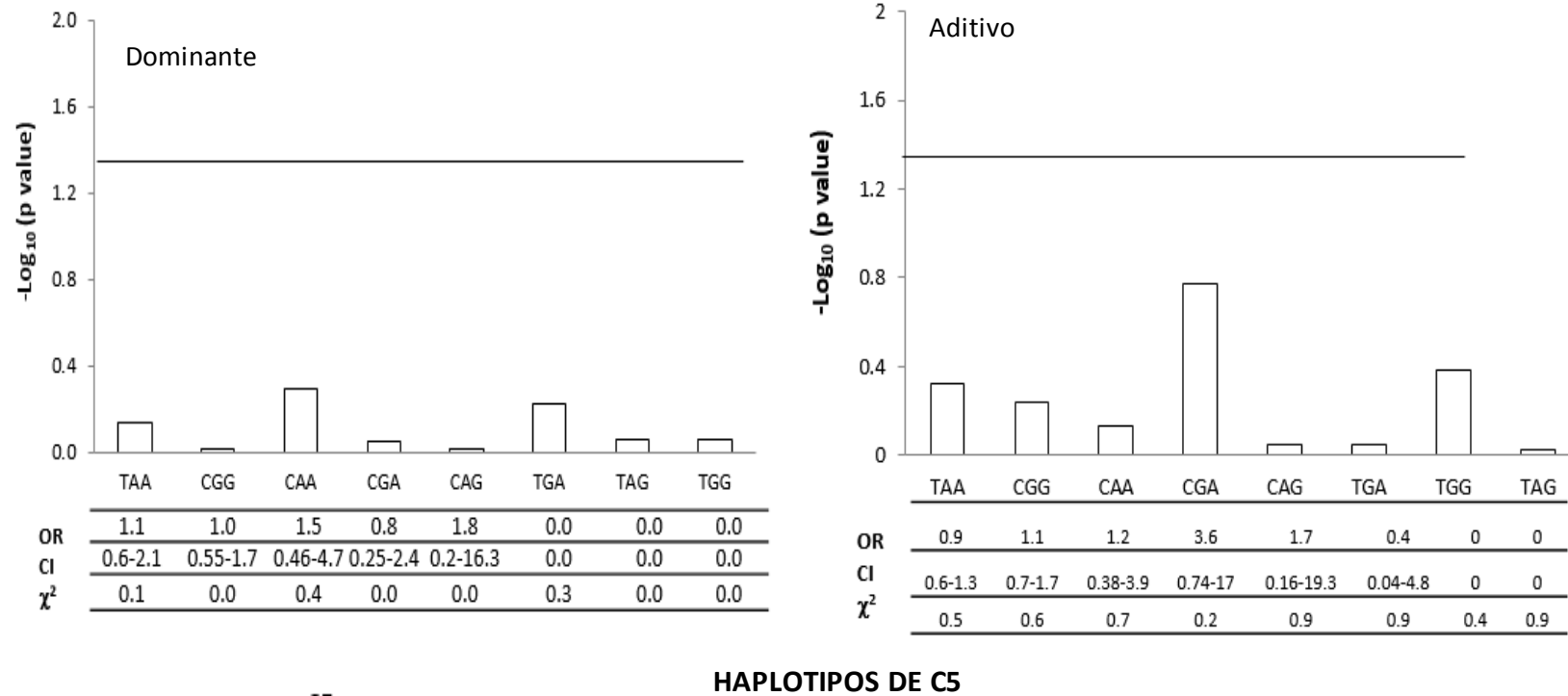
El análisis de haplotipos para la variable de número de parásitos (Grafica 2 A y B) mostró la formación de 2 bloques con un valor de desequilibrio de ligamiento (LD) significativo, bloque 1 ($r^2=86$) y bloque dos ($r^2=94$), el haplotipos más frecuente en el bloque 1 (TRAF1) fue AG(0.613) y en el bloque 2 TAA(0.514), cuando se analizó la significancia de la asociación de cada haplotipo con la prueba de Chi-cuadrada (figura 2 C), se observó que la combinación AA en el bloque 1 (TRAF1) tiene una tendencia a la significancia estadística ($p=0.066$) y de los haplotipos formados en C5 ninguno se encontró asociado ($p > 0.05$). Pero cuando se analizaron los haplotipos de acuerdo al modelo de herencia (figura 9, 10, 11 y 12) no se evidencia asociación alguna tanto de los haplotipos en C5 como en TRAF1 ($p > 0.05$).

Grafica 2. Gráfico de Haplotipos y disequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NC con un solo parásito o múltiples parásitos



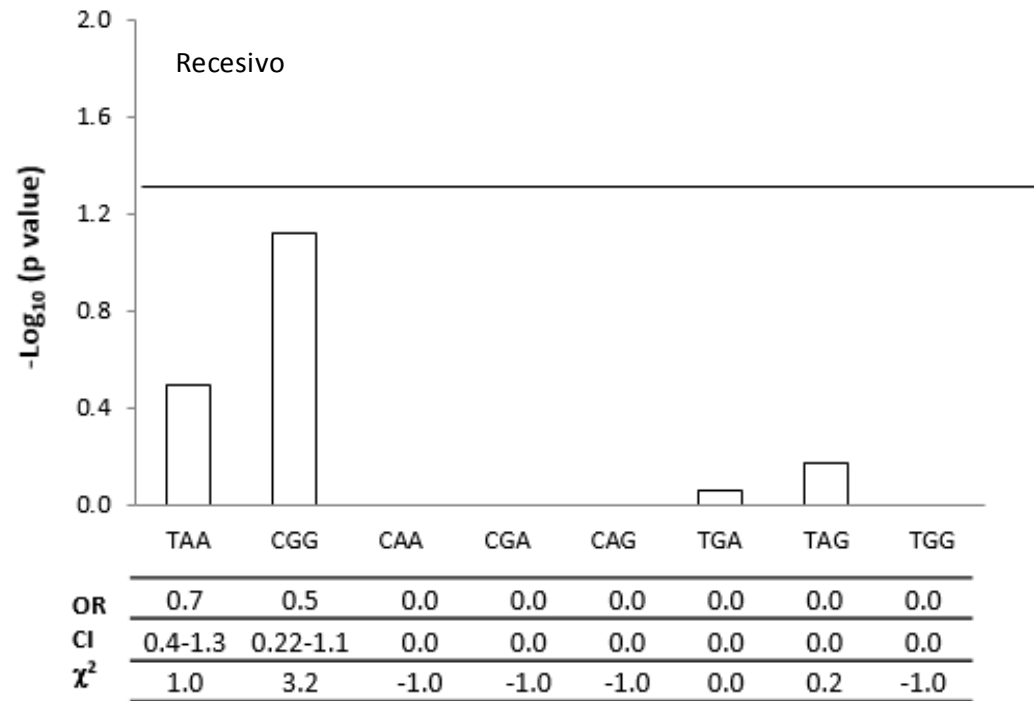
A) Los rombos del bloque representan el disequilibrio de ligamiento entre SNP, los valores de r^2 se informan dentro de los recuadros; el diamante más oscuro corresponde a un fuerte nivel de disequilibrio y rosa débil bajo nivel. B) muestra los haplotipos formados, su frecuencia y la comparación interbloques, C) nivel de significancia estadística de los haplotipos formados por el software Haploview con testado con la prueba de Chi cuadrado por bloque ($P < 0.05$ significativo).

Figura 9. Análisis por modelo de herencia dominante y aditivo de los haplotipos de C5 con la variable número de parásitos



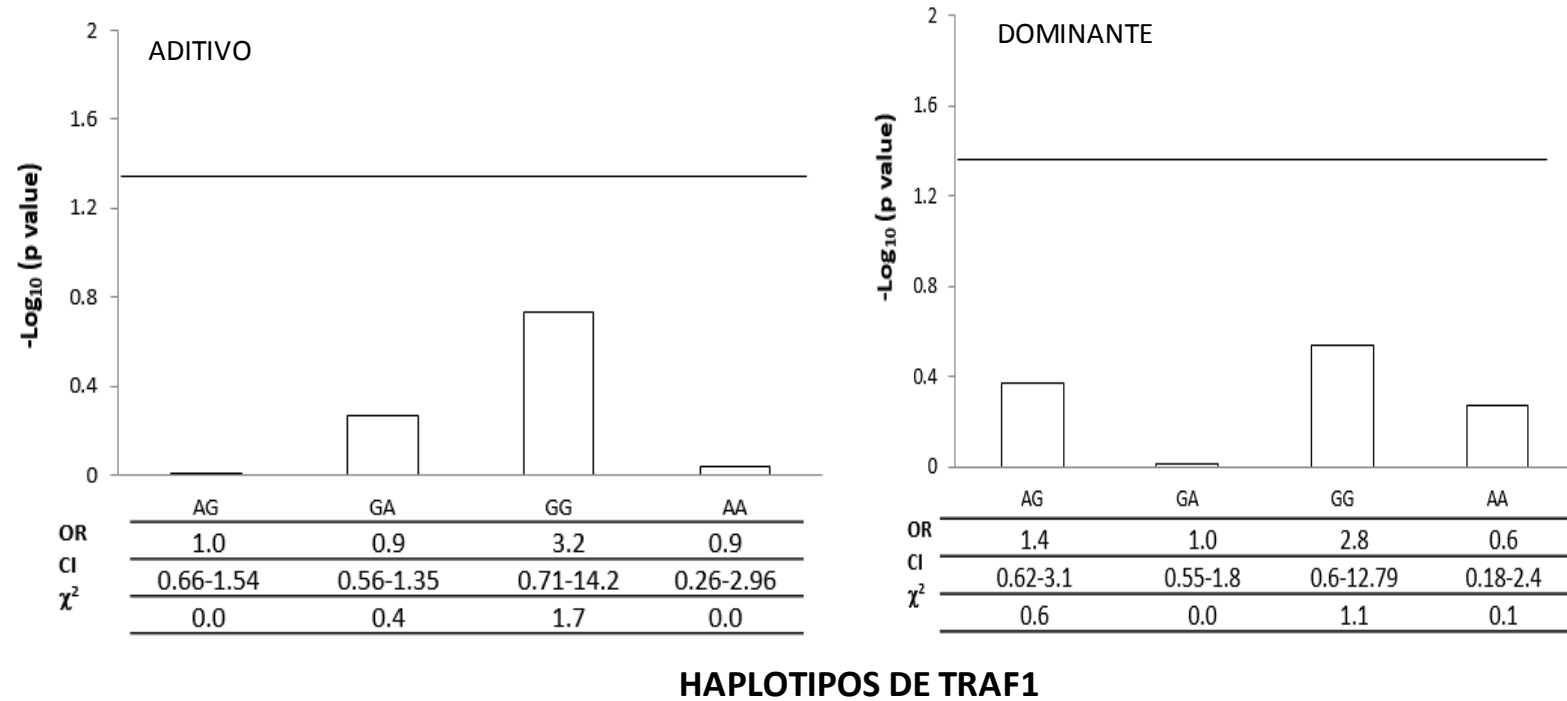
La barra horizontal muestra el nivel de significancia. - Log₁₀ (P), es significativo. |

Figura 10. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable número de parásitos.



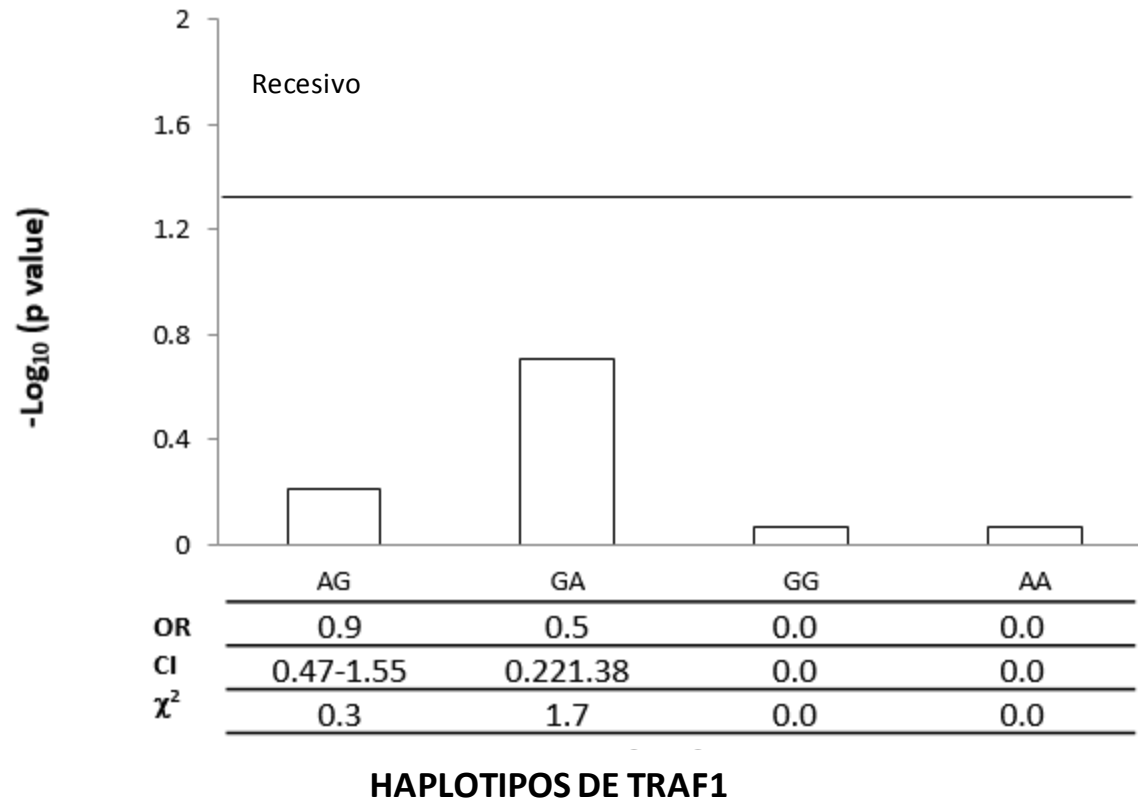
HAPLOTIPOS DE C5

Figura 11. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable número de parásitos



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. $-\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

Figura 12. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable número de parásitos



La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

En el análisis de regresión logística de los haplotipos (tabla 15), existe tendencia a la significancia estadística del haplotipo CGA en C5 ($p=0.054$, OR= 1.654, IC 0.990-2.763) y de igual forma el haplotipo CAG, En las haplotipos de TRAF1 no se encontró significancia estadística ($p >0.05$).

Tabla 15. Análisis de regresión logística para la determinación del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo al número de parásitos en pacientes con NCC.

Haplotipos	Múltiple N (%)	Único N (%)	OR(95% IC)	P
C5 (rs17611-rs25685-rs992670)				
TAA	534(51.4)	222(51.1)	Referencia)	
CGG	370(35.6)	176(40.5)	842(0.625-1.135)	0.259
CGA	39(3.8)	17(4.0)	654(0.990-2.763)	0.054
TGA	20(2)	1(0.2)	443(0.823-2.532)	0.201
CAG	16(1.5)	3(0.8)	654(0.990-2.763)	0.054
CAA	41(4)	13(3)	247(0.776-2.004)	0.363
TRAF1(rs3761847-rs10818488)				
AG	297(57.5)	125(58.9)	1(referencia)	
GA	138(26.8)	78(36.5)	0.771(0.509-1.167)	0.219
AA	47(9.1)	2(0.9)	1.105(0.605-1.878)	0.074
GG	34(6.6)	8(3.7)	1.105(0.650-1.878)	0.713

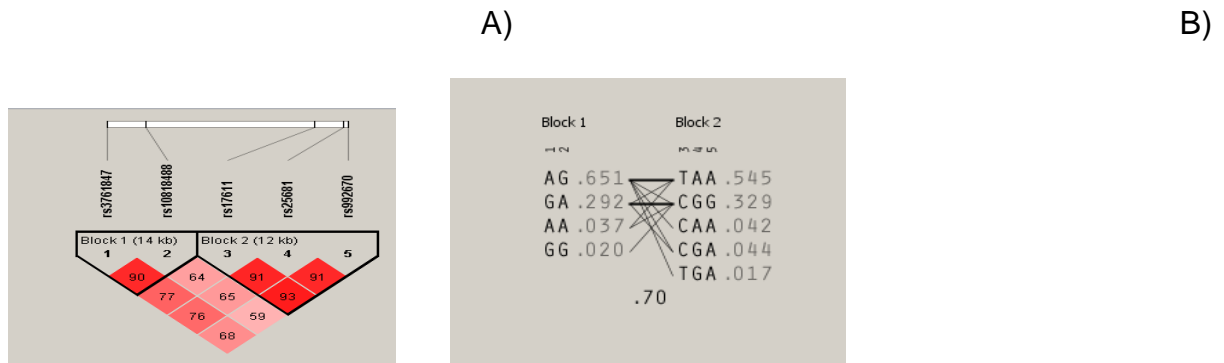
Regresión logística condicional; p value (<0.05) significativo

Para la variable celularidad en LCR, la gráfica 3 A y B muestra la formación de dos bloques con un valor de desequilibrio de ligamiento (LD) $r^2 >.8$ siendo el bloque 2(C5) el de mayor valor ($r^2=94$), el haplotipo de mayor frecuencia en este bloque es TAA(0.545) mientras que en lo bloque1 el de mayor fue frecuencia fue el haplotipo AG(0.641) el análisis para determinar la significancia de la asociación de estos haplotipos por el estadístico de Chi-cuadrada (Grafica 3, C) mostro a TGA en el bloque 2 con diferencia estadística significativa ($p=0.008$) lo cual puede ser asociado al riesgo de padecer mayor celularidad en LCR en pacientes con NCC con este análisis, pero esta tendencia no se observó cuando se realizó el análisis de haplotipos por modelos de herencia (figuras 13,14,15, y 16) en donde se observa

que bajo el modelo de herencia aditivo los haplotipos CAA y TGA en C5 tienen significancia estadística ($p < 0.05$) y en el modelo dominante CAA también muestra significancia estadística en el análisis de la variable, por tanto esto confirma la asociación de este loci con la variable celularidad bajo estos tipos de herencia. Para TRAF1 en el modelo recesivo y aditivo (figura 15 y 16) el haplotipo AG mostró significancia estadística mientras que el haplotipo GA mostro significancia en el modelo dominante y aditivo.

En el análisis de regresión logística de haplotipos para la variable celularidad (Tabla 19), se encontró que en C5 existe un haplotipo con una tendencia a la asociación (CGG, $p=0.064$), mientras que en los haplotipos formados en TRAF1, dos (GA $p=0.002$, GG $p=0.022$) tiene una clara asociación al fenotipo de celularidad alta. Este análisis es concordante en el haplotipo GA con el análisis bajo modelos de herencia de haplotipos.

Grafica 3. Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NC con alta y baja celularidad.

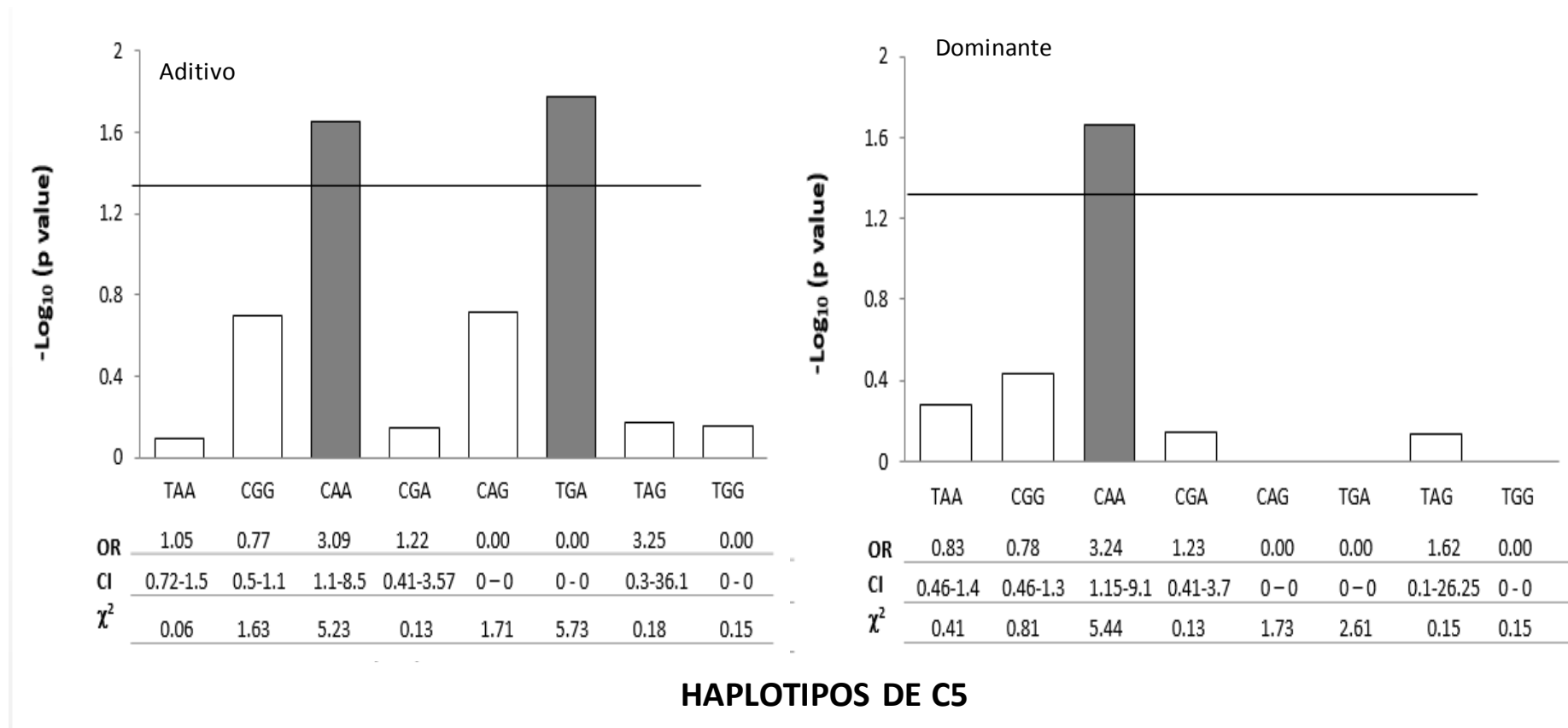


C)

Block 1	Chi cuadrada	P
AG	2.196	0.1384
GA	1.808	0.1787
AA	0.26	0.6103
GG	1.508	0.2195
Block 2		
TAA	0.144	0.7044
CGG	1.078	0.2992
CAA	2.923	0.0873
CGA	0.502	0.4786
TGA	6.989	0.0082
CAG	2.314	0.1282

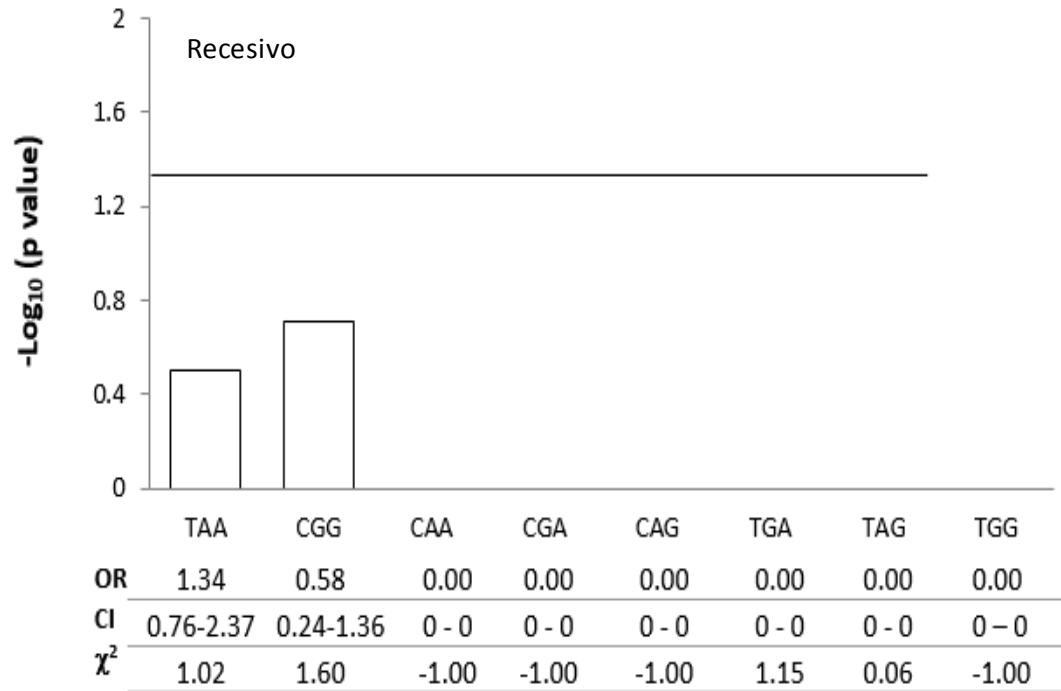
A) Los rombos del bloque representan el desequilibrio de ligamiento entre SNP, los valores de r^2 se informan dentro de los recuadros; el diamante más oscuro corresponde a un fuerte nivel de desequilibrio y rosa débil bajo nivel. B) muestra los haplotipos formados, su frecuencia y la comparación interbloques, C) nivel de significancia estadística de los haplotipos formados por el software Haploview con la prueba de Chi cuadrado por bloque ($P < 0.05$ significativo).

Figura 13. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 con la variable celularidad.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. - Log₁₀ (P), es significativo.

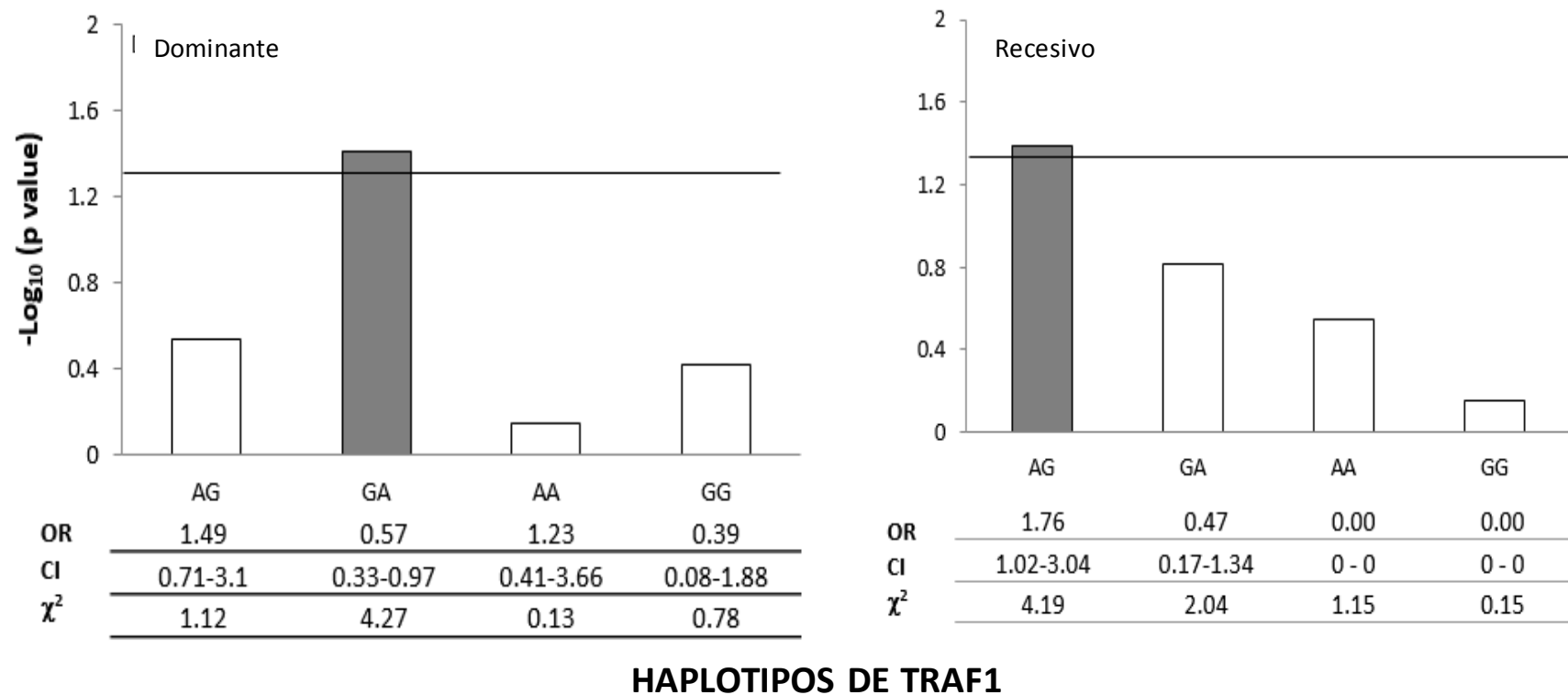
Figura 14. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable celularidad.



HAPLOTIPOS DE C5

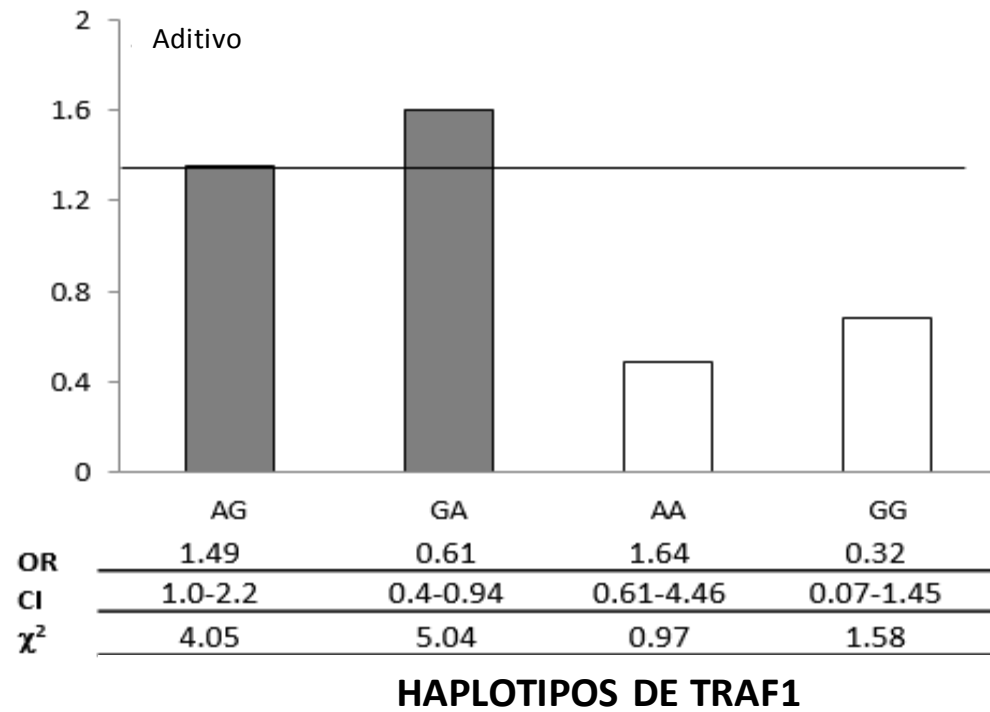
La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

Figura 15. Análisis por modelo de herencia recesivo y dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable celularidad.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. - $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

Figura 16. Análisis por modelo de herencia aditivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable celularidad.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

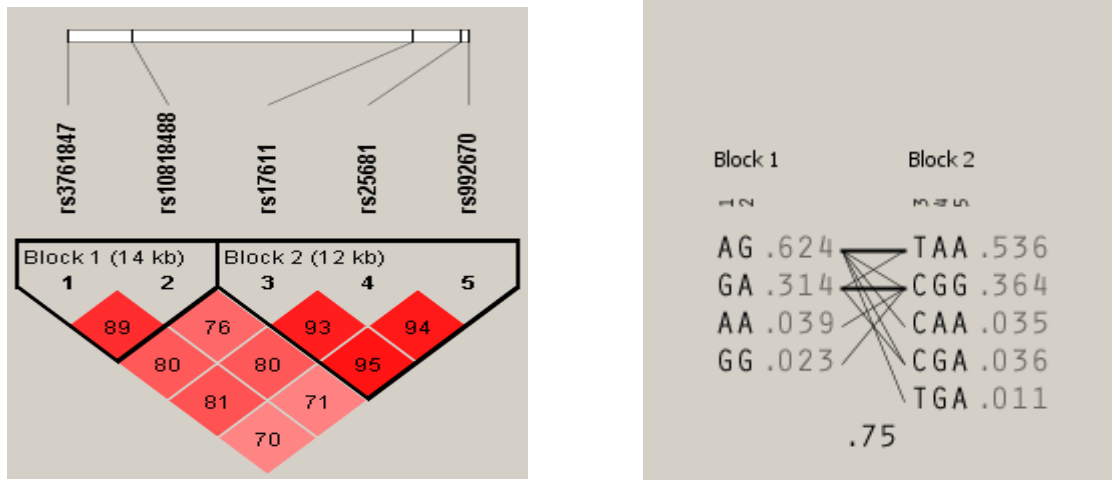
Tabla 16. Análisis de regresión del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF/C5 de acuerdo a la celularidad en pacientes con NCC

Haplotipos	Alta cel N (%)	Baja cel N (%)	OR(95% IC)	P
C5 (rs17611-rs25685-rs992670)				
TAA	202(68.1)	278(60.9)	1(Referencia)	
CGG	189(31.5)	328(36.5)	0.762(0.572-1.016)	0.064
CAA	38(6.4)	25(2.8)	0.914(0.598-1.396)	0.677
CGA	28(4.6)	28(3.2)	1.045(0.697-1.566)	0.832
TGA	20(3.4)	1(0.1)	0.907(0.563-1.461)	0.688
CAG	1(1.2)	16(1.8)	0.859(0.554-1.331)	0.495
TRAF1(rs3761847-rs10818488)				
AG	202(68.1)	278(60.9)	1(referencia)	
GA	78(26.2)	148(32.4)	0.525(0.347-0.796)	0.002
AA	13(4.3)	15(3.3)	0.835(.0527-1.332)	0.442
GG	4(1.4)	16(3.4)	0.556(0.339-0.912)	0.020

Regresión logística condicional; p value (<0.05) significativo

La grafica 4, A y B muestran la formación de haplotipos de acuerdo a la variable deterioro del parásito, en donde se forman 2 bloques con LD alto. El bloque 2(C5) con un alto LD (0.95), en donde TAA (0.536) es el haplotipo más frecuente dentro de la muestra poblacional. En el análisis de asociación con el estadístico de chi-cuadrada (grafica 4 C) no se encontró diferencia estadística significativa de ninguno de los haplotipos para la variable. En el análisis de haplotipos por modelos de herencia (figura 17, 18, 19 y 20) no se encontró bajo ningún modelo que C5 o TRAF1 tuvieran significancia estadística. Esto último no es concordante al compararlo con el análisis de regresión logística en donde (tabla 17) se encontraron dos haplotipos en C5 (CGG y CGA; p= 0.001 y 0.01, respectivamente) altamente significativos, con base en la OR y el IC 95% estos pueden ser asociados hacia una protección posiblemente conferida por esta presentación genética. Por otro lado los haplotipos de TRAF1 analizados no tuvieron diferencia estadística (p>0.05).

Grafica 4. Gráfico de Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC con parásitos deteriorados o no deteriorados



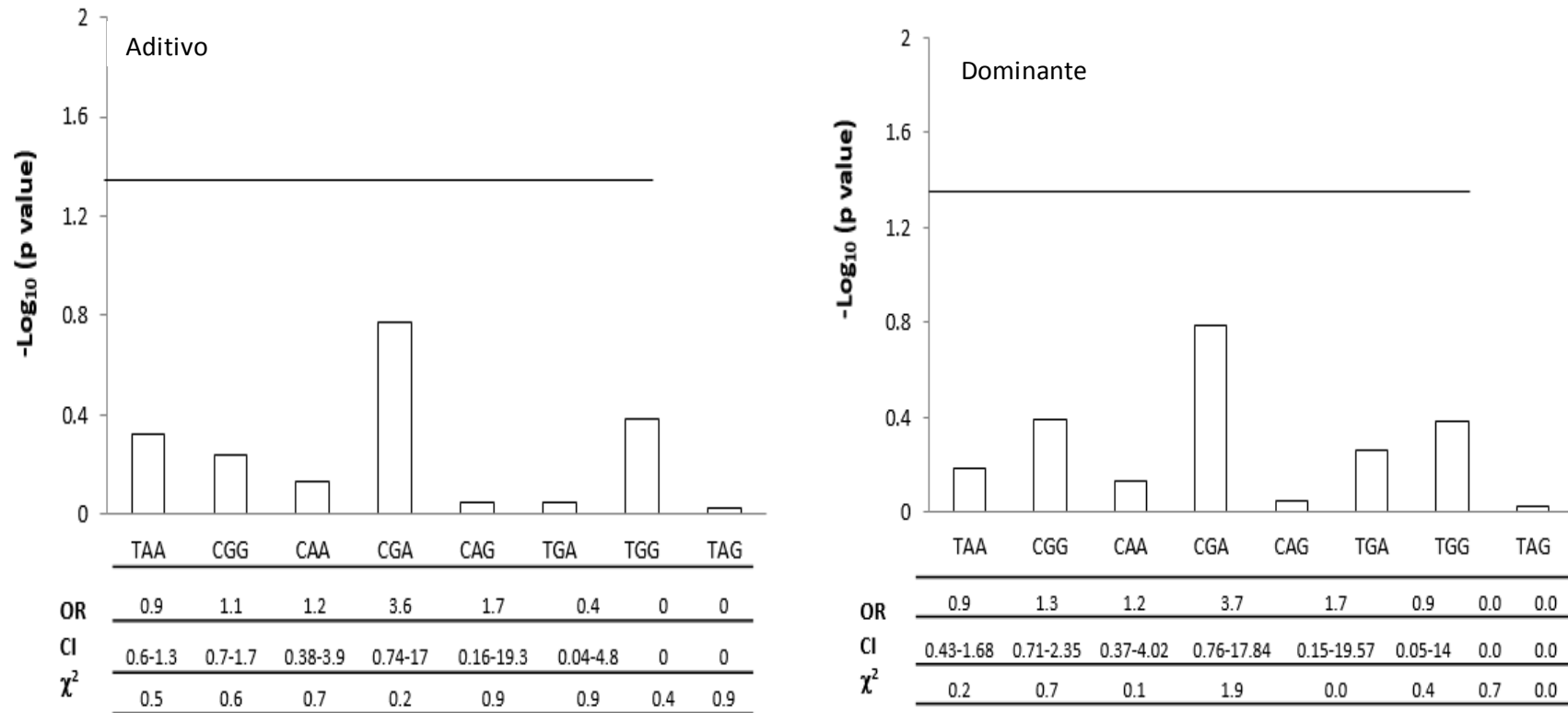
A).....B)

C)

Block 1	Chi cuadrada	<i>P</i>
AG	0.037	0.847
GA	0.404	0.525
AA	0.004	0.95
GG	1.632	0.201
Block 2		
TAA	0.75	0.386
CGG	0.101	0.7508
CGA	2.82	0.0931
CAA	0.073	0.7864
TGA	0.307	0.579

A) Los rombos del bloque representan el desequilibrio de ligamiento entre SNP, los valores de r^2 se informan dentro de los recuadros; el diamante más oscuro corresponde a un fuerte nivel de desequilibrio y rosa débil bajo nivel. B) muestra los haplotipos formados, su frecuencia y la comparación interbloques, C) nivel de significancia estadística de los haplotipos formados por el software Haploview con la prueba de Chi-cuadrado por bloque ($p < 0.05$ significativo).

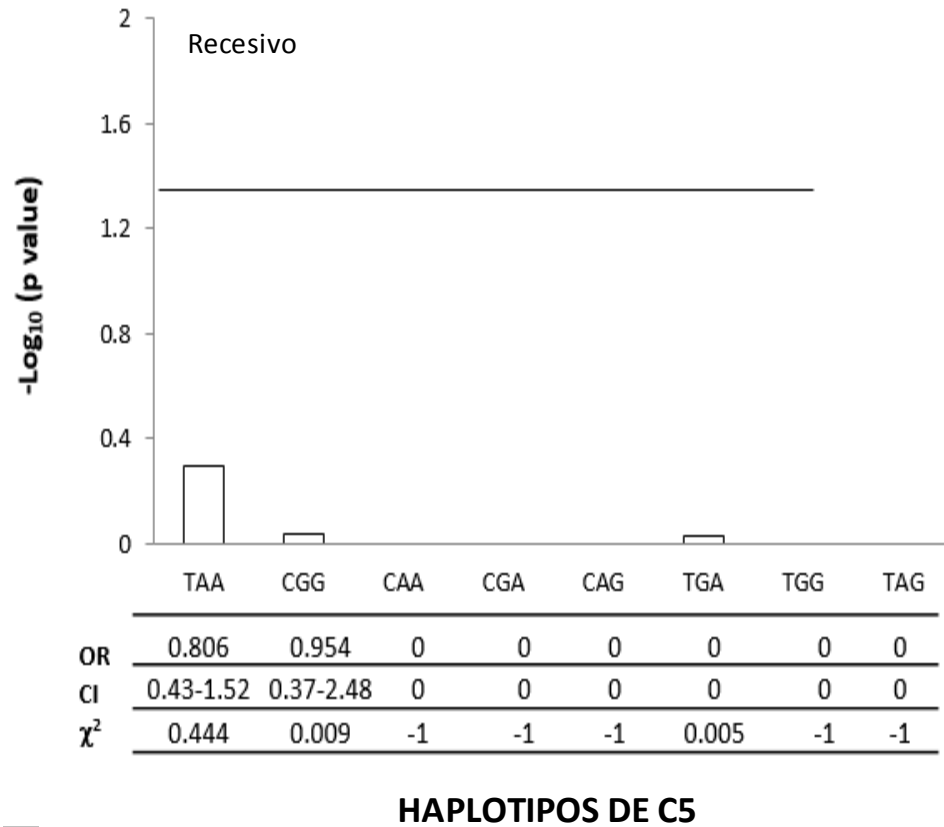
Figura 17. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 con la variable deterioro del parásito.



HAPLOTIPOS DE C5

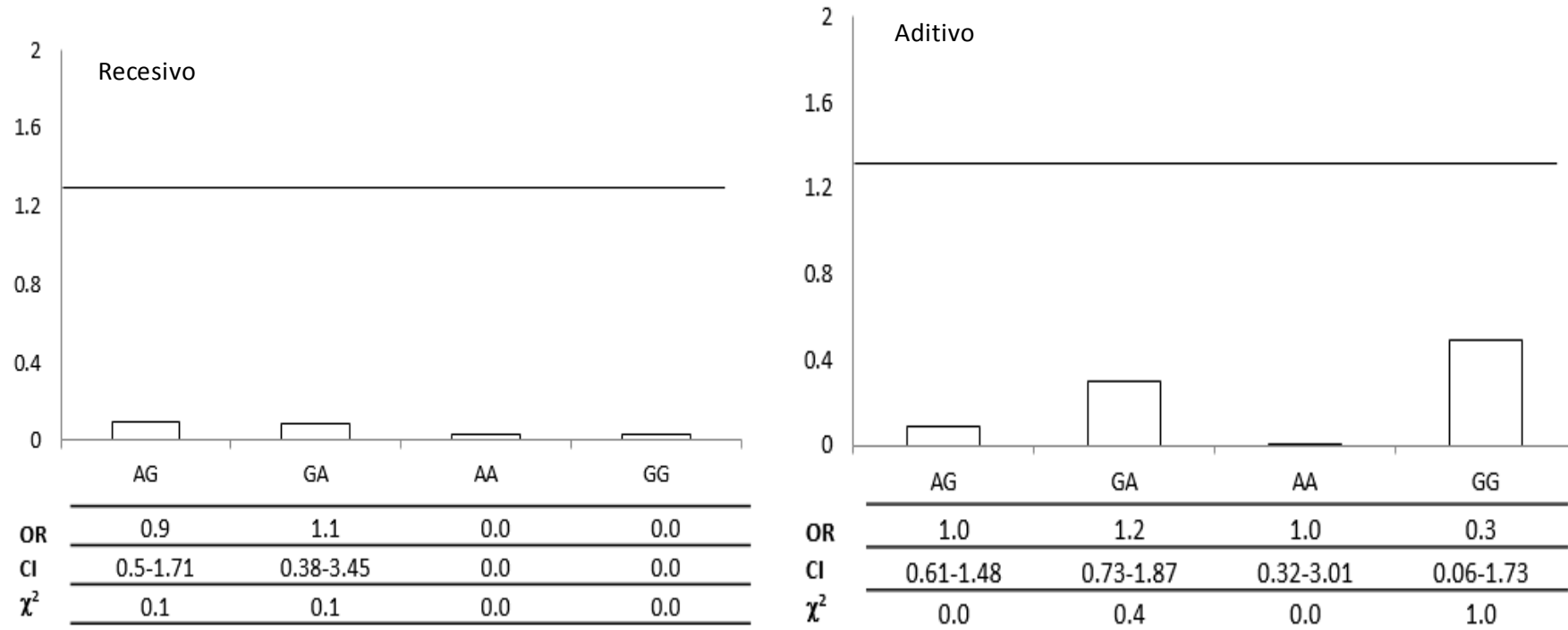
La barra horizontal muestra el nivel de significancia. $-\text{Log}_{10}(P)$, es significativo.

Figura 18. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable deterioro del parásito.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. - Log₁₀ (P), es significativo

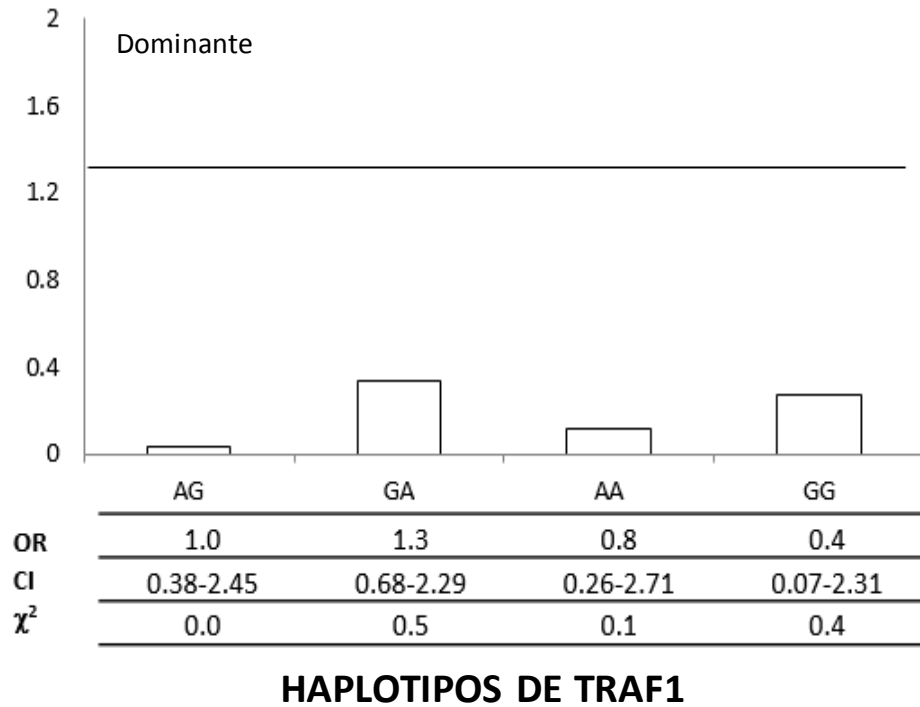
Figura 19. Análisis por modelo de herencia aditivo y recesivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable deterioro del parásito.



HAPLOTIPOS DE TRAF1

La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

Figura 20. Análisis por modelo de herencia dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable deterioro del parásito.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

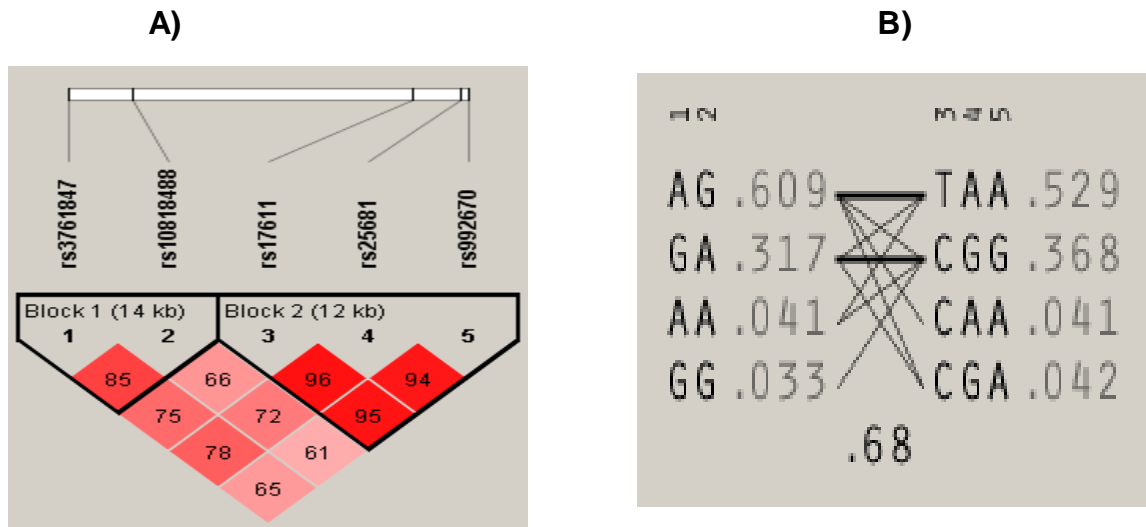
Tabla 17. Análisis de regresión del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF1/C5 de acuerdo al deterioro del parásito en pacientes con NCC.

Haplotipos	No deterior N (%)	Deteriorado N (%)	OR(95% IC)	P
C5 (rs17611-rs25685-rs992670)				
TAA	368(56.1)	243(51.5)	1(Referencia)	
CGG	233(35.5)	175(37.1)	0.550(0.391-0.775)	0.001
CAA	21(3.2)	17(3.7)	0.656(0.402-1.070)	0.091
CAG	13(2.0)	8(1.7)	0.661(0.402-1.070)	0.106
CGA	12(1.8)	25(5.2)	0.537(0.334-0.861)	0.010
TGA	9(1.4)	4(0.8)	1.091(0.644-1.849)	0.745
TRAF1(rs3761847-rs10818488)				
AG	205(63)	144(62)	1(referencia)	
GA	96(29.7)	77(32.9)	1.230(0.772-1.958)	0.384
AA	13(3.9)	9(3.8)	1.185(0.701-2.003)	0.527
GG	11(3.4)	3(1.3)	0.864(0.501-1.491)	0.600

Regresión logística condicional; p <0.05 significativo

La gráfica 5, A y B muestra la formación de haplotipos de acuerdo a la variable epilepsia, en donde se forman 2 bloques con LD alto. El bloque 2(C5) con un alto LD (0.95), en donde TAA (0.529) es el haplotipo más frecuente dentro de la muestra poblacional, en el bloque 1 el LD fue de 0.85 y el haplotipo más frecuente es AG (0.609). En el análisis de asociación con el estadístico de chi-cuadrada (grafica 5 C) se encontró diferencia estadística significativa en C5 del haplotipo CAA (p=0.0127) y en el haplotipo AG (p= 0.0127) de TRAF1. Esto resultó concordante con el análisis de acuerdo al modelo de herencia de haplotipos en donde, para C5 el haplotipo significativo fue CAA bajo el modelo aditivo y dominante, mientras que en TRAF1 AG fue significativo bajo el modelo aditivo y dominante. Cuando se observa la tabla 18 el análisis mostró que para C5 no hay significancia estadística, mientras que para TRAF1 el haplotipo AA y GG si mostraron significancia estadística en asociación con la variable epilepsia.

Gráfica 5. Haplotipos y desequilibrio de ligamiento de polimorfismos en región TRAF1/C5 en pacientes con NCC sin epilepsia y con epilepsia.

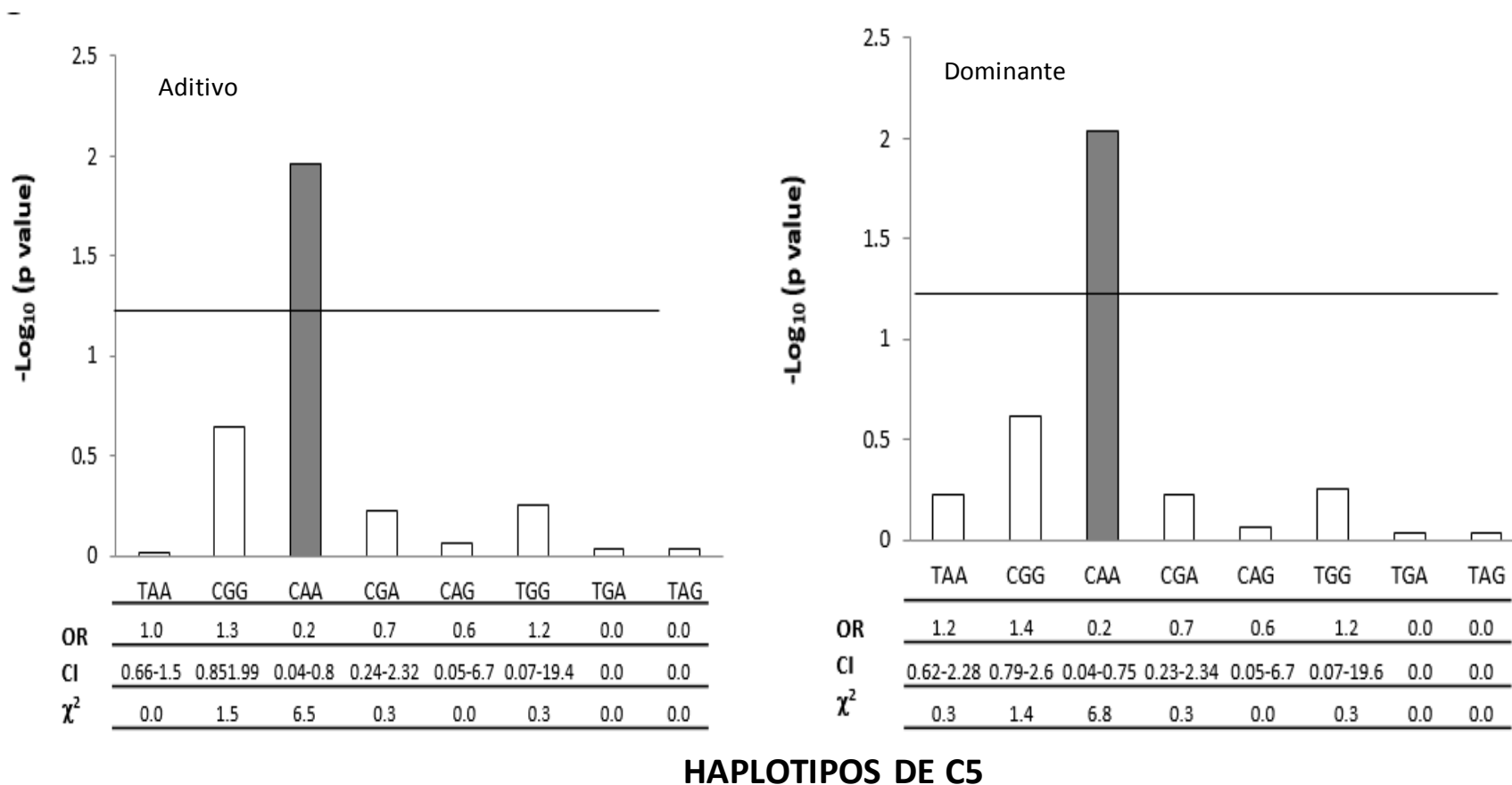


C)

Block 1	Chi cuadrada	P
AG	4.29	0.0383
GA	3.376	0.0661
AA	0.072	0.7877
GG	1.364	0.2429
Block 2		
TAA	0.00	0.9877
CGG	2.204	0.1377
CGA	0.837	0.3603
CAA	6.215	0.0127

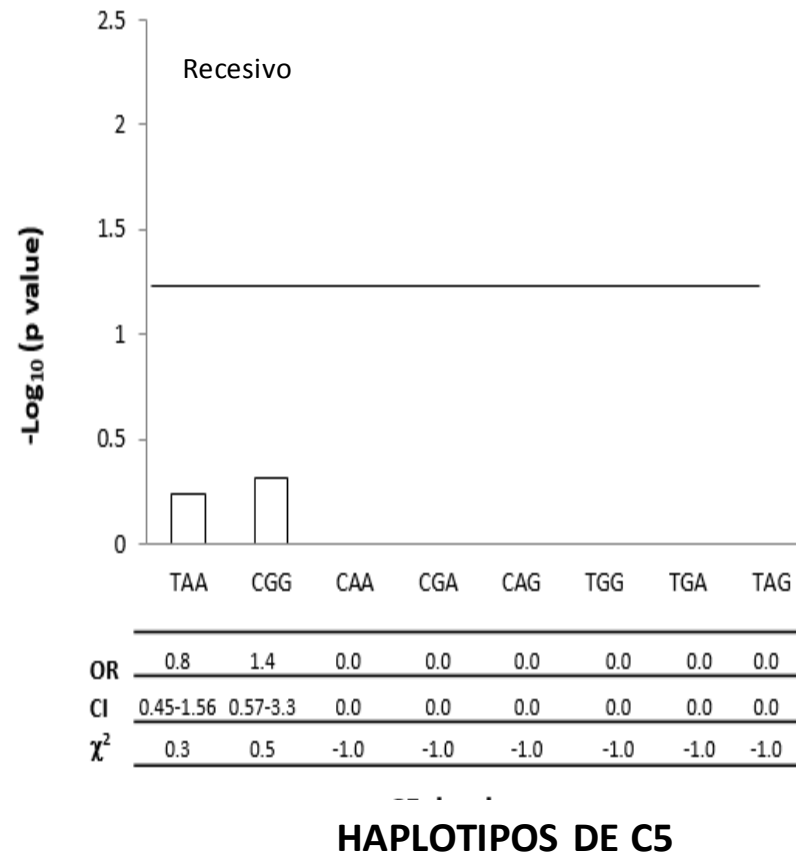
a) Los rombos del bloque representan el desequilibrio de ligamiento entre SNP, los valores de D' se informan dentro de los recuadros; el diamante más oscuro corresponde a un fuerte nivel de desequilibrio y rosa débil bajo nivel. B) muestra los haplotipos formados, su frecuencia y la comparación interbloques, C) nivel de significancia estadística de los haplotipos formados por el software Haploview con la prueba de Chi cuadrado por bloque ($P < 0.05$ significativo).

Figura 21. Análisis por modelo de herencia aditivo y dominante de los haplotipos de C5 con la variable epilepsia.



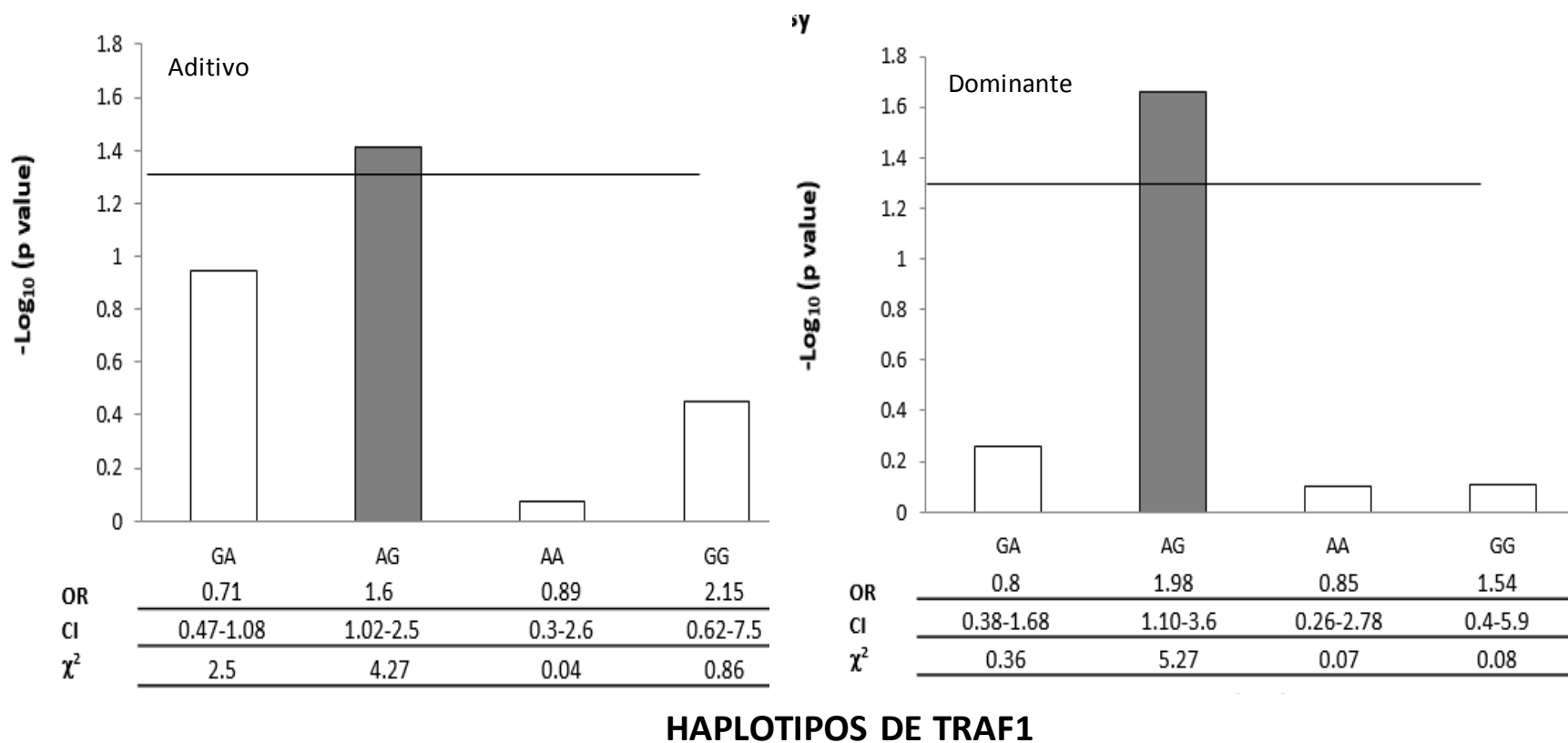
La barra horizontal muestra el nivel de significancia. - $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

Figura 22. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de C5 con la variable epilepsia.



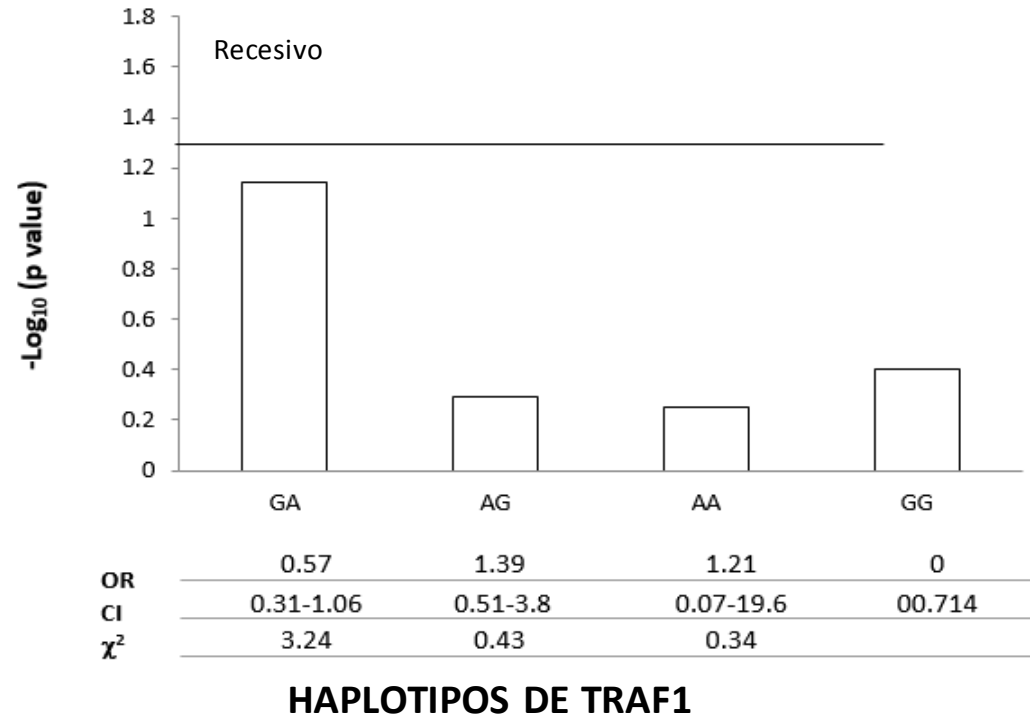
La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

Figura 23. Análisis por modelo de herencia dominante de los haplotipos de TRAF1 con la variable epilepsia.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia. $-\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

Figura 24. Análisis por modelo de herencia recesivo de los haplotipos de TRAF1 con la variable epilepsia.



La barra horizontal muestra el nivel de significancia.- $\text{Log}_{10}(P)$, es significativo

Tabla 18. Análisis de regresión del riesgo e intervalo de confianza de los haplotipos formados por los SNPs de la región TRAF1/C5 en pacientes con NCC con epilepsia y sin epilepsia.

Haplotipos	Epilepsia N (%)	No epilepsia N (%)	OR(95% CI)	P
C5 (rs17611-rs25685-rs992670)				
TAA	54(52.8)	45(52.9)	1	
CGG	42(40.8)	28(33.3)	2.195(0.190-25.298)	0.529
CGA	4(3.1)	4(5.0)	4.970(0.363-67.998)	0.230
CAA	2(1.3)	5(6.4)	0.973(0.074-12.878)	0.983
TRAF1(rs3761847-rs10818488)				
AG	56(55.2)	56(65.7)	1	
GA	37(36.6)	23(27.6)	1.189(0.652-2.168)	0.573
AA	4(3.8)	4(4.3)	5.372(2.204-13.097)	0.001
GG	5(4.5)	2(2.3)	1.687(1.042-2.729)	0.033

Regresión logística condicional; p value (<0.05) significativo

8 DISCUSION

La neurocisticercosis es la enfermedad causada por el establecimiento de larvas de *T. solium* en el sistema nervioso central. Dentro de las características de esta enfermedad es que no todos los pacientes expuestos se infectan, esto señala la participación de factores ambientales, inmunológicos y genéticos (Sciutto et al., 2013). Cuando un paciente adulto tiene una presentación grave existe una respuesta neuroinflamatoria muy intensa, que depende de varios factores como el número de parásitos, su localización, el estado degenerativo del parásito y posiblemente de la presencia o no de epilepsia. La intensidad y la extensión de la inflamación que provoca la presencia del parásito en el tejido nervioso es un punto crucial en la heterogeneidad en esta enfermedad, (Fleury et al., 2004) además de factores genéticos del huésped, que agrega una variante de gran interés en el estudio de esta enfermedad. El componente genético en NCC ya ha sido estudiado por algunos grupos. Entre los estudios figuran aquellos que se han enfocado en evaluar el papel del MHC en la presencia de sintomatología por la infección (Del Brutto et al., 1991), otros en polimorfismos de TLR-4, MMP-9 y su asociación a la inflamación perilesional

en el desarrollo de convulsiones (Lachuriya et al., 2016), polimorfismos en ICAM-1 con el desarrollo de NCC sintomática (A. Singh et al., 2014) y algunos otros estudios epidemiológicos, que señalan que en regiones de la población mestiza-mexicana el fondo genético es un factor que influye en la resistencia a la infección (Fleury et al., 2006).

En este estudio evaluamos la asociación de cinco polimorfismos en la región TRAF1/C5 con variables de mayor inflamación en pacientes con NCC, bajo la premisa que la región génica del gen C5 en un estudio de Ramírez-Aquino et al., (2011) se encontró ligada a la restricción a la infección por *T. crassiceps* en un modelo murino de cisticercosis (Ramirez-Aquino et al., 2011), señalándolo como un gen candidato o región candidata. Para ampliar la exploración se seleccionó la región contigua a C5, TRAF1 que se ha señalado como partícipe en fenómenos inflamatorios. Algunos estudios la señalan como una región denominándola TRAF1/C5 por la cercanía y por la probable influencia regulatoria que tiene la región intergénica en la regulación de C5 (Messemaeker et al., 2016). En este estudio no existió desequilibrio de ligamiento entre C5 y TRAF1 estadísticamente significativo ($DL < 74 D'$), resultado que coincide con el encontrado por Kurreman y cols, (2007) quienes reportaron un DL de 75 para estos genes (Kurreman et al., 2007) lo que puede permitir analizar estos genes por separado. TRAF1 y C5 son genes que generan componentes ligados a la respuesta innata. C5 es una proteína que participa en la cascada de activación del complemento que se escinde y produce una potente anafilotoxina (C5a) que potencia la respuesta inflamatoria (Merle, Church, et al., 2015; Merle, Noe, Halbwachs-Mecarelli, Fremeaux-Bacchi, & Roumenina, 2015). La proteína codificada por el gen TRAF1 pertenece a las proteínas de la familia de receptores de TNF; las proteínas TRAF median la señalización para la transducción de varios receptores de TNF. TRAF1 forma un complejo heterodimérico con TRAF2 que se requiere para la activación del TNF- α y las vías de señalización MAPK8/JNK y NF κ -B. El complejo formado por TRAF1 y TRAF2 también interactúa como inhibidor de proteínas pro-apoptóticas mediando señales anti-apoptóticas de los receptores de TNF (Lu et al., 2013; Wang et al., 1998).

En la exploración encontramos que los polimorfismos rs17611, rs992670 (en C5) y rs3761847 (TRAF1) están en desequilibrio de H-W, el primero de ellos para la

variable de localización, número, y celularidad, y los otros dos solo en la variable número de parásitos. Las razones para que un polimorfismo no cumpla el equilibrio pueden ser varias y atribuibles a distintas causas como un tamaño de muestra pequeño, estratificación de la población, fallas en el genotipado por falta de experiencia en las técnicas o bien puede existir una selección positiva de ciertos alelos especialmente considerando que ésta es una muestra dentro de una población de sujetos enfermos, este equilibrio describe como se comporta la variación en ausencia de fuerzas evolutivas, es una especie de modelo nulo como si no operara ningún proceso evolutivo (Eguiarte L. E., 2013; Hosking et al., 2004; *Statistical Human Genetics*, 2012). Cuando se analizaron los polimorfismos de manera individual se encontró solo una tendencia a la asociación del rs17611 (C5) con la celularidad y del rs376184 (TRAF1) con el número y la celularidad. El SNP rs17611 es un polimorfismo ampliamente estudiado en relación a enfermedades inflamatorias, Giles et al. (2015), estudiaron la variante en relación al aumento de C5a plasmático circulante en pacientes con artritis reumatoide, su hallazgo más relevante fue que el polimorfismo aumenta la cantidad de la anafilotoxina, sugiriendo que genera mayor escisión de C5 a C5a (Giles, Choy, van den Berg, Morgan, & Harris, 2015). Otros estudios implican la sobreexpresión de C5a en modelos experimentales de enfermedades inflamatorias como osteoartritis, lupus eritematoso, enfermedad obstructiva pulmonar, psoriasis o gingivitis entre algunas (H. Lee et al., 2008; Monk et al., 2007). Aunque no encontramos asociación a nivel individual de cada uno de estos SNPs, sí se encontró asociación en los haplotipos. Los haplotipos son la combinación de diferentes marcadores a lo largo de determinada región en el mismo cromosoma que se heredan como una unidad, cada haplotipo es una combinación de alelos mayores y menores y en cada individuo está representado dos veces para explicar las contribuciones maternas y paternas, también la asignación de haplotipos es poderosa por que proporciona información sobre la recombinación, que es el intercambio físico de ADN durante la meiosis (Crawford & Nickerson, 2005). Podemos observar que en los diferentes análisis realizados hay concordancia con los haplotipos mientras que en otros no, esto es debatible pero explicable por los algoritmos usados, mientras que los enfoques bayesianos realizan una mejor parsimonia y algoritmos de máxima verosimilitud (Stephens, Smith, & Donnelly, 2001), el análisis de regresión logística

modela la probabilidad en función de otros factores que en este caso fueron la edad y el sexo de los pacientes, por ello la variación en algunos de los resultados.

En el análisis de los haplotipos de C5, el haplotipo CAA bajo un modelo aditivo y dominante se encontró asociado a la localización del parásito, también el haplotipo CAA bajo un modelo aditivo y dominante en la variable celularidad mostro significancia, y en la variable deterioro del parásito el haplotipo CGA en modelo aditivo y dominante es significativo, estos resultados aunado a la relevancia de C5 en la cisticercosis murina (Ramírez-Aquino et al., 2013) hace suponer que los polimorfismos individuales de C5 sí están involucrados en el éxito de la infección más que en el estadio clínico o radiológico de pacientes con NCC, la participación de C5 en la inmunidad innata contra *T. taeniformis* apoya esta posibilidad (Davis & Hammerberg, 1990). También Kassis y Tanner (Kassis & Tanner, 1977) en un modelo murino encontraron que los protoescolex son susceptibles a la acción del complemento y podría esperarse que el número de larvas que sobreviven al ambiente rico en complemento dependa del ambiente peritoneal del hospedero. Si bien los polimorfismos individuales no se encontraron asociados a las características clínicas radiológicas de los pacientes, sí se encontró que el haplotipo CAA mostró incrementar el riesgo alrededor de 3 veces en la celularidad y casi 4 veces en la localización del parásito. Para la variable epilepsia también se encontró asociación del haplotipo CAA bajo un modelo aditivo y dominante en C5. Estos resultados al haplotipo CAA como un rasgo genético que predispone al paciente a desarrollar un cuadro más severo de NCC.

Los polimorfismos de TRAF1 aquí estudiados tampoco se asociaron de manera individual a alguna de las variables, el rs376184 tendió a la asociación con la variable celularidad y número de parásitos. Abdul-Sater y col. (2016) estudiaron el efecto de la mutación rs3761847 en TRAF1 sobre la inflamación en células provenientes de pacientes sin AR y en un modelo murino inflamatorio, sus hallazgos muestran que la disminución de TRAF1 aumenta la producción de citocinas pro inflamatorias, y concluyeron que aunque el SNP tiene un efecto pequeño en las cantidades de producción de la proteína TRAF1, esto podría tener un efecto sustancial en el resultado de la enfermedad cuando hay un periodo prolongado con muchos ciclos de

inflamación. Otro resultado relevante de este estudio es que encontraron que TRAF1 ejerce una regulación negativa sobre la señalización en receptores tipo toll, que proporcionó una explicación funcional al aumento de la inflamación que se observa para el polimorfismo asociado a la enfermedad; también se observó en un modelo murino que en los macrófagos de ratón *Traf1*^{-/-} se potencia la sepsis inducida por LPS y destacan que en ratones de la misma camada heterocigotos (*Traf1* +/-) hay un fenotipo intermedio, lo que indicó que una diferencia doble en la expresión de TRAF1 permite marcar el efecto del resultado del choque séptico inducido por LPS, lo que podría explicar algunos de los hallazgos de nuestro estudio, pues se encontró asociación con la variable celularidad del haplotipo AG, bajo modelos de herencia aditivo y recesivo (OR=1.76 y 1.76) y del haplotipo GA en un modelo aditivo y dominante (OR=0.61 y 0.57). Otras asociaciones de este loci fueron los haplotipos CGA en un modelo aditivo y dominante de la variable deterioro del parásito.

La región intergénica en donde se encuentra el rs10118488 puede tener gran relevancia pues Kurreman y cols. (2007) en un estudio multinivel de casos y controles en población europea con AR y con un enfoque de gen candidato, encontraron asociación significativa ($p < 0.05$) de SNP's ubicados en un bloque de haplotipos en el extremo 3' de C5 y TRAF1 y un pico de asociación de una región intergénica situada aproximadamente a 10 kb tanto de C5 como de TRAF1, este pico es definido por el SNP rs10818488. Los resultados de este estudio sugieren que existe un estado temprano hiperinflamatorio con bajas cantidades de TRAF1 que en monocitos podría incrementar potencialmente el reclutamiento de células inmunes (Kurreeman *et al.*, 2007). Además la región intergénica que involucra al rs10818488, podría funcionar de alguna otra forma en la regulación de C5 u otros genes inflamatorios ya que se ha descrito un transcrito no codificante (*C5T1/ncRNA*) que inicia en la región 3' no traducida de C5; este transcrito es expresado predominantemente en núcleo y su expresión se correlaciona positivamente con C5mRNA en varios tejidos ($p = 0.001$) y células mononucleares en sangre periférica sugiriendo una co-regulación transcripcional (Messemer *et al.*, 2016). Con esta última perspectiva de la participación de la región intergénica y los antecedentes de estudios previos (Abdul-Sater *et al.*, 2017; Lachuriya *et al.*, 2016) se abre la ventana para la exploración de la regulación entre TRAF1 y otros genes del componente inflamatorio en pacientes con

NCC. Podría ser necesario explorar si se requieren varios haplotipos (varios sitios que actúan en *cis*) en lugar de sitios únicos para producir el fenotipo o impactar el producto genético.

El presente trabajo nos permite comprender mejor los mecanismos genéticos que subyacen a la exacerbación de la inflamación con relación al fondo genético en pacientes con neurocisticercosis. Siendo una certeza que un solo polimorfismo no puede explicar el total del fenómeno inflamatorio, sin embargo la identificación y validación de predictores individuales o poblacionales como los realizados en este estudio en la región TRAF1/C5, puede contribuir a la creación de algoritmos complejos que con ayuda de herramientas bioinformáticas puedan mejorar la predicción para guiar el tratamiento clínico o hacer scores y estratificaciones en relación al riesgo poligénico, en población mestiza mexicana para NCC. Entonces el reto es encontrar variantes en locus que en conjunto mejoren la predicción para la enfermedad.

Es importante que se realicen estudios de todos los SNPs que se han encontrado asociados a la susceptibilidad a la infección y/o evolución de la enfermedad en los mismos sujetos así como en distintas poblaciones étnicas, incluyendo los SNPs en TRAF1/C, HLA-A28, HLA-B63, HLA-B50 (Jain et al., 1999), DQ-W2, HLA-A11 (Del Brutto et al., 1991), TLR-4 (Asp299Gly), (Asp/Gly + Gly/Gly), (Thr/Ile + Ile/Ile) (Verma et al., 2010), sICAM(-1/K469E, -1/E469K) (A. Singh et al., 2014), GSTM1(del) (A. Singh et al., 2017) o de algunos otros que aunque se encontraron asociados en la población de estudio como IL-6(-174C/G), TNF(-238G/A), IFNG(+874T/A), IL2(-330G/T), IL-4(-589 C/T) (Fleury et al., 2018), con el fin de evaluar si la contribución de todos ellos participa en la susceptibilidad a la infección o altera la evolución de la enfermedad.

9 CONCLUSIÓN

Finalmente podemos concluir que la región TRAF1/C5 tiene un aporte en el fenotipo inflamatorio en pacientes con NCC sintomática y la presentación de epilepsia, a través de los haplotipos que se construyeron entre los SNPs de C5 y de los TRAF1.

10 LITERATURA CITADA

- Abdul-Sater, A. A., Edilova, M. I., Clouthier, D. L., Mbanwi, A., Kremmer, E., & Watts, T. H. (2017). The signaling adaptor TRAF1 negatively regulates Toll-like receptor signaling and this underlies its role in rheumatic disease. *Nat Immunol*, *18*(1), 26-35. doi: 10.1038/ni.3618
- Alonso-Trujillo, J., Rivera-Montoya, I., Rodriguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2007). Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res*, *100*(6), 1341-1350. doi: 10.1007/s00436-006-0424-4
- Bradley, J. R., & Pober, J. S. (2001). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*, *20*(44), 6482-6491. doi: 10.1038/sj.onc.1204788
- Braun, M., & Davis, A. E., 3rd. (1998). Cultured human glomerular mesangial cells express the C5a receptor. *Kidney Int*, *54*(5), 1542-1549. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.00155.x
- Burgner, D., Jamieson, S. E., & Blackwell, J. M. (2006). Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis*, *6*(10), 653-663. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70601-6
- Cain, S. A., & Monk, P. N. (2002). The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74). *J Biol Chem*, *277*(9), 7165-7169. doi: 10.1074/jbc.C100714200
- Caratachea, M. A. C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Mexico*, *20*No. 3, 9.
- Carpentier, I., & Beyaert, R. (1999). TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF-kappaB activation. *FEBS Lett*, *460*(2), 246-250.
- Carroll, M. C., & Isenman, D. E. (2012). Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity*, *37*(2), 199-207. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.002
- Crawford, D. C., & Nickerson, D. A. (2005). Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med*, *56*, 303-320. doi: 10.1146/annurev.med.56.082103.104540
- Chakravarti, A. (1999). Population genetics--making sense out of sequence. *Nat Genet*, *21*(1 Suppl), 56-60. doi: 10.1038/4482
- Chapman, S. J., & Hill, A. V. (2012). Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*, *13*(3), 175-188. doi: 10.1038/nrg3114
- Chavarria, A., Fleury, A., Garcia, E., Marquez, C., Fragoso, G., & Sciotto, E. (2005). Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol*, *116*(3), 271-278. doi: 10.1016/j.clim.2005.04.008
- Chavarria, A., Roger, B., Fragoso, G., Tapia, G., Fleury, A., Dumas, M., . . . Sciotto, E. (2003). TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect*, *5*(12), 1109-1115.
- Cheng, T., Sun, X., Wu, J., Wang, M., Eisenberg, R. A., & Chen, Z. (2016). Increased serum levels of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1) correlate with disease activity and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*, *462*, 103-106. doi: 10.1016/j.cca.2016.08.021
- Chung, J. Y., Park, Y. C., Ye, H., & Wu, H. (2002). All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci*, *115*(Pt 4), 679-688.
- Davis, S. W., & Hammerberg, B. (1990). *Taenia taeniaeformis*: evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. *Int J Parasitol*, *20*(5), 587-593.
- DeGiorgio, C. M., Medina, M. T., Duron, R., Zee, C., & Escueta, S. P. (2004). Neurocysticercosis. *Epilepsy Curr*, *4*(3), 107-111. doi: 10.1111/j.1535-7597.2004.43008.x

- Del Brutto, O. H., Granados, G., Talamas, O., Sotelo, J., & Gorodezky, C. (1991). Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, C, DR, and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Hum Biol*, *63*(1), 85-93.
- del la Garza, Y., Graviss, E. A., Daver, N. G., Gambarin, K. J., Shandera, W. X., Schantz, P. M., & White, A. C., Jr. (2005). Epidemiology of neurocysticercosis in Houston, Texas. *Am J Trop Med Hyg*, *73*(4), 766-770.
- Eguiarte L. E., A.-L. J. A., Jardón-Barbolla Lev., Aguirre-Planter Erika., Souza Valeria. (2013). Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución. *TIP, Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *16*(1). doi: [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72077-1](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72077-1)
- Escobar, A., Aruffo, C., Cruz-Sanchez, F., & Cervos-Navarro, J. (1985). [Neuropathologic findings in neurocysticercosis]. *Arch Neurobiol (Madr)*, *48*(3), 151-156.
- Ferwerda, B., McCall, M. B., Alonso, S., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Mouktaroudi, M., Izagirre, N., . . . Netea, M. G. (2007). TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(42), 16645-16650. doi: 10.1073/pnas.0704828104
- Fleury, A., Alaez, C., Dessein, A., Rosetti, M., Saenz, B., Hernandez, M., . . . Fragoso, G. (2018). No association of IL2, IL4, IL6, TNF, and IFNG gene polymorphisms was found with *Taenia solium* human infection or neurocysticercosis severity in a family-based study. *Hum Immunol*, *79*(7), 578-582. doi: 10.1016/j.humimm.2018.04.011
- Fleury, A., Dessein, A., Preux, P. M., Dumas, M., Tapia, G., Larralde, C., & Sciutto, E. (2004). Symptomatic human neurocysticercosis--age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol*, *251*(7), 830-837. doi: 10.1007/s00415-004-0437-9
- Fleury, A., Escobar, A., Fragoso, G., Sciutto, E., & Larralde, C. (2010). Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *104*(4), 243-250. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.01.005
- Fleury, A., Gomez, T., Alvarez, I., Meza, D., Huerta, M., Chavarria, A., . . . Fragoso, G. (2003). High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology*, *22*(2), 139-145. doi: 68748
- Fleury, A., Morales, J., Bobes, R. J., Dumas, M., Yanez, O., Pina, J., . . . Sciutto, E. (2006). An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *100*(6), 551-558. doi: 10.1016/j.trstmh.2005.08.008
- Fleury, A., Moreno Garcia, J., Valdez Aguerrebere, P., de Sayve Duran, M., Becerril Rodriguez, P., Larralde, C., & Sciutto, E. (2010). Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, *4*(8), e805. doi: 10.1371/journal.pntd.0000805
- Flisser, A. (1994). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol*, *4*, 77-116.
- Foley, J. H., Walton, B. L., Aleman, M. M., O'Byrne, A. M., Lei, V., Harrasser, M., . . . Conway, E. M. (2016). Complement Activation in Arterial and Venous Thrombosis is Mediated by Plasmin. *EBioMedicine*, *5*, 175-182. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.02.011
- Fortin, A., Diez, E., Rochefort, D., Laroche, L., Malo, D., Rouleau, G. A., . . . Skamene, E. (2001). Recombinant congenic strains derived from A/J and C57BL/6J: a tool for genetic dissection of complex traits. *Genomics*, *74*(1), 21-35. doi: 10.1006/geno.2001.6528
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Govezensky, T., & Sciutto, E. (1996). Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology*, *112* (Pt 1), 119-124.
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Hernandez, M., & Sciutto, E. (1998). Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun*, *66*(2), 760-764.

- Garcia, H. H., Del Brutto, O. H., & Cysticercosis Working Group in, P. (2005). Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol*, *4*(10), 653-661. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70194-0
- Garcia, H. H., Evans, C. A., Nash, T. E., Takayanagui, O. M., White, A. C., Jr., Botero, D., . . . Del Brutto, O. H. (2002). Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev*, *15*(4), 747-756.
- Genetic, A., The New York-Mid-Atlantic Consortium for, G., & Newborn Screening, S. (2009).
- Gerard, N. P., Hodges, M. K., Drazen, J. M., Weller, P. F., & Gerard, C. (1989). Characterization of a receptor for C5a anaphylatoxin on human eosinophils. *J Biol Chem*, *264*(3), 1760-1766.
- Giles, J. L., Choy, E., van den Berg, C., Morgan, B. P., & Harris, C. L. (2015). Functional analysis of a complement polymorphism (rs17611) associated with rheumatoid arthritis. *J Immunol*, *194*(7), 3029-3034. doi: 10.4049/jimmunol.1402956
- Greenfeld, H., Takasaki, K., Walsh, M. J., Ersing, I., Bernhardt, K., Ma, Y., . . . Gewurz, B. E. (2015). TRAF1 Coordinates Polyubiquitin Signaling to Enhance Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Growth and Survival Pathway Activation. *PLoS Pathog*, *11*(5), e1004890. doi: 10.1371/journal.ppat.1004890
- Guo, R. F., Huber-Lang, M., Wang, X., Sarma, V., Padgaonkar, V. A., Craig, R. A., . . . Ward, P. A. (2000). Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *J Clin Invest*, *106*(10), 1271-1280. doi: 10.1172/JCI10793
- Guo, R. F., Riedemann, N. C., Laudes, I. J., Sarma, V. J., Kunkel, R. G., Dilley, K. A., . . . Ward, P. A. (2002). Altered neutrophil trafficking during sepsis. *J Immunol*, *169*(1), 307-314.
- Hajishengallis, G., & Lambris, J. D. (2010). Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system. *Trends Immunol*, *31*(4), 154-163. doi: 10.1016/j.it.2010.01.002
- Hirschhorn, J. N., Lohmueller, K., Byrne, E., & Hirschhorn, K. (2002). A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*, *4*(2), 45-61. doi: 10.1097/00125817-200203000-00002
- Hosking, L., Lumsden, S., Lewis, K., Yeo, A., McCarthy, L., Bansal, A., . . . Xu, C. F. (2004). Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet*, *12*(5), 395-399. doi: 10.1038/sj.ejhg.5201164
- Huber-Lang, M., Sarma, J. V., Zetoune, F. S., Rittirsch, D., Neff, T. A., McGuire, S. R., . . . Ward, P. A. (2006). Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*, *12*(6), 682-687. doi: 10.1038/nm1419
- Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., & Yamamoto, T. (2000). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res*, *254*(1), 14-24. doi: 10.1006/excr.1999.4733
- Jain, S., Padma, M. V., Kanga, U., Mehra, N. K., Puri, A., & Maheshwari, M. C. (1999). Family studies and human leukocyte antigen class II typing in Indian probands with seizures in association with single small enhancing computed tomography lesions. *Epilepsia*, *40*(2), 232-238.
- Kalant, D., MacLaren, R., Cui, W., Samanta, R., Monk, P. N., Laporte, S. A., & Cianflone, K. (2005). C5L2 is a functional receptor for acylation-stimulating protein. *J Biol Chem*, *280*(25), 23936-23944. doi: 10.1074/jbc.M406921200
- Kassis, A. I., & Tanner, C. E. (1977). Echinococcus multilocularis: complement's role in vivo in hydatid disease. *Exp Parasitol*, *43*(2), 390-395.
- Kim, C. M., Choi, J. Y., Bhat, E. A., Jeong, J. H., Son, Y. J., Kim, S., & Park, H. H. (2016). Crystal structure of TRAF1 TRAF domain and its implications in the TRAF1-mediated intracellular signaling pathway. *Sci Rep*, *6*, 25526. doi: 10.1038/srep25526
- Kolev, M., Le Friec, G., & Kemper, C. (2014). Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol*, *14*(12), 811-820. doi: 10.1038/nri3761

- Kurreeman, F. A., Padyukov, L., Marques, R. B., Schrodi, S. J., Seddighzadeh, M., Stoeken-Rijsbergen, G., . . . Toes, R. E. (2007). A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med*, *4*(9), e278. doi: 10.1371/journal.pmed.0040278
- Lachuriya, G., Garg, R. K., Jain, A., Malhotra, H. S., Singh, A. K., Jain, B., . . . Sharma, P. K. (2016). Toll-like Receptor-4 Polymorphisms and Serum Matrix Metalloproteinase-9 in Newly Diagnosed Patients With Calcified Neurocysticercosis and Seizures. *Medicine (Baltimore)*, *95*(17), e3288. doi: 10.1097/MD.0000000000003288
- Lander, E. S., & Schork, N. J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science*, *265*(5181), 2037-2048.
- Laudes, I. J., Chu, J. C., Huber-Lang, M., Guo, R. F., Riedemann, N. C., Sarma, J. V., . . . Ward, P. A. (2002). Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol*, *169*(10), 5962-5970.
- Lee, D. K., George, S. R., Cheng, R., Nguyen, T., Liu, Y., Brown, M., . . . O'Dowd, B. F. (2001). Identification of four novel human G protein-coupled receptors expressed in the brain. *Brain Res Mol Brain Res*, *86*(1-2), 13-22.
- Lee, H., Whitfeld, P. L., & Mackay, C. R. (2008). Receptors for complement C5a. The importance of C5aR and the enigmatic role of C5L2. *Immunol Cell Biol*, *86*(2), 153-160. doi: 10.1038/sj.icb.7100166
- Lee, S. Y., & Choi, Y. (2007). TRAF1 and its biological functions. *Adv Exp Med Biol*, *597*, 25-31. doi: 10.1007/978-0-387-70630-6_2
- Leung, L. L., & Morser, J. (2016). Plasmin as a complement C5 convertase. *EBioMedicine*, *5*, 20-21. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.03.015
- Lu, Y. Y., Li, Z. Z., Jiang, D. S., Wang, L., Zhang, Y., Chen, K., . . . Li, H. (2013). TRAF1 is a critical regulator of cerebral ischaemia-reperfusion injury and neuronal death. *Nat Commun*, *4*, 2852. doi: 10.1038/ncomms3852
- Ma N, X. C., Xiao H, Wang Y, Wang K, Hou C, et al. (2013). C5a Regulates IL-12+DC Migration to Induce Pathogenic Th1 and Th17 Cells in Sepsis. *PLoS ONE*, *8*(7): e69779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069779>
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069779>
- Marian, A. J. (2012). Molecular genetic studies of complex phenotypes. *Transl Res*, *159*(2), 64-79. doi: 10.1016/j.trsl.2011.08.001
- Marian, A. J., & Belmont, J. (2011). Strategic approaches to unraveling genetic causes of cardiovascular diseases. *Circ Res*, *108*(10), 1252-1269. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.236067
- McHugh, J. (2017). Rheumatoid arthritis: Reduced TRAF1 exacerbates inflammation. *Nat Rev Rheumatol*, *13*(1), 4. doi: 10.1038/nrrheum.2016.203
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*, *6*, 262. doi: 10.3389/fimmu.2015.00262
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*, *6*, 257. doi: 10.3389/fimmu.2015.00257
- Messemaker, T. C., Frank-Bertoncelj, M., Marques, R. B., Adriaans, A., Bakker, A. M., Daha, N., . . . Kurreeman, F. (2016). A novel long non-coding RNA in the rheumatoid arthritis risk locus TRAF1-C5 influences C5 mRNA levels. *Genes Immun*, *17*(2), 85-92. doi: 10.1038/gene.2015.54
- Mishra, B. B., Mishra, P. K., & Teale, J. M. (2006). Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol*, *181*(1-2), 46-56. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.07.019

- Monk, P. N., Scola, A. M., Madala, P., & Fairlie, D. P. (2007). Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol*, *152*(4), 429-448. doi: 10.1038/sj.bjp.0707332
- Moskowitz, J., & Mendelsohn, G. (2010). Neurocysticercosis. *Arch Pathol Lab Med*, *134*(10), 1560-1563. doi: 10.1043/2008-0756-RS.1
- Moura, V. B., Lima, S. B., Matos-Silva, H., Vinaud, M. C., Loyola, P. R., & Lino, R. S. (2016). Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology*, *143*(3), 334-342. doi: 10.1017/S0031182015001572
- Nash, T. E., Mahanty, S., Loeb, J. A., Theodore, W. H., Friedman, A., Sander, J. W., . . . Garcia, H. H. (2015). Neurocysticercosis: A natural human model of epileptogenesis. *Epilepsia*, *56*(2), 177-183. doi: 10.1111/epi.12849
- Nash, T. E., Pretell, E. J., Lescano, A. G., Bustos, J. A., Gilman, R. H., Gonzalez, A. E., . . . Cysticercosis Working Group in, P. (2008). Perilesional brain oedema and seizure activity in patients with calcified neurocysticercosis: a prospective cohort and nested case-control study. *Lancet Neurol*, *7*(12), 1099-1105. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70243-6
- Newton-Cheh, C., & Hirschhorn, J. N. (2005). Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res*, *573*(1-2), 54-69. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.006
- Nocentini, G., & Riccardi, C. (2009). GTR: a modulator of immune response and inflammation. *Adv Exp Med Biol*, *647*, 156-173. doi: 10.1007/978-0-387-89520-8_11
- OMS, O. M. d. I. s. (2015, Mayo 2015). Teniasis/Cisticercosis, Nota descriptiva. *Nota descriptiva*. 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/es/>
- Patnala, R., Clements, J., & Batra, J. (2013). Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC Genet*, *14*, 39. doi: 10.1186/1471-2156-14-39
- Plenge, R. M., Seielstad, M., Padyukov, L., Lee, A. T., Remmers, E. F., Ding, B., . . . Gregersen, P. K. (2007). TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genomewide study. *N Engl J Med*, *357*(12), 1199-1209. doi: 10.1056/NEJMoa073491
- Ramirez-Aquino, R., Radovanovic, I., Fortin, A., Sciutto-Conde, E., Fragoso-Gonzalez, G., Gros, P., & Aguilar-Delfin, I. (2011). Identification of loci controlling restriction of parasite growth in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*, *5*(12), e1435. doi: 10.1371/journal.pntd.0001435
- Restrepo, B. I., Alvarez, J. I., Castano, J. A., Arias, L. F., Restrepo, M., Trujillo, J., . . . Teale, J. M. (2001). Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun*, *69*(7), 4554-4560. doi: 10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001
- Restrepo, B. I., Llaguno, P., Sandoval, M. A., Enciso, J. A., & Teale, J. M. (1998). Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol*, *89*(1-2), 64-72.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, *11*(9), 785-797. doi: 10.1038/ni.1923
- Ricklin, D., & Lambris, J. D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol*, *25*(11), 1265-1275. doi: 10.1038/nbt1342
- Riedemann, N. C., Guo, R. F., Laudes, I. J., Keller, K., Sarma, V. J., Padgaonkar, V., . . . Ward, P. A. (2002). C5a receptor and thymocyte apoptosis in sepsis. *FASEB J*, *16*(8), 887-888. doi: 10.1096/fj.02-0033fje
- Riedemann, N. C., Guo, R. F., Sarma, V. J., Laudes, I. J., Huber-Lang, M., Warner, R. L., . . . Ward, P. A. (2002). Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. *J Immunol*, *168*(4), 1919-1925.
- Risch, N. J. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*, *405*(6788), 847-856. doi: 10.1038/35015718

- Sabbagh, L., Pulle, G., Liu, Y., Tsitsikov, E. N., & Watts, T. H. (2008). ERK-dependent Bim modulation downstream of the 4-1BB-TRAF1 signaling axis is a critical mediator of CD8 T cell survival in vivo. *J Immunol*, *180*(12), 8093-8101.
- Sciotto, E., Cardenas, 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*(6-7), 524-530. doi: 10.1016/j.micinf.2013.03.007
- Sciotto, E., Fragoso, G., Diaz, M. L., Valdez, F., Montoya, R. M., Govezensky, T., . . . Larralde, C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res*, *77*(3), 243-246.
- Sciotto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleste, J. P., Sotelo, J., Aluja, A., . . . 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*(15), 1875-1890.
- Scharf, D. (1988). Neurocysticercosis. Two hundred thirty-eight cases from a California hospital. *Arch Neurol*, *45*(7), 777-780.
- Schieferdecker, H. L., Schlaf, G., Jungermann, K., & Gotze, O. (2001). Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. *Int Immunopharmacol*, *1*(3), 469-481.
- Shastri, A., Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2013). Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm*, *2013*, 342931. doi: 10.1155/2013/342931
- Singh, A., Prasad, K. N., Singh, A. K., Singh, S. K., Gupta, K. K., Paliwal, V. K., . . . Gupta, R. K. (2017). Human Glutathione S-Transferase Enzyme Gene Polymorphisms and Their Association With Neurocysticercosis. *Mol Neurobiol*, *54*(4), 2843-2851. doi: 10.1007/s12035-016-9779-4
- Singh, A., Singh, A. K., Singh, S. K., Paliwal, V. K., Gupta, R. K., & Prasad, K. N. (2014). Association of ICAM-1 K469E polymorphism with neurocysticercosis. *J Neuroimmunol*, *276*(1-2), 166-171. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.07.018
- Singh, G. (1997). Neurocysticercosis in South-Central America and the Indian subcontinent. A comparative evaluation. *Arq Neuropsiquiatr*, *55*(3A), 349-356.
- Sorvillo, F. J., Portigal, L., DeGiorgio, C., Smith, L., Waterman, S. H., Berlin, G. W., & Ash, L. R. (2004). Cysticercosis-related deaths, California. *Emerg Infect Dis*, *10*(3), 465-469. doi: 10.3201/eid1003.020749
- Statistical Human Genetics*. (2012). (J. M. S. Robert C. Elston, Shuying Sun, Ed. 1 ed. Vol. 850): Humana Press.
- Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, *68*(4), 978-989. doi: 10.1086/319501
- Sun, X. (2017). Segregation Analysis Using the Unified Model. *Methods Mol Biol*, *1666*, 233-256. doi: 10.1007/978-1-4939-7274-6_12
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., & Larralde, C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*, *84*(1), 74-81.
- Thoman, M. L., Meuth, J. L., Morgan, E. L., Weigle, W. O., & Hugli, T. E. (1984). C3d-K, a kallikrein cleavage fragment of iC3b is a potent inhibitor of cellular proliferation. *J Immunol*, *133*(5), 2629-2633.
- Vallabhapurapu, S., & Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, *27*, 693-733. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132641

- Verma, A., Prasad, K. N., Gupta, R. K., Singh, A. K., Nyati, K. K., Rizwan, A., . . . Paliwal, V. K. (2010). Toll-like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis*, *202*(8), 1219-1225. doi: 10.1086/656395
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., & Baldwin, A. S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, *281*(5383), 1680-1683.
- Ward, P. A. (2004). The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol*, *4*(2), 133-142. doi: 10.1038/nri1269
- White, A. C., Jr. (2000). Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med*, *51*, 187-206. doi: 10.1146/annurev.med.51.1.187
- White, A. C., Jr., Robinson, P., & Kuhn, R. (1997). *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol*, *66*, 209-230.
- Wilfert, L., & Schmid-Hempel, P. (2008). The genetic architecture of susceptibility to parasites. *BMC Evol Biol*, *8*, 187. doi: 10.1186/1471-2148-8-187
- Yoo, J., Lee, Y., Kim, Y., Rha, S. Y., & Kim, Y. (2008). SNPAnalyzer 2.0: a web-based integrated workbench for linkage disequilibrium analysis and association analysis. *BMC Bioinformatics*, *9*, 290. doi: 10.1186/1471-2105-9-290
- Zhang, X., Boyar, W., Toth, M. J., Wennogle, L., & Gonnella, N. C. (1997). Structural definition of the C5a C terminus by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proteins*, *28*(2), 261-267.
- Zuiderweg, E. R., & Fesik, S. W. (1989). Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry*, *28*(6), 2387-2391.
- Zuiderweg, E. R., Nettlesheim, D. G., Mollison, K. W., & Carter, G. W. (1989). Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry*, *28*(1), 172-185.

11 ANEXO

zii-iai/zii01219/zii2939d19z xppws S=5 10/4/19 15:31 4/Color Fig: 1,8 ArtID: 00347-19 DOI:10.1128/IAI.00347-19 CE: tmr



Editor:
De'Broski R. Herbert

Section:
Fungal and Parasitic Infections

Designation:
T

FUNGAL AND PARASITIC INFECTIONS



Association of *TRAF1/C5* Locus Polymorphisms with Epilepsy and Clinical Traits in Mexican Patients with Neurocysticercosis

AQ:au **Marcela Villegas,^a Edda Scitutto,^b Marcos Rosetti,^{b,c} Agnes Fleury,^{b,d} Gladis Fragoso^b**

^aFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^bInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^cUnidad Psicopatología y Desarrollo, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico

^dUnidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

ABSTRACT Neurocysticercosis is caused by the establishment of *Taenia solium* cysts in the central nervous system. Murine cysticercosis by *Taenia crassiceps* is a useful model of cysticercosis in which the complement component 5 (C5) has been linked to infection resistance/permissiveness. We sought here to study the possible relevance for human neurocysticercosis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the C5-*TRAF1* region (rs17611 C/T, rs992670 G/A, rs25681 G/A, rs10818488 A/G, and rs3761847 G/A) in a Mexican population and associated with clinical and radiological traits related to neurocysticercosis severity (cell count in the cerebrospinal fluid [CSF] cellularity, parasite location and parasite load in the brain, parasite degenerating stage, and epilepsy). The AG genotype of the rs3761847 SNP showed a tendency to association with multiple brain-parasites, while the CT and GG genotypes of the rs17611 and rs3761847 SNPs, respectively, showed a tendency to associate with low CSF cellularity. The rs3761847 SNP was associated with epilepsy under a dominant model, whereas rs10818488 was associated with CSF cellularity and parasite load under dominant and recessive models, respectively. For haplotypes, C5- and the *TRAF1*-associated SNPs were, respectively, in strong linkage disequilibrium with each other; thus, these haplotypes were studied independently. For C5 SNPs, carrying the CAA haplotype increases the risk of showing high CSF cellularity 3-fold and the risk of having extraparenchymal parasites 4-fold, two conditions that are related to severe disease. For *TRAF1* SNPs, the GA and AG haplotypes were associated with CSF cellularity, and the AG haplotype was associated with epilepsy. Overall, these findings support the clear participation of C5 and *TRAF1* in the risk of developing severe NCC in the Mexican population.

AQ:Z-A

AQ:Z-B

AQ:Z-C

KEYWORDS neurocysticercosis, genetic polymorphism, C5 complement, *TRAF1*, association, SNP, *TRAF1/C5*

Human neurocysticercosis (NCC) is caused by the establishment of the larval stage of *Taenia solium* in the central nervous system (CNS); it is a prevalent infectious disease in nondeveloped countries of Asia, Africa, and Latin America (1). NCC is a clinically and radiologically pleomorphic disease. Indeed, some infected subjects can be completely asymptomatic, while others exhibit a severe, acute, life-threatening clinical picture (2, 3). This variability has been linked to radiological heterogeneity, i.e., differences in parasite load and parasite location in the CNS, and to the various degenerating stages of parasites (4). Seizures are the most frequent sign of NCC, and it is a significant contributor to late-onset epilepsy in tropical regions worldwide according to a recent meta-analysis study (5). Among the factors involved in the clinical and radiological heterogeneity of NCC, those related to the host immunoinflammatory and endocrino-

Citation Villegas M, Scitutto E, Rosetti M, Fleury A, Fragoso G. 2019. Association of *TRAF1/C5* locus polymorphisms with epilepsy and clinical traits in Mexican patients with neurocysticercosis. *Infect Immun* 87:e00347-19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00347-19>.

Editor De'Broski R. Herbert, University of Pennsylvania

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Gladis Fragoso, gladis@unam.mx.

Received 2 May 2019

Returned for modification 11 June 2019

Accepted 20 September 2019

Accepted manuscript posted online 30 September 2019

Published

logical response have been found to play a role in the pathogenesis of the disease (6–8), and previous studies have demonstrated the relevance of the host genetic background in modulating these factors (9–12).

AQ: D

Particularly, the participation of the complement component 5 (C5) in the early protective inflammatory response was observed in murine cysticercosis by *Taenia crassiceps* (10). The complement system is an innate immune component with a prominent role in modulating the inflammatory response against several sterile and nonsterile pathological conditions (13). The complement system is comprised of more than 30 proteins, from which the fragments C3a, C4a, and C5a act as anaphylatoxins and chemotactic factors, triggering inflammation. C5 polymorphisms have been found associated with chronic inflammatory diseases such as bronchial asthma, rheumatoid arthritis, liver fibrosis, periodontitis, and stroke (14–17). The role of complement in the outcome of neuroinflammation in sterile and nonsterile conditions has been widely studied and recently reviewed (18). Indeed, the complement system, especially the C5a fragment, plays an important role in some neuropathologies closely related to inflammation. C5 mice and C5 receptor (C5aR) knockout mice or mice therapeutically treated with specific antibodies against either C5 or C5aR showed a notable improvement in neurological disorders like traumatic brain injury, spinal cord injury, and Alzheimer's disease (19–21). Until now, no study has evaluated the levels of C5 or C5a in NCC. Proximal to C5 is the *TRAF1* gene, which codes for the TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1); this protein associates with and mediates the signal transduction of various receptors of the TNFR superfamily. TRAF1 plays a key role in the prosurvival downstream signaling of TNFR superfamily members such as TNFR2, LMP1, 4-1BB, and CD40; in addition, an independent role of the tumor necrosis factor (TNF) receptor was proposed as a negative regulator of the Toll-like receptor (TLR) and Nod-like receptor signaling pathways (22). TRAF1 is an essential molecule of the TNF signaling cascade, promoting the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α through the NF- κ B pathway (22), and it was recently suggested to have a regulatory influence on the expression of C5 (23). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *TRAF1* region have been associated with inflammation in rheumatoid arthritis (24). Considering this, three C5 and two *TRAF1* SNPs, the most widely studied SNPs in these regions, were studied here to evaluate the contribution of their alleles, genotypes, and haplotypes to the clinical and radiological heterogeneity of NCC in a Mexican population, in which their significance for NCC has not been yet defined.

RESULTS

T1/AQ:E

General traits of NCC patients. All patients included met the most recently validated NCC diagnosis criteria (25). The demographic and clinical-radiological characteristics of the patients enrolled are shown in Table 1. Since our study is aimed to evaluate genetic factors associated with parasite location and degenerating stage, patients with mixed parasite locations and/or parasite degenerating stages were excluded from the study.

AQ: F

Genotypic and allelic frequencies of the five SNPs studied in all NCC patients were compared to the information reported for the Mexican migrant population in Los Angeles (MLX) in the HapMap project (see Fig. S1 in the supplemental material). As shown, a heterozygous genotype was the most frequent finding in both populations except for rs3761847, for which AA was the most frequent genotype in NCC patients, with a similar frequency to the heterozygous (44.49 versus 41.52). With respect to allele frequency, our results agree with the HapMap study except for the rs25681 SNP, for which we found a higher frequency of the allele A, while the HapMap study reported a higher frequency of the allele G.

Allele and genotype frequencies of C5 and TRAF1 SNPs and association with susceptibility to develop a severe disease. Tables S1 to S5 show the genotype and allele frequencies of the five SNPs studied for each disease-related variable (parasite location, parasite load, cerebrospinal fluid [CSF] cellularity, parasite degenerating stage, and epilepsy), along with the results of the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) test. A

TABLE 1 Dichotomized clinical and radiological traits of NCC patients included in this study

Trait	Category ^a	n
Sex	Male	110
	Female	111
Parasite degenerating stage	Vesicular (viable)	95
	Colloidal or calcified (damaged)	82
	Mixed or ND†	44
Parasite load in the brain	Single	67
	Multiple	154
Parasite location in the brain	Parenchymal	90
	Extraparenchymal	123
Cell count in CSF (CSF cellularity)	High, >15 /ml	85
	Low, <15 /ml	113
	ND	23
Epilepsy	Yes	101
	No	84
	Unknown	36

^aND, not determined; †, not included in SNP analysis.

deviation of the HWE test was observed in the *C5* rs17611 SNP with respect to parasite load, parasite location in the brain, CSF cellularity, and epilepsy, while a deviation in the HWE was observed in the *C5* rs992670 and *TRAF1* rs3761847 SNPs with respect to parasite load only.

The effect of each SNP on the disease was evaluated by regression analysis on individual genotypic variants (Tables S6-S10) and under two genetic models of inheritance (dominant and recessive) (Table S11). Odds ratio (OR) data and *P* values of the frequency of association of the SNPs are shown. The phenotypes associated with increased inflammation are extraparenchymal location, multiple brain parasites in the degenerating state, and a CSF cellularity of >15 cells/ml. As observed, none of the individual SNPs was found to be associated with the risk of having parenchymal or extraparenchymal NCC, with the risk of having vesicular or damaged parasites, nor with the risk of suffering epilepsy (*P* > 0.05; Tables S6, S9, and S10, respectively). Although the AG genotype of the *TRAF1* rs3761847 SNP showed a slight tendency to associate with multiple brain parasites (Table S7), in this variable only age was statistically significant (*P* < 0.05). The CT and GG genotypes of the *C5* (rs17611) and *TRAF1* rs3761847 SNPs, respectively, showed a tendency toward association with low CSF cellularity (Table S8), with a statistically significant effect for sex as a covariate of these SNPs (*P* < 0.05), but not for age, since a higher inflammatory CSF was found in women (*P* < 0.05). According to the analysis of the effect of these SNPs under two inheritance models, the *TRAF1* rs10818488 (A/G) SNPs have a strong tendency toward association at the limit of significance (*P* = 0.0511) with the parasite location in the brains of NCC patients in a recessive model. In a dominant model, this SNP was significantly associated with CSF cellularity (*P* < 0.05) and showed a tendency to associate with epilepsy (*P* = 0.096). Meanwhile, the *TRAF1* rs3761847 (A/G) SNP was found to be significantly associated with epilepsy (*P* = 0.018) in a dominant model and showed a tendency toward association with CSF cellularity (*P* = 0.085). No association of the three *C5* SNPs studied was found with any clinical-radiological trait of NCC patients (Table S11).

C5 and TRAF1 haplotypes and their association with disease severity. As shown in Fig. 1, two haplotype groups were constructed, one for *C5* SNPs and the other for *TRAF1* SNPs. No linkage disequilibrium (LD) was found between *TRAF1* and *C5* haplotypes. The highest disequilibrium was found among *C5* SNPs (*D'* = 0.94).

The most common haplotypes in NCC patients for *C5* were TAA (51.41%) and CGG (35.3%); CAA, CGA, CAG, and TGA were also present at a very low frequency (3.7, 3.1, 1.2,

FI

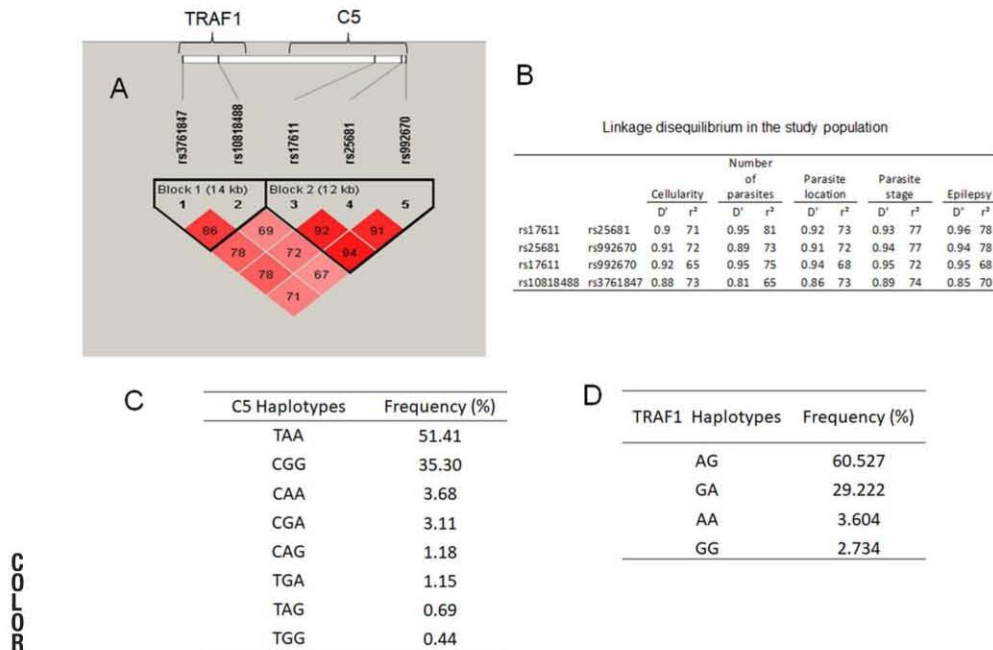


FIG 1 Representative pairwise linkage disequilibrium (LD) in the *C5/TRAF1* region for CSF cellularity. Three single *C5* SNPs and two *TRAF1* SNPs were analyzed in this study. An LD test was performed using HAPLOVIEW v4.2. The relative location of each SNP along chromosome 9 is shown. (A) Diamonds in haplotype blocks represent the pairwise linkage disequilibrium between all SNPs analyzed. As shown, two blocks were constructed: one for *C5* SNPs and the other for *TRAF1* SNPs. (B) D' and r^2 values for each comparison (cellularity, parasite degenerating state, number and location of brain parasites, and epilepsy). (C) Frequency of the constructed haplotypes for *C5* in NCC patients. (D) Frequency of the constructed haplotypes for *TRAF1* in NCC patients.

and 1.15%, respectively). For *TRAF1*, AG and GA were the most frequent haplotypes (60.53 and 29.22%, respectively), while the least frequent haplotypes were AA and GG, at 3.6 and 2.7% frequencies, respectively (Fig. 1). Associations of SNP haplotypes with disease severity NCC patients were obtained using SNP analyzer software (26). Among *C5* haplotypes, CAA was significantly associated with parasite location in the brain, CSF cellularity, and epilepsy in both additive and dominant inheritance models (Fig. 2 and 3 and Fig. 4, respectively). The TGA haplotype was significantly associated with CSF cellularity, but only in an additive inheritance model (Fig. 3). With respect to *TRAF1* haplotypes, GA was found to be significantly associated with CSF cellularity in both additive and dominant inheritance models (Fig. 5 and 6), whereas the haplotype AG was significantly associated with CSF cellularity in additive and recessive inheritance models and with epilepsy in additive and dominant inheritance models (Fig. 6 and 7, respectively). None of the *C5* haplotypes was significantly associated with parasite degenerating stage or parasite load in the brain, whereas no *TRAF1* haplotypes were significantly associated with parasite load, parasite degenerating stage, or parasite location in the brain (data not shown).

DISCUSSION

Neurocysticercosis, due to the establishment of *T. solium* cysticerci in the CNS, is a clinically and radiologically heterogeneous disease. Symptoms vary from headaches to severe intracranial hypertension; at a radiological level, the number, location, and degenerating stage of brain parasites are highly variable among patients (4). Hetero-

COLOR

F2
F3-4
F5-6/
AQ:G
F7

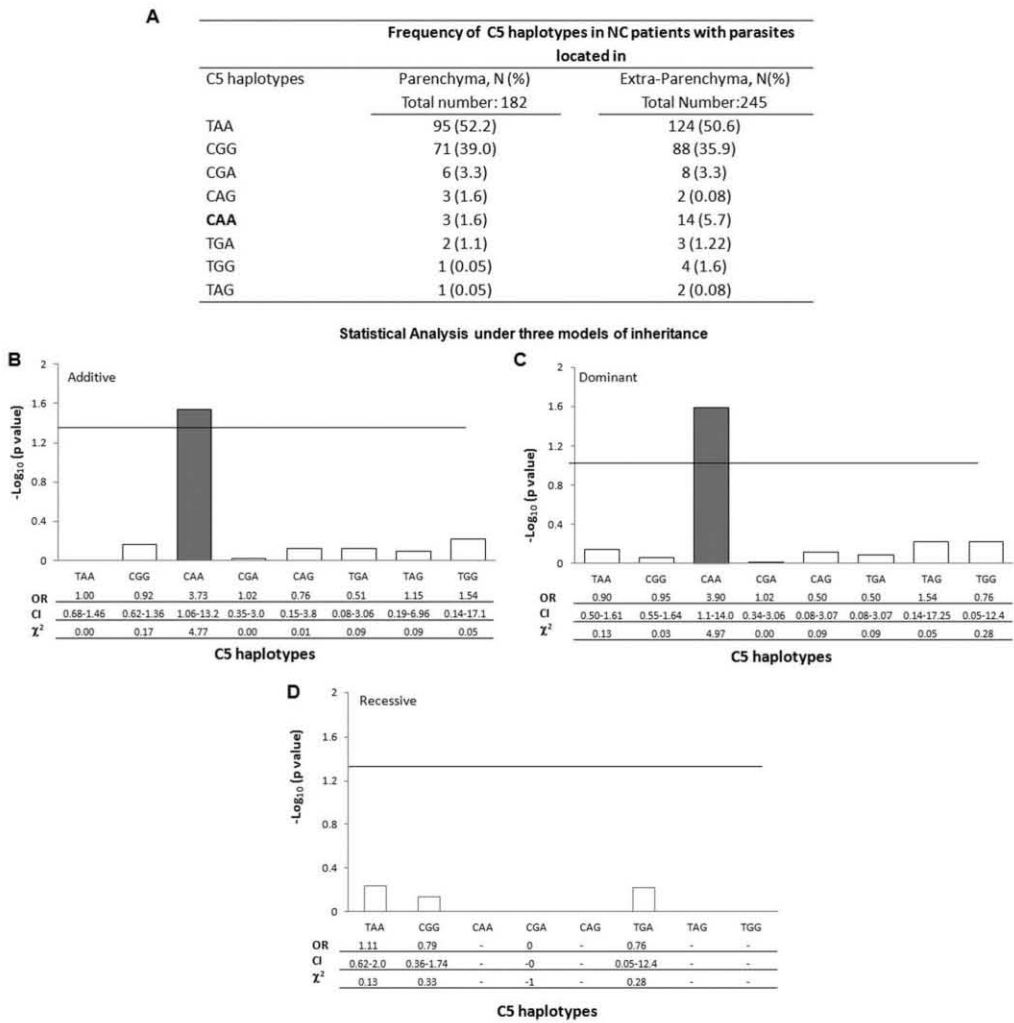


FIG 2 Association of C5 constructed haplotypes with parasite location in NCC patients (parenchymal versus extraparenchymal). (A) The absolute numbers and percentage values of each haplotype for patients with parenchymal and extraparenchymal brain parasites are shown. Graphs were generated using the SNP analyzer software. The graphs show the statistical association of the generated C5 haplotypes with parasite location for three inheritance models (B, additive; C, dominant; and D, recessive). P values are graphed as the $-\log_{10} P$ and are represented in the y axis. The horizontal line in each model represents the significance level ($P = 0.05$). χ^2 , OR, and confidence interval values are shown under each haplotype.

genity in the intensity of the inflammatory reaction is also frequent, and a clear relationship between increased inflammation and the destruction of parenchymal parasites has been observed (4). In addition, an association between degenerated parasites and the occurrence of symptomatic seizures has been clearly described (27, 28).

The host genetic background has been reported to participate in the clinical and radiological heterogeneity of NCC. Polymorphisms in the gene coding for the Toll-like

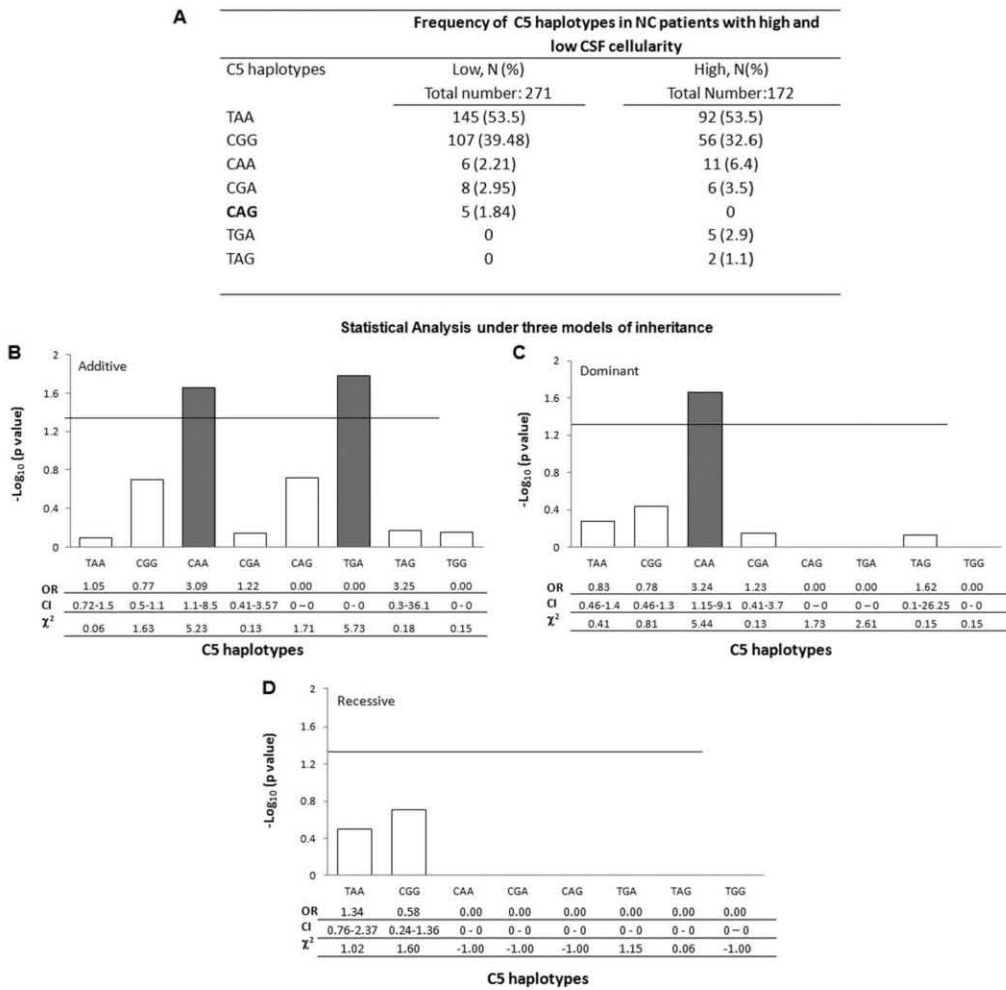


FIG 3 Association of C5 constructed haplotypes with CSF cellularity. (A) The absolute numbers and percentage values of each C5 generated haplotype for patients with high and low CSF cellularity values are shown. Graphs were generated using the SNP analyzer software. The graphs show the statistical association of the generated C5 haplotypes with parasite location for three inheritance models (B, additive; C, dominant; and D, recessive). P values are graphed as the $-\log_{10} P$ and are represented in the y axis. The horizontal line in each model represents the significance level ($P = 0.05$). χ^2 , OR, and confidence interval values are shown under each haplotype.

receptor 4 (*TLR4*) were found associated with calcified parasites and seizure occurrence; polymorphisms in the gene coding for matrix metalloproteinase-9 (*MMP-9*) were associated with calcified parasites (9), and polymorphisms in the gene coding for the intercellular adhesion molecule 1 (*ICAM-1*) were linked with brain edema (11).

The genes *TRAF1* and *C5* are associated with the immunoinflammatory response, and the selected SNPs have been found to be associated with the inflammatory reaction in several diseases (14, 16, 17, 29, 30). In addition, in a previous study on the murine model of cysticercosis by *T. crassiceps*, the *C5* gene was associated with

A

Frequency of C5 haplotypes in epileptic and non-epileptic NC patients		
C5 haplotypes	Non-epileptic, N (%)	Epileptic, N(%)
	Total number: 202	Total Number: 164
TAA	105(51.9)	84(52.4)
CGG	66(32.5)	64(39.1)
CAA	13(6.4)	2(3.1)
CGA	8(4.03)	5(1.16)
CAG	2(1.1)	1(0.66)
TGA	1(0.53)	0
TGG	1(0.52)	1(0.61)
TAG	0	2(0.62)

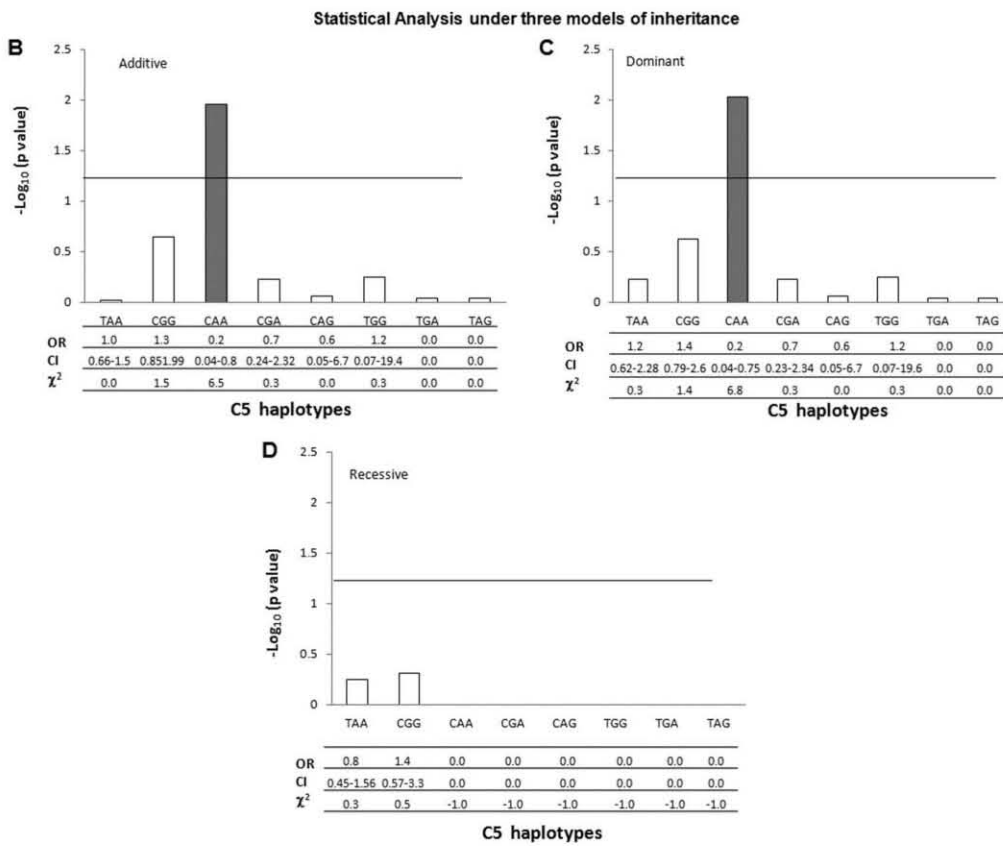


FIG 4 Association of C5 constructed haplotypes with epilepsy presentation. (A) The absolute numbers and percentage values of each C5 generated haplotype for epileptic and nonepileptic patients are shown. Graphs were generated using the SNP analyzer software. The graphs show the statistical association of the generated C5 haplotypes with parasite location for three inheritance models (B, additive; C, dominant; and D, recessive). P values are graphed as the $-\log_{10} P$ and are represented in the y axis. The horizontal line in each model represents the significance level ($P = 0.05$). χ^2 , OR, and confidence interval values are shown under each haplotype.

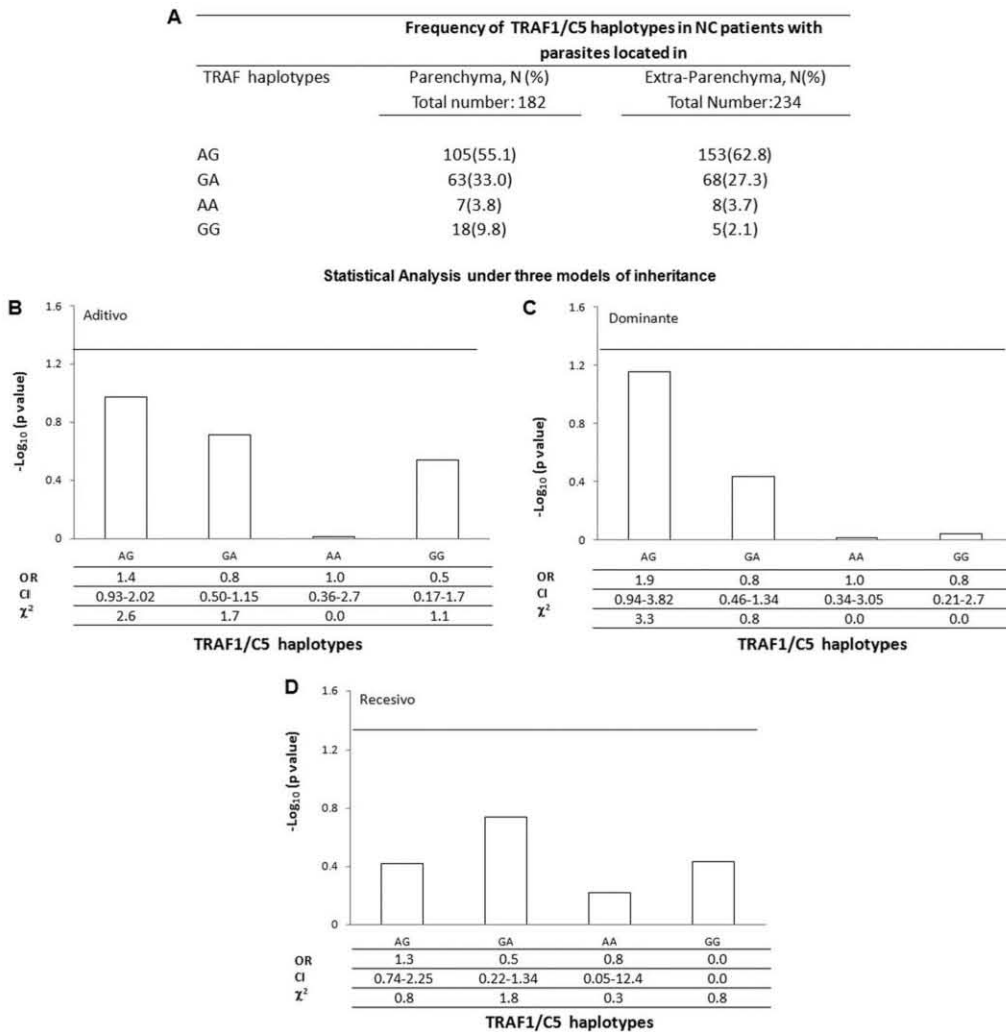


FIG 5 Association of *TRAF1* constructed haplotypes with parasite location in NCC patients (parenchymal versus extraparenchymal). (A) The absolute numbers and percentage values of each haplotype for patients with parenchymal and extraparenchymal brain parasites are shown. Graphs were generated using the SNP analyzer software. The graphs show the statistical association of the generated *TRAF1* haplotypes with parasite location for three inheritance models (B, additive; C, dominant; and D, recessive). *P* values are graphed as the $-\log_{10} P$ and are represented in the y axis. The horizontal line in each model represents the significance level ($P = 0.05$). χ^2 , OR, and confidence interval values are shown under each haplotype.

susceptibility to the infection (10). Since inflammation is one of the main clinical manifestations of symptomatic NCC, the relationship between five SNPs in the *TRAF1* region and NCC severity in Mexican patients was studied here.

None of the three *C5* SNPs under study was found to be significantly associated with the clinical and radiological traits of NCC patients. A tendency toward association was found between the *CT* genotype of the rs17611 SNP and a low CSF cellularity level. No significant association of the *C5* SNPs was found in either dominant or recessive

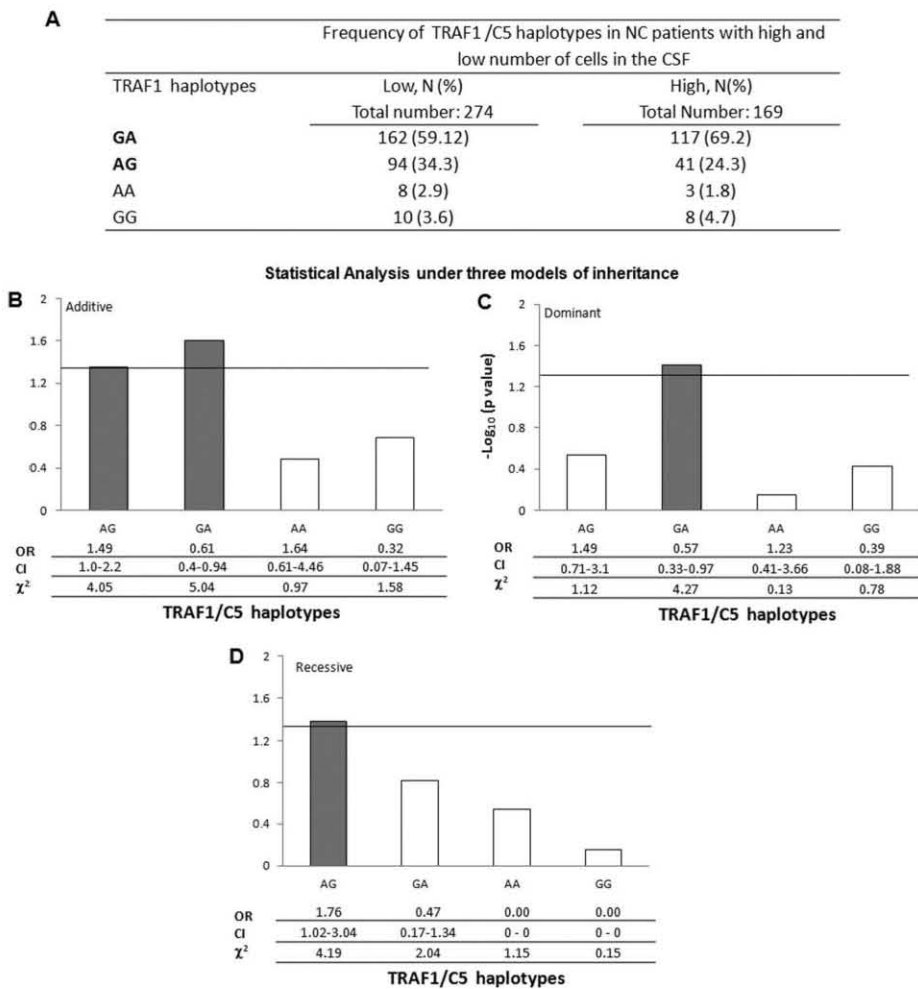


FIG 6 Association of *TRAF1/C5* constructed haplotypes with CSF cellularity. (A) The absolute numbers and percentage values of each C5 generated haplotype for patients with high and low CSF cellularity values are shown. Graphs were generated using the SNP analyzer software. The graphs show the statistical association of the generated *TRAF1* haplotypes with parasite location for three inheritance models (B, additive; C, dominant; and D, recessive). *P* values are graphed as $-\log_{10} P$ and are represented in the y axis. The horizontal line in each model represents the significance level ($P = 0.05$). χ^2 , OR, and confidence interval values are shown under each haplotype.

inheritance models. A joint contribution of these three C5 SNPs has been found only in one study on the human inflammatory disease caused by dental plaque in Chinese patients from Hong Kong (29). From these three C5 SNPs, the most widely studied one in inflammatory diseases is rs17611, which is related to C5 serum levels in these patients (31). Considering the relevance of C5 in murine cysticercosis (10), it could be hypothesized that these SNPs are involved in the success of infection rather than in the clinical and radiological status of NCC patients. The involvement of C5 in the innate immunity against *Taenia taeniaeformis* supports this possibility (32). In addition, several

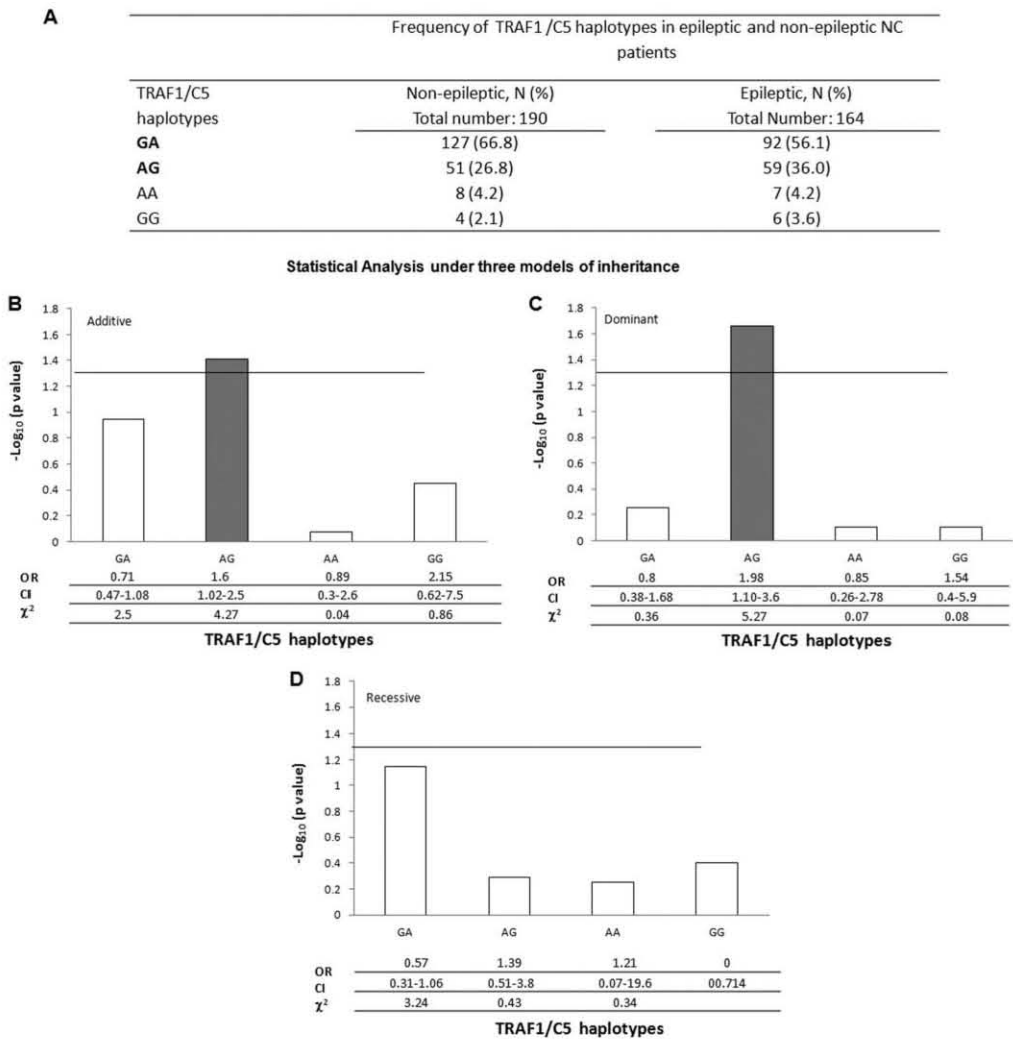


FIG 7 Association of TRAF1/C5 constructed haplotypes with epilepsy presentation. (A) The absolute numbers and percentage values of each C5 generated haplotype for epileptic and nonepileptic patients are shown. Graphs were generated using the SNP analyzer software. The graphs show the statistical association of the generated TRAF1 haplotypes with parasite location for three inheritance models (B, additive; C, dominant; and D: recessive). P values are graphed as the $-\log_{10} P$ and are represented in the y axis. The horizontal line in each model represents the significance level ($P = 0.05$). χ^2 , OR, and confidence interval values are shown under each haplotype.

cestodes, including *Echinococcus multilocularis* and *T. crassiceps*, are known to be damaged by the complement system (33, 34). Considering this, further family studies (parents and NCC children) will be required to evaluate the role of these C5 SNPs in the risk of acquiring the infection. However, the relevance of these C5 SNPs for disease severity cannot be ruled out, and the lack of association observed here may be due to the small sample size.

TRAF1 SNPs made a greater contribution to the clinical and radiological traits of NCC patients. Indeed, the AG genotype of the rs3761847 SNP showed a tendency toward association with multiple brain parasites and CSF cellularity. This SNP showed a tendency toward association with CSF cellularity and a significant association with epilepsy under a dominant model of inheritance (Table S11). None of the clinical and radiological NCC traits that have been reported to underlie epilepsy development, such as degenerating parasites and a parenchymal parasite location, were found significantly associated with this SNP. These findings indicate that epilepsy in NCC patients is a complex phenomenon that may be related to several factors beyond parasite location and degenerating state. The TRAF1 rs10818488 (A/G) SNP has a strong tendency toward association, at the limit of significance ($P = 0.051$), with parasite location in the brain of NCC patients in a recessive model of inheritance and with CSF cellularity ($P = 0.022$) in a dominant model of inheritance, although with low OR values, accounting for the low relevance of this SNP in the evolution of the disease, as shown in Table S11.

TRAF1 is a member of the TNF receptor family that participates in several signaling pathways, especially in NF- κ B signaling, which promotes the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α (22) and regulates leukocyte recruitment to inflamed tissues (35); this could explain the relationship of the rs10818488 SNP with CSF cellularity. In addition, TRAF1 forms a heterodimeric complex with TRAF2, required for the activation of the TNF- α , MAPK8/JNK, and NF- κ B signaling pathways, thus promoting an inflammatory response, but also to inhibit proapoptotic proteins, thus mediating antiapoptotic signals of TNF receptors (36, 37). In swine NCC, TNF- α has been detected in the fluid surrounding degenerating cysts, a condition associated with symptomatic NCC that causes additional damage to host tissues and hence may contribute to the pathology in NCC (38). Also, higher TNF- α levels were found in symptomatic NCC patients compared to healthy controls and asymptomatic NCC individuals (39). Finally, a TNF- α blockade suppresses pericystic inflammation after antihelminthic treatment in swine NCC (40). All of these findings highlight the relevance of TNF- α in promoting inflammation. The two TRAF1 SNPs here studied have not been reported to increase the levels of TNF- α , and only correlations with the production of autoantibodies have been observed. However, since TRAF1 modulates the expression of inflammatory cytokines, it is possible that can contribute to the expression of TNF- α . Recently, TRAF1 was proved to be an adapter that negatively regulates TLRs (41). Previous studies failed to show an association of the TNF (-238G/A) SNP (42) or the TLR4 (Asp299Gly) SNP (9) with parasite infection and its clinical evolution. These findings point out the relevance of studying the joint contribution of TRAF1 and TLR4 SNPs in the same population sample.

In previous studies of rheumatoid arthritis, high LD values were found between the TRAF1 and C5 genes, a result that precluded the determination of which of these two genes is responsible of the exacerbated inflammatory response (43). However, an LD of <0.78 between both genes was found in our study, a value like that reported by Kurreeman et al. for these genes (16). Thus, it is possible to analyze these two genes separately. From the five SNPs studied here two haplotype groups were constructed, one for C5 and one for TRAF1 SNPs. Among C5 SNPs, the two with the highest frequency in our Mexican population were TAA (51.41%) and CGG (35.30%), followed by the CAA haplotype, with a frequency of only 3.68%. The CAA haplotype was significantly associated with parasite location, CSF cellularity, and epilepsy; its expression was higher in patients with extraparenchymal parasites, patients who showed high CSF cellularity levels, and patients without epilepsy, although the latter with a very low OR (0.2 in both dominant and additive models). Thus, although individual C5 SNPs were not related to disease severity, an overall contribution of the C5 SNPs was found when haplotypes were considered. Nevertheless, these results should be replicated in other NCC populations.

Our data show a more severe inflammatory disease in the small population that carries the CAA haplotype; indeed, carrying this haplotype increased by three times the risk of showing high CSF cellularity levels (OR = 3.09 and 3.24 for the additive and dominant models, respectively). This haplotype also increased by almost four times the

risk of having parasites located in extraparenchymal regions of the brain (OR = 3.73 and 3.90 for the additive and dominant models, respectively). Both conditions are clearly linked with severe disease. With respect to *TRAF1* haplotypes, *AG* was the most common haplotype in the NCC patients included (60.52%), followed by the *GA* haplotype (29.22%). Although *GA* was significantly associated with high CSF cellularity, the risk is very low (OR = 0.61 and 0.57 for the additive and dominant models); a similar situation was observed when the analysis was performed on patients with high CSF cellularity levels and suffering from epilepsy, in whom a tendency toward association of the *AG* haplotype was found in the dominant model, although with a very low risk ($P = 0.071$, OR = 0.37). Meanwhile, the *AG* haplotype increased by 1.5 to 2.0 times the risk of having a low CSF cellularity level but suffering from epilepsy. However, the number of patients included for these analyses is very low, and a larger patient sample is required to evaluate the participation of these haplotypes in the development of epilepsy along with an inflammatory status or extraparenchymal parasites along with an inflammatory status. However, other factors beyond the expression of inflammatory genes could be influencing the clinical profile of patients, such as a genetic predisposition to develop epilepsy or physiological/anatomical conditions that favor epilepsy.

AQ: H

FB

AQ: I

The possible contribution of these genetic variants in the *C5* and *TRAF1* regions in the severity of NCC, considering the functions of the *C5* and *TRAF1* proteins, is depicted in Fig. 8. As proposed in the figure, the complement cascade can be activated by the parasite, rendering *C5a* and *C5b* (as previously described for other cestodes). As an anaphylatoxin, *C5a* promotes mastocyte degranulation and the release of histamine, which activates the endothelial cells of the blood-brain barrier (BBB), favoring the recruitment of peripheral blood mononuclear cells into the CNS, a process also promoted by the chemotactic activity of *C5a*. On the other hand, *C5b*, together with *C6*, *C7*, *C8*, and *C9*, forms the membrane attack complex, which may affect both the oncosphere and larvae before and after entering the CNS. On the other hand, *TNF- α* may trigger the *TNFR2* signaling pathway, involving the participation of *TRAF1* with the expression of inflammatory cytokines like *TNF- α* , which also increase BBB permeability. Further studies will be conducted to evaluate the levels of *C5*, *C5a*, and *TNF- γ* in these NCC patients to support this hypothetical picture.

Finally, the joint contribution of the already reported SNPs that have been found to be related with infection and disease severity (such as *TLR4*, *MMP-9*, and *ICAM1*), along with those reported in this study, could set a genetic marker to predict how an individual would respond to infection by *T. solium* and the evolution of the disease to establish personalized clinical treatments.

MATERIALS AND METHODS

Population under study and characterization of NCC cases. All of the patients included in this study met the most recently validated NCC diagnosis criteria (25). All subjects were Mexicans who attended the NCC outpatient clinic at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN), Mexico City, Mexico, from January 2009 to May 2016 (700 patients in total). Written informed consent was obtained from all participants, and the protocol was approved by the INNN Ethics and Research Committee. Patients came from rural communities, as well as from urban and suburban areas of Mexico. For this study, 221 patients (of 700 total) were recruited, and a DNA sample was obtained. Of these 221 patients, 111 were females, and 110 were males, with ages ranging from 17 to 74 years (mean, 37.8 ± 13.84 years old). Complete clinical-radiological records could not be recovered for all patients. The confirmatory diagnosis of NCC was based on computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI); all images were interpreted and analyzed by a medical specialist.

The radiological presentation of NCC was evaluated at the time of diagnosis, before treatment. Based on CT and/or MRI findings, parasite degenerating stages were defined as vesicular (parasites with a transparent membrane, clear vesicular fluid, and scarce surrounding inflammatory reaction) or damaged parasites, including colloidal (degenerating parasites with turbid fluid, surrounded by an inflammatory reaction) and calcified parasites (dead parasites that appear as a mineralized granuloma).

The following information was collected from clinical and radiological studies performed for each NCC patient (provided by the medical doctor of the neurocysticercosis clinic) and dichotomized for SNP analysis: number of lesions (single versus multiple cysts), cysticercal degenerating stages (vesicular versus damaged), and CNS location (parenchymal versus extraparenchymal). To evaluate the intensity of the CNS inflammatory reaction, CSF samples were taken by lumbar puncture to determine cell counts (CSF cellularity); CSF samples were regarded as inflammatory when more than 15 cells/ml were counted. Data on epilepsy were retrieved from clinical records.

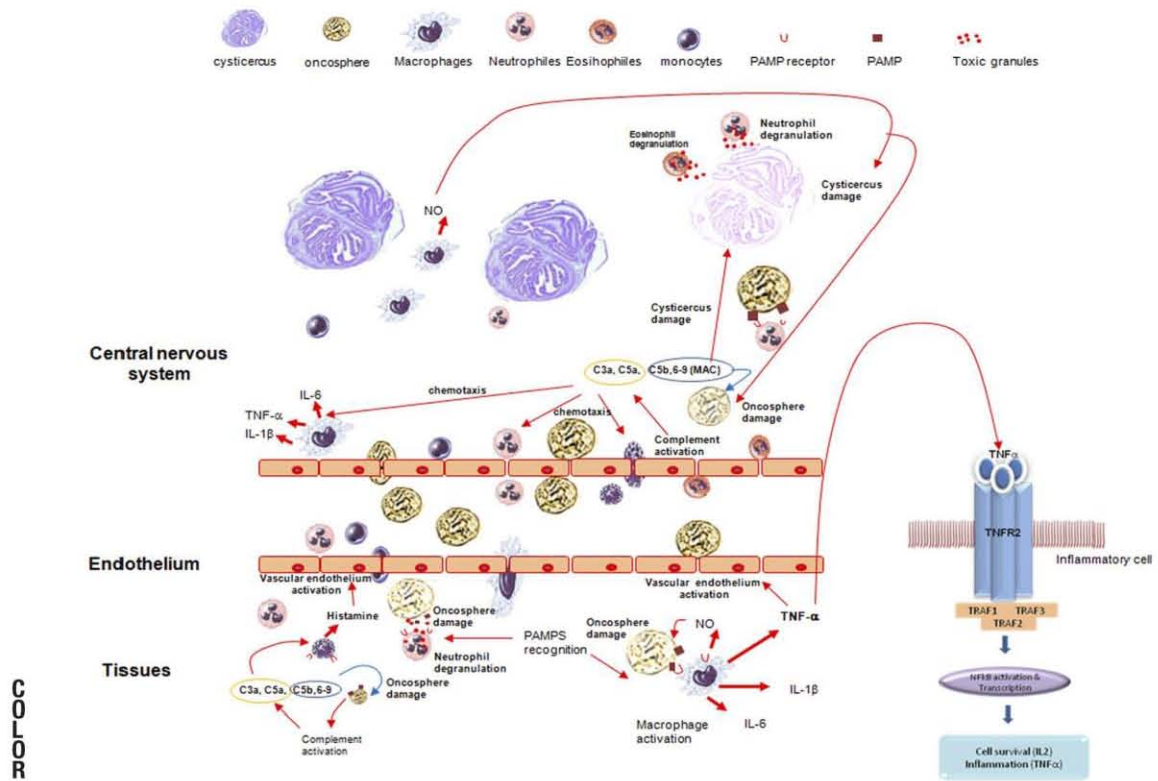


FIG 8 Schematic picture depicting the effect of the immune factors on cysticercal brain infection. Both C5a and TNF- α participate in the recruitment of peripheral blood cells (CSF cellularity increases) that may damage brain cysticerci. The exacerbated inflammation increases the severity of the disease and promotes the destruction of the parasite. Parenchymal parasites are the main cause of late-onset epilepsy in countries of endemicity, and seizure crises are clearly linked to the presence of an inflammatory reaction around the parasites. TRAF1 participates in the TNF- α signaling pathway via the TNFR2 receptor, which in turn participates in the production of TNF- α and the survival of activated cells. TNF- α , together with C5a and C3a, produced during complement activation, promotes the recruitment of peripheral macrophages, neutrophils, and eosinophils, which induce parasite damage through cell degranulation and the release of toxic molecules. On the other hand, cysticerci and oncospheres can also be damaged by the membrane attack complex of the complement.

Blood samples and DNA extraction. Portions (10 ml) of EDTA-treated peripheral blood were collected; plasma and cells were separated, dispensed into aliquots, and stored at -70°C . DNA was extracted from blood leukocytes using a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. DNA was stored at -20°C until used.

SNP selection. Three C5 SNPs (rs17611, rs25681, and rs992670), one SNP of the TRAF1 intergenic region (rs10818488), and one of the 5' untranslated regulatory region (5' UTR) of TRAF1 (rs3761847) were selected (Table 2), considering that these loci were previously identified in genetic linkage analyses as involved with permissiveness to parasite growth in *T. crassiceps* murine cysticercosis (10) and their participation in many inflammatory diseases. It should be noted that, according to the HapMap project and the variations found in a Mexican population residing in Los Angeles, the changes considered for rs17611, rs25681, rs992670, rs3761847, and rs10818488 were C/T, A/G, A/G, A/G, and A/G, respectively (<https://www.NCBI.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>). In addition, the minor allelic frequency of all these SNPs was up to 40% in the Mexican migrant population of Los Angeles; this allelic frequency was used as a reference since no previous studies on these SNPs have been conducted on the mestizo Mexican population.

Genotyping C5 and TRAF1 SNPs. TRAF1 (rs10818488 and rs3761847) and C5 (rs17611, rs992670, and rs25681) SNPs and their variations were detected by quantitative PCR using TaqMan predesigned probes (Applied Biosystems, Foster City, CA), i.e., C_11720402_10, C_2359571_10, C_2783709_10, C_2783655_10, and C_2783640_10 for rs17611, rs992670, rs25681, rs10818488, and rs3761847, respectively. Briefly, 20 ng of DNA

TABLE 2 Information of the selected SNPs in the *C5-TRAF1* region

Gene	SNP no.	Chromosome position (Chr9) ^a	Location	Base change	MAF ^b (%)
C5	rs17611	123769200	Missense	C/T	T/49
	rs25681	123780005	Intron	A/G	A/49
	rs992670	123781770	Intron	A/G	G/43
TRAF1	rs10818488	123705087	5' UTR	A/G	A/41
	rs3761847	123690239	Regulatory region	A/G	G/39

^aThat is, the SNP position according to the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) and the 1000 Genomes Project (<http://www.hapmap.org>).

^bFrequency of the minor allele for the Mexican population residing in Los Angeles (MXL), (<http://www.hapmap.org>).

containing 20× TaqMan genotyping master mix (Applied Biosystems), including two fluorescent probes, were used, along with allele-specific primers and AmpliTaq Gold DNA polymerase. The amplification conditions were as follows: preincubation at 60°C for 30 s, incubation at 95°C for 10 min, followed by 40 two-step cycles, one for denaturalization at 95°C for 15 s and another for hybridization-elongation at 60°C for 1 min. Data on DNA quality or SNP amplification could not be obtained for all samples.

Statistical analysis. This study was designed to evaluate the relevance of three *C5* and two *TRAF1* SNPs for the severity of the infection by *T. solium* in NCC patients with different clinical and radiological presentations. All patients who attended the INNN in the period from 2011 to 2015 on whom radiological and clinical studies were performed, who were diagnosed with NCC, and who met the inclusion criteria (most radiological and clinical information available and access to biological material to obtain appropriate samples [>20 ng of DNA/sample with $>90\%$ integrity]) were included. A total of 221 NCC patients of 700 met these inclusion criteria. The allele and genotype frequencies were determined, and an HWE analysis of all studied SNP and haplotype frequencies was performed for dominant and recessive models using SNP Analyzer 2.0 software (25). Haplotype construction and linkage disequilibrium (LD; $D' > 0.8$) analysis was performed using HAPLOVIEW 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). An association between the severity of each of the studied SNPs and the relationship between the joint contribution of the SNPs and the main clinical features of the disease were also evaluated using multiple logistic regression adjusted for age and sex for the categorical response variables (number of parasites, degenerating stage, and parasite location) and a general linear model for the continuous response variables (CSF cellularity). These analyses were performed using SPSS software (IBM Statistics, v23.0.0). Statistical significance was set at $P < 0.05$. The association of the *C5* and *TRAF1* haplotypes with disease severity was tested by Bayesian statistics for the dominant, recessive, and additive models using SNP Analyzer 2.0.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/IAI.00347-19>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the subjects who participated in this study. We especially thank Juan Francisco Rodríguez for editing the manuscript and Marisela Hernández and Andrea Toledo for technical assistance. We also thank the Unidad de Investigación at Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, for their support in the use of real-time PCR equipment.

We gratefully acknowledge the financial assistance of CONACYT to M.V. from Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM. This study was supported by CONACyT (FOSISS-272519), México.

Author contributions were as follows: conception and design, M.V., E.S., and G.F.; data acquisition, interpretation, and analysis, M.V., M.R., and G.F.; drafting of the manuscript, M.V., E.S., A.F., and G.F.; and critical revision of the manuscript, E.S., A.F., and G.F. M.V. performed the experiments.

REFERENCES

- Scitutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleite JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larraalde 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. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01336-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01336-8).
- Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Scitutto E. 2016. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunol* 38:147–157. <https://doi.org/10.1111/pim.12299>.
- Raibagkar P, Berkowitz AL. 2018. The many faces of neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 390:75–76. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.04.018>.
- Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Scitutto E, Larraalde C. 2010. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex inter-

actions among parasite, host, and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104:243–250. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.01.005>.

5. Debaqç G, Moyano LM, García HH, Boumediene F, Marin B, Ngoungou EB, Preux PM. 2017. Systematic review and meta-analysis estimating association of cysticercosis and neurocysticercosis with epilepsy. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005153. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005153>.
6. Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciuotto E. 2004. Symptomatic human neurocysticercosis: age, sex, and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 251:830–837. 2004. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0437-9>.
7. Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yáñez O, Piña J, Carrillo-Mezo R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Sciuotto E. 2006. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:551–558. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.08.008>.
8. Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G, Sciuotto E. 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 16:271–278. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.04.008>.
9. Lachuriya G, Garg RK, Jain A, Malhotra HS, Singh AK, Jain B, Kumar N, Verma R, Sharma PK. 2016. Toll-like Receptor-4 polymorphisms and serum matrix metalloproteinase-9 in newly diagnosed patients with calcified neurocysticercosis and seizures. *Medicine (Baltimore, MD)* 95:e3288. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003288>.
10. Ramirez-Aquino R, Radovanovic I, Fortin A, Sciuotto-Conde E, Fragoso-González G, Gros P, Aguilar-Delfín I. 2011. Identification of loci controlling restriction of parasite growth in experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1435. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001435>.
11. Singh A, Singh AK, Singh SK, Paliwal VK, Gupta RK, Prasad KN. 2014. Association of ICAM-1 K469E polymorphism with neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 276:166–171. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.07.018>.
12. Verma A, Prasad KN, Gupta RK, Singh AK, Nyati KK, Rizwan A, Pandey CM, Paliwal VK. 2010. Toll-like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis* 202:1219–1225. <https://doi.org/10.1086/656395>.
13. Ricklin D, Lambris JD. 2013. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol* 190:3831–3838. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203487>.
14. Karp CL, Grupe A, Schadt E, Ewart SL, Keane-Moore M, Cuomo PJ, Köhl J, Wahl L, Kuperman D, Germer S, Aud D, Peltz G, Wills-Karp M. 2000. Identification of complement factor 5 as a susceptibility locus for experimental allergic asthma. *Nat Immunol* 1:221–226. <https://doi.org/10.1038/79759>.
15. Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A, Schirin-Sokhan R, Wilkens G, Geier A, Lorenzen J, Köhl J, Gressner AM, Matern S, Lammert F. 2005. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet* 37:835–843. <https://doi.org/10.1038/ng1599>.
16. Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoecken-Rijsbergen G, van der Helm-van Mil AH, Allaart CF, Verduyn W, Houwing-Duistermaat J, Alfredsson L, Begovich AB, Klareskog L, Huizinga TW, Toes RE. 2007. A candidate gene approach identifies the TRAF1 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 4:e278. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040278>.
17. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A, Davies LR, Li W, Tan AK, Bonnard C, Ong RT, Thalamuthu A, Pettersson S, Liu C, Tian C, Chen WV, Carulli JP, Beckman EM, Altshuler D, Alfredsson L, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Klareskog L, Gregersen PK. 2007. TRAF1 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genome-wide study. *N Engl J Med* 357:1199. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073491>.
18. Carpanini SM, Torvell M, Morgan BP. 2019. Therapeutic inhibition of the complement system in diseases of the central nervous system. *Front Immunol* 10:362. 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00362>.
19. Brennan FH, Gordon R, Lao HW, Biggins PJ, Taylor SM, Franklin RJ, Woodruff TM, Ruitenberg MJ. 2015. The complement receptor C5aR controls acute inflammation and astrogliosis following spinal cord injury. *J Neurosci* 35:6517–6531. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5218-14.2015>.
20. Landlinger C, Oberleitner L, Gruber P, Noiges B, Yatsyk K, Santic R, Mandler M, Staffler G. 2015. Active immunization against complement factor C5a: a new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 12:150. 16. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0369-6>.
21. Sewell DL, Nacewicz B, Liu F, Macvily S, Erdei A, Lambris JD, Sandor M, Fabry Z. 2004. Complement C3 and C5 play critical roles in traumatic brain cryoinjury: blocking effects on neutrophil extravasation by C5a receptor antagonist. *J Neuroimmunol* 155:55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.06.003>.
22. Edilova MI, Abdul-Sater AA, Watts TH. 2018. TRAF1 signaling in human health and disease. *Front Immunol* 9:2969. 18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02969>.
23. Messemaker TC, Frank-Bertoncelj M, Marques RB, Adriaans A, Bakker AM, Dahan N, Gay S, Huizinga TW, Toes RE, Mikkers HM, Kurreeman F. 2016. A novel long noncoding RNA in the rheumatoid arthritis risk locus TRAF1-C5 influences C5 mRNA levels. *Genes Immun* 17:85–92. <https://doi.org/10.1038/gene.2015.54>.
24. Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanez Z. 2013. Genetics of rheumatoid arthritis: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45:170–179. <https://doi.org/10.1007/s12016-012-8346-7>.
25. Carpio A, Fleury A, Romo ML, Abraham R, Fandiño J, Durán JC, Cárdenas G, Moncayo J, Leite Rodrigues C, San-Juan D, Serrano-Dueñas M, Takayanagui O, Sander JW. 2016. New diagnostic criteria for neurocysticercosis: reliability and validity. *Ann Neurol* 80:434–442. <https://doi.org/10.1002/ana.24732>.
26. Yoo J, Lee Y, Kim Y, Rha SY, Kim Y. 2008. SNPAnalyzer 2.0: a web-based integrated workbench for linkage disequilibrium analysis and association analysis. *BMC Bioinformatics* 9:290. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-290>.
27. Carpio A, Romo ML. 2014. The relationship between neurocysticercosis and epilepsy: an endless debate. *Arq Neuropsiquiatr* 72:383–390. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20140024>.
28. Marcin-Sierra M, Arroyo M, Cadena-Torres M, Ramirez-Cruz N, García-Hernández F, Taboada D, Galicia-Martínez A, Govezensky T, Sciuotto E, Toledo A, Fleury A. 2017. Extraparenchymal neurocysticercosis: demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005646. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005646>.
29. Chai L, Song YQ, Zee KY, Leung WK. 2010. Single nucleotide polymorphisms of complement component 5 and periodontitis. *J Periodontol Res* 45:301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2009.01234.x>.
30. Guo L, Zheng L, Guo X, Chang Y, Zhou X, Sun Y. 2016. Single-nucleotide polymorphism rs17611 of complement component 5 shows association with ischemic stroke in northeast Chinese population. *Genet Test Mol Biomarkers* 20:766–770. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0125>.
31. Gressner O, Meier U, Hillebrandt S, Wasmuth HE, Köhl J, Sauerbruch T, Lammert F. 2007. Gc-globulin concentrations and C5 haplotype-tagging polymorphisms contribute to variations in serum activity of complement factor C5. *Clin Biochem* 40:771–775. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.02.001>.
32. Davis SW, Hammerberg B. 1990. *Taenia taeniaeformis*: evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. *Int J Parasitol* 20:587–593. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90115-4](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90115-4).
33. Kassis AI, Tanner CE. 1977. *Echinococcus multilocularis*: complement's role *in vivo* in hydatid disease. *Exp Parasitol* 43:390–395. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(77\)90045-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(77)90045-5).
34. Núñez G, Villalobos N, Herrera CP, Navarrete-Perea J, Méndez A, Martínez-Maya JJ, Bobes RJ, Fragoso G, Sciuotto E, Aguilar L, Del Arenal IP. 2018. Anti-GK1 antibodies damage *Taenia crassiceps* cysticerci through complement activation. *Parasitol Res* 117:2543–2553. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5943-2>.
35. Oyoshi MK, Barthel R, Tsetsikov EN. 2007. TRAF1 regulates recruitment of lymphocytes and, to a lesser extent, neutrophils, myeloid dendritic cells and monocytes to the lung airways following lipopolysaccharide inhalation. *Immunology* 120:303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02499.x>.
36. Lu Y, Li C, Zhang P, Shao Y, Su X, Li Y, Li T. 2013. Two adaptor molecules of MyD88 and TRAF6 in *Apostichopus japonicus* Toll signaling cascade: molecular cloning and expression analysis. *Dev Comp Immunol* 41:498–504. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.07.009>.
37. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. 1998. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281:1680–1683. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1680>.
38. Singh AK, Prasad KN, Prasad A, Tripathi M, Gupta RK, Husain N. 2013. Immune responses to viable and degenerative metacystode of *Taenia solium* in naturally infected swine. *Int J Parasitol* 43:1101–1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.009>.
39. Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. 2011. Immune responses in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis.

- Med Microbiol Immunol 200:255–261. <https://doi.org/10.1007/s00430-011-0198-x>.
40. Mahanty S, Orrego MA, Cangalaya C, Adrianzen MP, Arroyo G, Calcina J, Gonzalez AE, García HH, Guerra-Giraldez C, Nash TE. 2017. TNF- α blockade suppresses pericystic inflammation following anthelmintic treatment in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0006059. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006059>.
 41. Abdul-Sater AA, Edilova MI, Clouthier DL, Mbanwi A, Kremmer E, Watts TH. 2017. The signaling adaptor TRAF1 negatively regulates Toll-like receptor signaling and this underlies its role in rheumatic disease. *Nat Immunol* 18:26–35. <https://doi.org/10.1038/ni.3618>.
 42. Fleury A, Alaez C, Dessein A, Rosetti M, Saenz B, Hernández M, Bobes RJ, Ramírez-Aquino R, Sciuotto E, Gorodezky C, Fragoso G. 2018. No association of IL2, IL4, IL6, TNF, and IFNG gene polymorphisms was found with *Taenia solium* human infection or neurocysticercosis severity in a family-based study. *Hum Immunol* 79:578–582. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.011>.
 43. Canhão H, Rodrigues AM, Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Bettencourt BF, Cui J, Rocha FL, Canas Silva J, Polido-Pereira J, Pereira Silva JA, Costa JA, Araujo D, Silva C, Santos H, Duarte C, Cáliz R, Filipescu I, Pimentel-Santos F, Branco J, Sainz J, Plenge RM, Solomon DH, Bruges-Armas J, Da Silva JA, Fonseca JE, Karlson EW. 2015. TRAF1 but not PTPRC variants are potential predictors of rheumatoid arthritis response to anti-tumor necrosis factor therapy. *Biomed Res Int* 2015:1. <https://doi.org/10.1155/2015/490295>.
 44. Del Brutto OH, García E, Talámas O, Sotelo J. 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med* 148:544–566. <https://doi.org/10.1001/archinte.148.3.544>.

AQ:J