



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Psicología

**La microbiota intestinal como posible modulador de la
respuesta inflamatoria en un modelo de cisticercosis**

Tesis

Que para obtener el grado de
Licenciado en Psicología

Presenta

Marco Antonio Chávez Román

Director de tesis

Dra. Agnes Odile Marie Fleury



Ciudad Universitaria, CDMX, 2021



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.

INDICE

<u>Agradecimientos.....</u>	<u>1</u>
<u>Resumen.....</u>	<u>3</u>
<u>1. Antecedentes.....</u>	<u>4</u>
<u>1.1. Cisticercosis y neurocisticercosis.....</u>	<u>4</u>
<u>1.2. Modelo animal de <i>T. crassiceps</i>.....</u>	<u>8</u>
<u>1.3. La microbiota intestinal.....</u>	<u>11</u>
<u>2. Planteamiento del problema.....</u>	<u>17</u>
<u>2.1. Justificación.....</u>	<u>17</u>
<u>2.2. Pregunta de investigación.....</u>	<u>18</u>
<u>2.3. Objetivo general.....</u>	<u>18</u>
<u>2.4 Hipótesis de trabajo.....</u>	<u>18</u>
<u>3. Materiales y método.....</u>	<u>19</u>
<u>3.1. Animales.....</u>	<u>19</u>
<u>3.2. Técnicas.....</u>	<u>20</u>
<u>3.3 Procedimiento.....</u>	<u>25</u>
<u>3.4 Análisis estadístico.....</u>	<u>26</u>
<u>4. Resultados.....</u>	<u>27</u>
<u>4.1. Cargas parasitarias.....</u>	<u>27</u>
<u>4.2. Medición de citocinas.....</u>	<u>30</u>
<u>4.3. Pruebas conductuales.....</u>	<u>31</u>
<u>5. Discusión.....</u>	<u>33</u>
<u>6. Referencias.....</u>	<u>40</u>

Agradecimientos

Es increíble que de todas las partes a escribir esta fue la más difícil, creo que cada parte de una tesis tiene cierto estándar que permite facilitar su escritura, aunque en este apartado ni siquiera sé por dónde empezar, o tal vez solo sea la incertidumbre de saber que por fin todo terminó. Es complicado agradecer cuando creo que en realidad el mundo que te rodea tiene una pequeña influencia en todo lo que haces, aunque si tenemos que hacer menciones en específico creo que quienes las merecen son los siguientes:

Principalmente a mi madre, que pese a todas las dificultades que tuvo que vivir, gracias a ella tuve la oportunidad de estudiar y poder realizar todo esto. No creo poder encontrar las palabras adecuadas para agradecer por todo lo que ella ha hecho por mí, no solo como madre, sino como padre, amiga, guía, etc. Me hubiera gustado haberte dado esta satisfacción antes, pero el mundo no puede ser perfecto.

A las amigas que hice en la carrera y aún conservo. Araceli, Ruth, Karen y Mariela. Gracias por intercambiar ideas, risas, indicarme cuando me estaba equivocando y así mismo escucharme cuando más lo necesitaba, aunque siempre fui el más callado de todos. También a las personas que llegué a considerar amigos y que por “x” o “y” ya casi no hablamos, en su momento fueron alguien importante para mí. Así mismo a aquellos compañeros que puede que ni recuerde su nombre, el simple hecho de compartir aula con ellos me hacía sentirme parte de la universidad.

A la UNAM, mi segunda casa. Por menos de \$1 por semestre me diste la oportunidad de prepararme con la esperanza de tener una mejor vida. Aunque sé que en la realidad puede ser difícil “triunfar”, nada me quitará todas las experiencias que me permitiste vivir.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, por permitirme realizar mi servicio social y

posteriormente este trabajo. Gracias a la Dra. Fleury por brindarme un espacio en su laboratorio, permitirme presentarle mis ideas y posteriormente guiarme en este trabajo. A la Dra. Andrea, gracias por enseñarme todo lo que sé en cuanto a técnicas de laboratorio, manejo de animales y como llevar un protocolo de investigación. También gracias a los compañeros de laboratorio que tanto estimo e hicieron mi estadía más cómoda, Chío, Mariana y Esteban, siempre recordaré esas tardes en el laboratorio. Gracias también al Dr. Rosetti por ayudarme en gran parte de mi protocolo y prestarme su laboratorio para hacer mis pruebas conductuales.

A las personas que conocí desde antes de la carrera, Blanca, Carlos y Raúl. Espero poder seguir mencionándolos en futuros eventos y logros.

Y en general a todos aquellos que pudiera haber olvidado mencionar, pero que de una u otra forma contribuyeron a este trabajo.

Y ¿por qué no?, a las cosas materiales que me ayudaron a escribir y terminar este trabajo, al Jim Beam etiqueta negra que me acompañó en varias noches escribiendo, la música en YouTube que me ayudó a concentrarme y a la fluoxetina, que en determinado periodo de tiempo me ayudo a no abandonar este proyecto.

Resumen

La cisticercosis es un problema de salud común en países en desarrollo. Ocurre cuando la larva del parásito *Taenia solium*, invade el cuerpo de un individuo. Cuando la larva llega al sistema nervioso central (SNC), se le denomina neurocisticercosis (NCC).

Una de las características más evidentes de la neurocisticercosis humana es la heterogeneidad en la intensidad de la respuesta inmuno-inflamatoria entre pacientes. A lo largo de la vida del cisticerco, se van presentando diferentes perfiles inmunitarios, por lo regular se presenta un perfil proinflamatorio que busca eliminar al parásito, aunque en algunos casos no se llega a tener registros de este tipo de respuesta. Esto repercute en los síntomas que presentan los pacientes que padecen NCC, en algunos casos no se presentan, mientras que en otros pueden llegar a ser de gran severidad. El exceso de inflamación producida en la NCC puede generar desde dolores de cabeza y mareos, hasta incluso ser la causa de demencia o epilepsia.

El término microbiota intestinal se refiere a toda la comunidad de microorganismos que alberga el intestino, y su estudio ha suscitado mucho interés en los últimos años. Además de cumplir a nivel local con funciones de mantenimiento, se ha observado que estos organismos son relevantes para la maduración de las células del sistema inmune y pueden influir el curso de diferentes patologías. En particular, en algunos modelos animales se ha observado que mediante el uso de antibióticos se puede modificar la conformación de la microbiota intestinal, como consecuencia cambia la inmunidad del sujeto.

En este trabajo se buscó evaluar si la modificación en la microbiota intestinal por medio de antibióticos, puede ser un factor que interviene en la respuesta inmunitaria del huésped ante una infección parasitaria en el modelo de *Taenia crassiceps*. Además, se evaluó si también se modificaron los déficits cognitivos que se han descrito en dicho modelo. Se empleó el modelo de disbiosis inducida por antibióticos con la intención de depletar a la microbiota intestinal.

Nuestros resultados sugieren que la disbiosis por antibióticos podría estar implicada con el desarrollo de los cisticercos en este modelo animal, por lo que probablemente la microbiota intestinal esté relacionada. Además de la parte inmunológica, otros mecanismos podrían estar implicados con los cambios observados. También se observaron modificaciones conductuales como consecuencia de la interacción del tratamiento antibiótico y la infección. Estos resultados abren la puerta a otras investigaciones para profundizar en la relación de estas dos variables.

Palabras clave:

Neurocisticercosis, Inflamación, Disbiosis, Microbiota Intestinal, Antibióticos

1. Antecedentes

1.1 Cisticercosis y neurocisticercosis

La cisticercosis es una infección que ocurre cuando la fase larvaria del parásito *Taenia solium* invade el cuerpo de un individuo (Mahanty & García, 2010; Carpio & Fleury, 2014). El parásito puede localizarse en diferentes tejidos y órganos, frecuentemente en el tejido subcutáneo, corazón, músculo esquelético, ojos y en el sistema nervioso central (SNC) (Sciutto et al., 2000). Cuando la invasión se da en este último, se le denomina neurocisticercosis (NCC) y es la principal infección parasitaria que afecta al SNC. (Gonzales et al., 2016, Varguese et al., 2016).

1.1.1. Características del cisticerco

Las larvas de *T. solium* o cisticercos, son vesículas que se encuentran rellenas de colina, miden 0.5 - 1 centímetro de diámetro, su membrana se pliega hacia el interior formando un canal que termina en la cabeza (escólex) de lo que será una nueva tenia, es decir, la forma adulta del parásito (Del Brutto, 2014; Mahanty & García, 2010).

1.1.2. Ciclo de vida del cisticerco

La infección se da por doble huésped, uno intermedio (por lo general cerdos) que consumen los huevos del parásito, presentes en las heces fecales del huésped definitivo (humano). Los huevecillos eclosionarán y se almacenarán en la carne del cerdo, entonces cuando un humano ingiere cisticercos vesiculares (vivos) de la carne mal cocida de un cerdo infectado, el escólex se pliega hacia el exterior, gracias a la acción de enzimas digestivas o de jugos gástricos y se adhiere a la pared intestinal del humano. Después empezará a aumentar el tamaño de su cuerpo, que a su vez se dividirá en segmentos, denominados proglótides, hasta convertirse en tenia (Del Brutto, 2014). Como consecuencia el sujeto desarrolla una infección intestinal denominada teniasis (Gonzales et al., 2016). La tenia comenzará a producir huevecillos infecciosos después de 2 o 3 meses, que en su mayoría se ubicarán en los segmentos cercanos a la cola del gusano, conocidos como

proglótides grávidas. Estos se desprenden con el paso de heces fecales por el intestino, dando como resultado que dichas heces se contaminen con los huevecillos (Mahanty & García, 2010). De esta forma es como se infectan los cerdos que consuman dichas heces y como se repite el ciclo. Sin embargo, cuando el humano ingiere los huevecillos de manera accidental (el caso más común es al consumir vegetales con contaminación fecal), se volverá también hospedero intermediario y desarrollará cisticercosis (Varghese, et al., 2016). El mecanismo es el mismo que ocurre con el cerdo (Figura 1).

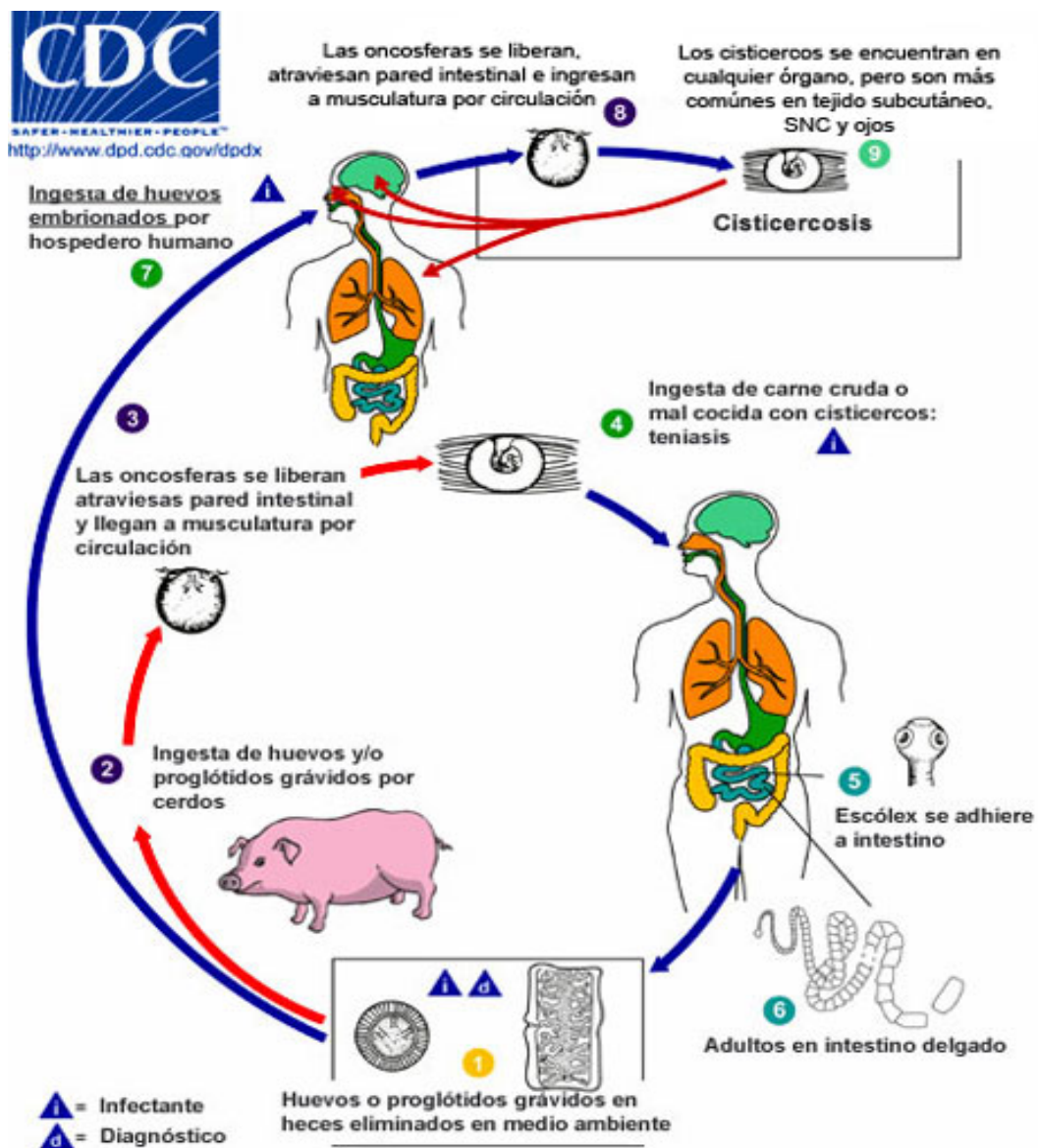


Figura 1. Ciclo de vida del parásito *T. solium*. Tomado de Center for disease control and prevention, 2017

En caso de establecerse una neurocisticercosis en el humano, se han descrito cuatro fases de desarrollo del cisticerco (Escobar, 1983). En la primera (fase vesicular), el parasito está vivo, es una vesícula que contiene una larva invaginada de 4-5 mm que se encuentra en un líquido transparente (Figura 2a). En la siguiente (fase coloidal), el cisticerco se está degenerando (Figura 2b), lo que ocasiona que libere antígenos y en consecuencia se producirá una reacción inflamatoria a su alrededor (Álvarez et al., 2002). En la tercera fase (fase nodular-granular), el tamaño del cisticerco disminuye, el líquido ha desaparecido y su membrana no puede ser identificada fácilmente. Finalmente, en la última fase (fase calcificada) se identifica un nódulo duro (Figura 2c), completamente calcificado, reducido a menos de la mitad de su tamaño original (Carpio & Fleury, 2014).

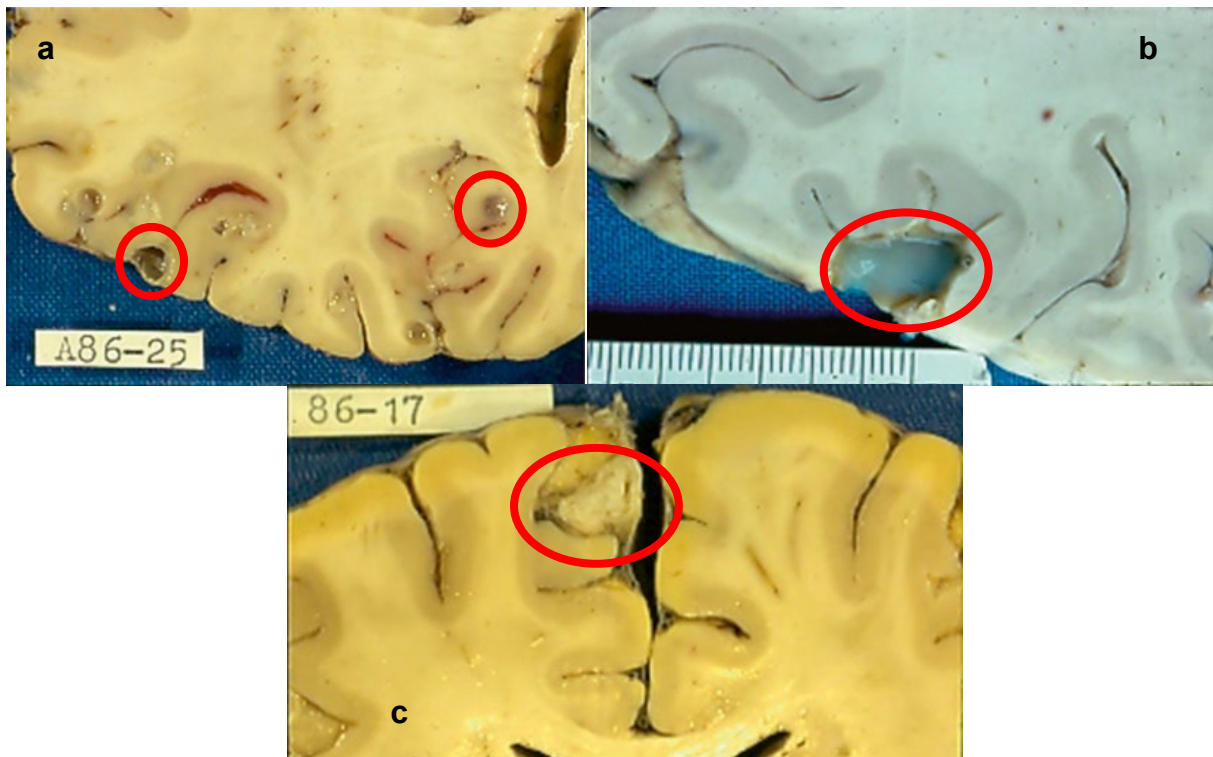


Figura 2. Ejemplos de las diferentes fases de cisticercos presentes tejido cerebral en humanos. a) Cisticerco en fase vesicular. b) Cisticerco en fase coloidal c) Cisticerco calcificado

1.1.3 Sintomatología

Las características de los síntomas en humanos dependerán de la zona en donde se desarrolle el cisticerco. En músculo estriado, incluso en el corazón, se le considera inocuo dado que no suele generar síntomas, se estima que la causa

principal de esto es que no hay repercusiones cuando el sistema inmunológico elimina al parásito en estas localizaciones (Sciutto, et. al., 2000). Sin embargo, cuando se aloja en el SNC es cuando usualmente se presentan síntomas que pueden ser de gran severidad, aunque se estima que alrededor del 50% de los sujetos son asintomáticos (Del Brutto, 2014; Gonzales, Rivera & García, 2016).

La presencia de síntomas depende del número de parásitos, la localización dentro del SNC y de la respuesta inmune del huésped. El síntoma más común es la presencia de epilepsia, ocurriendo en hasta el 79% de sujetos que presentan síntomas (Carpio & Fleury, 2014), además, la NCC es la principal causa de epilepsia en países en desarrollo (Varguese et al., 2016). También pueden presentarse mareos o dolores de cabeza, aumento en la presión intracraneal, además puede generar déficits cognitivos (Ciampi de Andrade et. al, 2010; Varguese et al., 2016, Nau et al., 2018) o en el peor de los casos ser la causa de una demencia (Del Brutto, 2014; Sciutto et al., 2000; Mahanty & García, 2010).

Dentro de las funciones cognitivas que se pueden ver afectadas en la NCC se encuentra la memoria verbal y no verbal, funciones ejecutivas, fluencia verbal y praxis constructiva (Ciampi de Andrade et al., 2010). Se ha encontrado que un mayor número de lesiones y el estadio del cisticerco en fase vesicular disminuye el puntaje en pruebas neuropsicológicas que evalúan estas funciones (Varguese et al., 2016).

1.1.4. Inmunología y neurocisticercosis

En la neurocisticercosis ocurre una respuesta inmunitaria que se asocia con la presencia y severidad de los síntomas. Los linfocitos T se encargan de eliminar microbios en el interior de las células o eliminar por completo a las células infectadas para evitar que la infección se propague (Abbas, 2015). En los pacientes con síntomas se da una respuesta celular de tipo Th1, en ella, los linfocitos T secretan citocinas proinflamatorias para dañar al parásito (Chavarría et al., 2005; Mahanty & García, 2010). En cambio, las personas que son asintomáticas tienden a presentar una respuesta inmunológica celular tipo “Th2”, asociada con la secreción de

citocinas tanto inflamatorias como antiinflamatorias dando como resultado una respuesta reguladora (Chavarría et al., 2003; Chavarría et al., 2006; Abbas, 2015; Mahanty & García, 2010). Ambas respuestas inmunológicas se observan tanto en la sangre periférica como en el tejido cerebral de los sujetos afectados (Fleury et al., 2016). Aunque se ha visto que la edad y el sexo pueden estar relacionados con la activación entre una respuesta y otra, aún se desconoce de que depende que haya una respuesta tipo Th1 o Th2 (Fleury et al., 2016).

Aunado a lo anterior, la respuesta inflamatoria se relaciona con la etapa del desarrollo del cisticerco. Cuando el parásito está en fase vesicular, se observa un discreto incremento en linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en su alrededor (Escobar, 1983). Durante la fase coloidal, cuando el cisticerco está en degeneración, el número de estas células incrementa y existe una respuesta de tipo Th1, con aumento en las citocinas IL-2, IL-6, IL-12 e IFN- γ (Restrepo et al., 1998). En el siguiente estado, el granular, las citocinas del estado Th1 aún son prevalentes, aunque se presentan también citocinas del estado Th2 como IL-4, IL-13 e IL-10. Durante estas dos últimas fases existe una activación de las células gliales, en particular de los astrocitos y de la microglía. De acuerdo con Álvarez et. al. (2002), en presencia de los antígenos liberados a causa de la degeneración del parásito, la microglía expresa un fenotipo que promueve una respuesta citotóxica similar al tipo Th1, al aumentar la secreción de IFN- γ , secundando esto, se observa que aumenta el número y el tamaño de los astrocitos, se cree que este efecto es un mecanismo que en un inicio promoverá la respuesta proinflamatoria, para después tratar de regular y recuperar la homeostasis en el tejido cerebral (Sikasunge et al., 2009). Finalmente, el cisticerco se calcificará y la reacción inflamatoria desaparecerá dejando frecuentemente una gliosis alrededor del parásito (Fleury et al., 2016).

1.2 Modelo animal de *Taenia crassiceps*

Dada la dificultad para estudiar las causas en la infección por *T. solium* en humanos, principalmente relacionado con la variabilidad en el estilo de vida de los pacientes, se ha recurrido al uso de modelos animales (Mahanty y García, 2010).

Entre estos destaca el uso de *Taenia crassiceps*. La infección por el parásito de *T. crassiceps* afecta principalmente a otras especies, por lo regular el huésped intermedio son roedores salvajes, mientras que el huésped definitivo son zorros rojos, lobos y perros (Bush et al., 2001). Sin embargo, se han presentado casos en donde los humanos se han infectado con esta cepa de parásitos (Schmid et al., 2013). El ciclo de vida es similar al que ocurre con *T. solium*, los roedores ingieren al parásito a través del medio ambiente y después un depredador al ingerir al ratón se infecta con el parásito (Willms & Zurabian, 2009).

Una de las características más importantes de *T. crassiceps* es su plasticidad genética, pues cuando está en el cuerpo del huésped intermedio es capaz de modificarse para reproducirse de manera asexual por medio de gemación, sin llegar a la fase adulta (Willms & Zurabian, 2009). Dada su capacidad de reproducción por gemación, el uso de *T. crassiceps* es práctico al poder mantener varias generaciones del parásito en un laboratorio. Así mismo, no resulta caro ni complicado poder trabajar con él y permite describir claramente las interacciones huésped-parásito, desde perspectivas biológicas, genéticas, inmunológicas y farmacológicas (Sánchez, 2006; Terrazas, 2008).

Aunque en el modelo experimental, la infección no tiene una causa natural, o sea el roedor no ingiere al parásito, sino se le inyecta, es muy útil para hacer observaciones en determinados intervalos de tiempo a lo largo de la infección. La similitud que se observa en este tipo de infección y la ocasionada por *T. solium* ha permitido comprender mejor los mecanismos inflamatorios que ocurren durante la cisticercosis en humanos, dado que los antígenos que libera *T. crassiceps* inducen el mismo tipo de respuesta inflamatoria que ocurre con la neurocisticercosis en humanos (Terrazas, 2008; Sánchez, 2006; Mahanty & García, 2010). Sin embargo, este modelo murino no permite estudiar la parte neurológica de forma directa por ser una infección intraperitoneal (Mahanty & García, 2010).

Como ocurre con la *T. solium*, el modelo *T. crassiceps* produce una respuesta inmune inicial de tipo Th1, y conforme aumenta el tiempo de la infección, la

respuesta se vuelve más dirigida hacia el tipo Th2 a las 3-4 semanas de la infección (López, 2013). Se ha observado que la respuesta Th1 se asocia con una resistencia al crecimiento parasitario (Terrazas, 2008). Durante este periodo pro inflamatorio se observan altos niveles de IFN- γ además de macrófagos activados que producen IL-12 y óxido nítrico (Rodríguez-Sosa et al., 2002). Tiempo después, junto al incremento en la carga parasitaria se observa una respuesta Th2, en donde, disminuyen los niveles de IFN- γ e IL-12, mientras que las IL-4, IL-13 e IL-5 aumentan drásticamente (Terrazas, 2008).

1.2.1 Alteraciones conductuales en el modelo *T. crassiceps*.

Debido a que *T. crassiceps* no afecta directamente al sistema nervioso, casi no hay investigaciones que relacionen a este modelo con alteraciones conductuales. Sin embargo, dentro de los pocos estudios hechos al respecto, Morales-Montor y colaboradores (2014), encontraron que los ratones con una infección de 6 meses, disminuyen su desempeño en la prueba de objeto novedoso (prueba relacionada con la memoria de reconocimiento), dicho cambio se asocia con un aumento de citocinas pro inflamatorias (IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ y TNF- α) en el hipocampo. Por otro lado, Zepeda et al. (2017) observaron en ratones infectados con este parásito, un aumento en el número de células apoptóticas en las tres capas del giro dentado y en las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, tras 45 días de infección. A los 110 días de infección (Zepeda et al., 2018), persistía el aumento de células apoptóticas en las regiones previamente mencionadas, y se observó una disminución en el desempeño de la tarea de laberinto de Barnes asociada con memoria espacial. Estos estudios, sugieren que el hipocampo es una estructura que se ve afectada en este modelo, y como consecuencia, hay repercusiones en la memoria de reconocimiento y espacial.

1.2.2 Alteraciones conductuales en otros modelos de inflamación periférica.

Aunado a los estudios anteriormente mencionados, en otros modelos de inflamación periférica, se han visto repercusiones similares al modelo de *T.*

crassiceps. Por ejemplo, Campos y cols. (2016), encontraron que al administrar LPS en ratones por vía intraperitoneal, hay un aumento en los niveles de TNF- α en el hipocampo, acompañado con la expresión del marcador Iba-1, el cual indica activación de la microglía, en esa zona. Conductualmente, este fenómeno se ve asociado con conductas depresivas como inmovilidad en el test de suspensión de cola y un índice de preferencia disminuido en la prueba de preferencia a la sacarosa, lo cual se asocia con anhedonia. Por otro lado, Di Filippo y colaboradores (2013) realizaron un estudio donde administraron a dos grupos las bacterias *M. tuberculosis* y *M. butyricum*. Al primer grupo también se le administró un conjunto de antígenos específicos al SNC con el fin de simular encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), modelo similar a la esclerosis múltiple en humanos; mientras que al segundo grupo solo se le administraron las bacterias para observar un fenómeno de inflamación periférica. Los autores reportaron que en ambos grupos hubo una intensa reacción de la microglía en la capa CA1 del hipocampo comparando con un tercer grupo control, además no hubo diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. Además de observar este marcador inflamatorio, se buscó inducir LTP en algunas rebanadas de la zona hipocampal de estos roedores. Se encontró que la capacidad de producción de LTP se veía reducida en ambos grupos experimentales, mientras que el grupo control produjo un LTP robusto. Considerando que el LTP es un proceso que se asocia con un adecuado desempeño en tareas de memoria (Morris et al., 1986), podría sugerirse que en este modelo de inflamación periférica también podría verse afectado el desempeño en la memoria, por lo que parece ser que el hipocampo no solo es susceptible a daños en el modelo de *T. crassiceps*, si no que en general a la inflamación crónica incluso si tiene su origen en la periferia.

1.3 La microbiota intestinal

El término microbiota es relativamente nuevo y se ha ido modificando conforme avanza el tiempo. El primero en hacer referencia a esta comunidad de microorganismos fue Joshua Lederberg con el término “microbioma”, definiéndolo como “la comunidad ecológica de microorganismos comensales, simbióticos y

patógenos que literalmente comparten nuestro espacio corporal” (Lederberg & McCray, 2001, citado en The National Institutes of Health Microbiome Human Project Working Group, 2009). En estudios más recientes, Wang y Kasper (2014), emplean el término microbiota o microflora, para referirse a todos aquellos microorganismos ubicados en un hábitat o comunidad en particular, mientras que microbioma, refiere al grupo de genes asociado a dichos organismos.

Se estima que la cantidad de microorganismos en el cuerpo de un humano adulto es de 10 a 100 trillones, de las cuales, el 80% se encuentra en el intestino (Wang & Wang, 2016). Estos microorganismos coexisten en un balance con el sistema inmunológico de su huésped (Pandiyani et al., 2019). Las bacterias, principalmente bacterias anaeróbicas, dominan este ambiente, donde predominan dos phylum *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, y las cantidades de *Proteobacteria*, *Actinomyces*, *Fusobacteria*, y *Verrucomicrobia* son relativamente pequeñas, además de existir otros organismos como virus, protozoarios, arqueas y hongos (Wang & Wang, 2016; Pandiyani et al., 2019).

En el medio intestinal la microbiota puede cumplir con diferentes funciones como participar en la barrera intestinal a modo de protección contra patógenos, estimular la regeneración de células epiteliales, producir moco y nutrir a la mucosa produciendo ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), inducir la producción de inmunoglobulina A secretora (sIgA), con el fin de disminuir la penetración de bacterias externas a los tejidos, y aportar nutrientes metabolizando componentes en la dieta difíciles de digerir. Además, más recientemente, se ha mostrado que existe otra función muy importante, contribuyendo a la maduración del sistema inmunológico tanto en la protección del intestino como en todo el cuerpo del individuo (Wang & Kasper, 2014; Wang y Wang, 2016; Pandiyani et al., 2019; Wang, Mónaco & Donovan, 2016).

1.3.1 Microbiota intestinal y respuesta inmunológica

El establecimiento de la microbiota intestinal en periodos postnatales es importante para el desarrollo sano del sistema inmunológico en el tracto intestinal.

Así mismo, el sistema inmune es importante para mantener un equilibrio homeostático entre el sujeto y los agentes en su interior, entre ellos la microbiota intestinal (Rescigno, 2014). En etapas posteriores, la microbiota intestinal y el sistema inmunológico desarrollan una relación más estrecha (Wang, Mónaco & Donovan, 2016). Es gracias a la gran cantidad de microorganismos y a la complejidad en su distribución, que el medio intestinal permite la maduración de diversas células inmunes como basófilos, macrófagos y las inmunoglobulinas de las células B (Rescigno, 2014)

En cuanto a la maduración y diferenciación en la respuesta de los linfocitos T, se ha descrito que de forma individual cada uno de los taxones bacterianos albergados dentro del medio intestinal participan de forma específica en su maduración. Por ejemplo, de acuerdo con Cervantes-Barragán et al. (2017), cada tipo de bacteria intestinal permite generar la diferenciación en el tipo de respuesta de las células T vírgenes (o sea que aún no se han especializado), por ejemplo, las bacterias segmentadas filamentosas predisponen a las células T a convertirse en células con un tipo de respuesta Th17 (segregan citocinas proinflamatorias).

En el caso de uno de los géneros bacterianos con mayor presencia en el intestino, los bacteroides (pertenecientes al phylum *Bacteroidetes*), se ha observado que su disminución repercute principalmente en la homeostasis entre las respuestas tipo Th1 y Th2 de los linfocitos T (Troy & Kasper, 2010). Se ha descrito que las bacterias *Bacteroides fragilis* y *Faecalibacterium prausnitzii*, inducen a las células T a convertirse en T CD4⁺ secretoras de IL-10, asociada a una respuesta Th2 (Cervantes-Barragán et al., 2017). En el caso de las *Bacteroides fragilis*, estas liberan una molécula llamada polisacárido A, el cual es el principal involucrado en la maduración de las células T para producir respuestas tipo Th1/Th2 (Rescigno, 2014; Troy & Kasper, 2010).

Se hace un breve resumen de lo antes descrito en la siguiente tabla de revisión:

Tipo de bacteria	Efecto	Fuente
Segmentada Filamentosa (SFB)	Linfocito T virgen predispuesto a convertirse en Th17.	Cervantes-Barragán et al., 2017
Género “Bacteroides”	Mantienen la homeostasis entre la respuesta Th1 y Th2.	Troy & Kasper, 2010
<i>Bacteroides Fragilis/Faecalibacterium prausnitzii</i>	Inducen a las células t a segregar IL-10, asociado a respuesta Th2.	Cervantes-Barragán et al., 2017
<i>Bacteroides Fragilis</i>	Liberan polisacárido A, el cual contribuye a la maduración de las células T para producir respuestas Th1/Th2	Rescigno, 2014; Troy & Kasper, 2010

Tabla 1. Aportes de algunas bacterias en la maduración del sistema inmunológico

1.3.2 Modelos animales para el estudio de la microbiota intestinal

Los principales hallazgos sobre las relaciones entre la microbiota intestinal y los diferentes componentes del sistema inmune han sido gracias a los estudios con roedores. Para estudiar la relevancia de la microbiota intestinal, el modelo más utilizado es el modelo murino “Germ-Free” (GF), modelo que permite estudiar la interacción entre los microorganismos intestinales y el hospedero (Al-Asmakh & Zadjali, 2015). Los animales GF se caracterizan por no contar con microorganismos como hongos, bacterias y virus desde su nacimiento, y con el mantenimiento adecuado permanecen con esta condición a lo largo de su vida (Al-Asmakh & Zadjali, 2015; Kennedy, King & Baldrige, 2018). Este modelo es útil para observar los efectos de la ausencia de microorganismos en el intestino, así como los efectos que puede tener alguna bacteria o microorganismo en particular, al poder recolonizar el intestino del sujeto de forma selectiva (Grover & Kashiap, 2014, Kennedy, King & Baldrige, 2018). Se ha visto que la ausencia de la microbiota

intestinal hace a estos sujetos más propensos a infecciones, lo cual se asocia con una respuesta ineficiente del sistema inmunológico (Al-Asmakh & Zadjali, 2015).

Utilizando este modelo, se ha podido estudiar las relaciones entre la ausencia de microbiota intestinal y distintas patologías, en particular las autoinmunes y las enfermedades con componente inflamatorio. Por ejemplo, un estudio hecho por Singh et al. (2016), reveló que la inducción de un modelo de isquemia cerebral en ratones C57BL/6J, indujo cambios en el medio intestinal, relacionado con la severidad de la lesión. A su vez, describieron que un trasplante de heces fecales de un sujeto con isquemia severa (C57BL/6J) a otro GF sano, predispone al sujeto GF a un mayor daño cerebral cuando se le induce isquemia. Por el contrario, un trasplante de materia fecal de un sujeto sano (C57BL/6J) a otro GF a quien se le aplicó el modelo de isquemia, revirtió los efectos del daño secundario que se produce por inflamación en la isquemia, por lo que el tamaño de la lesión isquémica disminuyó.

Así mismo, un estudio sugiere que los ratones GF no desarrollan encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), modelo utilizado para estudiar la esclerosis múltiple (Berer et al., 2011, citado en Wang y Kasper, 2014). En dicho artículo se observó que las manifestaciones clínicas características de los ratones con EAE no se presentan en el modelo GF. Se hipotetiza que sea en relación con la disminución de la respuesta inmunológica característica del modelo GF (Al-Asmakh & Zadjali, 2015). Además, se ha visto que los ratones GF tienen una deficiencia en las respuestas Th1/Th2, la cual es capaz de recuperarse cuando se recoloniza a los ratones con *Bacteroidetes fragilis* (Troy & Kasper, 2010).

Pese a que el modelo GF es el más característico para estudiar la relación entre la microbiota intestinal y otros procesos en el hospedero, resulta muy complicado de utilizar dado que para la producción y el mantenimiento de esta cepa, se necesitan instalaciones especializadas además de un constante monitoreo por medio de técnicas de cultivo, microscopía y de detección de ADN, con el fin de evitar la contaminación (Kennedy, King & Baldrige, 2018). Además, existe la posibilidad

de que el sujeto desarrolle mecanismos compensatorios que frenen los déficits fisiológicos como consecuencia de la ausencia crónica de los microorganismos intestinales (Fröhlich et al., 2017). La alternativa empleada por varios investigadores es el modelo de disbiosis inducida por antibióticos. El término disbiosis hace referencia a una alteración en el balance de la microbiota intestinal (Wang y Kasper, 2014), por lo que dicho modelo se caracteriza por la depleción o disminución de las bacterias intestinales a través de la administración continua de un tratamiento antibiótico (Kennedy, King & Baldrige, 2018). Mientras los ratones GF tienen varias deficiencias en muchos aspectos del desarrollo, en particular en el sistema inmunológico desde edades tempranas; el modelo con tratamiento antibiótico permite observar como la modificación de las bacterias intestinales repercute en el mantenimiento y la funcionalidad de las células inmunes del ratón adulto cuyo desarrollo fue normal (Wang, Mónaco & Donovan, 2016; Al-Asmakh & Zadjali, 2015; Kennedy, King & Baldrige, 2018). Aunado a lo anterior, otras de las ventajas del modelo de disbiosis inducida por antibióticos es la reducción del costo de mantenimiento de los sujetos, pues no se necesita un constante monitoreo para evitar la contaminación y puede ser aplicable para cualquier cepa de ratón (Kennedy, King & Baldrige, 2018). Sin embargo, la principal desventaja de este modelo es que después del tratamiento aún habrá presencia de microorganismos intestinales, por lo que se busca la combinación de varios antibióticos para reducir en la mayor medida de lo posible la cantidad de estos (Fröhlich, et al., 2017, Xu et al., 2017).

En cuanto a las repercusiones que ocasiona el modelo por disbiosis inducida al sistema inmunológico, Xu y colaboradores (2017), realizaron un estudio donde administraron un tratamiento antibiótico por 14 días, posteriormente indujeron un tumor en estos animales, se observó que los animales a los que se les administró el tratamiento, disminuyeron de forma significativa sus citocinas de tipo Th1 (proinflamatorias) y en consecuencia el tumor tuvo un mejor desarrollo, el peso y tamaño del tumor aumentó de forma significativa comparando con el grupo al que solo se le administró agua. Otro estudio hecho por Ochoa Reparaz et al. (2009), mostró que disminuir la cantidad de microorganismos en el intestino, por medio de

antibióticos, fue suficiente para prevenir que los ratones desarrollen encefalomiелitis autoinmune experimental, tal como se observa en los ratones GF a los que se les induce este modelo (Berer et al., 2011 citado en Wang & Kasper, 2014), además los animales con el tratamiento antibiótico presentaron una disminución en la población linfocitaria y en las citocinas secretadas por estos.

En ambos modelos animales se observa una disminución de la respuesta proinflamatoria, asociada a las citocinas producidas por el perfil Th1 de los linfocitos T, lo que demuestra la estrecha relación que hay entre la microbiota intestinal y la respuesta inmune.

2. Planteamiento del problema

En la neurocisticercosis, la intensidad de la respuesta inflamatoria modula la sintomatología y la degeneración parasitaria. Se ha mostrado que la edad y el sexo de los pacientes pueden modificar la intensidad de la inflamación durante la infección (Fleury et al., 2010; Fleury et al., 2016), sin embargo, estos dos factores no son suficientes para poder explicar la heterogeneidad en los síntomas de esta enfermedad, por lo que es necesario estudiar que otros factores pudieran estar implicados.

2.1. Justificación

Se ha observado que el estado de la microbiota intestinal puede repercutir en el desarrollo de diferentes patologías por medio de la modulación de la respuesta inflamatoria, sin embargo, por el momento no se han evaluado las posibles interacciones entre el estado de la microbiota intestinal y la cisticercosis. Considerando que la reacción inflamatoria asociada a la infección por *T. solium* comparte mecanismos de acción con la infección por *T. crassiceps*, se pretende estudiar la relación entre la modificación de la microbiota intestinal (por medio de antibióticos) y la respuesta inflamatoria en dicho modelo.

2.2. Pregunta de investigación

¿Qué efectos tiene la modificación de la microbiota intestinal sobre la cisticercosis murina por *T. crassiceps*?

2.3. Objetivo general

Determinar qué efectos tiene la modificación de la microbiota intestinal sobre la cisticercosis murina por *T. crassiceps*.

2.3.1. Objetivos específicos

- Evaluar si la cantidad de parásitos por *T. crassiceps* cambia con la modificación en la cantidad de bacterias intestinales
- Evaluar si las citocinas asociadas a la infección por *T. crassiceps* cambian con la modificación en la cantidad de bacterias intestinales.
- Evaluar si los déficits en la memoria característicos en la infección por *T. crassiceps* cambian con la modificación en la cantidad de bacterias intestinales.

2.4. Hipótesis de trabajo

1. La disminución de la población bacteriana intestinal por medio de antibióticos se asociará con un aumento en el número de cisticercos en la cavidad peritoneal.
2. La disminución de la población bacteriana intestinal por medio de antibióticos disminuirá la intensidad de la respuesta proinflamatoria asociada a la infección por *T. crassiceps*.
3. La disminución de la población bacteriana intestinal, revertirá los efectos característicos en el desempeño en tareas de memoria en la infección por *T. crassiceps*.

2.4.1. Hipótesis estadísticas

1. H₀: La administración de un tratamiento con antibióticos que disminuye la población bacteriana intestinal no se asocia con un aumento del número de cisticercos en la cavidad peritoneal.
H₁: La administración de un tratamiento con antibióticos que disminuye la población bacteriana intestinal se asocia con un aumento del número de cisticercos en la cavidad peritoneal.
2. H₀: La disminución de la población bacteriana intestinal no disminuye la intensidad de la respuesta inmuno-inflamatoria asociada a la infección por *T. Crassiceps*.
H₁: La disminución de la población bacteriana intestinal disminuye la intensidad de la respuesta inmuno-inflamatoria asociada a la infección por *T. Crassiceps*.
3. H₀: La disminución de la población bacteriana intestinal, no tiene repercusiones sobre los efectos característicos de la infección por *T. crassiceps* en el desempeño en tareas de memoria.
H₁: La disminución de la población bacteriana intestinal, revierte los efectos característicos de la infección por *T. crassiceps* en el desempeño en tareas de memoria.

3. Materiales y método

3.1 Animales

Se utilizaron 40 ratones hembra (5-6 semanas) de la cepa Balb/c Ann. Los animales fueron proporcionados por la unidad de modelos biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Tras la obtención de los animales, se les colocó en cajas con condiciones de esterilidad, en una sala con temperatura controlada y un ciclo 12 horas luz/12 horas oscuridad (luz de 6:00 AM a 6:00 PM). Los animales fueron mantenidos en un periodo de habituación de una semana, previo a los experimentos. Durante este periodo, los animales tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*, ambos esterilizados. Los experimentos fueron llevados a

cabo de acuerdo a lo establecido en la norma oficial mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

3.2 Técnicas

3.2.1. Inducción del modelo *T. crassiceps*.

Se obtuvieron larvas del parásito de *T. crassiceps* (cepa ORF) de un ratón donante con 8 semanas de infección. Diez larvas (de aproximadamente 2 mm de diámetro), fueron suspendidas en 0.5 ml de solución salina isotónica estéril y se les inyectó a los sujetos de los grupos correspondientes por vía intraperitoneal usando una aguja con un calibre de 0.25 mm de ancho (exceptuando a los sujetos control, a los cuales solo se les inyectó solución salina isotónica).

3.2.2. Tratamiento antibiótico

Se disolvieron 150 mg de ampicilina (ampicillin sodium salt, Sigma-Aldrich, no. cat. A9518), 40 mg de vancomicina (vancomycin hydrochloride from *Streptomyces orientalis*, Sigma-Aldrich, no. cat. 4747) y 150 mg de neomicina (neomycin trisulfate salt hydrate, Sigma-Aldrich, no. cat. N5285), en 150 ml de agua esterilizada y se colocó en los bebederos de los grupos correspondientes. El agua con el tratamiento antibiótico fue cambiada cada 3 días. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a este tratamiento durante 10 días (los sujetos control tuvieron acceso a agua esterilizada). La composición del tratamiento está basada en los resultados obtenidos por Fröhlich et. al. (2017), Zarrinpar et. al. (2018) y Xu et. al. (2017), quienes, por medio de estos fármacos, consiguen una modificación en la población bacteriana del intestino, particularmente la disminución de *bacteroidetes* y *firmicutes*.

3.2.3. Evaluaciones conductuales

3.2.3.1. Tarea de reconocimiento de objetos

Es una tarea en donde se evalúa la memoria de reconocimiento, dicha memoria se asocia con el hipocampo. Consiste en tres fases, una de habituación, una de adquisición y otra de evocación. La prueba se distribuyó en 2 días, en el primer día se llevó a cabo la fase de habituación, mientras que en el segundo se hicieron la fase de adquisición y de evocación. Previo a la fase correspondiente, los ratones fueron habituados por 1 hora, a una intensidad de luz de aproximadamente 12 lux. Durante la fase de habituación, se puso al animal en una caja de 40x40x30 cm. Se dejó al animal explorar libremente por un periodo de 8 minutos. En la siguiente fase, la de adquisición, se metió al animal en la caja utilizada previamente, sin embargo, la caja contenía dos objetos idénticos ($A \times A$), los cuales, estuvieron colocados en esquinas opuestas de la caja. Entre cada ensayo se cambió la localización de los objetos y se limpió cada objeto con alcohol al 70%, para evitar pistas olfativas. El animal fue libre de explorar ambos objetos por un periodo de 8 minutos y el ensayo fue grabado por medio de una cámara de video. Se registró el tiempo que el animal exploró cada objeto, se consideró esto cuando la nariz estuviera direccionada hacía el objeto y no hubiera una distancia mayor a 2 cm entre el ratón y el objeto, o cuando las patas delanteras del animal estuvieran en contacto con el objeto. Una hora después de la fase de adquisición se hizo la fase de evocación, de igual forma, se lavaron los objetos empleados con alcohol al 70%. En la fase de evocación, se reemplazó a uno de los objetos con uno nuevo ($A \times B$) y se colocaron en la misma ubicación en la que estuvieron durante la fase de adquisición. Se regresó al animal a la misma caja y se volvió a grabar la exploración del animal por 8 minutos. Se registró el tiempo que exploró cada objeto, el criterio de exploración fue el mismo que en la fase anterior. Los videos fueron analizados por medio del software Boris versión 7.4.5 para Windows (Friard & Gamba, 2016). En esta prueba, una disminución en el tiempo de exploración del objeto nuevo (B) se asocia con déficits en la memoria a corto plazo.

3.2.3.2. Laberinto de Barnes

Esta prueba es empleada para evaluar memoria espacial en roedores. Para ello fue empleada una plataforma circular de 120 cm de diámetro y 80 cm de altura, con 20 agujeros de 5 cm de diámetro, ubicados a 2 cm del borde (Fig. 3). Uno de los agujeros se conectaba con una cámara de escape. Para motivar al animal a ingresar a esta cámara, se utilizó a modo de reforzador negativo una luz intensa junto con ruido blanco a aproximadamente 70 decibeles. Ambos estímulos se presentaron a lo largo de cada ensayo y se retiraban en cuanto el animal ingresara a la cámara de escape.

La prueba tuvo una duración de 9 días. Previo a comenzar cada fase, todos los roedores fueron habituados a la oscuridad por 1 hora. En el primer día se hizo una fase de habituación a la cámara de escape, se colocó al animal en el centro de la plataforma, e inmediatamente se le dirigió hacia la ubicación de la cámara de escape, en donde permaneció por 2 minutos. Un segundo ensayo de este tipo fue llevado a cabo 2 horas después, durante este, se le permitía la exploración de la plataforma por un minuto, previo a dirigirlo al agujero correcto. De igual forma el animal permaneció dos minutos en la cámara de escape.

Del día 2 al día 8 cada ratón tuvo dos ensayos de entrenamiento con una duración de 3 minutos, el ensayo consistió en poner al animal en el centro de la plataforma y observar si podía ingresar al agujero correcto en un tiempo menor a ese lapso, en caso contrario se le dirigía a la cámara de escape pasados los 3 minutos. Se dejaba al animal en la cámara por 30 segundos. La ubicación de la cámara fue diferente a los ensayos de habituación y fue la misma para todos los grupos. Para evitar pistas olfativas se limpiaba a la plataforma con alcohol al 70% entre cada ensayo, y cada 3 ensayos se rotó a la plataforma sin modificar la localización de la cámara de escape. El lapso entre cada ensayo fue de 2 horas. Se registró el tiempo en que el ratón tardó en encontrar y en ingresar al agujero, así como el número de errores antes de encontrar el agujero correcto. El total de ensayos de entrenamiento fue 14.

En el día 9, se llevó a cabo el ensayo de prueba. En este caso se retiró la cámara de escape. Se le dejó al animal explorar la plataforma por 90 segundos. Para el registro, se dividió al laberinto en 4 cuadrantes. El tiempo en que el animal tardó en encontrar el agujero blanco y el tiempo que pasó en el cuadrante de este agujero (Fig. 3) fueron registrados. El análisis del video fue hecho mediante BORIS versión 7.4.5 para Windows (Friard & Gamba, 2016).

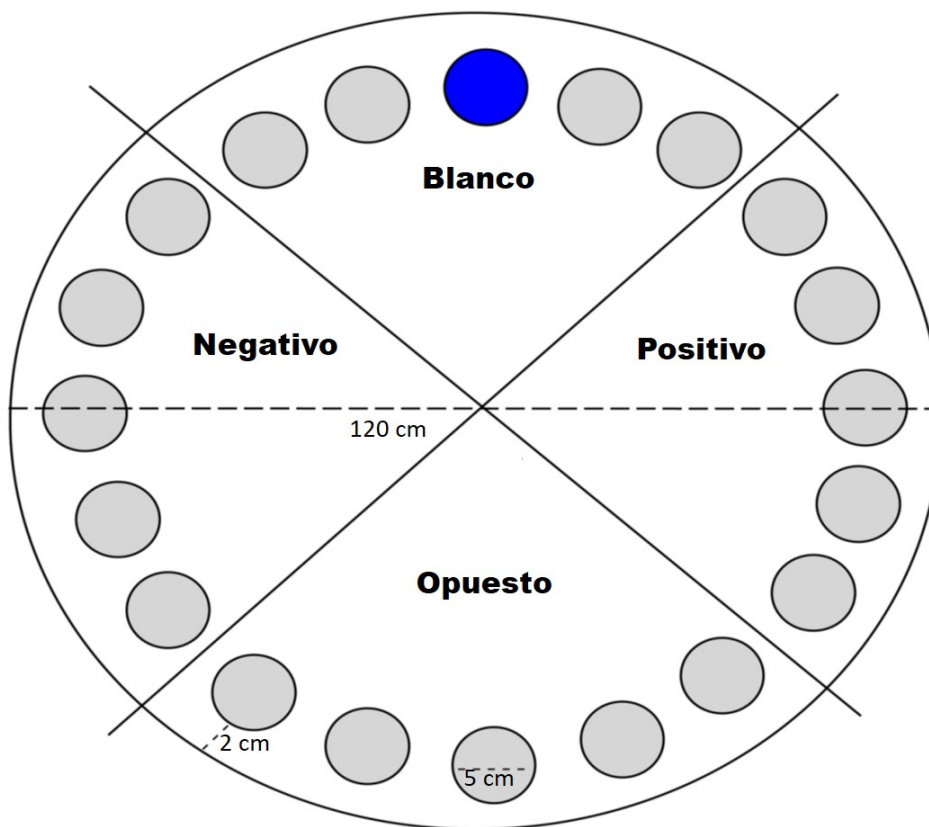


Figura 3. Esquema del laberinto de Barnes con división de cuadrantes. Figura de Attar et. al, 2013

3.2.4. Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA)

Esta técnica inmunológica se utilizó para determinar los niveles de las citocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ , en la sangre de los sujetos. Para ello, se utilizaron los kits "ELISA MAX" de Biolegend, específicos para cada una de estas en roedores. En una placa de plástico con 96 pozos (NUNC "MaxiSorp", Biolegend, no. cat. 423501), se colocó 100 μ l de una dilución (1:10) del anticuerpo de captura específica

para cada citocina a medir, y buffer de Carbonatos (8.4g NaHCO₃, 3.56g Na₂CO₃, pH 9.5), en cada pozo y se le dejó reposar durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Pasado este periodo, se hicieron 4 lavados a la placa, con 300 microlitros de PBS 1x (8.0g NaCl, 1.16g Na₂HPO₄, 0.2g KH₂PO₄, 0.2g KCl, pH 7.4) + Tween-20 0.05% con la ayuda de un lavador de placas (Wellwash, Thermo Scientific). Posteriormente se llevó a cabo el bloqueo de la placa utilizando buffer de bloqueo (PBS 1x + Suero fetal bovino 10%) durante una hora a temperatura ambiente, con 400 rpm de agitación. Pasado este periodo se volvió a hacer el mismo proceso de lavado y se adicionó la muestra obtenida de los ratones, haciendo diluciones 1:2, en caso de que el volumen de la sangre no fuera suficiente, la dilución utilizada fue 1:4. El diluyente empleado fue el buffer de bloqueo. Adicionalmente se colocó en la placa la curva estándar para cada una de las citocinas, las cuales se diluyeron con el buffer antes mencionado. Tanto las muestras como la curva estándar fueron incubadas por dos horas. Posteriormente, se repitió el proceso de lavado y se agregó un anticuerpo de detección (específico para cada citocina). Se incubó por una hora, se hicieron cuatro lavados y se agregó Avidina-Peroxidasa de rábano con un tiempo de incubación de 30 minutos. Finalmente se hicieron 5 lavados con un periodo de 45 segundos entre cada lavado y se adicionaron 100 µl sustrato TMB (Tetrametil-benzidina). Después de 20 minutos se detuvo a la reacción con ácido sulfúrico 5% (H₂SO₄) y se leyó la absorbancia (450 nm) producida, por medio de un espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo Scientific). Cada una de las incubaciones se hicieron a temperatura ambiente y con un agitador de placas.

3.2.5. Conteo parasitario

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, se fijó a cada ratón en una tabla de operación para hacer un corte en la cavidad peritoneal, se administraron 10 ml de solución salina 0.9% con una pipeta de bulbo con el propósito de lavar esta zona, los parásitos fueron recuperados de la cavidad peritoneal y almacenados en tubos de 50 ml. Tras obtener todos los parásitos de cada uno de los sujetos, se procedió a contar de forma manual, la cantidad de cisticercos en cada tubo. Para ello, se vertió el interior del tubo en una caja de Petri

y con la ayuda de una pipeta, se fue contando uno por uno a los cisticercos. Además de contar el número total de los parásitos, se les dividió acorde a su morfología, es decir, si el parásito estaba gemado o no gemado. Se consideró que un parásito estaba gemado cuando presentó protuberancias en su membrana.

3.3. Procedimiento

Los animales se dividieron en 4 grupos de 10 ratones cada uno. Tras su obtención del bioterio, se asignaron 2 cajas por grupo (5 sujetos por caja), todos con las mismas condiciones de hábitat. Dependiendo el grupo, se les administró un tratamiento antibiótico, se les infectó con parásitos de *T. crassiceps*, tuvieron ambas condiciones o ninguna de las dos (Tabla 2).

Grupo	Infección	Tratamiento antibiótico	n
1	Sí	Sí	10
2	Sí	No	10
3	No	Sí	10
4	No	No	10

Tabla 2. Características de cada uno de los grupos.

Se consideró un periodo de habituación de una semana (T0-T1). Tras este periodo, se expuso a los grupos 1 y 3 al tratamiento antibiótico durante 10 días (T1-T2) (Fig. 4). En el tiempo T2 se llevó a cabo la infección de los grupos 1 y 2 con 10 parásitos de *T. crassiceps*. A partir de aquí, se retiró el tratamiento antibiótico, todos los grupos tuvieron acceso a agua esterilizada. Transcurridos 30 días (T2-T3), se inició el periodo de las pruebas conductuales (T3-T4). Para llevar a cabo las pruebas, fueron tomados 6 ratones de cada grupo de forma azarosa. El total de los sujetos que se emplearon para las evaluaciones conductuales fue de 24.

Al transcurrir el periodo de las pruebas conductuales (T4), se obtuvieron muestras de sangre (Fig. 4) para determinar la cantidad de citocinas por ELISA. Se anestesió a los sujetos con pentobarbital (50 mg/kg) y se obtuvo la muestra por punción cardiaca. Tras obtener la muestra, se sacrificó a los animales por

dislocación cervical y se obtuvieron los cisticercos de la zona peritoneal, para contar el total de estos de forma manual (Fig. 4).

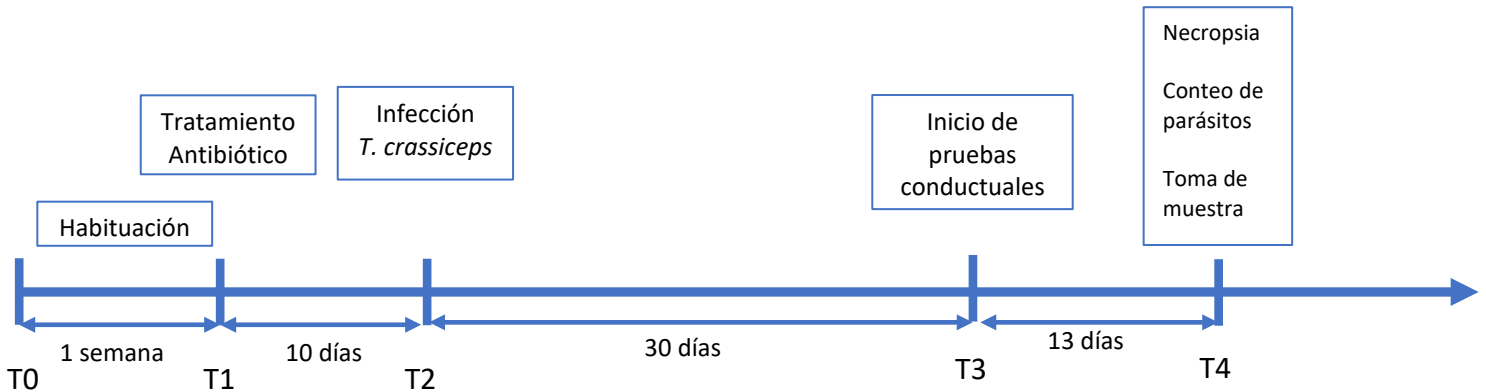


Figura 4. Línea de tiempo donde se describe la temporalidad de cada una de las fases del experimento.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando los softwares GraphPad Prism versión 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) y SPSS versión 21 para Windows (IBM Corp., Armonk NY). Se realizaron pruebas para determinar la normalidad de cada una de las variables dependientes y acorde a eso, se decidió realizar estadística paramétrica o no paramétrica. Cabe resaltar que, al obtener los parásitos de los animales, resultó que dos sujetos del grupo 1, y uno del grupo 2 no se infectaron, por lo que se les eliminó del experimento. Para hacer la comparación en el número total de parásitos, se consideró a los dos grupos infectados por *T. crassiceps* (Grupo 1 y grupo 2), la variable independiente el tratamiento antibiótico (dos niveles: Sí/No) y las variables dependientes fueron la cantidad de parásitos gemados, no gemados y el total de estos. Se realizó una t de student para muestras independientes para comparar el número total de parásitos. Además, se realizó una chi cuadrada para observar asociaciones entre el tratamiento antibiótico y la morfología de los parásitos. A su vez, se comparó el total de parásitos gemados y no gemados en cada grupo por medio de una t de student para muestras independientes. Dado que

se eliminaron sujetos por no resultar infectados, la n del grupo 1 fue de 8, mientras que la n del grupo 2 fue 9.

Se realizó un ANOVA de dos vías para el análisis de los resultados en la expresión de las citocinas en sangre y en las pruebas conductuales. Las variables independientes fueron infección (dos niveles: Sí/No) y Tratamiento antibiótico (dos niveles: Sí/No), mientras que las variables dependientes fue la cantidad de pg/ml de IFN- γ e IL-10 en la sangre, el tiempo (en segundos) de latencia y de permanencia en el cuadrante blanco para el laberinto de Barnes, e índice de discriminación (DI) para la tarea de objeto novedoso. El índice de discriminación fue calculado de acuerdo con Antunes & Biala (2012), de la siguiente forma: $DI = \frac{TN-TF}{TN+TF}$ donde TN representa el tiempo de exploración del objeto novedoso y TF el tiempo de exploración del objeto familiar. A causa de la eliminación de los 3 sujetos que se eliminaron por no resultar infectados, el análisis para las citocinas tuvo una n de 37 sujetos. Para el análisis estadístico de las pruebas conductuales, se eligieron al azar 6 ratones de cada grupo (n=24), sin embargo, tampoco se tomó en cuenta a uno de los sujetos del grupo 1 que no resultó infectado, por lo que la n total para estas pruebas fue de 23.

4. Resultados

4.1 Cargas parasitarias

Para el análisis de las cargas parasitarias se utilizaron a los dos grupos infectados (grupo 1 y grupo 2), el primero con tratamiento antibiótico previo a la infección (n=9) y el segundo sin tratamiento antibiótico (n=8). Se contó la cantidad de parásitos en la cavidad peritoneal y a su vez se les dividió acorde a su morfología (gemados y no gemados).

4.1.1 Diferencias en el número total de parásitos

Para determinar si hubo diferencias en la cantidad de parásitos totales, se realizó una t de student para muestras independientes, si bien hubo una disminución

en la carga parasitaria del grupo de ratones con antibióticos, no se encontraron diferencias significativas ($t_{(15)}=0.8711$, $p>0.05$) entre las medias del grupo con tratamiento antibiótico ($\bar{x}=248 \pm 31.49$) y el grupo sin tratamiento antibiótico ($\bar{x}=281.6 \pm 23.19$) (Figura 5).

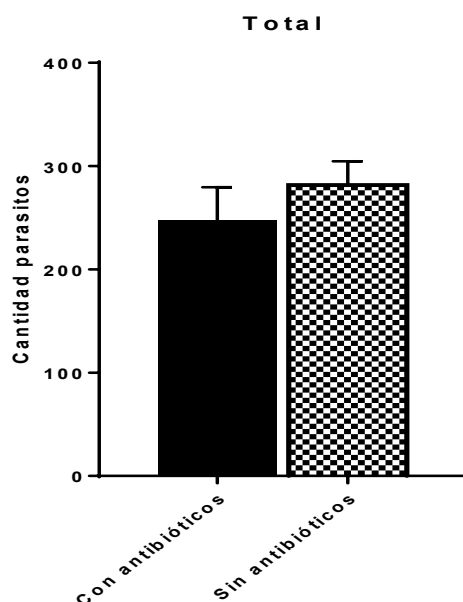


Figura 5. Medias de la cantidad total de parásitos de *T. crassiceps* entre los grupos con y sin antibióticos. En el eje de las abscisas se ubican los grupos mientras en el eje de las ordenadas se cuantifica el total de parásitos (promedio \pm SEM).

4.1.2 Diferencias en el número de parásitos gemados vs no gemados

Para evaluar si hubo una asociación entre el tratamiento antibiótico y la morfología de los parásitos, se realizó una chi cuadrada. Se comparó la cantidad total de parásitos gemados (Con antibióticos vs Sin antibióticos) y no gemados (Con antibióticos vs Sin antibióticos) (Tabla 3). Una relación significativa ($\chi^2_{(1)}=997.2$, $p<0.01$) apareció: el número de parásitos gemados fue significativamente disminuido en el grupo con tratamiento antibiótico (112, 8.27%) comparado con el grupo sin tratamiento (1242, 91.73%).

	Gemados	No gemados	Total
Con antibióticos	* 112 8.27%	1872 59.17%	1984 43.91%
Sin antibióticos	1242 91.73%	1292 40.83%	2534 56.09%

Total	1354 100%	3164 100%	4518 100%
-------	--------------	--------------	--------------

Tabla 3. Número total de parásitos gemados y no gemados en los dos grupos estudiados. Se observa que disminuye de forma significativa la cantidad de parásitos gemados en el grupo con tratamiento ($p < 0.01$).

Al realizar la prueba de t de student para muestras independientes, se corrobora lo anterior. Se encontró que al comparar el número de parásitos gemados, la media del grupo sin antibióticos ($\bar{x} = 138 \pm 49.28$), fue mayor que la media del grupo con antibióticos ($\bar{x} = 14 \pm 2.89$). Dicha diferencia fue significativa ($t_{(15)} = 2.361$, $p < 0.05$) (Figura 6).

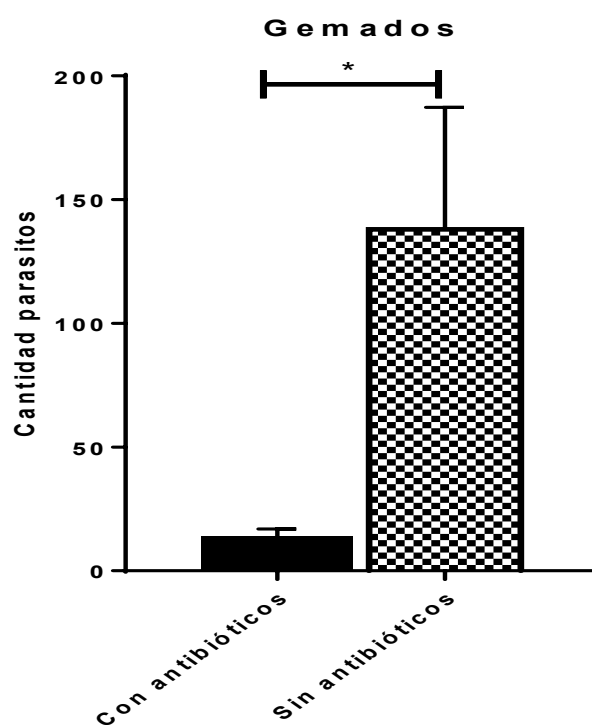


Figura 6. Medias de la cantidad de parásitos gemados entre los grupos con antibióticos y sin antibióticos. En el eje de las abscisas se ubican los grupos mientras en el eje de las ordenadas se cuantifica el total de parásitos (promedio \pm SEM). Se observa una disminución significativa de los parásitos gemados en presencia del tratamiento ($p < 0.05$).

En cuanto a la cantidad de parásitos no gemados, la t de student no encontró ninguna diferencia significativa ($t_{(15)} = 1.829$, $p > 0.05$) entre la media del grupo con antibióticos ($\bar{x} = 234 \pm 29.73$) y el grupo sin antibióticos ($\bar{x} = 143.6 \pm 38.35$).

4.2. Medición de citocinas

En el análisis de las citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-6 se consideraron a los 4 grupos descritos previamente (Tabla 2). Se utilizó un ANOVA de dos vías considerando a la infección y al tratamiento antibiótico como factores. Respecto al IFN- γ , el factor infección tuvo un efecto significativo ($F_{(1,33)} = 11.09$, $p < 0.01$), mientras que el tratamiento antibiótico no mostró ningún cambio ($F_{(1,33)} = 1.885$, $p > 0.05$), así mismo, no hubo interacción entre ambos factores ($F_{(1,33)} = 1.885$, $p > 0.05$). Un análisis *post hoc* Tuckey reveló que la media de los pg/ml de IFN- γ en la sangre aumento en el grupo que solo tenía la infección (Grupo 2) ($\bar{x} = 1326.76 \pm 1632.10$) comparando con el grupo que solo tenía antibióticos (Grupo 3) ($\bar{x} = 0$) y el grupo sin infección y sin antibióticos (Grupo 4) ($\bar{x} = 0$). En ambos casos el valor de p fue menor a 0.01 (Figura 7). Así mismo el análisis *post hoc* no encontró diferencias significativas entre los grupos infectados (1 y 2) ($p > 0.05$).

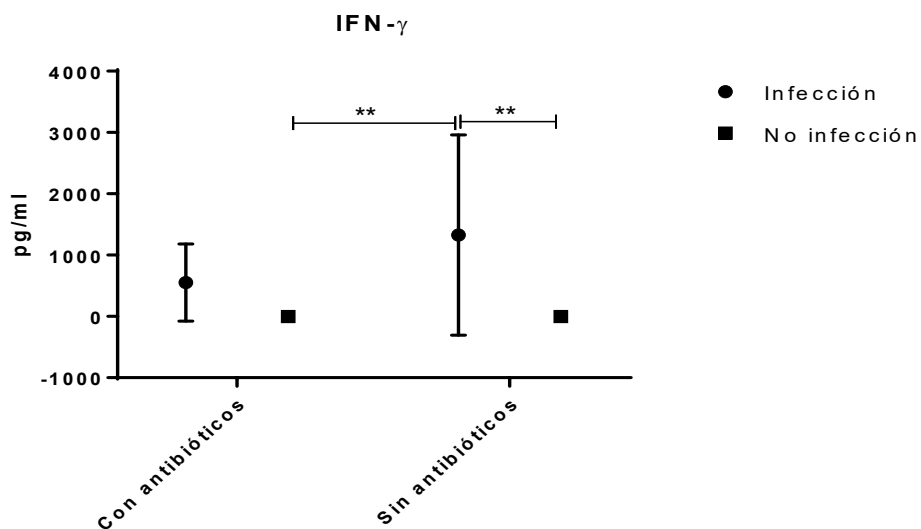


Figura 7. Medias de la expresión de IFN- γ en el suero de los sujetos. Se cuantifica la cantidad de pg/ml en cada grupo (promedio \pm sd). El análisis *post hoc* Tuckey muestra un aumento significativo en la expresión de IFN- γ del grupo 2 (Infección/Sin antibióticos) comparando con el grupo 3 (No infección/Con antibióticos) y el grupo 4 (No infección/Sin antibióticos) ($p < 0.01$)

Respecto a la expresión de IL-10 no hubo ningún efecto significativo en cuanto a la infección ($F_{(1,33)} = 0.937$, $p > 0.05$) y el tratamiento ($F_{(1,33)} = 0.315$, $p > 0.05$). Tampoco hubo interacción entre ambos factores ($F_{(1,33)} = 0.153$, $p > 0.05$).

En cuanto a la expresión de IL-6 en el suero de los sujetos, no se encontraron niveles detectables de esta citocina en ninguno de los grupos.

4.3. Pruebas conductuales

Para el análisis de las pruebas conductuales también fueron contemplados los 4 grupos (Tabla 2). En ambas pruebas se llevó a cabo un ANOVA de dos vías. En la prueba de reconocimiento de objeto novedoso no se encontró ninguna diferencia significativa en la infección ($F_{(1,19)} = 1.086$, $p > 0.05$) ni el tratamiento antibiótico ($F_{(1,19)} = 0.241$, $p > 0.05$), en ambos casos las medias del índice de discriminación fueron similares entre grupos, así mismo no hubo interacción entre ambos factores ($F_{(1,19)} = 0.383$, $p > 0.05$). (Figura 8)

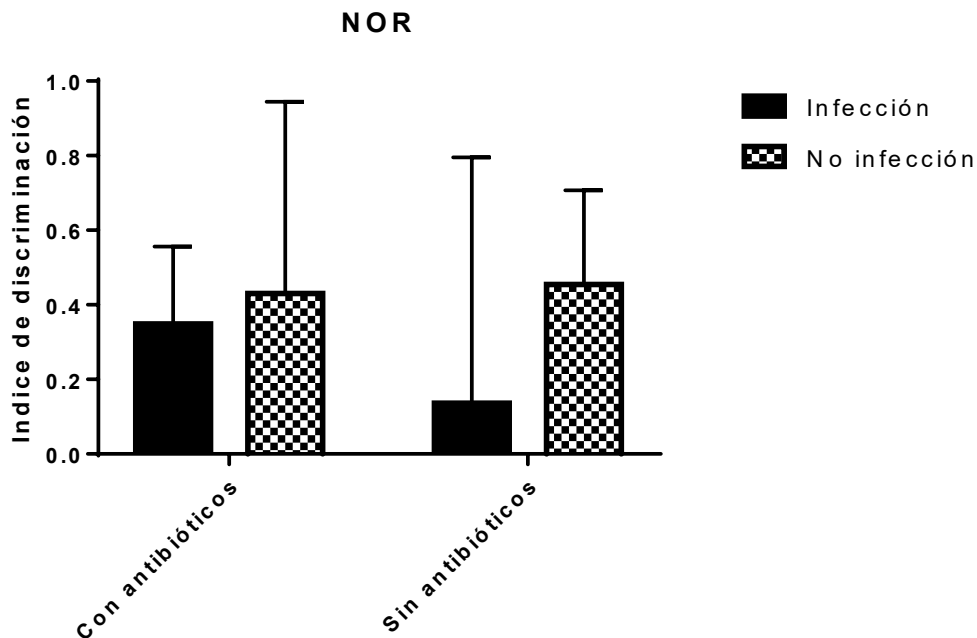


Figura 8. Comparación de las medias del índice de discriminación para la prueba de reconocimiento de objeto novedoso. El color de las barras define la variable Infección, en el eje de las abscisas se observa la variable Tratamiento antibiótico, y en el eje de las ordenadas se cuantifica el desempeño por medio del índice de discriminación (promedio \pm sd).

En la prueba de Laberinto de Barnes tampoco se encontraron diferencias en las medias del tiempo de permanencia en el ensayo final, entre grupos para la variable infección ($F_{(1,19)}=0.0006$, $p>0.05$) ni para la variable tratamiento antibiótico ($F_{(1,19)}=0.574$, $p>0.05$). (Figura 9)

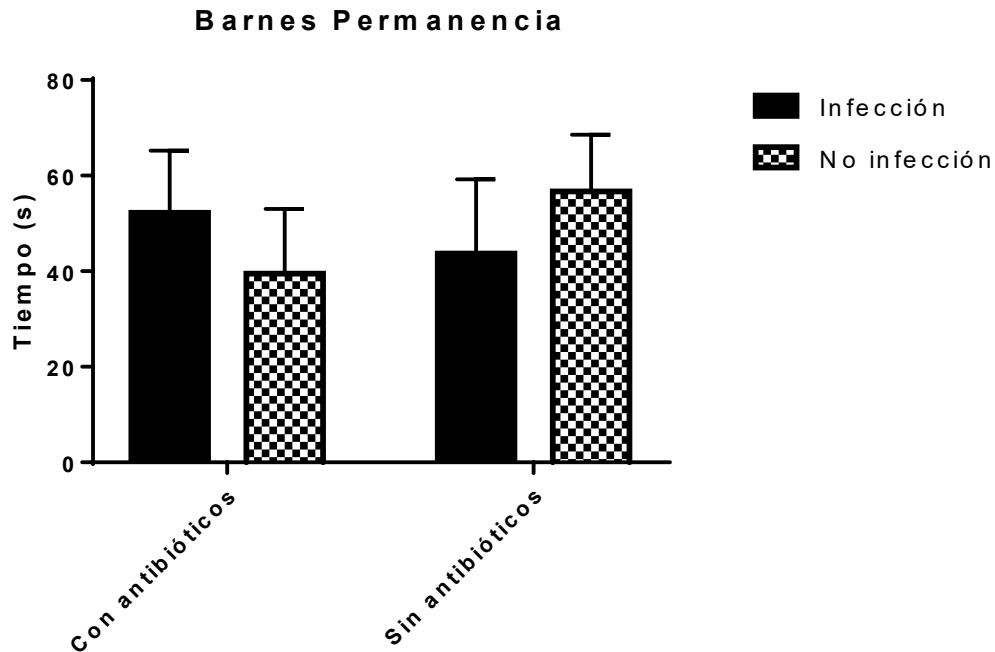


Figura 9. Comparación de las medias en el tiempo de permanencia durante el ensayo final del laberinto de Barnes. El color de las barras define la variable Infección, en el eje de las abscisas se observa la variable Tratamiento antibiótico, y en el eje de las ordenadas se cuantifica el desempeño por medio del tiempo medido en segundos (promedio \pm sd).

Sin embargo, se encontró una interacción significativa entre ambos factores ($F_{(1,19)}=5.092$, $p<0.05$). Tomando como base el grupo 4 que no tuvo ninguna de las variables ($\bar{x}=56.667 \pm 11.911$), se observa que en los grupos donde se aplicaba un solo factor como el grupo 2 infectado ($\bar{x}=43.667 \pm 15.591$) y el grupo 3 con tratamiento antibiótico ($\bar{x}=39.5 \pm 13.561$) la media disminuye, mientras que en el grupo 1 que tenía tanto el tratamiento antibiótico como la infección, tuvo un desempeño similar al grupo 4 ($\bar{x}=52.20 \pm 13.008$) (Figura 10).

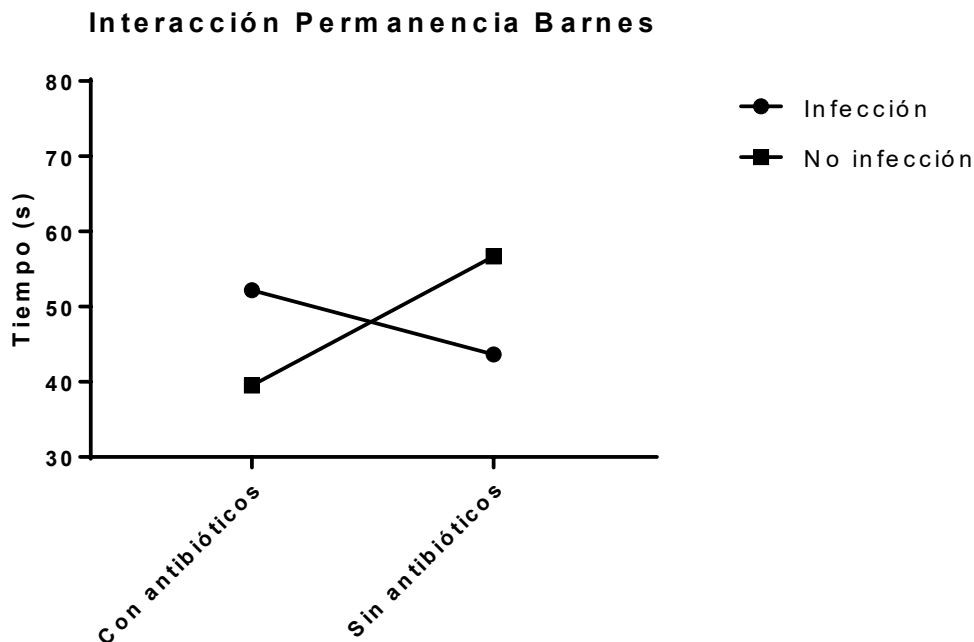


Figura 10. Representación de la interacción acorde al ANOVA de dos vías en el tiempo de permanencia durante el ensayo final del laberinto de Barnes. Se observa que los efectos principales disminuyen el tiempo de permanencia, mientras que tanto en presencia como en ausencia de ambos factores se observa el efecto contrario.

5. Discusión

No existen claras evidencias de cuales podrían ser los factores implicados en la intensidad de la respuesta inmunológica durante la neurocisticercosis. Comprender lo anterior es clave dado que la gravedad de los síntomas depende totalmente del estado inflamatorio que presenta el paciente durante la patología. Lo que se propuso en esta tesis fue relacionar las repercusiones de disminuir la cantidad de bacterias de la microbiota intestinal, en ratones que posteriormente fueron infectados con el parásito de *T. crassiceps*, evaluando la reacción inmune del huésped, la cantidad de parásitos y cambios en la conducta de los animales, particularmente el desempeño en algunas tareas de memoria (Reconocimiento y Espacial) relacionadas con el hipocampo. Sin embargo, dado que la conformación de la microbiota intestinal es muy compleja, solamente se hizo una aproximación, buscando modificar por medio de antibióticos, ciertos grupos de bacterias específicos, como los bacteroides y los firmicutes, que se han descrito predominan

en el medio intestinal (Wang & Wang, 2016). Por otro lado, cabe destacar que el modelo de cisticercosis con *T. crassiceps* simula en la mayor medida de lo posible la situación inmunológica de los pacientes con neurocisticercosis, con la diferencia que por la cepa empleada (Balb/c) el hospedero no logra eliminar al parásito (Sánchez, 2006; Terrazas, 2008).

Lo que se encontró fue lo siguiente.

No se encontró una diferencia significativa en la cantidad de parásitos de los grupos con tratamiento antibiótico (microbiota modificada) y sin tratamiento antibiótico (microbiota sin modificaciones). Acorde a la literatura, la microbiota intestinal es necesaria para la maduración del sistema inmunológico (Wang & Kasper, 2014), particularmente se ha observado que la producción de citocinas proinflamatorias de tipo Th1 se ve disminuida cuando se administra una combinación de ampicilina, neomicina y vancomicina (Xu et al., 2017), combinación de antibióticos que se utilizó en este trabajo. Así mismo, la producción de citocinas proinflamatorias Th1 es importante para la resistencia al crecimiento parasitario en las primeras semanas de este modelo (López, 2013; Rodríguez-Sosa et al., 2004). Tomando en cuenta lo anterior, se esperaba que el tratamiento antibiótico al disminuir la cantidad de bacterias intestinales, generaría una deficiencia en la respuesta Th1 y en consecuencia un aumento en el total de parásitos, pero no fue así.

Pese a este resultado negativo, durante el conteo parasitario se observó que los parásitos del grupo al que se le administró el tratamiento antibiótico presentaron diferencias respecto a su morfología comparándolos con el grupo sin tratamiento antibiótico, por lo que suscitó interés en observar si estadísticamente existía un cambio. Efectivamente, los análisis estadísticos reflejaron una disminución significativa en la cantidad de parásitos gemados en el grupo con tratamiento antibiótico. En este modelo con roedores, la forma de reproducción de *T. crassiceps* es por medio de gemación por lo que un reducido número de parásitos gemados podría traducirse en una deficiencia en la reproducción. Esto permite plantear la

siguiente posibilidad, si se hubiera hecho este experimento por un periodo más prolongado, el número total de parásitos podría haber sido menor en el grupo con tratamiento antibiótico. Pero al no haber estudios que relacionen a este tipo de parásito con la microbiota intestinal, es incierto poder establecer una relación clara en cuanto al porqué de la reducción en la cantidad de parásitos gemados.

No obstante, se plantean estas dos ideas que pudieran explicar este fenómeno:

1. La microbiota intestinal además de relacionarse con el sistema inmune, cumple con otras funciones a nivel local como la digestión y la síntesis de algunos nutrientes (Wang & Kasper, 2014), por lo que cabe la posibilidad que los ratones con el tratamiento tuvieron alguna deficiencia metabólica, por ejemplo, se ha visto que, con la administración del tratamiento antibiótico en roedores, los niveles de glucosa en la sangre disminuyen en estos sujetos (Zarrinpar et al., 2018), y esta sea la razón de la disminución en la cantidad de parásitos gemados en dicho grupo. Lo anterior se plantea con base en que los parásitos dependen totalmente de los nutrientes del huésped en el que están alojados para poder sobrevivir, en particular, el parásito *T. crassiceps* requiere consumir glucosa del huésped para poder sobrevivir y reproducirse, dado que cuando se inhibe el consumo de glucosa, el parásito como mecanismo de supervivencia acude a vías alternas de metabolización y en consecuencia la gemación se ve reducida (Vinaud et al., 2009). Sin embargo, la principal limitante de esta hipótesis es que en este trabajo no se tiene ningún registro de la actividad metabólica tanto del parásito como del hospedero que pueda corroborar lo anterior.

2. Tanto la microbiota intestinal, como la inmunología del propio parásito modifican a la inmunología del hospedero (Wang & Wang, 2016; Rodríguez-Sosa et al., 2004), así que al manipular ambos, pudo darse un efecto no planeado en la respuesta inmunológica de los ratones como el aumento en la respuesta proinflamatoria, que afectaría el crecimiento parasitario. La microbiota intestinal no solo se relaciona con la respuesta Th1, sino con la maduración de otros tipos de

respuesta tanto proinflamatoria como reguladora (Cervantes-Barragán et al., 2017; Rescigno, 2014; Troy & Kasper, 2010), aunque con la administración de este tratamiento se buscó afectar principalmente a los bacteroides, relacionados con la respuesta Th1 (Fröhlich et al., 2016; Xu et al., 2017; Ochoa-Reparaz et al., 2009). El problema de suponer esto, es que solo se midió IFN- γ en los sujetos experimentales así que no se sabe con certeza si otros factores inmunológicos puedan estar relacionados con el estado reproductivo del parásito, si bien no se cuentan con los elementos necesarios para sostener esto, es un factor que debería contemplarse y no descartar por completo.

Lo anterior nos lleva al siguiente punto, la infección produjo un aumento significativo en la expresión de IFN- γ al compararse con los grupos que no fueron infectados, este resultado era totalmente esperado dado que concuerda con reportes previos en la literatura (Morales-Montor, 2014; Terrazas, 2008). Por otro lado, el grupo infectado y con tratamiento antibiótico no tuvo un aumento significativo comparando con ambos grupos sin infección. Pero, el tratamiento antibiótico tampoco produjo una diferencia significativa entre ambos grupos infectados, por lo que no es claro que tan relevante es la microbiota intestinal para este tipo de respuesta inmune. En otros estudios se observa que la ausencia o disminución en la cantidad de bacterias intestinales, reduce la cantidad de citocinas proinflamatorias (Xu et al., 2017; Ochoa-Reparaz, 2009). Sin embargo, las patologías asociadas a inflamación donde se evalúa este modelo son de mucho menor duración, por lo que las mediciones se realizan al poco tiempo de dejar de administrar el tratamiento. Considerando que tras la interrupción de este tipo de tratamiento antibiótico la cantidad de microorganismos en el intestino no se recupera, pero si las proporciones en las que se distribuyen las diferentes familias bacterianas (Guida et al., 2018), existe la posibilidad de que el efecto de la administración de los antibióticos sobre el sistema inmunológico puede perderse a lo largo del tiempo.

Una de las hipótesis de este trabajo sugirió que el tratamiento antibiótico podría disminuir la inflamación producida por la respuesta tipo Th1 característica en

la infección con *T. crassiceps*, pero con los resultados obtenidos no se puede asegurar ni rechazar que la microbiota intestinal participe en la inflamación de este modelo. Además, se sabe que clásicamente el IFN- γ es considerada una citocina proinflamatoria (Ivashkiv LB, 2018), aunque también se le ha descrito propiedades antiinflamatorias (Mühl & Pfeilschifter, 2003; Miller et al., 2015). Así que ninguna conclusión definitiva puede ser emitida.

Una limitante de este trabajo es que la evaluación sobre el estado inmunoinflamatorio, se basa en la medición de dos moléculas, IFN- γ característico de la respuesta Th1 e IL-10 correspondiente a Th2, por lo que, al no tener mediciones de otras moléculas implicadas en ambas respuestas, podría ser muy subjetiva cualquier explicación que se pueda hacer respecto a la respuesta inmune de los ratones. Una evaluación más completa del estado inmune (como evaluar las poblaciones linfocitarias) es necesaria para poder entender el papel del estado inmunológico en estos resultados.

Respecto a las pruebas conductuales, el efecto de la infección no fue significativo como se ha reportado en estudios realizados previamente (Morales-Montor et al., 2014; Zepeda et al., 2017; Zepeda et al., 2018). Sin embargo, hay que considerar que en el presente trabajo el tiempo que duró la infección fue de 30 días, mientras que en los trabajos citados la infección duró 6 meses, 45 días y 110 días respectivamente. Es muy probable que el daño que se piensa es ocasionado por la infección, se vea agravado por el tiempo durante el cual el ratón se mantiene en este estado inflamatorio crónico. En otros modelos de inflamación periférica (Campos et al., 2016; Di Filippo et al., 2013), es suficiente con esperar periodos cortos, incluso de menos de un día, para poder observar repercusiones tanto en la histología del SNC como a nivel conductual. Posiblemente lo anterior se relacione con la intensidad de la inflamación específica de cada modelo, pero dado que cada uno de estos trabajos ha empleado diferentes marcadores para cuantificar los daños al SNC, no es posible hacer una comparación directa de la respuesta inflamatoria en cada uno de estos modelos. Uno de los problemas que tienen los pocos trabajos que se han realizado en la parte conductual en el modelo de *T. crassiceps*, es que

en todos son infecciones con 10 parásitos (Morales-Montor et al.,2014; Zepeda et al., 2016; Zepeda et al., 2018), por lo que no se puede indagar si como en el caso de los humanos, la cantidad de parásitos pueda modificar la intensidad de la inflamación y en consecuencia generar daños en un periodo de tiempo menor.

El efecto de la microbiota intestinal en el desempeño de tareas de memoria es ambiguo. Algunos estudios reportan una disminución en el desempeño de la memoria, mientras que otros no reportan diferencias (Fröhlich et al.,2017; Guida et al., 2018). En este trabajo, el desempeño del grupo al que solo se le administró el tratamiento antibiótico, fue menor en ambas tareas de memoria, aunque no hubo diferencias significativas. Sin embargo, hubo una interacción significativa entre los factores en el desempeño de la tarea de Laberinto de Barnes, lo cual sugiere lo siguiente:

1. El efecto de la infección disminuye el desempeño en el laberinto de Barnes.
2. El efecto del tratamiento antibiótico disminuye el desempeño en el laberinto de Barnes.
3. La combinación de la infección con el tratamiento antibiótico, revierte el efecto que tienen estas variables individuales sobre el desempeño en el laberinto de Barnes, siendo el desempeño similar a si no se hubieran aplicado dichas variables.

Pese a que la disminución del desempeño a causa de los efectos principales no es significativa, es interesante ver que los ratones que fueron sometidos a ambas variables tienen un desempeño similar a los animales sin estas variables. Se puede hipotetizar que el tratamiento no permite una alta expresión de IFN- γ , por lo que la inflamación no generaría daños al hipocampo y por eso la memoria no se ve afectada. Este estudio no permite describir los mecanismos implicados, pero se ha observado que en general las moléculas asociadas a procesos inflamatorios, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y generar daños en el hipocampo

(Morales-Montor et al., 2014; Di Filippo et al, 2013; Campos et al., 2016; Zepeda et al., 2018).

En conclusión, los resultados encontrados en el presente trabajo no permiten afirmar que la disbiosis ocasionada por antibióticos participa tanto en la regulación de la infección por *T. crassiceps* como en las características conductuales consecuentes de la misma, aunque algunos puntos podrían sugerir que la microbiota intestinal esté relacionada con la respuesta del huésped en este modelo, no solo en mecanismos inmunológicos, sino también en procesos metabólicos que repercuten en la infección. Aunque ninguno de estos resultados aún es contundente, se abre la puerta a futuros trabajos que exploren con mayor profundidad a cada una de las variables evaluadas. En particular será necesario establecer con precisión los siguientes puntos:

1. Se debe hacer una evaluación más completa del estado inmunoinflamatorio en este modelo de *T. crassiceps* ante la presencia y ausencia de este tratamiento antibiótico, considerando que la cantidad de marcadores inmunológicos medidos en este trabajo no permiten responder de forma eficaz a la problemática que se pretendía resolver.
2. Realizar las pruebas conductuales en animales con un mayor tiempo de infección en presencia y ausencia del tratamiento antibiótico. Esto permitiría contrastar de manera más adecuada las repercusiones en la memoria acorde a los tiempos que se han descrito previamente (Morales-Montor et al., 2014; Zepeda et al., 2018).
3. Emplear técnicas que permitan registrar la actividad metabólica de los parásitos o del hospedero, por ejemplo, la cantidad de glucosa en la sangre de los sujetos, o los metabolitos secretados por el parásito. Lo anterior se realizaría para poder comprobar que existe una alteración en la reproducción de los parásitos a raíz de una deficiencia metabólica ocasionada por el tratamiento antibiótico.

Referencias

Abbas A., Lichtman A. & Pillai S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Barcelona, España: Elsevier

Al-Asmakh M. & Zadjali F. (2015). Use of Germ-Free Animal Models in Microbiota-Related Research. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (10), 1583–1588.

Alvarez J. I., Colegial C. H., Castaño C. A., Trujillo J., Teale J. M., & Restrepo B. I. (2002). The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *Journal of Neuroimmunology*, 127(1-2), 139–144. doi:10.1016/s0165-5728(02)00101-7

Antunes M. & Biala G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*. 13:93-110.

Bush A. O., Fernández J. C., Esch G. W. & Seed J. (2001). Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Pp. 151-152. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Campos A. C., Rocha N. P., Nicoli J. R., Vieira L. Q., Teixeira M. M., Teixeira A. L. (2016). Absence of gut microbiota influences lipopolysaccharide-induced behavioral changes in mice. *Behavioral Brain Research*. 312, 186-194

Carpio A. & Fleury A. (2014). Neurocysticercosis: Neurology and neurobiology. En Bentivoglio M., Cavalheiro E. A., Kristensson K. & Kabel N. B. (Eds.), *Neglected tropical diseases and conditions of the nervous system* (pp. 127-146). New York, NY: Springer

Cervantes-Barragan L., Chai J. N., Tianero M. D., Di Luccia B., Ahern P. P., Merriman J., & ... Colonna M. (2017). *Lactobacillus reuteri* induces gut intraepithelial CD4 + CD8 α + T cells. *Science*, 357(6353), 806-810.

Chavarria A., Roger B., Fragoso G., Tapia G., Fleury A., Dumas M., Dessein A., Larralde C. & Sciutto E. (2003). TH2 profile in asymptomatic *Tenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes and Infection*. 5, 1109-1115

Chavarria A., Fleury A., García E., Marquez C., Fragoso G & Sciutto E. (2005). Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clinical Immunology*. 116, 271-278

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

Ciampi de Andrade D., Rodrigues C. L., Abraham R., Castro L. H., Livramento J. A., Machado L. R., Leite C. C., & Caramelli P. (2010). Cognitive impairment and dementia in neurocysticercosis: a cross-sectional controlled study. *Neurology*, 74(16), 1288–1295. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d9eda6>

Del Brutto O. H. (2014). Neurocysticercosis. *The Neurohospitalist*, 4(4), 205–212. <https://doi.org/10.1177/1941874414533351>

Di Filippo M., Chiasserini D., Gardoni F., Viviani B., Tozzi A., Giampà C., ... & Calabresi P. (2013). Effects of central and peripheral inflammation on hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiology of Disease*. 52, 229-236

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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104, 243-250

Fleury A., Cardenas G., Adalid-Peralta L., Fragoso G. & Sciutto, E. (2016). Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunology*, 38(3), 147–157. <https://doi.org/10.1111/pim.12299>

Friard O. & Gamba M. (2016), BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7: 1325–1330.

Fröhlich, E. E., Farzi, A., Mayerhofer, R., Reichmann, F., Jačan, A., Wagner, B., ... Holzer, P. (2016). Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. *Brain, Behavior, and Immunity*, 56, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.020>

Escobar A. (1983). The pathology of neurocysticercosis. In: Palacios E, Rodríguez-Carbajal J, Taveras JM (eds). *Cysticercosis of central nervous system*. Charles C Thomas, Springfield

Gonzales I., Rivera J. T., García H. H. (2016). Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunology*. 38, 136–146. <https://doi.org/10.1111/pim.12307>

Grover M., & Kashyap P. C. (2014). Germ-free mice as a model to study effect of gut microbiota on host physiology. *Neurogastroenterology & Motility*, 26(6), 745–748. <https://doi.org/10.1111/nmo.12366>

Guida F., Turco F., Iannotta M., De Gregorio D., Palumbo I., Sarnelli G., Furiano A..., Maione S. (2018). Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 67, 230-245.

IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Ivashkiv L. B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 18(9),545-558. doi: 10.1038/s41577-018-0029-z

Kennedy, E. A., King, K. Y., & Baldrige, M. T. (2018). Mouse Microbiota Models: Comparing Germ-Free Mice and Antibiotics Treatment as Tools for Modifying Gut Bacteria, *Frontiers in Physiology*. 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01534>

López D. (2013). Identificación de genes de linfocitos involucrados en la respuesta inmune en el modelo de cisticercosis murina (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Chiapas, Chiapas, México.

Mahanty, S., & García, H. H. (2010). Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 91(2), 172–184. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.008>

Miller N. M., Wang J., Tan Y., Dittel B. N. (2015). Anti-inflammatory mechanisms of IFN- γ studied in experimental autoimmune encephalomyelitis reveal neutrophils as a potential target in multiple sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*. 18 ;9 :287.

Morales-Montor J., Picazo O., Besedovsky H., Hernández-Bello R., López-Griego L., Becerril-Villanueva E., Moreno J., Pavón L., Nava-Castro K. & Camacho-Arroyo I. (2014). Helminth Infection Alters Mood and Short-Term Memory as well as Levels of Neurotransmitters and Cytokines in the Mouse Hippocampus. *Neuroimmunomodulation*. 21, 195–205. <https://doi.org/10.1159/000356521>

Morris R. G. M., Anderson E., Lynch G. S. & Baudry M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774-776.

Mühl H., Pfeilschifter J. (2003) Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-g. *International Immunopharmacology*. 3:1247-55

Nau A. L., Mwape K. E., Wiefek J., Schmidt K., Abatih E., Dorny P., Praet N., Chiluba C., Schmidt H., Phiri I. K., Winkler A. S., Gabriël S., & Blocher J. (2018). Cognitive impairment and quality of life of people with epilepsy and neurocysticercosis in Zambia. *Epilepsy & behavior* : E&B, 80, 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.10.042>

Ochoa-Repáraz J., Mielcarz D. W., Lauren E., Burroughs A. R., Foureau D. M., Kasper L. H., Haque-Begum S. (2009). Role of gut comensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 183, 6041-6050 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>

Pandiyan P., Bhaskaran N., Zou M., Schneider E., Jayaraman S., Huehn J. (2019) Microbiome Dependent Regulation of Tregs and Th17 Cells in Mucosa. *Frontiers in Immunology*. 8(10),426. doi: 10.3389/fimmu.2019.00426.

Rescigno M. (2014). Intestinal microbiota and its effects on the immune system. *Cellular Microbiology*. 16(7), 1004-1013.

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. *Journal of Neuroimmunology*, 89(1-2), 64–72. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00112-x](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00112-x)

Rodríguez-Sosa, M.; Satoskar, A.R.; Calderon, R.; Gomez-Garcia, L.; Saavedra, R.; Bojalil, R.; Terrazas, L.I. (2002). Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2 - biasing ability. *Infection and Immunity*, 70,3656-3664.

Rodriguez-Sosa M., Saavedra R., Tenorio E.P., Rosas L. E., Satoskar A. R. & Terrazas L. I. (2004). A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity*, 72, 4552-4560.

Sanchez Y. (2006). Relevancia de los factores biológicos del hospedero, del parásito y de la exposición en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Schmid S., Grimm F., Huber M., Beck B., Custer P., & Bode B. (2013). *Taenia crassiceps*infection - an unusual presentation of a tapeworm diagnosed by FNA cytology and PCR. *Cytopathology*, 25, 340-341. doi:10.1111/cyt.12092

Sikasunge C. S., Johansen M. V., Phiri I. K., Willingham A. L., & Leifsson, P. S. (2009). The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood–brain barrier permeability. *Veterinary Parasitology*, 160(3-4), 242–250.

Singh, V., Roth, S., Llovera, G., Sadler, R., Garzetti, D., Stecher, B., ... Liesz, A. (2016). Microbiota Dysbiosis Controls the Neuroinflammatory Response after Stroke. *Journal of Neuroscience*, 36(28), 7428–7440.

Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Lacleste J. P., Sotelo J., Aluja A., Vargas L., Larralde C. (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection*, 2(15), 1875–1890.
[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01336-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01336-8)

Terrazas L. I. (2008). The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8(5), 383–392.

The National Institutes of Health Human Microbiome Project Working Group. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*, 19(12), 2317–2323.
<https://doi.org/10.1101/gr.096651.109>.

Troy E. B. & Kasper D. L. (2010). Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. *Frontiers in Bioscience*, 15, 25-34

Varghese V., Chandra S. R., Christopher R., Rajeswaran J., Prasad C., Subasree R., & Issac T. G. (2016). Cognitive Dysfunction and its Determinants in Patients with Neurocysticercosis. *Indian journal of psychological medicine*, 38(2), 142–146.
<https://doi.org/10.4103/0253-7176.178809>

Vinaud M. C., Ferreria C. S., Lino R., Barreto J. C. (2009). *Taenia crassiceps*: Fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. *Experimental Parasitology*, 122, 208-211

Wang H. X. & Wang Y. P. (2016). Gut microbiota-brain axis. *Chinese Medical Journal*, 129(19), 2373–2380. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190667>

Wang M., Monaco M. H., & Donovan S. M. (2016). Impact of early gut microbiota on immune and metabolic development and function. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 21(6), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2016.04.004>

Wang Y. & Kasper L. H. (2014). Brain, Behavior and Immunity. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behavior and Immunity*, 38, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.015>

Willms K. & Zurabian R. (2009). *Taenia crassiceps*: In vivo and in vitro models. *Parasitology*, 137(3), 335-346. <https://doi:10.1017/S0031182009991442>

Xu C., Ruan B., Jiang Y., Xue T., Wang Z., Lu H., ... Lu Z. (2017). Antibiotics-induced gut microbiota dysbiosis promotes tumor initiation via affecting APC-Th1 development in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488(2), 418–424. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.071>

Zarrinpar A., Chaix A., Xu Z.Z., Chang M. W., Clarisse A. M., Saghatelian A., Knight E. & Panda S. (2018). Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nature Communications*. 9, 2872. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05336-9>

Zepeda N., Solano S., Copitin N., & Chávez J. L. (2017). Apoptosis of mouse hippocampal cells induced by *Taenia crassiceps* metacestode factor. *Journal of Helminthology*. 91, 215–221. <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000146>

Zepeda N., Copitin N., Chávez J., García F., Jaimes-Miranda F., Rincón-Heredia R., ... Molinari J. (2018). Hippocampal sclerosis induced in mice by a *Taenia crassiceps* metacestode factor. *Journal of Helminthology*, 93(6), 690-696. doi:10.1017/S0022149X18000755