



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PAPEL QUE JUEGA UNA SUSTANCIA DE BAJO PESO MOLECULAR SECRETADA
POR METACESTODOS DE *Taenia crassiceps* EN LA PATOLOGÍA DE BAZO Y
CEREBRO DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

NADIA ZEPEDA CÓRDOVA

TUTOR PRINCIPAL: DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PAPEL QUE JUEGA UNA SUSTANCIA DE BAJO PESO MOLECULAR SECRETADA
POR METACESTODOS DE *Taenia crassiceps* EN LA PATOLOGÍA DE BAZO Y
CEREBRO DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

NADIA ZEPEDA CÓRDOVA

TUTOR PRINCIPAL: DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD (INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR)

OFICIO CPCB/175/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. EN C. IVONNE RAMÍREZ WENCE

Directora General de Administración Escolar, UNAM

Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 02 de marzo de 2020, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **ZEPEDA CÓRDOVA NADIA** con número de cuenta **403053564** con la tesis titulada **“PAPEL QUE JUEGA UNA SUSTANCIA DE BAJO PESO MOLECULAR SECRETADA POR METACESTODOS DE *Taenia crassiceps* EN LA PATOLOGÍA DE BAZO Y CEREBRO DE RATÓN”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. IRENE PATRICIA DEL ARENAL MENA
Vocal: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS
Vocal: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Secretario: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de febrero de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de seguir preparándome académica y profesionalmente

Al apoyo económico recibido por el CONACyT, número de becario 262633

A mi tutor, el Dr. José Luis Molinari Soriano por permitirme ser parte de este proyecto y de este grupo de trabajo, por impulsarme a mantener una mente crítica y por motivarme en la búsqueda de nuevos retos en la investigación. Su experiencia en la cisticercosis fue fundamental y enriquecedora para el desarrollo de esta tesis.

A los miembros de mi Comité Tutor; a la Dra. Ingeborg Dorotea Becker Fauser con amplio conocimiento en inmunología contra parásitos y al Dr. Abraham Landa Piedra con experiencia en moléculas producidas por metacestodo de *Taenia solium*. A ambos, por sus sugerencias y su apoyo durante el desarrollo de mi trabajo teórico y experimental.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

- A la Dra. Ana María Fernández Presas por su apoyo con la realización de algunos experimentos, por apoyar este proyecto y por la revisión detallada de esta tesis y de mi candidatura.
- A la M. en C. Sandra Georgina Solano por su apoyo técnico con las tinciones de bazo y por escucharme siempre que lo necesitaba.
- A la Dra. Ruth Rincón Heredia por su apoyo con la obtención de las imágenes mediante microscopía confocal y a Rodolfo Paredes Díaz por el procesamiento de los tejidos para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión (Unidad de imagenología IFC, UNAM).
- Al M. en C. José Luis Chávez Juárez por su experiencia con la obtención de cerebros de los ratones.
- A la Dra. Claudia Rivera y al Dr. Héctor Malagón Rivero por la crianza y cuidado de todos los ratones usados en este proyecto (Bioterio IFC, UNAM).
- A la M. en C. Natalia Ivanova Copitin Niconova por su apoyo con las tinciones de cerebro y la producción del FM.
- A los miembros del jurado: Dra. Irene Patricia del Arenal Mena, Dra. Ana María Fernández Presas, Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez, Dra. Laila Gutiérrez Kobeh y Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser por la revisión minuciosa de esta tesis, por sus correcciones y comentarios que sin duda hicieron que mejorara en todos los aspectos
- A la Dra. Lilian Hernández Mendoza por su apoyo y revisión del proyecto durante mi candidatura.
- A Sara Méndez Ibáñez por su apoyo con todos los trámites académicos a lo largo del doctorado
- A María del Rocío Romualdo Martínez por su mejor disposición y apoyo durante mis tutorales.
- A los miembros del Lab. 303 Ote del IFC, UNAM que sin su apoyo este proyecto no se hubiera podido llevar a cabo.
- A la Dra. Lucía Méndez Sánchez por impulsarme a terminar la tesis y las correcciones, por revisarla y por darme su punto de vista crítico. A la Biol. Itzel Alejandra Llorente Gil por ayudarme a mejorar mis técnicas en el laboratorio, por revisar la tesis y por darme su opinión objetiva. A la Dra. Violeta Martínez Alcántara por escucharme y aclarar mis dudas. A las tres por su sincera amistad.
- A mis papás, no me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí. A ti papá por no perder la fe en mí, por apoyarme en todas mis decisiones y por ser pilar en mi vida. A ti mamá, por no soltar mi mano, porque juntas somos invencibles y porque siempre me enseñas a buscar lo justo de la vida. Y a mi segunda madre, tía Mary, por apoyarme y cuidarme siempre que lo necesito.
- A mis hermanos porque de alguna u otra forma siempre están presentes. Adrián, por enseñarme a ser más tolerante. Raúl, por impulsarme a buscar nuevos horizontes y por estar al pendiente de nosotras. Nushko, porque este último tramo de la vida que nos ha tocado vivir, nos ha unido más y me ha hecho sentir arropada por ti.
- A Emma Itzayana, por llegar a mi vida cuando más lo deseaba, por ser mi motor de vida y por dejarme ser tu mami.

DEDICATORIA

...

*Pero no cambia mi amor
Por más lejos que me encuentre
Ni el recuerdo ni el dolor
De mi pueblo y de mi gente*

*Y lo que cambió ayer
Tendrá que cambiar mañana
Así como cambio yo
En esta tierra lejana*

*Cambia todo cambia
Cambia todo cambia
Cambia todo cambia
Cambia todo cambia*

...

Emma Itzayana:

Cada paso en mi vida es para ti

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIRE	Autoimmune regulator
APC	Antigen presentation cell
BALB/c	Bagg AL Binos of Jackson Laboratory
CA1	Cornu Ammonis 1
CA2	Cornu Ammonis 2
CA3	Cornu Ammonis 3
CC	Cisticercosis
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21
CD152	Cluster differentiation 152
CD19	Cluster differentiation 19
CD25	Cluster differentiation 25
CD28	Cluster differentiation 28
CD3	Cluster differentiation 3
CD35	Cluster differentiation 35
CD4	Cluster differentiation 4
CD47	Cluster differentiation 47
CD69	Cluster differentiation 69
CD8	Cluster differentiation 8
ConA	Concanavalina A
CTLA4	Citotoxic T lymphocyte antigen 4
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CXCL13	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13
CXCR5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
Da	Daltones
DAPI	4',6diamidino-2-phenylindole
DG	Giro dentado
DMT1	Diabetes melitus tipo 1
dUTP	deoxyuridine triposphate
E/S	Escresiones/Secreciones
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
FM	Factor de metacesodo
Foxp3	Forkhead box P3
GIRT	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
HS	Esclerosis hipocampal
IgE	Inmunoglobulina E
IgG1	Inmunoglobulina G1
IgG4	Immunoglogulina G4
IL10	Interleucina 10
IL2	Interleucina 2
IL25	Interleucina 25
IL33	Interleucina 33
IL4	Interleucina 4
IL8	Interleucina 8
IL9	Interleucina 9
ILC2	type 2 innate lymphoid cells
INF	Ratones infectados con metacestodos de <i>T. crassiceps</i>
IFN- γ	Interferón gamma
iTregs	Células T reguladoras inducidas
KDa	Kilo daltones

LAP	Latency associated peptide
LFA-1	Lymphocyte-associated antigen 1
LT α 1 β 2	Linfotoxina α 1 β 2
M2	Macrófagos tipo 2
MMM	Macrófagos metaloflicos marginales
mTEC	Células epiteliales de la médula tímica
MTL-HS	Lóbulo temporal medial refractario con esclerosis hipocampal
MZ	Zona Marginal
NCC	Neurocisticercosis
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
nm	Nanómetros
nTreg	Células T reguladoras naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
PALS	Vaina linfoide periarteriolar
PB	Pulpa blanca
PBS	Phosphate buffer solution
PD-1	Programmed cell death protein 1
POD	Peroxidasa
PR	Pulpa roja
regDC	Células dendríticas reguladoras
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S1P	Esfingosina 1 fosfato
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SFB	Suero Bovino Fetal
SNC	Sistema Nervioso Central
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TCR	T cell receptor
TGF- β	Transformation Grow Faction β
Th1	T helper cells 1
Th17	T helper cells 17
Th2	T helper cells 2
Th3	T helper cells 3
TLE	Epilepsia del lóbulo temporal
TNFRII	Tumor necrosis factor dirfferentiation receptor II
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
Tr1	Regulator T cell 1
Treg	Células T reguladoras
TSLP	Linfopoyetina del estroma tímico
TUNEL	Terminal deoxy nucleotidyltransferse (TdT) dUTP Nick-end labeling
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
WFU	Wake Forest University
ZCB	Zona de células B
ZCT	Zona celular T
α 4 β 7	Integrina α 4 β 7

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Taenia solium y Taenia carssiceps.....	3
2. Bazo	7
2.1 Pulpa Roja.....	8
2.2 Pulpa Blanca	9
2.3 Zona Marginal	10
3. Células T reguladoras	11
3.1 Células T reguladoras naturales	11
3.2 Células T reguladoras inducidas	13
3.3 Células Treg en infecciones parasitarias	16
4. Regulación de la respuesta inmune en enfermedades causadas por helmintos.....	16
5. Hipocampo en la neurocisticercosis.....	18
5.1 Anatomía del Hipocampo.....	19
5.2 La memoria espacial y el hipocampo.	20
ANTECEDENTES	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Reactivos	27
2. Material Biológico.	27
3. Ultrafiltración en una columna de Sephadex G-50 M.....	28
4. Tratamientos para obtener los bazos de los ratones de 45 dpi.....	28
5. Obtención de linfocitos esplénicos.	29
6. Tinción de linfocitos esplénicos con anti-CD4 y TUNEL	29
7. Análisis por citometría de Flujo.....	30
8. PCR punto final.....	30
9. Tratamientos para obtener cerebro de ratones de 45 dpi.	31
10. Tratamientos para obtener cerebros de ratones de 115 dpi.....	31
11. Laberinto de Barnes	32

12.	Tinción con hematoxilina-eosina de bazo y cerebro (45 y 115 dpi)	32
13.	Tinción con TUNEL (bazo de 45 dpi y cerebros de 45 dpi y 115 dpi)	33
14.	TUNEL-Pod (cerebros de 45 dpi)	33
15.	Microscopía de transmisión electrónica	34
16.	Tinción DAPI (4',6diamidino-2-phenylindole)	34
17.	Estadísticas	34
RESULTADOS		36
1.	Ultrafiltración a través de Sephadex G50.	36
2.	Evaluación de los cortes de bazo teñidos con H/E	36
3.	Estudio de la apoptosis en células esplénicas.....	37
4.	Microscopía electrónica de transmisión del bazo de ratones	40
5.	Análisis de los linfocitos CD4+ del bazo de ratones mediante citometría de flujo	41
6.	PCR de TGF- β y Foxp3.....	42
7.	TUNEL POD del hipocampo de ratones de 45 dpi	44
8.	TUNEL y TUNEL POD del giro dentado de ratones de 45 dpi.	44
9.	TUNEL POD de CA1, CA2 y CA3 de ratones de 45 dpi	45
10.	Laberinto de Barnes con ratones de 115 dpi	46
11.	Tinción con H/E del giro dentado, CA1, CA2 y CA2 de ratones de 115 dpi	47
12.	Tinción DAPI de hipocampo de ratones de 115 dpi	49
13.	TUNEL del hipocampo de ratones infectados con metacestodos de <i>T. crassiceps</i> e inoculados con FM de 115 dpi	50
DISCUSIÓN		54
CONCLUSIONES		58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		59
SOBRETIRO		67

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Mapa mundial de edemicidad de <i>T. solium</i> . OMS.	3
Fig. 2 Ciclos de vida. A) <i>T. solium</i> . B) <i>T. crassiceps</i>	6
Fig. 3 Vista esquemática de la anatomía del bazo de ratón. Modificado de Bronte y Pittet, 2013	8
Fig. 4 Compartimientos y quimiocinas que participan en la migración de los linfocitos B y T	10
Fig. 5 Mecanismos de selección	13
Fig. 6 Generación tímica y periférica de las células Treg Foxp3+ y Foxp3-	15
Fig. 7 Agudeza y cronicidad de la infección por helmintos impulsan distintos perfiles inmunes	18
Fig. 8 Corte coronal a través del eje transversal del hipocampo.	20
Fig. 9 Perfil de elución mediante ultrafiltración por Sephadex G-50 de los líquidos peritoneales de ratones infectados con metacestodos de <i>T. crassiceps</i> y ratones sanos.	36
Fig. 10 Histoarquitectura de la pulpa blanca y la pulpa roja del bazo de ratones.	37
Fig. 11 Análisis por microscopía confocal de secciones de bazo teñidas con TUNEL	39
Fig. 12 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de bazos.	41
Fig. 13 Efecto de la infección con <i>T. crassiceps</i> y de la inoculación del FM en los linfocitos CD4+ del bazo de ratones.	42
Fig. 14 Expresión de TGF- β y Foxp3 en las células de bazo del control, ratones infectados con <i>T. crassiceps</i> y tratados con FM.	43
Fig. 15 Secciones cerebrales de ratón teñidas con TUNEL POD	44
Fig. 16 TUNEL y TUNEL POD del giro dentado de ratones Con, Inf, FM	45
Fig. 17 Secciones cerebrales teñidas con TUNEL POD de ratones controles, infectada y tratados con el FM.	46
Fig. 18 Latencia de escape media \pm SD en segundos de ratones controles, Inf y FM	47
Fig. 19 Sección del giro dentado y el hilus del hipocampo teñido con H/E de ratones controles, Inf y FM.	48
Fig. 20 Secciones cerebrales teñidas con H/E que contienen porciones de regiones CA1, CA2, CA3.	49
Fig. 21 Secciones cerebrales teñidas con DAPI de ratones controles, Inf, FM.	50
Fig. 22 Secciones cerebrales teñidas con TUNEL de ratones controles, Inf.	51
Fig. 23 Secciones cerebrales teñidas con TUNEL de ratones controles, Inf y FM	52
Fig. 24 Datos estadísticos de los resultados obtenidos con la tinción con TUNEL.	53

RESUMEN

Este estudio se realizó para determinar si una sustancia secretada por metacestodos de *Taenia crassiceps* produce patología estructural en el bazo y el cerebro del ratón. Un factor de metacestodo (FM) de *T. crassiceps* de bajo peso molecular, aislado del líquido peritoneal de ratones hembras infectadas con metacestodos de *T. crassiceps*, indujo cambios patológicos e inmunológicos en células de bazo de ratón *in vivo*. La microscopía electrónica y la microscopía confocal revelaron cambios en la histoarquitectura del bazo de ratones infectados con *T. crassiceps* y ratones tratados con el FM. Se observaron células de bazo degeneradas y apoptóticas en las pulpa blanca y roja siendo más conspicuas en la pulpa blanca del bazo de los ratones infectados con *T. crassiceps* que en la de los ratones tratados con el FM. El análisis de citometría de flujo reveló que el número de células CD4+ del bazo fue significativamente menor en ambos grupos experimentales que en los ratones de control. La expresión *ex vivo* del factor de crecimiento transformante TGF- β y el factor Foxp3 fueron significativamente mayores en los esplenocitos de los ratones experimentales que la expresión basal observada en las células de los ratones controles.

En el caso del cerebro se analizó el daño en las células del hipocampo a los 45 y 115 días post tratamiento. Todos los ratones se anestesiaron y se perfundieron transcárdialmente con solución salina seguido de formalina al 10% tamponada con fosfatos y a continuación los cerebros se removieron cuidadosamente y se embebieron en parafina. Se analizaron cortes coronales teñidos con varias técnicas. Se encontró apoptosis extensa y significativa en los animales experimentales, principalmente en el giro dentado, CA1, CA2, CA3 y regiones vecinas, en comparación con las células aparentemente intactas de los ratones controles ($P < 0.01$). A los 115 días post-infección (dpi) en los ratones experimentales se observó un déficit significativo de aprendizaje usando el laberinto de Barnes y esclerosis hipocampal bilateral. El análisis bajo microscopía óptica reveló una importante dispersión celular, apoptosis extensa y pérdida de células en el giro dentado, hilus y en las regiones CA1-CA3 en el hipocampo de ambos grupos experimentales, así como un intenso deterioro de la corteza adyacente. También se observó una alteración sobresaliente de su histoarquitectura en el tejido circundante de todas estas regiones y apoptosis de las células endoteliales.

Estos hallazgos pueden mejorar la comprensión de la relación huésped-parásito en la neurocisticercosis humana. Los resultados del presente estudio sugieren que las deficiencias neurológicas que sufren los pacientes con neurocisticercosis, particularmente las deficiencias de aprendizaje y memoria pueden generarse por la apoptosis extensa de las células del hipocampo.

ABSTRACT

This study was conducted to determine if a parasitic substance secreted by *Taenia crassiceps* metacestodes causes structural pathology in the spleen and brain of mice. A low molecular weight *T. crassiceps* metacestode factor (MF), isolated from the peritoneal fluid of female mice infected with *T. crassiceps* metacestodes, induced pathological and immunological changes in mouse spleen cells *in vivo*. Electron microscopy and confocal microscopy revealed severe changes of the spleen of mice infected with *T. crassiceps* or treated with MF. Apoptotic spleen cells were observed in the white and red pulps, being more conspicuous in the white pulp of the spleen of mice infected with *T. crassiceps* than in mice treated with MF. Flow cytometry revealed that the number of CD4+ cells was smaller in both experimental groups than in control mice. The *ex vivo* expression of transforming growth factor (TGF) β and Foxp3 factor were significantly higher in splenocytes of experimental mice than the basal expression observed in control cells.

In the case of the brain, damage was analysed in hippocampal cells 45 and 115 days after infection (dpi), all mice were anesthetized and perfused transcardially with saline, followed by 10% formalin buffered with phosphate afterwards the brains were removed. Coronal sections were analysed using different staining techniques. Extensive and significant apoptosis was found in the experimental animals, mainly in the dentate gyrus, CA1, CA2, CA3, and neighbouring regions, in comparison with the apparent intact cells of control mice ($P < 0.01$). In the experimental mice, a significant decrease in performance (learning) was observed in the Barnes labyrinth and bilateral hippocampal sclerosis. Analysis under optical microscopy revealed significant cell dispersion, extensive apoptosis and cell loss in the dentate gyrus, hilus and CA1-CA3 regions of both hippocampi, as well as an intense deterioration of the adjacent cortex. We also observed an outstanding alteration of its histoarchitecture in the surrounding tissue of all these regions and apoptosis of the endothelial cells.

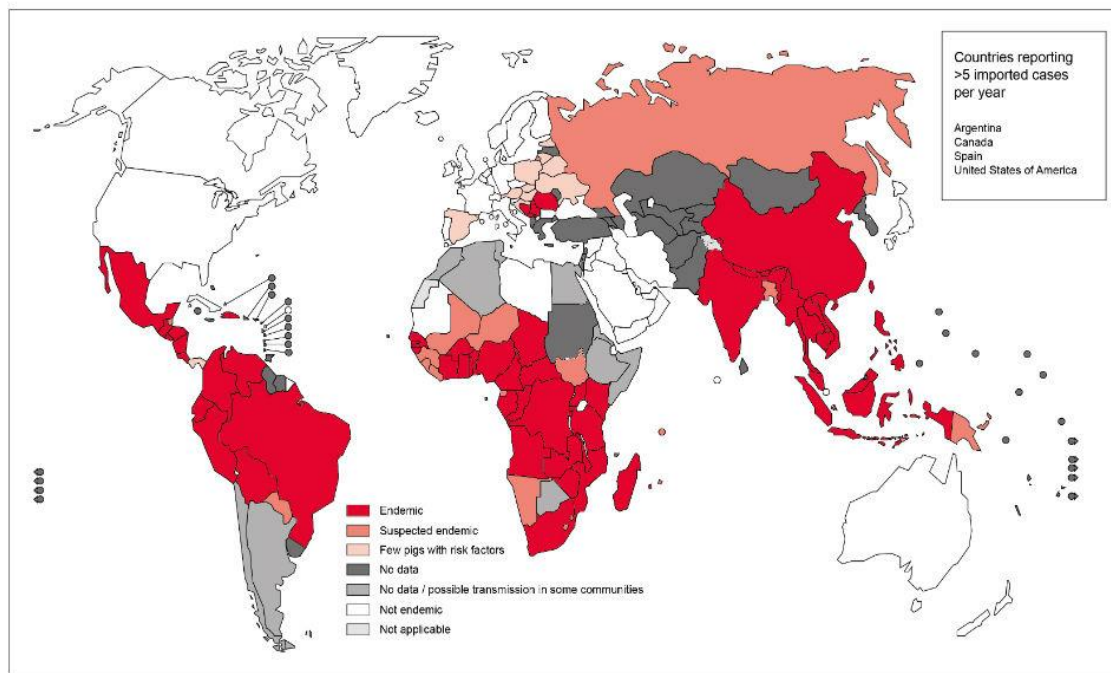
These findings may have applications for a better understanding of the host-parasite relationship in human neurocysticercosis. Our results suggest that the neurological deficiencies that patients with neurocysticercosis suffer, especially learning and memory deficits, may be generated by extensive apoptosis of hippocampal cells.

INTRODUCCIÓN

1. *Taenia solium* y *Taenia carssiceps*

La cisticercosis (CC) es ocasionada por *Taenia solium* y es un problema de salud pública mundial. La prevalencia de esta enfermedad es elevada en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, Asia y África y se está aumentando en países industrializados debido a la inmigración (Evans *et al.*, 1997, Garcia *et al.* 2020) (Fig. 1). En la década de los 80's en México presentaba una mayor seroprevalencia en las regiones centro occidental y sureste del país (Larralde *et al.*, 1990). En 2016 la Secretaría de Salud reportó una disminución considerable de casos de teniosis en México (Secretaría de Salud, 2016). Sin embargo, Bhattarai *et al.*, 2019 reportaron que México gasto \$186.2 millones en 2015. Esto incluye el costo del tratamiento de la epilepsia asociada a la neurocisticercosis (NCC), las pérdidas humanas y las de cerdos para la ganadería.

Endemicity of *Taenia solium*, 2015



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2016. All rights reserved.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Fig. 1 Mapa mundial de edemicidad de *T. solium*. OMS.

Frecuentemente se observan múltiples metacestodos en varias localizaciones principalmente en el sistema nervioso central por lo que los síntomas clínicos pueden variar

en cada caso (García *et al.*, 2005). Los órganos hacia los que el parásito presenta tropismo son el corazón, músculo esquelético y tejido graso subcutáneo. La CC sintomática se observa casi exclusivamente en el sistema nervioso central (SNC) o en el ojo (Nash y Garcia, 2011). Cuando el metacestodo se encuentra en el SNC es causante de la NCC, que se caracteriza por síntomas tales como cefalea, convulsiones, trastornos en la conducta e hipertensión intracraneal entre los más importantes. Las manifestaciones clínicas causadas por la CC dependen del número, localización, tamaño y viabilidad o estado de degeneración del parásito (Del Brutto, 2012). Sanz (1987) reportó que alrededor de los metacestodos vivos había una escasa reacción inflamatoria alrededor de los cisticercos en tomografías de cerebros obtenidas de niños con NCC. De igual forma, en la NCC experimental se encontraron pocas células inflamatorias alrededor de metacestodos de *T. solium* implantados subcutáneamente en ratones, comparada con la intensa reacción inflamatoria en ratones testigos (Tato *et al.*, 1995; 1996; Molinari *et al.*, 1998). Otro signo de inmunosupresión que se puede observar es la disminución de la proliferación de linfocitos de bazo de ratón implantado con metacestodos de *T. solium* (Willms *et al.*, 1980). La escasa reacción inflamatoria y la disminución de la proliferación de linfocitos pueden estar asociadas a las estrategias de evasión de la respuesta inmune que tiene el parásito.

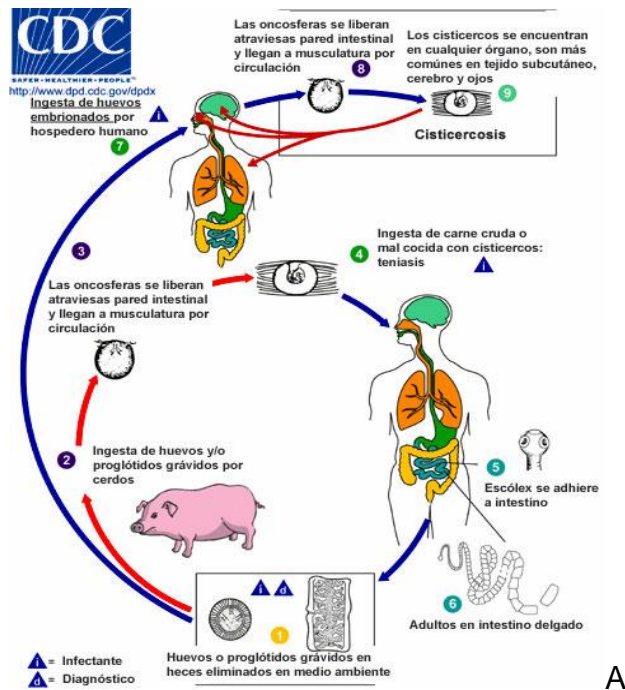
Numerosos estudios de CC experimental se han enfocado en la respuesta inmunológica del huésped que ocurre por la infección. Sin embargo, es poco conocida la participación de sustancias secretadas por el parásito que pudieran estar participando en la interacción hospedero parásito. Estas sustancias podrían estar implicadas en la evasión de la respuesta inmune, y en los déficits cognitivos que se observan en pacientes con NCC.

La generación de información necesaria para conocer los efectos de estas sustancias en el humano es difícil y su obtención es prácticamente imposible. Además, aunque se pudieran obtener, no se podrían probar en humanos. Los cerdos son también hospederos naturales del parásito, pero su manejo y manutención requiere de espacios grandes y costosos. Debido a esto, se buscan estrategias alternativas que permitan conocer mejor su patogenia en un modelo animal. Por ello, se ideó un modelo de cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*.

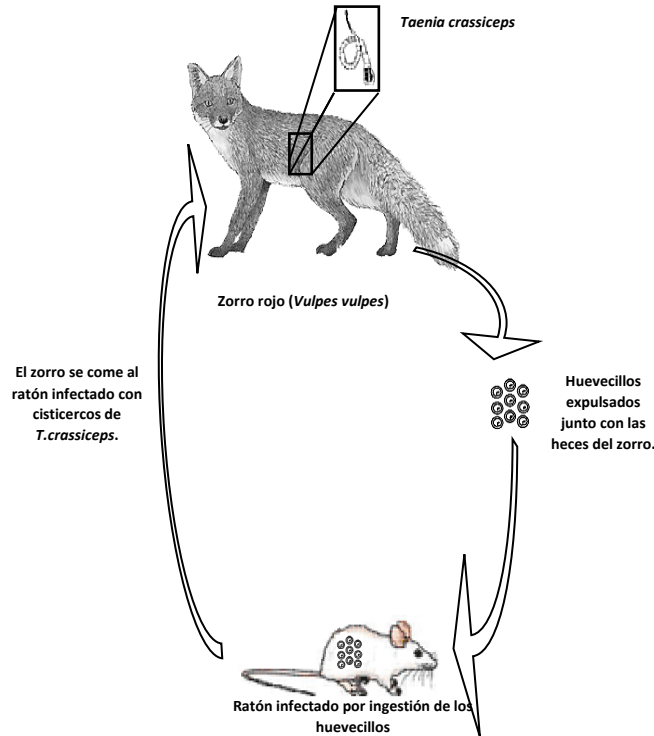
Se eligió a *T. crassiceps* porque su ciclo de vida es muy parecido al de *T. solium* y ambas pertenecen a la familia Taeniidae. Requieren de dos hospederos: uno intermediario que son cerdos y ratones y uno definitivo representado por humanos y caninos para *T. solium* y *T. crassiceps*, respectivamente. La fase adulta se encuentra alojada en el hospedero definitivo. Son gusanos planos con un escólex que cuenta con ganchos y ventosas para poder adherirse a la pared del intestino delgado. A lo largo del gusano se encuentran proglótidos inmaduros, maduros y grávidos. Los proglótidos grávidos se encuentran llenos de huevecillos (50,000 a 60,000 huevos/proglótidos), los cuales son expulsados junto con las heces del hospedero definitivo. Al ingerir estos huevecillos, los hospederos intermediarios de ambas especies son infectados. Los huevecillos viajan por el tracto digestivo hasta llegar al intestino donde las oncosferas eclosionan. Ahí atraviesan la pared intestinal y viajan por el torrente sanguíneo hasta el lugar definitivo en donde los cisticercos se alojarán (Del Brutto, 2012; Freeman, 1962). En el caso de *T. solium*, los humanos suelen ser pseudo-hospederos intermediarios, es decir, que naturalmente la fase larvaria (metacestodo) no se aloja en el humano, pero en lugares insalubres los humanos pueden consumir alimentos contaminados con huevecillos y desarrollar cisticercosis (Fig. 2 a y b). El metacestodo de *T. crassiceps* ofrece varias ventajas, entre ellas, que puede mantenerse fácilmente en animales de laboratorio, por lo que se pueden producir grandes cantidades de antígeno el cual es obtenido en condiciones homogéneas, en contraste con las serias dificultades técnicas y económicas que se presentan para obtener antígenos de *T. solium* (Peon *et al.*, 2013)

En investigaciones de nuestro grupo de trabajo se encontró que ratones infectados con *T. crassiceps* presentan un intenso daño en el epitelio seminífero (Zepeda *et al.*, 2011). Esto sugiere que el parásito debe de estar secretando una sustancia de bajo peso molecular capaz de viajar por el torrente sanguíneo y llegar a órganos distantes al sitio de infección. En este estudio se analizan los efectos de una sustancia de bajo peso molecular (denominada Factor de Metacestodo, FM) sobre el bazo y cerebro de ratones hembras Balb/C y su repercusión en la respuesta inmunológica. Este FM se aisló de las excreciones/secreciones producidas por metacestodos de *T. crassiceps*, con el que se inocularon ratones para conocer si la histoarquitectura del bazo y del cerebro sufren alguna

alteración. Para evaluar el efecto del FM se realizaron diversas tinciones como el TUNEL que ayudó a determinar si había apoptosis en las células que conforman estos órganos. Por último, la afectación del aprendizaje/memoria se examinó en el laberinto de Barnes (Rosenfeld y Ferguson, 2014).



A



B

Fig. 2 Ciclos de vida. A) *T. solium*. B) *T. crassiceps*

2. Bazo

El bazo es un órgano linfoide que tiene un papel importante en la inmunidad humoral y celular. Los antígenos son filtrados desde la sangre periférica y transportados a los centros germinales en donde se activan múltiples mecanismos para tratar de controlar las posibles infecciones presentes en el huésped. Durante la infección en el humano por *T. solium* Bueno *et al.*, 1993 demostraron una disminución en la proliferación de linfocitos de sangre periférica; por otro lado, Willms *et al.*, 1980 observaron una baja proliferación de linfocitos esplénicos de ratón cuando se les implantaron metacestodos de *T. solium* subcutáneamente. Estos datos sugieren que el parásito juega un papel importante en la disminución de la función del este órgano.

El bazo es el sitio primario en donde se filtra la sangre. Está ubicado en el abdomen, directamente debajo del diafragma y cercano al estómago. El bazo está dividido por función y estructura en pulpa roja (PR) y pulpa blanca (PB), entre estas dos regiones está la zona marginal (MZ) en los roedores que en los humanos se conoce como la zona perifolicular (Bronte *et al.*, 2013).

El bazo se organiza como un árbol de vasos arteriales ramificados en el que las arteriolas más pequeñas terminan en un sistema sinusoidal venoso. El órgano está rodeado por una cápsula fibrosa de tejido conectivo que proviene de la trabécula que soporta la vasculatura más grande. Las ramas más pequeñas del suministro arterial están cubiertas por tejido linfoide que forman la PB (Mebius y Kraal, 2005). La PR esplénica contiene macrófagos que sirven principalmente para filtrar la sangre y reciclar el hierro de los glóbulos rojos viejos. El hierro de los glóbulos rojos es liberado por los macrófagos de la pulpa roja o se almacena en el propio eritrocito en forma de ferritina. Además, el eritrocito puede almacenar grandes cantidades de hierro en forma de hemosiderina y se pueden observar grandes depósitos de este en los macrófagos de la pulpa roja. Los macrófagos de la pulpa roja también obtienen hierro mediante la eliminación de un complejo de hemoglobina (liberada de los eritrocitos destruidos intravascularmente en todo el cuerpo) y la haptoglobina a través de la vía endocitosis a través de CD163. El hierro almacenado en los macrófagos esplénicos se libera según las necesidades de la médula ósea (Forrellat *et al.*, 2000). La organización estructural y la composición multicelular del órgano también permiten la detección de los eritrocitos

viejos de la mayor parte de la sangre en la PR y la ZM. Las diversas poblaciones esplénicas no solo atrapan y eliminan los antígenos transportados en la sangre, sino que también inician respuestas inmunes innatas y adaptativas contra los patógenos. La pulpa blanca es estructuralmente similar a un ganglio linfático, contiene zonas de células T y B y permite la generación de respuestas inmunitarias específicas de antígenos que protegen al cuerpo contra enfermedades bacterianas transmitidas por sangre, infecciones víricas y fúngicas. (Bronte y Pittet, 2013). Los leucocitos en el bazo incluyen varios subconjuntos de células T y B, células dendríticas y macrófagos (Fig. 3).

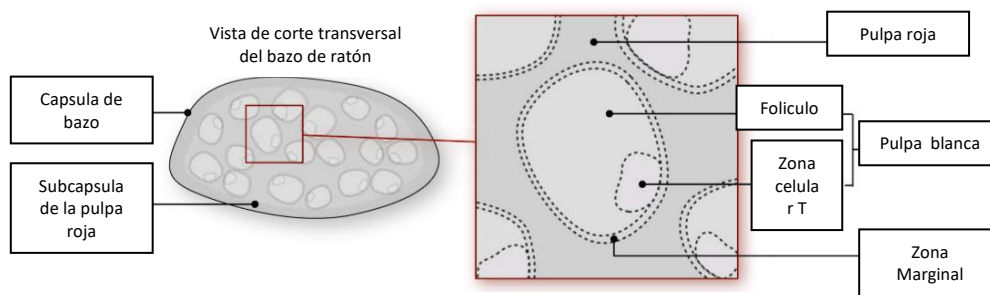


Fig. 3 Vista esquemática de la anatomía del bazo de ratón. Modificado de Bronte y Pittet, 2013

2.1 Pulpa Roja

La PR esplénica extrae células envejecidas, muertas u opsonizadas de la circulación, mientras que al mismo tiempo reconoce los patógenos y el daño tisular. La sangre se envía a la ZM por las arteriolas terminales y estas arteriolas liberan su contenido en un sistema sanguíneo abierto sin los revestimientos endoteliales tradicionales. En la PR se filtran los glóbulos envejecidos que deben atravesar los sinusoides venosos tortuosos para volver a entrar en circulación. Estos glóbulos rojos envejecidos, junto con los infectados o disfuncionales, que han perdido a CD47 (también conocida como, IAP integrin associated protein), una señal de “no me comas”, o han sido opsonizados por anticuerpos o complemento son removidos de la circulación por macrófagos de la PR y el hierro que transportaban es reciclado. Después de percolar la sangre en la PR se recoge en los senos venosos para formar el sistema sinusoidal venoso e ingresa en la vena eferente para regresar al sistema circulatorio (Lewis SM *et al.*, 2019). Entre los cordones esplénicos se encuentran los glóbulos rojos, granulocitos y monocitos. Los granulocitos están casi ausentes en la PR solo se encuentran en la PB. Los plasmablastos migran de la PB a la PR

siguiendo los gradientes de CXCL12 para que en la PB produzcan anticuerpos y luego sean transmitidos por el sistema circulatorio (Nolte *et al.*, 2000).

2.2 Pulpa Blanca

La PB se organiza como los ganglios linfáticos con compartimentos de células T y B, alrededor de los vasos arteriales. La organización y el mantenimiento correctos de la pulpa blanca están controlados por quimiocinas específicas que atraen a las células T y B a sus respectivos dominios (Fig. 4). En la vaina linfoide periarteriolar (PALS por sus siglas en inglés) las células T interactúan con células dendríticas y células B a través de un proceso de sinapsis inmunológica. Por otro lado, en los folículos de células B o zona de células B (ZCB) se lleva a cabo la expansión clonal de las células B activadas, lo que permite un cambio de isotipo e hipermutación somática (Mebius y Kraal, 2005). La migración de las células B a la ZCB requiere CXCL13, mientras que las quimiocinas CCL19 y CCL21 participan en la atracción de células T en donde se unen al receptor CCR7 (Fig. 4). El CXCL13 es producido por células dendríticas foliculares CD35+ (CDF) y células estromales adyacentes a éstas. Las células B expresan CXCR5, que participa en su migración hacia la ZCB e induce la expresión de la linfotoxina $\alpha 1\beta 2$ (LT $\alpha 1\beta 2$) en la superficie de las células B, que a su vez induce la diferenciación de las CDF y su expresión de CXCL13, lo que produce un ciclo de retroalimentación positiva (Mebius y Kraal, 2005). Existe un mecanismo similar para regular la integridad de la zona de células T, en la que las quimiocinas CCL19 y CCL21 son cruciales para la atracción y retención de las células T. Además, las células dendríticas en la ZCT producen CCL19, aunque en menor medida que la estromales. Esta interacción crucial de las células B y las células estromales ocurre en la vida neonatal temprana (Mebius y Kraal, 2005).

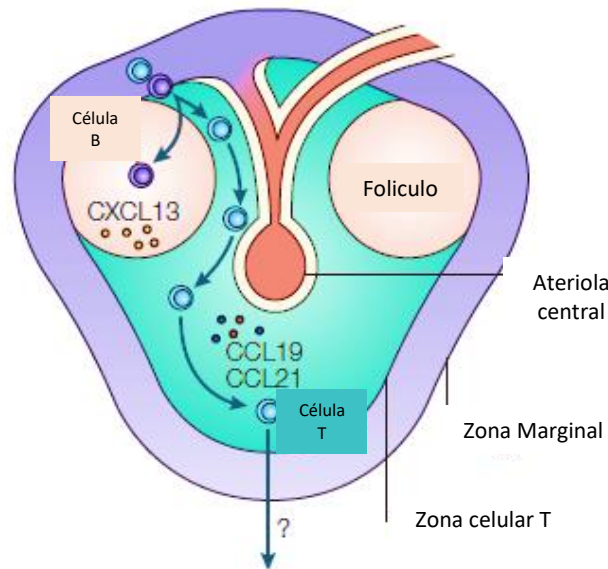


Fig. 4 Compartimientos y quimiocinas que participan en la migración de los linfocitos B y T
 Los linfocitos del bazo ingresan a la pulpa blanca del bazo desde la zona marginal, la entrada está mediada por la señalización a través de receptores de quimiocinas. Las células B son atraídas a los folículos de las células B por CXCL13, mientras que las células T se dirigen a la zona de células T atraídos por CCL19 y CCL21. Modificado de Mebius y Kraal, 2005

2.3 Zona Marginal

Parte de la sangre liberada por las arteriolas terminales en la PR se drena en la zona marginal (ZM). En esta zona reside un tipo distinto de células B de tipo innato (células B de la ZM) en estado latente ancladas por las integrinas LFA-1 y $\alpha 4\beta 7$ que se unen a la molécula de adhesión intracelular -1 (ICAM-1) y a una molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) junto con señales de quimioatracción (S1P). En la ZM los leucocitos especializados, capturan y transportan antígenos transmitidos por la sangre a la PB para la vigilancia de las células T y B. En esta zona hay dos poblaciones de macrófagos: macrófagos metalofílicos marginales (MMM) que están ubicados más cerca de la pulpa blanca formando un anillo interno y se caracterizan por la expresión de la molécula de adhesión SIGLEC1 (sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin1). Y, macrófagos de la ZM los cuales forman un anillo externo y se caracterizan por la expresión de la lecitina tipo-C SINCNR y del receptor scavenger tipo 1 MARCO (macrophage receptors with collagen structure) (Eisenbarth SC, 2019; Mebius y Kraal, 2005).

3. Células T reguladoras

Otra de las células moduladoras de la respuesta inmunológica que se encuentran en el bazo son las células T reguladoras (Treg). Se sabe que las Treg tienen un papel relevante en la modulación de la respuesta inmunoinflamatoria. Su presencia se ha reportado en parasitosis causadas por *Trypanosoma*, *Plasmodium* y *T. solium*. En la cisticercosis humana, el papel de las células Treg parece estar relacionado con el control de la inflamación, que al mismo tiempo promueve el establecimiento del parásito y reduce los posibles daños al hospedero asociados con una inflamación exacerbada en respuesta a la parasitosis.

Las células T reguladoras (Treg) son linfocitos T que regulan o suprimen a otras células del sistema inmune. Controlan la respuesta inmune ante partículas propias o extrañas y ayudan a prevenir enfermedades autoinmunes. Existen dos tipos principales: las producidas en el timo (Treg naturales – nTreg) o aquellas que se diferencian a partir de células T activadas en la periferia (Treg inducidas – iTreg).

En los años 70's surgió el concepto de células T supresoras, sin embargo, no se encontró un marcador celular o molécula soluble para identificar esta población (Gershon y Kondo, 1971). Más tarde en los 80's se encontró que los ratones timectomizados desarrollaron enfermedades autoinmunes (Nishizuka *et al.*, 1982). Sakaguchi S. y colaboradores (1995) demostraron que lo anterior se debía a la ausencia específica de células T CD4+CD25+ y que al transferirlas de otro animal se prevenía el desarrollo de estas enfermedades. La búsqueda de nuevos marcadores para definir a las células Treg llevó a la identificación de Foxp3 (Forkhead box P3). Se descubrió que estaba altamente expresado en células T CD4+CD25+ (Viguer *et al.*, 2004). La mutación de este factor de transcripción provoca diversas deficiencias inmunológicas tales como esplenomegalia, hepatomegalia y muerte temprana (Hori *et al.*, 2003). La expresión sostenida de Foxp3 en células Treg maduras es necesaria para el mantenimiento del fenotipo de la célula Treg y la función supresora. La pérdida o la disminución en la expresión de Foxp3 en las células Treg conduce a la adquisición de propiedades de las células T efectoras (Williams y Rudensky, 2007)

3.1 Células T reguladoras naturales

En la actualidad se sabe que las células nTreg CD4+CD25+Foxp3+ se originan durante el proceso normal de maduración de los linfocitos T en el timo y constituyen entre el 5% y el

10% de las células T CD4+ de la sangre periférica. La selección tímica de las nTreg requiere interacciones de mayor avididad entre su TCR y el MHCII expresado en las células del estroma del timo. Además, las células nTreg son dependientes de la vía de señalización del receptor de IL-2 para su desarrollo, expansión y función en la periferia (Rodríguez-Perea *et al.*, 2015). Expresan también en su superficie otras moléculas tales como el receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GIRT, glucocorticoid – induced tumor necrosis factor receptor) y el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4 – cytotoxic T Lymphocyte antigen 4) o CD152, cuyo papel se relaciona con mecanismos de suspensión (Chavez-Sanchez FR *et al.*, 2017). Tras el proceso de selección positiva, la selección negativa de antígenos propios se lleva a cabo por las células epiteliales de la médula tímica (células mTEC). Durante la selección negativa, los linfocitos T adquieren competencia para la eliminación de células potencialmente autorreactivas por apoptosis. Por lo tanto, si el TCR muestra una afinidad elevada o inapropiada por el autoantígeno expresado en mTEC, el timocito se destruirá. Esto gracias a la expresión de una molécula reguladora de la transcripción denominada regulador autoinmune (AIRE, autonimmune regulator) que les permite a las células epiteliales de la médula tímica expresar y presentar auto antígenos llamados ectópicos (Chavez-Sanchez *et al.*, 2017) (Fig. 5). Las mTEC son importantes para la implementación de la autotolerancia, que está mediada por células nTreg CD4+ CD25+ Foxp3+. El desarrollo de Foxp3 en las Treg está respaldado por las mTEC durante la selección negativa cuando los timocitos tienen especificidades de TCR con afinidad intermedia por los autoantígenos.

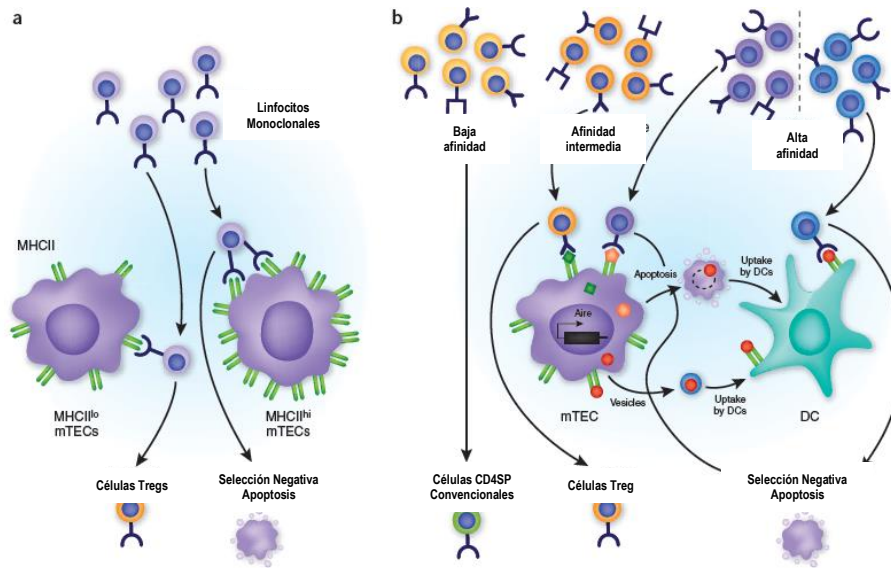


Fig. 5 Mecanismos de selección

- (a) Efecto de los cambios cuantitativos en la presentación de MHC de clase II (MHCII) por mTEC en los timocitos CD4SP con un TCR específico autorreactivo de MHC de clase II. Un nivel elevado de presentación de MHC de clase II favorecen la selección negativa, mientras que pequeñas cantidades conducen "preferentemente" a la generación de células Treg. (b) Selección de timocitos policlonales en la médula con presentación de MHC de clase II de tipo salvaje. Los mTEC expresan los antígenos con restricción de tejido en parte bajo la influencia de Aire. Algunos antígenos se transfieren a DC mediante apoptosis y fagocitosis de mTEC o mediante transferencia de célula a célula. Los timocitos que expresan TCR que reconocen el péptido MHC de clase II con baja avididad dan lugar a células CD4SP convencionales. Para los timocitos con alta avididad por el péptido propio-MHC, un grupo se elimina por interacciones con mTEC, mientras que un grupo separado se elimina por interacciones con DC. Para timocitos con afinidad intermedia, el reconocimiento de antígeno-MHC clase II en mTEC puede conducir a la inducción de células Treg. Las interacciones de afinidad moderada con otros tipos de células, incluidas las DC, también pueden conducir a la inducción de células Treg (no presentadas aquí). (Modificado de Ivan Dzhagalov & Ellen A Robey)

3.2 Células T reguladoras inducidas

Las células iTreg Foxp3+ se diferencian en condiciones variadas. Por ejemplo, las células iTreg aparecen en los nódulos linfáticos mesentéricos durante la inducción de tolerancia oral (Coombes *et al.*, 2007; Mucida *et al.*, 2005), pueden diferenciarse continuamente en la lámina propia del intestino en respuesta a la microbiota y los antígenos alimentarios (Sun *et al.*, 2007). Se generan también en tejidos con inflamación crónica (Curotto de Lafaille *et al.*, 2008), tumor (Cao *et al.*, 2007) y tejidos trasplantados (Waldmann *et al.*, 2004). La comprensión de los diferentes microambientes en el desarrollo de las células iTreg *in vivo* aún es incompleta. Sin embargo, se ha definido que el programa mínimo para el desarrollo de las células iTreg Foxp3+ requiere estimulación a través del TCR y las citocinas TGF- β e IL-2, tanto para células iTreg generadas *in vitro* como *in vivo*. La adición de TGF- β a las células T CD4+ vírgenes estimuladas por el TCR indujo la transcripción de Foxp3, la adquisición de actividad anérgica y supresora *in vitro* y la capacidad de suprimir la inflamación en un modelo experimental de asma (Chen *et al.*, 2003). El TGF- β indujo la expresión de Foxp3 en

cultivos de células T vírgenes adheridas a una placa y estimuladas con CD3 y CD28 unidas a placa (Chen *et al.*, 2003); por lo tanto, las células presentadoras de antígeno (APC) no son necesarias para la conversión *in vitro*. El mecanismo por el cual el TGF- β induce la transcripción de Foxp3 implica la cooperación de los factores de transcripción STAT3 y NFAT que actúan como un efecto potenciador para su expresión (Fantini *et al.*, 2004; Josefowicz y Rudensky, 2009). La elevada expresión de Foxp3 y la adquisición de actividad supresora por células vírgenes activadas con TGF- β *in vitro* requieren de una regulación positiva de CTLA-4. En contraste, CTLA-4 no es necesario para el desarrollo de las células nTreg en el timo, pero es necesario para su función (Yi *et al.*, 2006). Consistentemente se requería la expresión de B7 en las APC para que se una a CTLA-4 en las células T CD4 + CD25, de este modo se adquiriera el fenotipo CD4+ Foxp3 + CD25 + (Chen *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2005) (Fig. 6)

Se han descrito dos tipos de células iTreg: Tr1 y Th3. Las células Tr1 muestran una fuerte actividad inmunosupresora y son capaces de restablecer la tolerancia en varias enfermedades autoinmunes (Roncarolo y Battaglia, 2007; Pot *et al.*, 2011). La secreción de grandes cantidades de IL-10 y la destrucción de las células APC por la granzima B son los principales mecanismos de supresión mediada por Tr1 (Magnani *et al.*, 2011). Hasta el momento no se han identificado biomarcadores específicos para las células Tr1. Sin embargo, se distinguen de las células Th1, Th2 y Th17 por su perfil único de citocinas y su función. Secretan mayores cantidades de IL-10, pero también secretan IL-4 e IL-17 que son citocinas características de las células Th2 y Th17, respectivamente. Dependiendo del medio local de citocinas pueden producir IFN- γ , además producen pequeñas cantidades de IL-2 y ambas citocinas son características de las células Th1. Foxp3 no es un marcador de células Tr1, ya que su expresión es baja y transitoria después de la activación (Roncarolo *et al.*, 2011). Las células Tr1 han sido detectadas en pacientes con inmunodeficiencias combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés) después del trasplante de células hematopoyéticas que no desarrollan la enfermedad de injerto vs. huésped. Suprimen la respuesta de células T de memoria a través de vía dependiente de IL-10 y TGF- β a nivel local (Weiner *et al.*, 2011) (Fig. 6).

Las células Th3 es el tercer tipo de células iTreg. Se han descrito en contextos de tolerancia oral (mucosas). Se distinguen de las células Th1/Th2 por la secreción de TGF- β y por la expresión del péptido asociado a latencia (LAP). LAP es un propéptido que está asociado de forma no covalente al dominio amino-terminal de TGF- β formando un complejo latente (Santiago *et al.*, 2011). Oida y colaboradores (2010) identificaron una población de células T CD4+ CD25- LAP+ en el bazo que suprimían la colitis inducida por CD4+ CD45RB de manera dependiente de TGF- β . Se han identificado también células CD4+ LAP+ en sangre periférica de humanos que no expresan Foxp3, pero si el marcador de activación CD69. Estas células secretan IL-8, IL-9, IL-10, IFN- γ y TGF- β tras su activación. Además, proliferan después de activar y amplificar IL-8 (Gandhi *et al.*, 2010). Los estudios realizados hasta el momento sugieren que las células Th3 son CD4+ CD25- Foxp3- LAP+, se encuentran en la periferia y se activan por la señalización del TCR en el intestino por algún antígeno oral (Weiner *et al.*, 2011) (Fig.6).

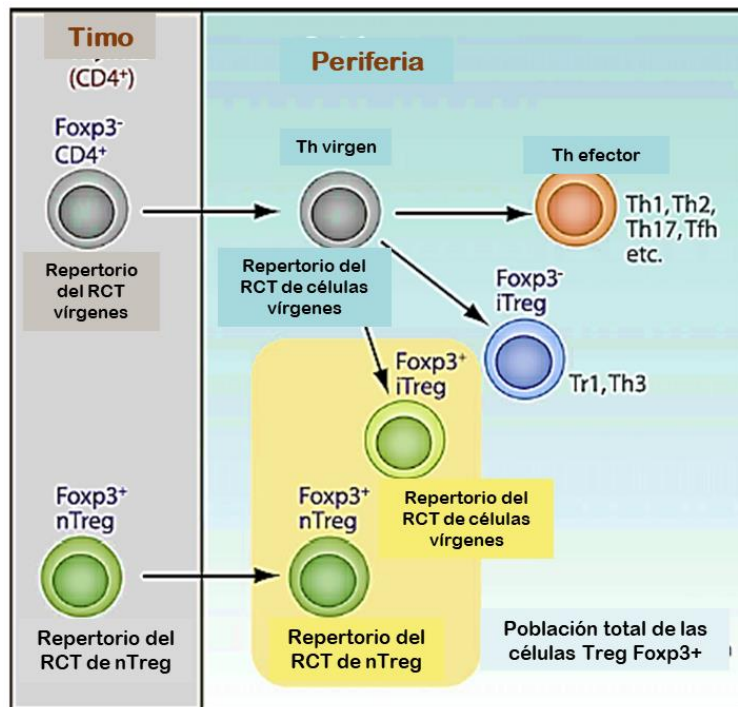


Fig. 6 Generación tímica y periférica de las células Treg Foxp3+ y Foxp3-
 Las células Treg naturales (nTreg) se diferencian en el timo y migran a los tejidos periféricos. Las células inducidas Treg Foxp3+ (iTreg) se diferencian en órganos y tejidos linfoides secundarios. Las células inducidas Treg Foxp3- Tr1 y Th3 son estimuladas por IL-10 y TGF- β respectivamente. (Modificado de Curotto de Lafaille y Lafaille, 2009)

3.3 Células Treg en infecciones parasitarias

Las células Treg que influyen en la persistencia del parásito se describieron por primera vez en un modelo de ratón con infección crónica por *Leishmania*. Las células Treg se acumulan en el sitio de inoculación / infección y suprimen la respuesta protectora Th1 por mecanismos dependientes e independientes de IL-10 (Belkaid *et al.*, 2002). Por otra parte, el modelo murino de *Trypanosoma congolense* mostró que las células Treg afectan el control eficaz de los parásitos y la producción de citocinas proinflamatorias lo cual exacerban la enfermedad (Okwor *et al.*, 2012). En humanos, *Plasmodium falciparum* induce Treg posiblemente por un mecanismo no específico de antígeno (que implica IL-2, IL-10 y TGF- β) que disminuye la respuesta inmune específica de antígeno y promueve la parasitemia (Scholzen *et al.*, 2009; Walther *et al.*, 2005). Además, se ha propuesto que el subconjunto TNFR11 + de Treg con funciones supresoras mejoradas puede contribuir a la gravedad de la malaria (Minigo *et al.*, 2009). Todos estos estudios sugieren un papel perjudicial de las células Treg en el control de infecciones parasitarias. Las células Treg se han implicado también en la reactivación de enfermedades causadas por parásitos. Por ejemplo, en el modelo de infección por *Leishmania*, la transferencia de células Treg de ratones infectados a ratones infectados crónicamente resultó en la reactivación de la enfermedad. Por el contrario, el agotamiento de células Treg en el momento de la exposición secundaria impidió la reactivación de la enfermedad (Méndez *et al.*, 2004).

4. Regulación de la respuesta inmune en enfermedades causadas por helmintos.

Se ha demostrado que los helmintos modulan/regulan la respuesta del huésped (Nutman, 2005; Harnett y Harnett, 2008). Las células Treg se han asociado con la modulación de la gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (McSoley *et al.*, 2011), diabetes (Zaccone P, Cooke A, 2011) y artritis (Chen *et al.*, 2016). Debido a la capacidad de los helmintos para regular la respuesta inmune del huésped, ha habido un interés generalizado en comprender los mecanismos por los que llevan a cabo la regulación inmune inducida por helmintos junto con las moléculas codificadas por los parásitos que pueden conducir dicha regulación. En particular, los llamados productos excretores/secretorios (ES) de parásitos helmínticos han recibido la mayor atención, ya que pueden ser objetivos para vacunas,

diagnósticos y medicamentos antihelmínticos o podrían ser útiles como posibles terapias para trastornos inflamatorios y autoinmunes (Gazzinelli-Guimaraes, Nutman, 2018). Al principio de la infección natural por helmintos durante la migración larval a través de los pulmones o la mucosa intestinal, antes del desarrollo y establecimiento del gusano adulto, las células epiteliales secretan un grupo de alarmas tales como la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), IL-33 e IL-25, que promueven la activación y diferenciación de las células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) y las células T cooperadoras CD4 T (Th2), lo que conduce a la secreción de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas asociadas a una respuesta tipo T helper 2 (Th2) provocan hiperplasia de células caliciformes, hipersecreción de moco, eosinofilia periférica y tisular, diferenciación de macrófagos M2 e inducen también altos niveles de IgG1 e IgE específicas. Las respuestas tempranas/agudas de los helmintos se asocian generalmente con una respuesta similar a la alergia. La exposición persistente a los parásitos helmintos y a los antígenos excretados/secretados (ES) derivados de éstos durante el curso de la infección conducen a una respuesta modificada de tipo Th2 que resulta en una modulación significativa de la respuesta T helper 1 (Th1): IL-2 e interferón gamma (IFN- γ) e inducen también la expansión de células (nTreg) que expresan CTLA-4, PD-1, GITR (glucocorticoid-induced TNFR family related gene), células dendríticas reguladoras (regDC) y monocitos, que son todas fuentes de IL-10. Esta misma respuesta impulsa el cambio de isotipo de células B a IgG4. La infección crónica con helmintos altera también la composición de las comunidades bacterianas intestinales, lo que conduce a la presencia de más ácidos grasos de cadena corta (SCFA) derivados de microbios que también activan y promueven la expansión de las células Treg. Colectivamente, este nuevo entorno regulatorio favorece el establecimiento de una infección crónica asintomática de larga duración, caracterizada por una respuesta linfoproliferativa específica del parásito silenciada/anérgica, pero también una inmunidad suprimida a los patógenos, alérgenos, vacunas o inflamaciones no relacionadas, enfermedades autoinmunes como enfermedades inflamatorias del intestino (EII) y diabetes tipo 1 (DMT1) o enfermedades metabólicas (Gazzinelli-Guimaraes, Nutman, 2018) (Fig. 7).

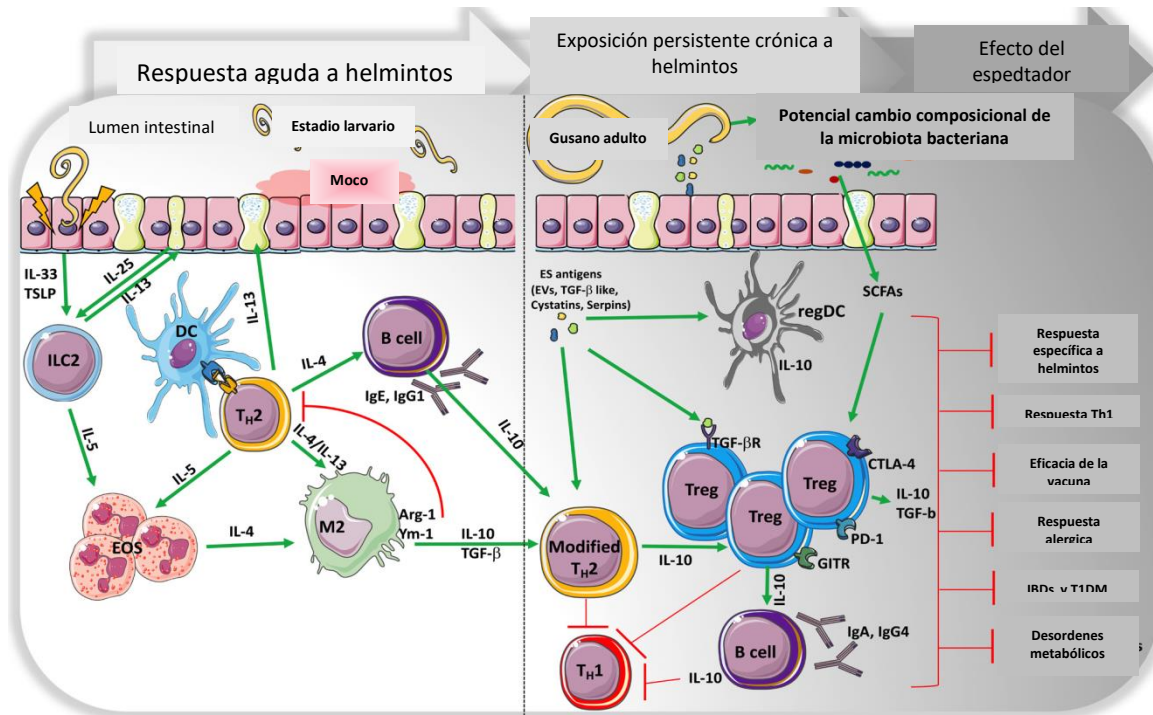


Fig. 7 Agudeza y cronicidad de la infección por helmintos impulsan distintos perfiles inmunes
 Modificado de Gazzinelli-Guimaraes y Nutman, 2018.

5. Hipocampo en la neurocisticercosis

Durante la infección por metacestodos de *T. solium* pueden resultar afectados varios órganos del huésped dependiendo en donde se aloje el parásito. Cuando se aloja en el cerebro, una de las áreas afectadas puede ser el hipocampo. Se estima que entre dos y ocho millones de personas en todo el mundo tienen NCC (OMS, 2017). Los estudios de población en regiones endémicas de *T. solium* de Sudamérica, India y partes de África han identificado el NCC como el posible factor de riesgo en aproximadamente un tercio de los casos de epilepsia (Montano *et al.*, 2005; Medina *et al.*, 2011; Millogo *et al.*, 2012). Las convulsiones son la presentación clínica más común y se estima que ocurren en hasta el 80% de las personas con NCC sintomático. En raras ocasiones, la NCC podría estar asociada con una epilepsia difícil de tratar (Singla M *et al.*, 2007; Rathore *et al.*, 2013). Las causas de la epilepsia crónica en pacientes con NCCa menudo es resistente a los medicamentos y puede contribuir al desarrollo de la esclerosis hipocampal (EH). Esta farmacoresistencia puede deberse a la gliosis perilesional o residual y daño celular directo que rodea la lesión. Vista en secuencias de resonancia magnética (MR) no convencionales, la gliosis, se ha

asociado con epilepsia mal controlada (de Souza *et al.*, 2011). Esto, sin embargo, debe ser corroborado en estudios a mayor escala. Si se confirma, el hallazgo podría ser relevante para casos de epilepsia criptogénica aparente con imágenes normales en humanos con evidencia de exposición previa a *T. solium*. Se ha sugerido también una asociación entre las lesiones calcificadas de NCC y la epilepsia del lóbulo temporal mesial con esclerosis del hipocampo (HS), aunque se especula que es esto es coincidencia (Leite *et al.*, 2000). En este trabajo se exploraron los efectos del Factor de *T. crassiceps* sobre el hipocampo de los ratones para saber si esta sustancia es causante de gliosis y esclerosis como las reportadas en enfermos de NCC.

5.1 Anatomía del Hipocampo

En los humanos, el hipocampo es una estructura alargada dentro del lóbulo temporal medial. En una disección gruesa se encontró un gran parecido a un caballito de mar el cual inspiró su nombre. En los roedores, el hipocampo es una estructura relativamente grande en forma de nuez de la india que se encuentra justo debajo de la neocorteza. Una sección transversal revela la representación anatómica del hipocampo, el llamado "bucle trináptico" (Fig. 8). La corteza entorrinal es el principal interfaz entre el hipocampo y la neocorteza y con proyecciones más fuertes a través de la ruta prefrontal a la región del giro dentado (DG) (sinapsis 1). El DG proyecta a la región CA3 a través de las fibras nerviosas (sinapsis 2). Las proyecciones de la región CA3 a la región CA1 a través de la vía colateral Schaffer (sinapsis 3). Finalmente, CA1 se proyecta nuevamente a la corteza entorrinal, completando el ciclo. Una adición importante al circuito trisináptico clásico es que los axones CA3, además de sus proyecciones a CA1, envían señales colaterales que hacen sinapsis en otras neuronas CA3. Esta vía colateral recurrente inspiró una serie de teorías influyentes acerca de la región CA3 como un sistema de memoria autoasociativo que muestra dinámicas de atracción que son críticas para soportar una memoria distribuida. Originalmente se creía que la señalización unidireccional del circuito trináptico estaba contenida principalmente dentro de un corte transversal (o lámina) del hipocampo. La "hipótesis lamelar" propuso que el hipocampo estaba estructurado como una pila de estas láminas organizadas como módulos independientes y funcionales a lo largo del eje longitudinal del hipocampo. Sin embargo, los estudios modernos de trazado anatómico han

revelado una conectividad generalizada a lo largo del eje longitudinal, que muestra que los cortes transversales (secciones transversales, como en la figura 9) a través del hipocampo no son funcionalmente independientes. La conectividad dentro del eje transversal es también más compleja con múltiples circuitos de procesamiento en paralelo y circuitos de retroalimentación. La corteza entorrinal se proyecta no solo al DG, sino también directamente a las regiones CA3 y CA1. La región CA3 proporciona una proyección de retroalimentación al DG a través de las células musgosas excitadoras del hilus, violando así la noción anterior de que el procesamiento del hipocampo es exclusivamente unidireccional. Finalmente, experimentos recientes han fomentado una nueva apreciación de la región CA2, que tradicionalmente se ha considerado una zona de transición entre CA1 y CA3. Ahora está claro que CA2 tiene sus propias funciones y debe considerarse como una unidad distinta de las regiones CA3 y CA1 (Knierim, 2015)

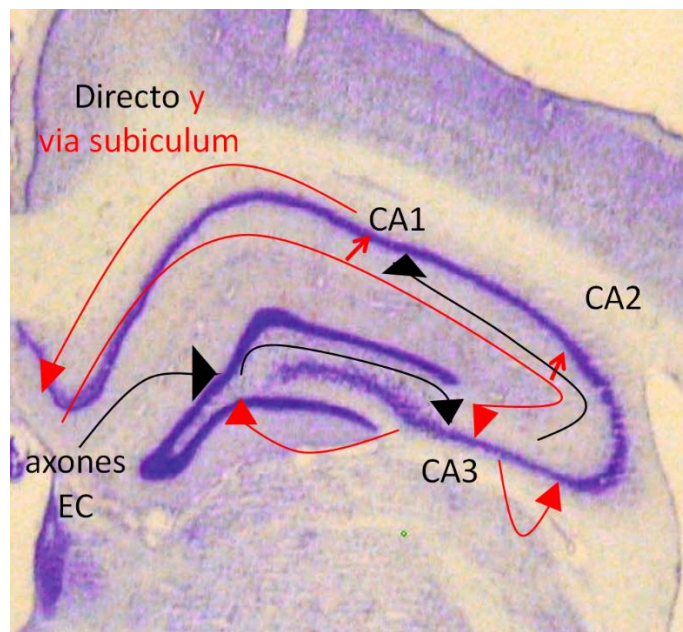


Fig. 8 Corte coronal a través del eje transversal del hipocampo.

Las flechas negras trazan el clásico "lazo trináptico". Las líneas rojas representan otras vías importantes en el hipocampo, incluidas las proyecciones directas de la corteza entorrinal (EC) a los tres campos de CA, la retroalimentación a la CE a través del subículo, la circuitería colateral recurrente de CA3 y la proyección de retroalimentación de CA3 a la DG. Por simplicidad, se omiten muchos otros detalles de la conectividad del hipocampo. Current Biology 25, 2015

5.2 La memoria espacial y el hipocampo.

En el ser humano el sistema hipocámpico que se compone por la corteza perirrinal y la corteza etorrinal. Este sistema se asocia con la memoria episódica y la memoria espacial.

Como se mencionó antes, la corteza etorrinal es el interfaz entre la neocorteza y el hipocampo. Por su parte, la corteza perirrinal participa en el reconocimiento visual de objetos complejos. Ambas cortezas conforman la circunvolución parahipocampal. La imagen neuronal funcional encefálica de seres humanos sanos muestra que la memoria espacial involucra en mayor grado a la actividad del hipocampo en el hemisferio derecho que la memoria para palabras, objetos o personas, mientras que estos últimos implican mayor actividad en el hipocampo del hemisferio izquierdo dominante (Solis y Lopez-Hernandez, 2009). La relación entre las estructuras cerebrales y las formas de memoria se ha conceptualizado bajo una taxonomía de sistemas de memoria múltiple, en la que estructuras específicas están vinculadas a clases específicas de comportamiento aprendido (Burwell *et al.*, 1995). En esta taxonomía, el hipocampo está asociado con la memoria episódica, el cuerpo estriado con el aprendizaje de habilidades, la neocorteza con el aprendizaje perceptual y la amígdala con la memoria emocional. Esto fomenta la idea de que existe una correspondencia simple uno a uno entre una estructura única y un tipo de memoria y que estos sistemas están separados unos de otros (Squire, 1987). Actualmente se considera que si bien estas estructuras inicialmente actúan de forma independiente, posteriormente generan redes de conexión complejas que interactúan para generar un memoria parcialmente compleja (Dudai *et al.*, 2015).

La red del hipocampo, que incluye el DG y las áreas neocorticales, no es el lugar donde se almacenan los recuerdos, pero tiene un papel crucial en la formación de nuevos recuerdos y en su reactivación posterior. Se sugiere que el hipocampo tiene una capacidad limitada y adquiere información de forma rápida y automática sin guardarla durante mucho tiempo. Con el tiempo, la información originalmente disponible se vuelve permanente en otras estructuras cerebrales (en la corteza), independientemente de la actividad del hipocampo en sí. El mecanismo crucial de esta transferencia es la reactivación neuronal. En otras palabras, el hipocampo y las estructuras temporales mediales conectadas a él son cruciales para mantener un evento en su conjunto, ya que distribuye de manera organizada los rastros de memoria. La dinámica entre el hipocampo, la corteza y la amígdala depende de la duración de la retención de la memoria (Dudai and Morris 2013).

Las observaciones de pacientes con amnesia después del daño del hipocampo revelan un patrón complicado de funciones de memoria deterioradas y preservadas. Los déficits incluyen un deterioro profundo y generalizado en el aprendizaje y el recuerdo de nuevos hechos y eventos, lo que impide que los pacientes, por ejemplo, aprendan normalmente de nuevas rutas, lugares o personas y que hagan un seguimiento de las citas o eventos de la vida diaria. Sin embargo, otros aspectos de la memoria como el aprendizaje de habilidades permanecen completamente intactos (Watson *et al.*, 2013). La pérdida de memoria espacial suele ser el primer síntoma que experimentan los pacientes con daño en el lóbulo temporal medial en enfermedades progresivas como el Alzheimer (Kolb y Wishaw, 1998).

ANTECEDENTES

Como ya se ha mencionado antes, los metacestodos de *T. solium* pueden alojarse en el SNC. Durante la infección, mientras el parásito está vivo puede causar inmunosupresión. Una de las primeras indicaciones de inmunosupresión es la ausencia o reducción de reacciones inflamatorias que rodean al parásito en la cisticercosis humana (Sanz, 1987) y alrededor de metacestodos de *T. solium* implantados por vía subcutánea en ratones (Tato *et al.*, 1995, 1996; Molinari *et al.*, 1998). Otro signo de inmunosupresión es la disminución de la proliferación no específica, *ex vivo* de linfocitos de sangre periférica estimulados con concanavalina A (Con A) en cerdos infectados naturalmente con cisticercos (Molinari *et al.*, 1993). Además, se ha demostrado una disminución de la proliferación de linfocitos esplénicos de ratones infectados con *T. crassiceps* y linfocitos periféricos estimulados con Con-A o antígenos cisticercos en humanos infectados con cisticercos de *T. solium* (Sciutto *et al.*, 1995; Bueno *et al.*, 2001). Hay poca información disponible sobre las moléculas que E/S los metacestodos de *T. solium* involucradas en la inducción de los efectos inmunosupresores. Sin embargo, está demostrado que una sustancia de bajo peso molecular (3500 Da) secretada por el metacestodo de *T. solium* disminuye la captación de timidina triteada [H^3] por linfocitos periféricos humanos estimulados con fitohemaglutinina (Molinari *et al.*, 1990). Esta sustancia disminuye también la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4 en linfocitos sanos de bazo de ratón estimulados con Con-A y la del TNF- α en macrófagos peritoneales de ratón estimulados *in vitro* con lipopolisacárido (Arechavaleta *et al.*, 1998). Otros estudios han demostrado que los productos de excreción/secreción de metacestodos de *T. crassiceps* suprimen las respuestas proliferativas de células T *in vitro* y la producción de IFN- γ e IL-4 en las primeras etapas de la infección (Spolski *et al.*, 2000). Recientemente, se demostró que el FM de *T. crassiceps* induce daño estructural en células somáticas y germinativas de los testículos y aumenta significativamente la atresia de los folículos de ovario primario y secundario en ratones Balb/C (Zepeda *et al.*, 2011b; Solano *et al.*, 2015). Los estudios experimentales de la cisticercosis se han centrado en gran medida en su relación con la respuesta de inmunorregulación del huésped (Gómez-García *et al.*, 2006; Peón *et al.*, 2013). Por el contrario, se sabe poco sobre la participación de sustancias secretadas por el parásito en las interacciones huésped-parásito. Numerosos estudios han

demostrado que el TGF- β tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de varias células linfoides, incluidas las células T y B (Kehrl *et al.*, 1986, 1991). Chen *et al.*, (2003) proporcionaron evidencia de que TGF- β 1 es un factor crítico en el desarrollo de células reguladoras Treg periféricas) y demostró que TGF- β cambia las células CD4⁺ CD25⁻ hacia un fenotipo supresor de células T CD4⁺CD25⁻ a través de la activación del factor Foxp3. El FM podría estar activando la expresión de TGF- β y Foxp3 para regular la respuesta inmune a su favor.

Los metacestodos de *T. solium* no solo pueden suprimir al sistema inmune. Además, cuando se alojan en el SNC y causan la NCC pueden manifestar diversos síntomas en el huésped tales como convulsiones, dolores de cabeza y déficits neurológicos. Sin embargo, los déficits neurológicos causados por *T. solium* en humanos no se han examinado completamente, particularmente los síndromes de depresión. Adicionalmente, el deterioro cognitivo en pacientes con NCC puede ser mucho más frecuente de lo que anteriormente se pensaba. Se han informado signos de enfermedad psiquiátrica y deterioro cognitivo en 65.8% y 87% de los pacientes, respectivamente (Forlenza *et al.*, 1997). Estos autores detectaron también déficits de atención en todos los pacientes y el 25% de los pacientes tenían la memoria alterada en una muestra de 38 pacientes con NCC. Descubrieron además que la enfermedad activa y la hipertensión intracraneal se asociaron con tasas más altas de morbilidad psiquiátrica y trastornos del estado de ánimo que estaban fuertemente relacionados con la depresión existente. Otros síntomas de enfermos de NCC son hidrocefalia, meningitis crónica y deterioro de las funciones ejecutivas, memoria verbal y no verbal, praxis y fluidez verbal (Varghese *et al.*, 2016). Se ha observado atrofia del hipocampo sin convulsiones en pacientes con NCC calcificada, lo que sugiere mecanismos mediados por inflamación provocados por la cisticercosis que pueden contribuir o incluso conducir a una epilepsia del lóbulo temporal mesial refractaria con esclerosis del hipocampo (MTLE-HS) por mecanismos que necesitan aclararse (Bianchin *et al.*, 2015; Gripper y Welburn, 2017). Recientemente, Morales-Montor *et al.*, (2014) identificaron correlación entre la infección por *T. crassiceps*, la alteración de la memoria a corto plazo y los niveles alterados de neurotransmisores y citocinas en el hipocampo del ratón. Usando las secreciones *in vitro* de metacestodos de *T. solium* obtenidas de cerdos cisticercosos, se aisló una "fracción" de bajo peso molecular,

que al cultivarla con linfocitos T humanos y de ratón redujo significativamente su proliferación y la producción de citocinas cuando se estimuló con lectinas (Molinari *et al.*, 1990; Arechavaleta *et al.*, 1998; Hernández-Mendoza *et al.*, 2005). Dado que la NCC humana parece estar asociada con déficits cognitivos, incluidas las alteraciones de la memoria, se necesitan estudios que investiguen la participación de áreas relacionadas con la memoria en la NCC. De igual forma que en el caso de *T. solium*, en nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que una sustancia de bajo peso molecular (1300 Da) secretada por metacestodos de *T. crassiceps*, está involucrada en el daño de diversos órganos como testículos y ovarios en ratones inoculados con la misma (Zepeda *et al.*, 11a y b, Solano *et al.*, 2015). A esta sustancia la hemos denominado Factor de Metacestodos (FM). Este FM fue aislado del líquido peritoneal de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* mediante una ultrafiltración en una columna de Sephadex G50.

Todos estos hallazgos sugieren que la psicopatología observada en la NCC humana debe tener una base orgánica, que podría ser inducida por una fracción de bajo peso molecular secretada por el parásito en su etapa vesicular durante la infección. A partir de esto dicha fracción podría migrar y dañar las células en varios tejidos. Por lo tanto, en el presente trabajo se determinarán los efectos patogénicos de la infección por *T. crassiceps* y la inoculación del FM en la histoarquitectura del bazo de ratón y sus repercusiones en la respuesta inmune del huésped, como la expresión de TGF- β y el factor Foxp3 por las células esplénicas. Esto puede ayudar a entender la inmunosupresión en la cisticercosis experimental. Se estudiarán también los efectos tanto de la infección como la inoculación del FM en células del hipocampo de ratones BALB/c, como modelo de cisticercosis humana. En esta parte del estudio se analizarán algunas formas de aprendizaje y memoria el laberinto de Barnes, así como las lesiones histológicas que puedan causar en el hipocampo y las diferentes áreas que lo componen. Histopatológicamente la epilepsia del lóbulo temporal (TLE) asociada con esclerosis hipocampal se ha caracterizado por la muerte celular y la pérdida de células neuronales, que es más grave en las regiones CA1 y CA3 y en el hilus del DG, pérdida de volumen, gliosis reactiva, y dispersión de las células granulares de DG (Sloviter, 1994; Lurton *et al.*, 1998).

HIPÓTESIS

Si el factor de metacestodos de bajo peso molecular está relacionado con la inmunosupresión en la cisticercosis, puede ser el responsable de la disminución de linfocitos ocasionados por un daño tisular del bazo y de la pérdida de memoria espacial debido al daño en el hipocampo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos patogénicos del factor de metacestodo de *Taenia crassiceps* sobre la histoarquitectura del bazo e hipocampo de ratón, su repercusión en la respuesta inmunológica del huésped y en la memoria espacial.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar el Factor de Metacestodos (FM) secretado por *T. crassiceps*
2. Determinar el efecto de la infección intraperitoneal con metacestodos de *T. crassiceps* y del FM inoculado subcutáneamente en ratones sobre las células de bazo.
3. Analizar la expresión génica del TGF β y Foxp3 en esplenocitos de ratones infectados o inoculados con el FM
4. Cuantificar las poblaciones de linfocitos esplénicos CD4+, CD8+ y CD19+ en bazos de ratones sanos, infectados o tratados con el FM.
5. Analizar el aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto de Barnes en ratones sanos, infectados o tratados con el FM.
6. Determinar el efecto de la infección o de la inoculación del FM sobre las células del hipocampo en el cerebro de ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Reactivos

PBS (Roche, Mannheim, Alemania)
Membrana de 0.45 μm de poro (Millipore, Darmstadt, Germany)
Sephadex G-50 (Pharmacia, Issaquah, WA, USA)
Pesos moleculares estándares (BioRad, Hercules, California, US)
Glutaraldehido (Merck, Darmstadt, Alemania)
RPMI 1640 (SIGMA [®] , Mannheim, Alemania)
L-Glutamina 200mM-Penicilina (10,000U)- Estreptomina 10mg (SIGMA [®] Mannheim, Alemania)
Suero Fetal Bovino (SBF) (Gibco, Grand Island, N.Y.)
Histopaque 1077 (SIGMA [®] , Mannheim, Alemania)
Anti-CD4 PE (0.2 mg/ml) (BD, Franklin Lakes, Nueva Jersey, USA)
Paraformaldehido (Merck, Darmstadt, Alemania)
FACS [™] Permeabilizing Solution 2 (Roche)
In Situ Cell Death fluorescein Kit (Roche)
Pentobarbital sódico (Sedalphorte ^{MR})
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD (Roche)

2. Material Biológico.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c de 28 días de edad (20-22 g) que se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento con acceso a comida y agua *ad libitum*, siempre bajo los principios de los cuidados de animales de laboratorio y las leyes sobre el uso de animales (Bankowski y Hower-Jones, 1986).

Se utilizaron metacistos de *T. crassiceps* de la cepa WFU, mantenidos intraperitonealmente en los ratones hembras BALB/c por pases sucesivos cada 45 días post-infección. Se infectaron 12 ratones hembras BALB/c por vía intraperitoneal con 40 metacistos (de 1 a 2 mm) de *T. crassiceps* suspendidos en 200 μl de PBS. Después de 9 días de la infección, los ratones fueron sacrificados y se les lavó el peritoneo con 10 ml de PBS estéril. Como controles se obtuvieron lavados peritoneales de 6 ratones hembras

BALB/c sanas. Los lavados (controles e infectados) se recuperaron en tubos cónicos estériles de 15 ml. Todos los tubos y se centrifugaron a 28 g por 10 minutos (Centrifuga DAMON/IEC DIVISION, Needham, Mass, USA). Los sobrenadantes de cada grupo de ratones se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

3. Ultrafiltración en una columna de Sephadex G-50 M.

Los sobrenadantes liofilizados de ambos grupos (controles e infectados), se re suspendieron en 15 ml de PBS y se ajustaron a 2.0 mg de peso seco/ml. Se filtraron a través de una membrana de 0.45 μm de poro (Millipore) y se cargaron en una columna (95 X 1.5 cm) de Sephadex G-50 que fue previamente equilibrada con 0.15 M de PBS y se recolectaron fracciones de 4 ml. Los sobrenadantes eluidos con PBS se monitorearon mediante un analizador ultravioleta ISCOModelo UA5 a una longitud de onda de 280 nm. Se seleccionaron y mezclaron las fracciones correspondientes al pico II (34-44) de ambos grupos, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C. La columna de Sephadex G-50 se calibró previamente usando pesos moleculares estándares. Al pico II de los ratones sanos se le llamó Líquido Peritoneal Control (LPC) y al pico II de los ratones infectados se le llamó Factor de Metacestodo (FM).

4. Tratamientos para obtener los bazos de los ratones de 45 dpi.

Tanto el FM como el LPC (Líquido peritoneal control) se ajustaron a una concentración a 2.5 mg/ml de proteína usando un espectrofotómetro Spectronic 1001 plus (Milton Roy, North Houston Gardens, Texas, USA). Se inocularon 5 ratones BALB/c sanos con 0.1 ml de FM y 5 ratones hembras BALB/c con 0.1 ml de LPC; ambos grupos fueron inoculados cada 4 días durante 43 días. Dos días después de la última inoculación (45 días), los ratones fueron sacrificados y se obtuvo el bazo de cada uno. Por otro lado, se infectaron intraperitonealmente 5 ratones hembras BALB/c con 40 metacestodos de *T. crassiceps* intraperitonealmente suspendidos en 200 μl de PBS 1X. La infección se mantuvo 45 días y se sacrificaron el mismo día que los dos grupos anteriores. Los bazos de cada grupo (control y experimentales) se cortaron en 3 partes. La sección derecha se fijó con formalina amortiguada (PBS) pH 7.4 durante 12 horas a temperatura ambiente; posteriormente se

deshidrató usando diferentes concentraciones de alcohol (desde 70% al 100%). La sección izquierda se fijó con glutaraldehído al 2.5% y se procesó para su estudio mediante microscopía electrónica. La sección central se perfundió con RPMI 1640 para obtener los linfocitos como se detallará posteriormente.

5. Obtención de linfocitos esplénicos.

La sección central de cada bazo se perfundió con 15 ml de RPMI 1640 con L-Glutamina 200mM-Penicilina (10,000U)-Estreptomicina 10mg (RPMI incompleto)} en una caja Petri para recolectarlo posteriormente en un tubo cónico de 15 ml. El material se dejó reposar en hielo durante 5 minutos para eliminar los detritus gruesos y se decantó a otro tubo. Los tubos con células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos (Centrifuga DAMON/IEC DIVISION, Needham, Mass, USA). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de RPMI arriba mencionado adicionado con 10% de Suero Fetal Bovino (SBF), (RPMI completo). Los linfocitos esplénicos se obtuvieron mediante un gradiente de histopaque 1077 por centrifugación a 28 g durante 30 minutos en una centrifuga DAMON/IEC DIVISION. La interfase se recuperó y se colocó en 15 ml RPMI incompleto. Las células se centrifugaron a 38 g durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI completo, se tiñeron con azul de tripano para determinar viabilidad y se contaron en hemocitómetro.

6. Tinción de linfocitos esplénicos con anti-CD4 y TUNEL

Un millón de células de cada ratón se colocaron en tubos para citómetro (BD). Un tubo para cada ratón. A cada tubo se le agregó 2 μ l de anti-CD4 PE (0.2 mg/ml) en un volumen final de 200 μ l. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación durante 30 min (Agitadora horizontal Water Bath Shaker). A cada tubo se le agregó 1ml de PBS 1X y todos los tubos se centrifugaron a 38 g (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) durante 10 minutos. Los sobrenadantes se desecharon, a cada tubo se le agregó 1 ml de paraformaldehído al 4% en PBS 1X y todos los tubos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS 1X centrifugándolos durante 10 minutos. Los sobrenadantes se desecharon y a

cada tubo se le agregó 1ml de FACS™ Permeabilizing Solution 2 (10) 1:10 v/v y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad y agitación por 10 minutos. A continuación, las células se lavaron 2 veces con 2 ml de PBS 1X y los tubos se centrifugaron durante 10 minutos. A cada tubo se le agregaron 20 µl de la mezcla de TUNEL (mezcla: 50 µl de Enzyme solution (vial1) + 450 µl de Label solution (vial2)) (In Situ Cell Death fluorescein Kit) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora agitando ligeramente cada 15 minutos. Por último, a cada tubo se le añadió 1 ml de PBS 1X y se centrifugaron a 20 g durante 10 min, los sobrenadantes se desecharon y a cada tubo se le agregó 1ml de PBS 1X. Todas las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (BD).

7. Análisis por citometría de Flujo.

El citómetro de flujo FACSCalibur permite analizar de forma simultánea diversas características celulares, lo que proporciona información de varios parámetros de cada una de células que se analizan. Los valores de calibración fueron: FSC – 1.60, SSC - 389, FL1 - 579, FL2 – 462, FL3 – 465. Compensación: FL1-FL2 – 0.6, FL2-FL1 – 163, FL2-FL3 – 15.4 y FL3-FL2 – 9.1. Se analizaron 10,000 células por cada experimento, se obtuvieron gráficos FSC (tamaño) y la SSC (granularidad) para conocer el porcentaje de células de cada estirpe mediante fluorescencia.

8. PCR punto final

Para determinar si la infección con metacestodos de *T. crassiceps* y la inoculación de ratones con el FM indujeron la expresión génica de TGF-β y Foxp3 por células esplénicas de ratón se usaron 18 ratones hembras BALB/c con un peso de 20 g ±2 g (seis por grupo). Los ratones se infectaron y se inocularon con el FM como se describió en el punto 3 de la metodología. A los 45 días post-tratamiento todos los ratones se sacrificaron, los bazo se removieron asépticamente y el ARN total se obtuvo de acuerdo con el método de Shabaana *et al.*, (2001). Los primers forward y reverse que se usaron son: TGF-β1 FP: TTGCTTCAGCTCCACAGAGA, RP: TACTGTGTGTCCAGGCTCCA; and FOXP3 FP: TCCTTCCCAGAGTTCTTCCA, RP: CGAACATGCGAGTAAACCAA (Yang *et al.*, 2010). El gene β-actina se usó como control interno (Sun *et al.*, 2012).

9. Tratamientos para obtener cerebro de ratones de 45 dpi.

Nuevamente tanto el FM como el LPC se ajustaron a una concentración a 2.5 mg/ml de proteína de acuerdo a la lectura a 280 nm, medida en un espectrofotómetro Spectronic 1001 plus (Milton Roy). Se inocularon dos grupos de 5 ratones como se describió anteriormente. Por otro lado, se infectaron 5 ratones con metacestodos de *T. crassiceps* como se describió anteriormente. La infección se mantuvo 45 días y se sacrificaron el mismo día que los dos grupos anteriores. Todos los ratones fueron anestesiados con 0.3 ml de pentobarbital sódico (Sedalphorte ^{MR}) para hacer una perfusión transcárdica. Primero se perfundió con solución salina durante 5 minutos para eliminar todas las células sanguíneas del sistema circulatorio y luego con formalina amortiguada durante 5 minutos para fijar todos los órganos del ratón. El cerebro se obtuvo haciendo un corte coronal en la línea bregma de cada uno, la parte posterior del corte se mantuvo en formalina amortiguada durante 12 horas a temperatura ambiente; posteriormente las muestras se deshidrataron usando diferentes concentraciones de alcohol (desde 70% al 100%). Todas las muestras se embebieron en parafina.

10. Tratamientos para obtener cerebros de ratones de 115 dpi.

18 ratones fueron divididos en 3 grupos de 6 ratones c/u. El grupo control (Con) y el grupo inoculado con el factor de metacestodos (FM) fueron inoculados subcutáneamente con 0.1 ml de LPC y del FM respectivamente cada 4 días durante 100 días. Un 3er grupo (Inf) fue inoculado intraperitonealmente con 40 metacestodos de *T. crassiceps*. Todos los ratones fueron sacrificados a los 115 dpi anestesiándolos con 0.3 ml de pentobarbital sódico (Sedalphorte ^{MR}) para hacer una perfusión transcárdica primero con solución salina fisiológica y luego con formalina amortiguada como se describió anteriormente. Se obtuvo el cerebro de cada uno, haciendo un corte coronal como se describe arriba y las porciones detrás del corte se mantuvieron en formalina amortiguada durante 12 horas a temperatura ambiente; posteriormente se deshidrataron usando diferentes concentraciones de alcohol (desde 70% al 100%). Todas las muestras se embebieron en parafina.

11. Laberinto de Barnes

A los 110 días postinfección con metacestodos intraperitoneales de *T. crassiceps* o inoculación subcutánea con FM se siguió el procedimiento de Barnes Maze para roedores pequeños para estimar el deterioro cognitivo en el aprendizaje y la memoria (Rosenfeld y Ferguson, 2014) con modificaciones menores. Se utilizó una sobrecarga de iluminación brillante. El laberinto estaba centrado debajo de las luces. Los ratones fueron probados sin el uso de una pared o señales. El laberinto tenía 90 cm de diámetro y 90 cm de altura, con 20 agujeros de escape que tenían un diámetro de 5 cm cada uno y solo había un agujero con una caja de escape. En esta prueba ningún agujero fue tapado. Después de 30 min de habituación, cada ratón se retiró suavemente de su jaula y se depositó en el centro del laberinto. Entonces, las luces del techo se encendieron. La actuación de cada ratón se grabó utilizando una cámara Canon vixia HF R70 (Canon, Melville, N.Y. USA). Si el ratón no pudo ingresar a la jaula de escape en 5 minutos, se le llevó suavemente de la cola a la ubicación correcta y dentro de la caja de escape, donde permaneció durante dos minutos. Esta tarea se realizó con cada ratón 2 veces/día con un intervalo entre ensayos de aproximadamente 30 minutos. Todos los ratones se evaluaron durante cinco días consecutivos. Los videos se analizaron cuidadosamente y los datos se graficaron en función del tiempo de latencia en segundos (tiempo que el ratón tarda en encontrar el agujero de escape y se introduce en él). La prueba de laberinto de Barnes se utilizó para estudiar el comportamiento de los ratones control, infectados con metacestodos y tratados con FM.

12. Tinción con hematoxilina-eosina de bazos y cerebro (45 y 115 dpi).

Los bazos y los cerebros fijados con formalina amortiguada y deshidratados se incluyeron en parafina para hacer 20 cortes de 3 μm de cada órgano (control y experimentales), en un microtomo 1130/Biocut (Reichert-Jung, Metek, Depew, NY, USA). Los cortes se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina y se analizaron en un microscopio óptico IX71 Olympus. Se fotografiaron las regiones hipocampales y las imágenes se procesaron en Photoshop.

13. Tinción con TUNEL (bazos de 45 dpi y cerebros de 45 dpi y 115 dpi)

Se utilizó el *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein para esta tinción. Después de desparafinar y rehidratar los cortes se incubaron 30 minutos a 37 °C en una solución de proteinasa K (15 µg/ml en Tris HCL 10 mM, pH 7.4) para permeabilizar los tejidos. Se lavaron 2 veces con PBS 1X y se trataron con una solución de bloqueo (Tris HCL pH 7.5 0.1M + 3% BSA + 20% SFB). Se lavaron 2 veces con PBS 1X, se secó el área alrededor de la muestra y se añadieron 50 µl del mix de reacción de TUNEL (como lo indica el Kit). Los cortes se cubrieron con parafilm con el fin de que la solución se distribuyera uniformemente y se incubaron en una cámara húmeda durante 1 hora a 37 °C en oscuridad. Por último, los cortes se lavaron 2 veces con PBS 1X y se analizaron en un microscopio confocal invertido FV 1000 Olympus y se obtuvieron fotografías que luego se procesaron en Photoshop.

14. TUNEL-Pod (cerebros de 45 dpi)

Para esta tinción se utilizó el *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD para esta tinción. De los cortes de cerebro se escogieron 10 cortes alternadamente que se desparafinaron y rehidrataron. A continuación, se bloqueó la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% en metanol, se lavaron 2 veces con PBS 1X y se incubaron 30 minutos a 37 °C en una solución de trabajo de proteinasa K (15 µg/ml en Tris HCL 10 mM, pH 7.4) para permeabilizar los tejidos. Se lavaron 2 veces con PBS 1X y se trataron con una solución de bloqueo (Tris HCL pH 7.5 0.1M + 3% BSA + 20% SFB). Se lavaron 2 veces con PBS 1X, se secó el área alrededor de la muestra y se añadieron 50 µl de la mezcla de reacción de TUNEL (como lo indica el Kit). Los cortes se cubrieron con parafilm con el fin de que la solución se distribuyera uniformemente y se incubaron en una cámara húmeda durante 1 hora a 37 °C en oscuridad. Para convertir la señal se agregaron 50 µl del convertidor POD sobre el tejido, se cubrió con parafilm y se incubó en una cámara húmeda por 30 minutos a 37 °C. Se lavó 2 veces con PBS 1X y se utilizó una solución de DAB (3, 3' diaminobenzidine tetrahydrochloride) (900 µL de buffer de DAB + 100 µl DAB 10X) para revelar la señal. Por último, los cortes se lavaron 2 veces con PBS 1X, se deshidrataron (alcohol al 70, 80, 90, 100% por 10 minutos) y 10 minutos en xileno para al final poner cubre objetos. Al final se analizaron en un microscopio óptico IX71 Olympus.

15. Microscopía de transmisión electrónica

Los bazo de los ratones control y experimentales se lavaron con cacodilatos y se siguió la técnica de Spurr (1969) para el procesamiento. Para analizar las ultraestructuras, se realizaron cortes ultrafinos con una navaja de diamante, se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con un microscopio de transmisión electrónica Jeol 100 S.

16. Tinción DAPI (4',6diamidino-2-phenylindole)

Se tomaron 5 laminillas de cada ratón. Después de desparafinarlas y rehidratarlas, se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 10 minutos. Los cortes se permeabilizaron con 0.1% de Triton X100 + 0.1% de Citrato de Sodio durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS 1X durante 10 minutos y se tiñeron con 25 μ l del stock de DAPI + 975 μ l de PBS 1X. (Stock= 0.002g DAPI + 1ml de H₂O estéril). Por último, se lavaron con PBS 1X durante 5 minutos y se contratiñeron con azul de Evans (0.026% en PBS 1X) 1 segundo por laminilla. Se lavaron con PBS 1X y se analizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Oberkochen, Alemania).

17. Estadísticas

Se contaron las células apoptóticas en diez campos microscópicos de la pulpa blanca de cada bazo de todos los grupos para calcular la media \pm DE y el valor P en las secciones de bazo teñidas con H/E. Las secciones de bazo teñidas con TUNEL (dos secciones de cada bazo para todos los grupos) se analizaron con un microscopio invertido confocal FV 1000 Olympus. Las imágenes se analizaron con el programa ImagePro v. 6.2 (Media Cybernetics Silver Spring, Maryland, EE. UU.) Para medir la media \pm DE y los valores P de los núcleos fluorescentes (TUNEL+) en áreas de 0.3-6 mm². Los porcentajes de células CD4+ determinados a partir de los diagramas de citometría de flujo FL1 / FL2 se consideraron para análisis estadísticos. Todos los datos, incluidos los de densitometría, se procesaron para determinar los valores media \pm DE y P utilizando el software GraphPad InStat (La Jolla, California, EE. UU.). Los valores de P<0.05 se consideraron estadísticamente significativos. El número de núcleos teñidos con TUNELPOD del hipocampo de ratones de 45 dpi se midió

mediante conteo manual (células/mm²) con la ayuda del software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA; <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997- 2012). Las células de los tres grupos de ratones se contaron en áreas seleccionadas de 1 o 3 mm² de cada sección del hipocampo. Para el análisis estadístico se realizaron análisis de varianza de una cola para comparar la media de células apoptóticas de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* o ratones tratados con FM con la media de células apoptóticas de ratones controles. El análisis estadístico se realizó con el software Graphpad (GraphPad Instat, San Diego, California, EE. UU.) P<0,05 se consideró significativo. El número de células teñidas con hematoxilina/eosina y TUNEL positivas del hipocampo de ratones de 115 dpi se midió mediante conteo manual (área de 100 μm²) con la ayuda del software Image J. Para datos estadísticos se hizo un análisis de varianza de una cola y la prueba de Tukey, ambos se realizaron con el software GraphPad (GraphPad Instat, San Diego, California, EE. UU.). Los datos se presentan como la media ± DE. P <0.05 se consideró significativo.

RESULTADOS

1. Ultrafiltración a través de Sephadex G50.

Después de concentrar los líquidos peritoneales de los ratones infectados y de los ratones sanos se pasaron por una columna de Sephadex G-50. En la figura 9 se puede observar como el líquido peritoneal del ratón infectado, genera dos picos. El pico número I se encuentra constituido por proteasas principalmente (dato no mostrado), mientras que las fracciones 34 a la 44 indicadas con el número II constituyen lo que se ha llamado Factor de Metacestodos (FM). Estas fracciones se mezclaron y la mezcla se utilizó para inocular a los ratones experimentales. Por otro lado, el líquido peritoneal de los ratones sanos generó solo el pico I aunque en menor concentración que el de los ratones infectados. Las fracciones 30 a la 47 de los ratones sanos se utilizaron para inocular a los ratones controles.

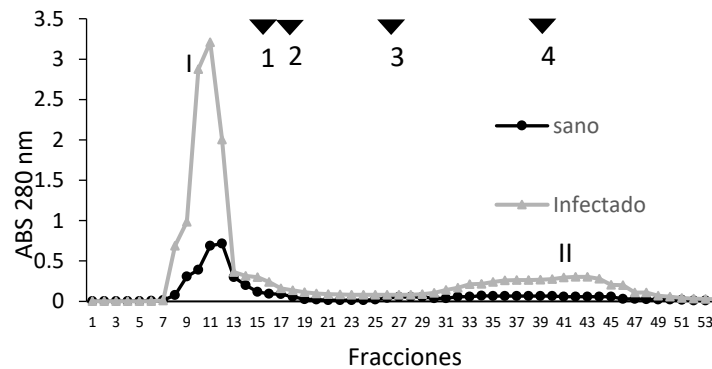


Fig. 9 Perfil de elución mediante ultrafiltración por Sephadex G-50 de los líquidos peritoneales de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* y ratones sanos.

Las flechas señalan los PM expresados en kDa. 1 = 105.92 kDa, 2 = 36.84 kDa, 3 = 9.2 kDa, and 4 = 1.3 kDa. I=pico I de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* y de ratones sanos. II=pico II de ratones infectados.

2. Evaluación de los cortes de bazo teñidos con H/E

La histoarquitectura de la pulpa blanca de las secciones de bazo de los ratones control tratados con LPC estaba intacta (figura 10 A y D). En contraste, las secciones del bazo de los ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* y teñidas con H/E exhibieron un daño grave de los tejidos en ambas pulpas: la histoarquitectura de la pulpa blanca estaba desorganizada y muchas células habían perdido contacto intercelular y exhibido alteraciones intracelulares como picnosis y núcleos fragmentados (figura 10 B y E). Los bazos de los ratones tratados con el FM exhibieron también desorganización de la pulpa blanca, aunque el alcance de esta desorganización fue menor que la de la pulpa blanca de ratones infectados con *T. crassiceps*. Muchas células mostraron la cromatina fragmentada

y periférica. En cada campo algunos linfocitos exhibieron núcleos picnóticos y fragmentados (figura 10 C y F). El número de células apoptóticas en la pulpa blanca de los ratones infectados con *T. crassiceps* fue significativamente mayor que el de los ratones de control (figura 10 G).

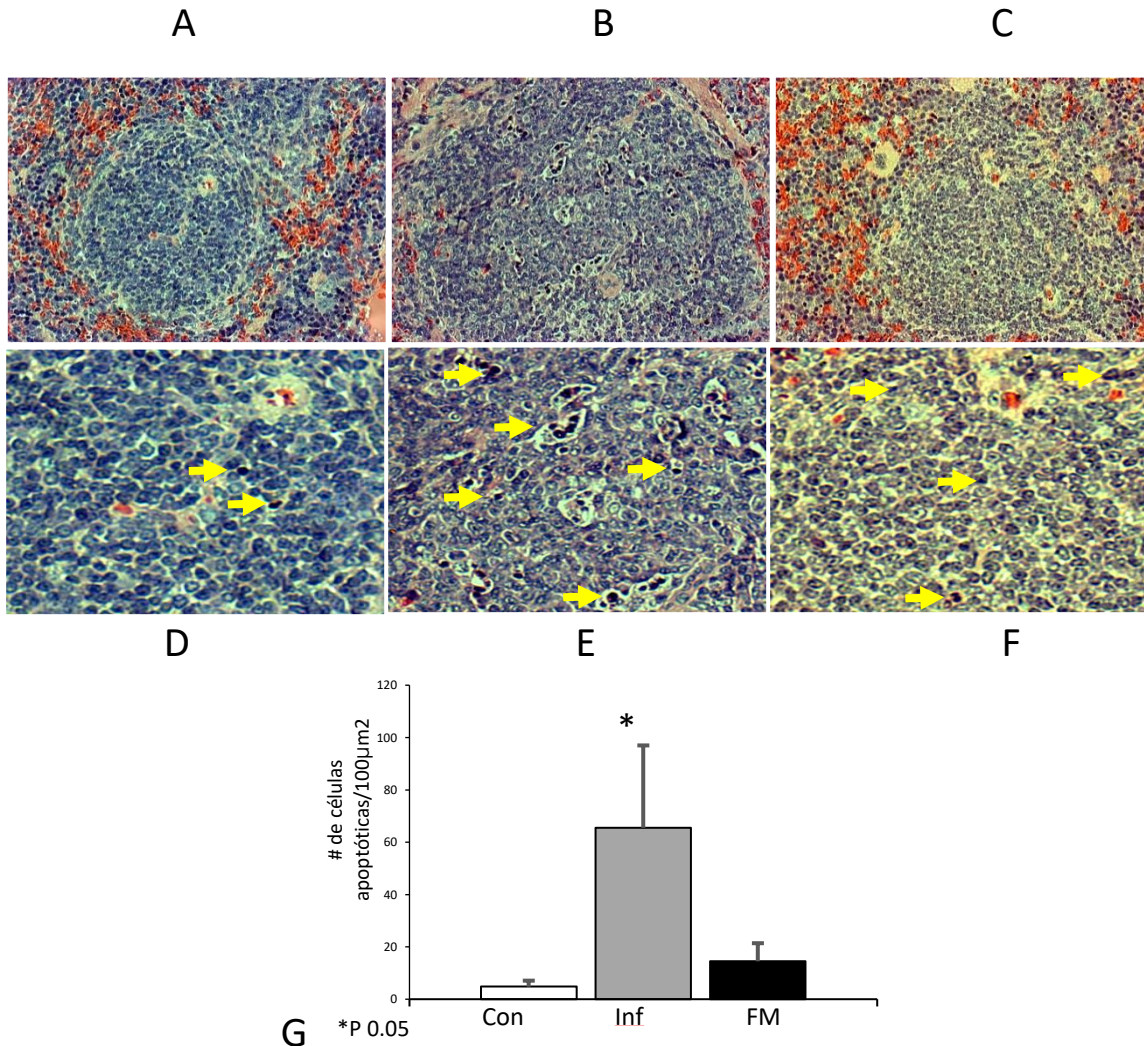


Fig. 10 Histoarquitectura de la pulpa blanca y la pulpa roja del bazo de ratones. Control (A y D) con células esplénicas intactas, (B y E) ratones infectados con *Taenia crassiceps* y (C y F) ratones tratados con FM que muestran una histoarquitectura interrumpida y células apoptóticas (flechas). (G) La media \pm SD del número de células apoptóticas en 20 campos* $P < 0.05$. Barra de escala = 2.5 μm ; Aumento de 40X.

3. Estudio de la apoptosis en células esplénicas.

Para evaluar el daño en el ADN en las células esplénicas de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* o inoculados con FM se realizaron análisis de microscopía

confocal. Las secciones de la pulpa blanca del bazo teñidas con TUNEL de ratones control no exhibieron fluorescencia positiva (figura 11 A). Sin embargo, si se observaron células fluorescentes TUNEL positivas en la pulpa roja (figura 11 D). Por el contrario, las secciones de bazo de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* o inoculados con el FM contenían células fluorescentes positivas para TUNEL tanto en la pulpa blanca como en la roja. Los ratones infectados con *T. crassiceps* mostraron un número significativamente mayor de células fluorescentes en la pulpa blanca que los ratones tratados con el FM ($P \leq 0,05$) (figura 11 B, C). La pulpa roja de los ratones control exhibió núcleos dañados (figura 11 B), pero este daño no fue significativo en comparación al observado en la pulpa roja de los ratones infectados y tratados con el FM (figura 11 E, F). La tasa de apoptosis en las células de la pulpa blanca de los ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) que la de las células de la pulpa blanca de los ratones tratados con el FM (figura 11 G). Además, la tasa de apoptosis de las células de la pulpa roja de los ratones infectados fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) que la de los ratones controles. La diferencia en la apoptosis entre las células de la pulpa roja de los ratones tratados con el FM y las de los ratones control no fue significativa (figura 11 H).

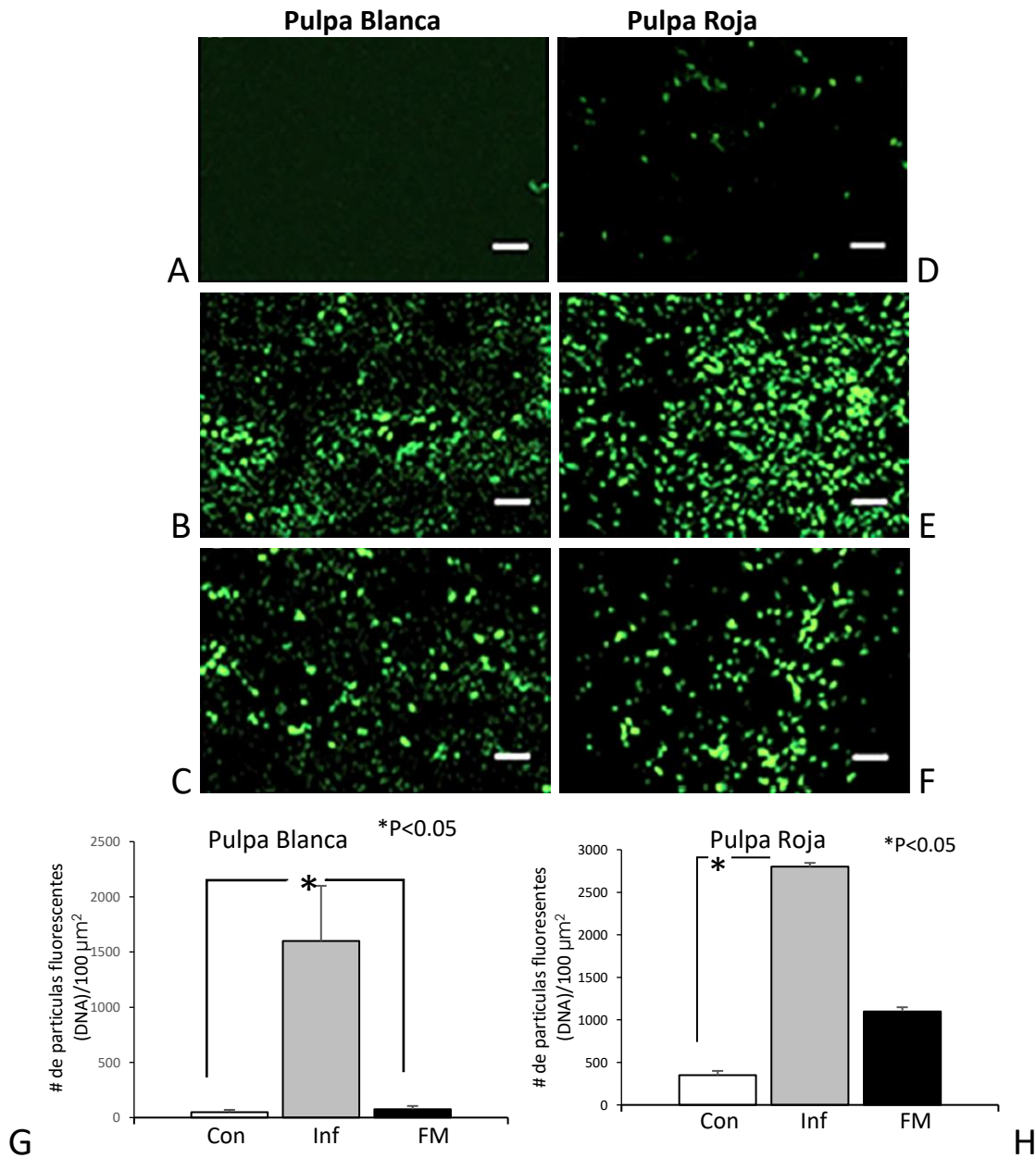


Fig. 11 Análisis por microscopía confocal de secciones de bazo teñidas con TUNEL (A) Pulpa blanca sin apoptosis y (D) pulpa roja con núcleos fluorescentes (TUNEL positivo) en ratones de control; (B) pulpa blanca y (E) pulpa roja con abundantes núcleos fluorescentes en ratones infectados con *Taenia crassiceps*; y (C) pulpa blanca y (F) pulpa roja de ratones tratados con FM, ambos con abundantes núcleos fluorescentes. Se muestran las medias \pm SD de los números de núcleos fluorescentes (ADN) en (G) la pulpa blanca y (H) la pulpa roja del control, ratones infectados con *T. crassiceps* o tratados con FM medidos en 20 campos. * P<0.05. Barra de escala = 25 μ m; Aumento de 40 X.

4. Microscopía electrónica de transmisión del bazo de ratones

Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión revelaron que la histoarquitectura del bazo de los ratones control (pulpa blanca y roja) estaba bien conservada (figura 12 A, B). En contraste, se observaron varias anomalías celulares en la pulpa blanca y roja del bazo de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps*. Se observó cromatina compactada, segmentada y periférica en numerosos linfocitos picnóticos. Varios macrófagos se dispersaron entre los linfocitos y se observaron numerosas vesículas citoplásmicas en estas células. Las formas, tamaños y densidades de estas partículas sugirieron que probablemente son partículas de cromatina de las células apoptóticas (figura 12 C, D). La pulpa blanca y roja de los ratones inoculados con el FM exhibió las mismas características histopatológicas que los ratones infectados, aunque en menor grado (figura 12 E),

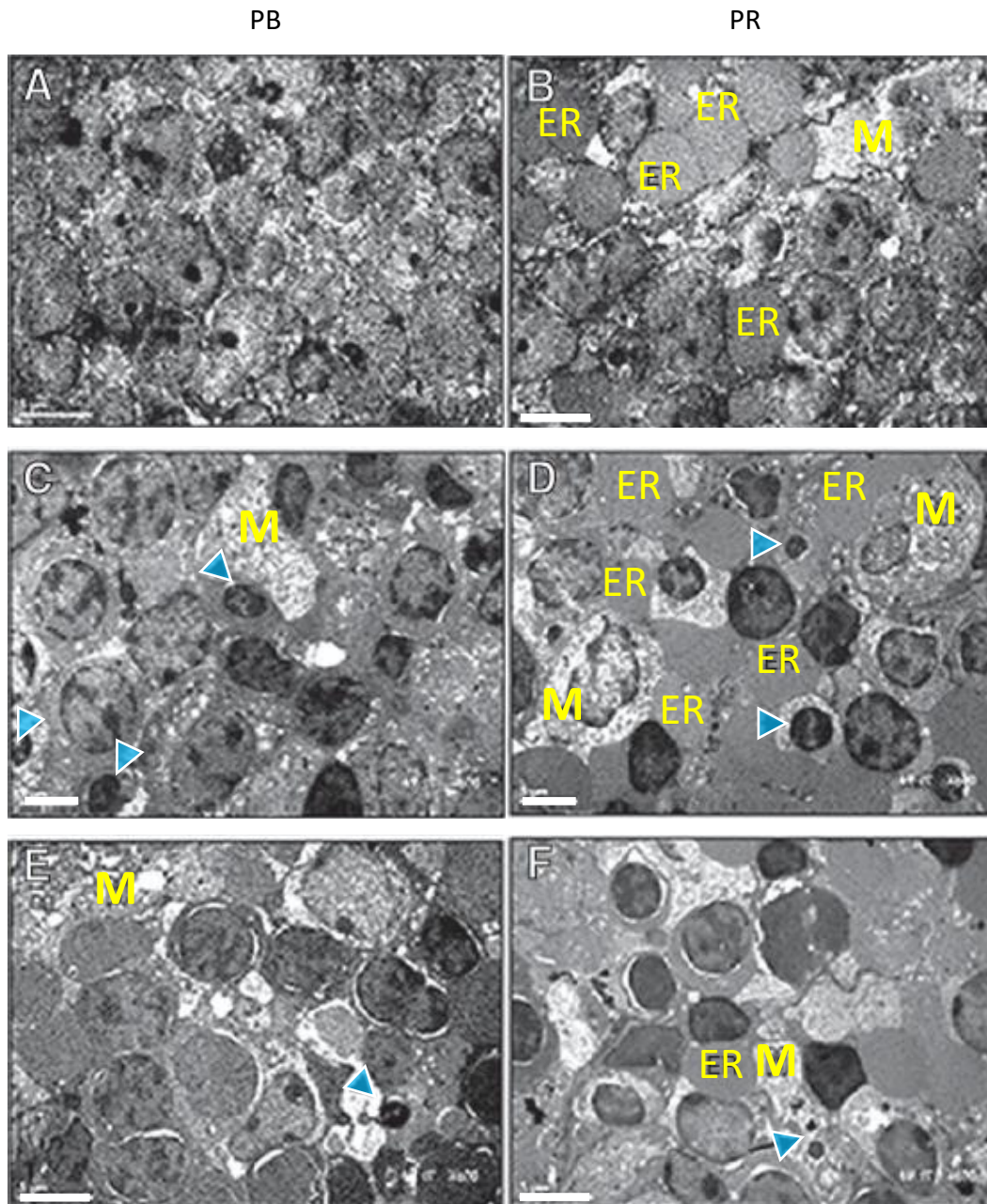


Fig. 12 Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de bazo.

Histoarquitectura intacta de (A) pulpa blanca y (B) pulpa roja de ratones de control; cambios en la cromatina como picnosis (puntas de flecha) en (C) la pulpa blanca y (D) la pulpa roja de ratones infectados; y (E) picnosis de núcleos en pulpa blanca y (F) cuerpos apoptóticos en la pulpa roja de ratones tratados con FM. M, macrófagos con densas partículas esféricas (flechas); ER, eritrocitos. Barras de escala = 5 μ m.

5. Análisis de los linfocitos CD4+ del bazo de ratones mediante citometría de flujo
Los análisis de citometría de flujo revelaron una disminución significativa ($P \leq 0.05$) en las células CD4+ en los bazo de ratones infectados con *T. crassiceps* y de los ratones tratados con el FM en comparación con los ratones control (figuras 13 A-B).

Con

Inf

FM

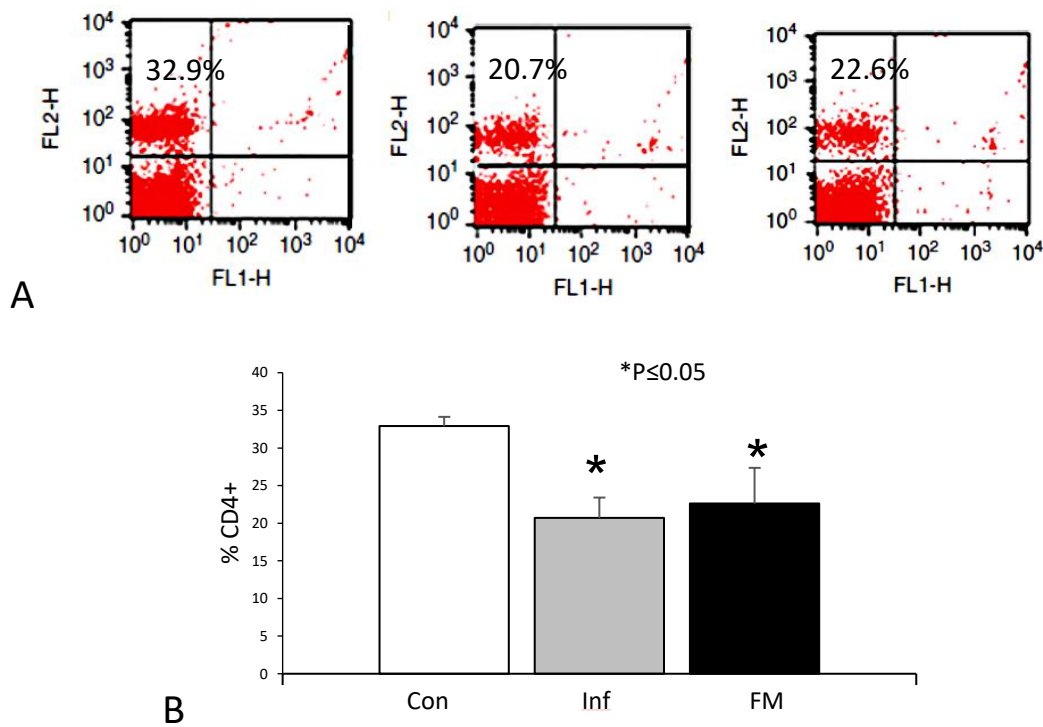


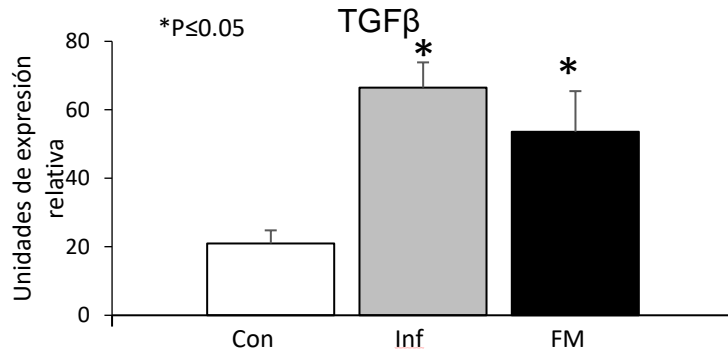
Fig. 13 Efecto de la infección con *T. crassiceps* y de la inoculación del FM en los linfocitos CD4+ del bazo de ratones.

A) Ratones de control, B) ratones infectados con *T. crassiceps* y C) ratones tratados con FM. (D) Gráfico de barras que indica el porcentaje de células CD4+ (media \pm SD) en 100 mil eventos. * $P \leq 0.05$ entre el control y los ratones infectados / tratados.

6. PCR de TGF- β y Foxp3

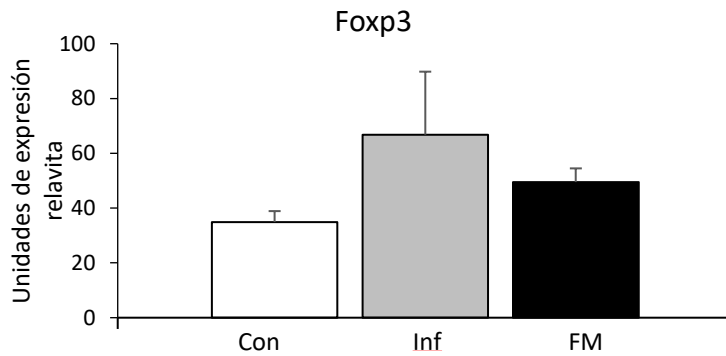
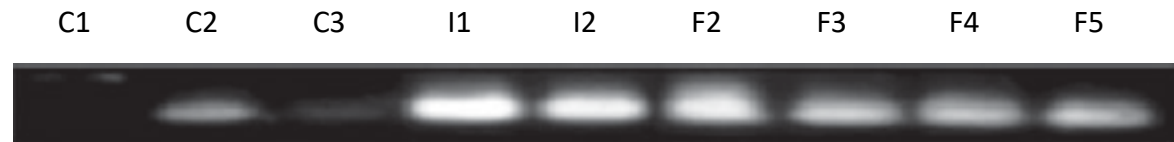
La expresión de TGF- β aumentó significativamente en ratones infectados con *T. crassiceps* (media \pm SD = 66.55 ± 7.35 , $P = 0.0021$) y en ratones tratados con FM (53.58 ± 11.88 , $P = 0.0054$) en comparación con los ratones control (21 ± 3.8 , figura 14 A, B). La expresión de Foxp3 aumentó significativamente ($P \leq 0.05$) en los ratones tratados con el FM (49.5 ± 5) en comparación con la expresión basal de los ratones controles (34 ± 4) y fue mayor en los ratones infectados (66.8 ± 23) que en los ratones controles (figura 14 C, D)

A. TGF-β



B.

C. Foxp3



D.

E. β – actina

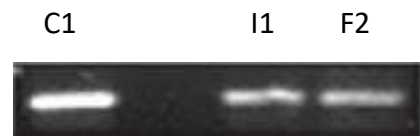


Fig. 14 Expresión de TGF-β y Foxp3 en las células de bazo del control, ratones infectados con *T.rassiceps* y tratados con FM.

A) Expresión de TGF-β , C)Foxp3. B) Unidades de expresión relativa de TGF-β y D) Foxp3 (media ± SD) * P<0.05 entre ratones infectados con *T. crassiceps* y ratones control; yentre ratones tratados y control. (E) Expresión representativa de β-actina utilizada como control interno.

7. TUNEL POD del hipocampo de ratones de 45 dpi

Se ha reportado que los pacientes con NCC presentan déficits cognitivos en aprendizaje y memoria. Tales funciones neurológicas se desempeñan en parte en el hipocampo (Watson PD *et al.*, 2013) por lo que se estudió la histopatología de esta región. Para saber si las células del hipocampo estaban afectadas por el FM, se hizo una tinción con TUNEL con la adición de un anticuerpo conjugado con antiluoresceína POD secundaria (TUNEL POD) por lo que las células apoptóticas se ven de color rojo oscuro. Los resultados del último ensayo mostraron un alto número de células apoptóticas en las tres capas de la circunvolución dentada (capa molecular, capa granular y capa polimórfica o hilio) y en células de las regiones CA1, CA2, CA3 y otras áreas vecinas, en los ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* y en los ratones inoculados con el FM en comparación con las células del hipocampo aparentemente intactas de los ratones control (Fig. 15 A, B y C).

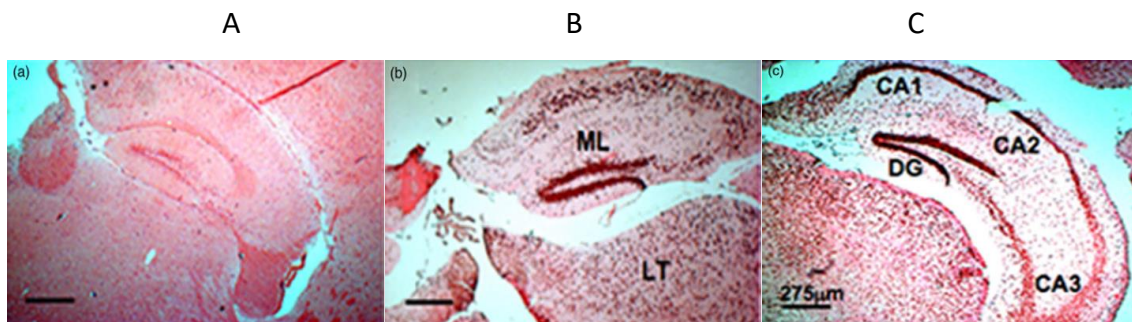


Fig. 15 Secciones cerebrales de ratón teñidas con TUNEL POD

Las imágenes muestran el giro dentado (DG), CA1, CA2, CA3 y la capa molecular (ML) del hipocampo de los ratones control (A), ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* (B) y ratones inoculados con el FM (C). LT, núcleos talámicos laterodorsal. Barra de escala = 275 μ m.

8. TUNEL y TUNEL POD del giro dentado de ratones de 45 dpi.

En un segundo análisis las células apoptóticas se identificaron inicialmente mediante un ensayo TUNEL positivo y luego mediante un ensayo TUNEL POD positivo (Fig. 16). En las secciones teñidas con el ensayo TUNEL POD únicamente células apoptóticas fuertemente teñidas se contaron en áreas de 100 μ m² del giro dentado. En estas áreas seleccionadas se encontraron números significativos de células apoptóticas en los ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* y en ratones tratados con el FM en comparación con el número de células apoptóticas en el hipocampo de los ratones control ($P < 0.01$ para ambos) (fig. 16).

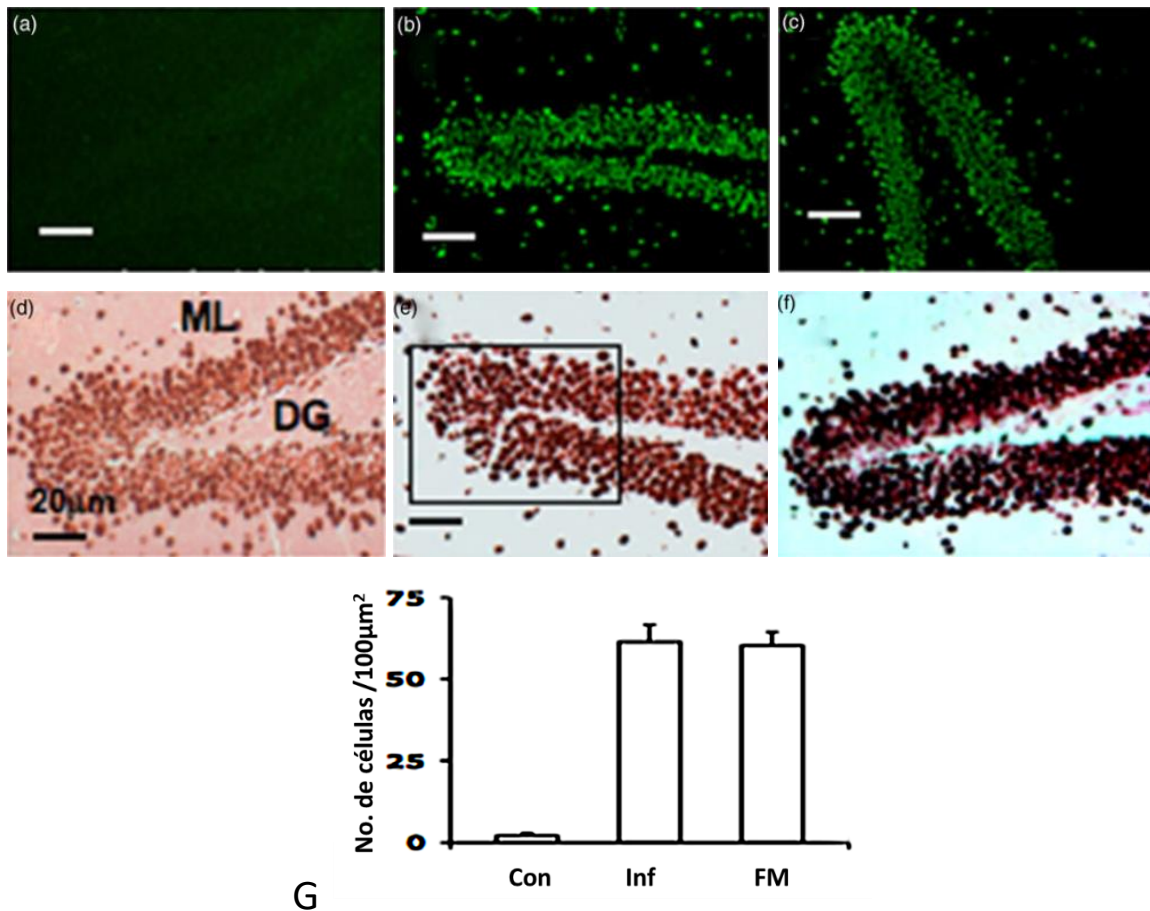


Fig. 16 TUNEL y TUNEL POD del giro dentado de ratones Con, Inf, FM

(a – c) y secciones cerebrales teñidas con TUNELPOD (d – f) que contienen una porción de la capa de células granulares del giro dentado (DG) de ratones de control (a y d), ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* (b y e) y ratones inoculados con el factor de metacestodo de *T. crassiceps* (c y f). Área del rectángulo en E = 3 μm². ML, capa molecular del hipocampo. Barras de escala = 20 μm. (g) Las barras representan la media ± SD de células apoptóticas / μm² de ratones de control (C), ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* (I) y ratones inoculados con *T. crassiceps* FM (FM). $P \leq 0.01$, I y FM vs. C.

9. TUNEL POD de CA1, CA2 y CA3 de ratones de 45 dpi

En las regiones CA1, CA2 y CA3 las células apoptóticas se contaron en áreas de 100 μm². Los resultados mostraron que había un número significativo ($P \leq 0,01$) de células apoptóticas en estas tres regiones en los ratones experimentales en comparación con el número de células apoptóticas en los ratones controles (fig. 17). Cabe señalar que, aunque se observó una apoptosis extensa bilateralmente en los hipocampos de cada ratón experimental, los datos estadísticos se calcularon a partir de solo un hipocampo por ratón por grupo.

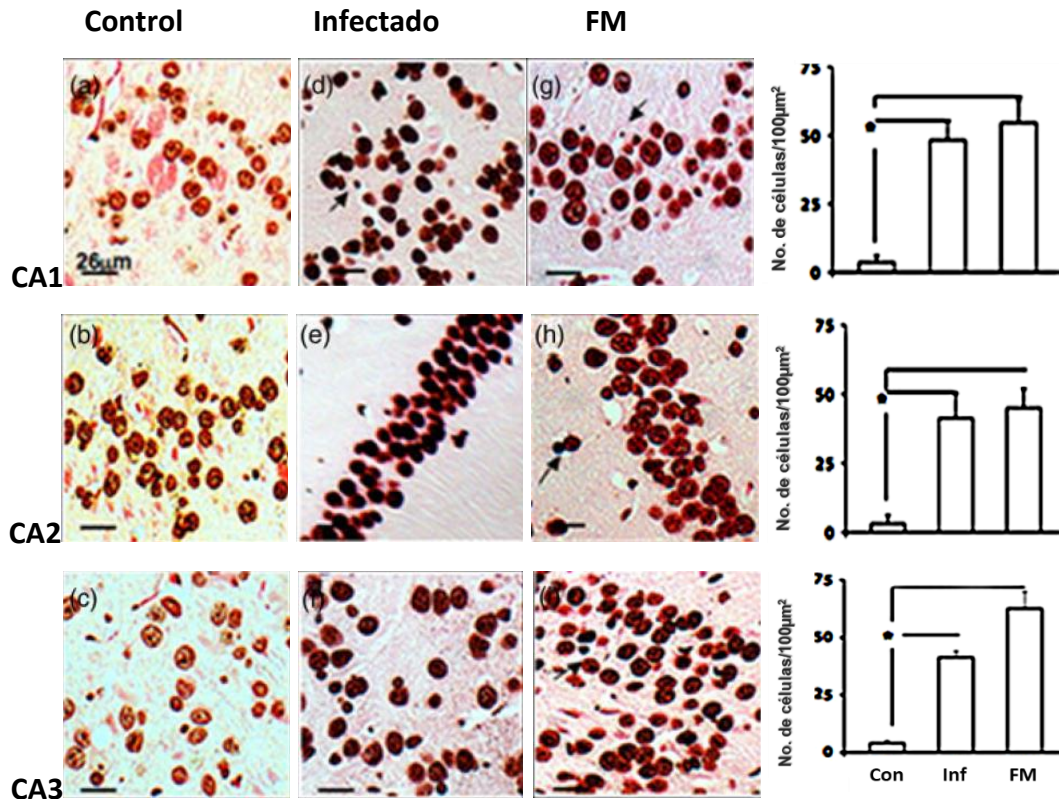


Fig. 17 Secciones cerebrales teñidas con TUNEL POD de ratones controles, infectados y tratados con el FM. Las imágenes muestran parte de las regiones CA1, CA2 y CA3 de los ratones control (a – c), ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* (d – f) y ratones inoculados con el FM (g – i). Cada micrografía tiene un área de 1 μm². Las flechas indican cuerpos apoptóticos. Barras de escala = 26 μm. (j) Las barras representan la media ± SD (20 áreas) de células apoptóticas / μm² en regiones CA1, CA2 y CA3 de ratones de control (C), ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* (I) y ratones inoculados con *T. crassiceps* MF (MF). * P < 0,01.

10. Laberinto de Barnes con ratones de 115 dpi

Tanto la infección intraperitoneal en los ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps*, así como los que fueron inoculados subcutáneamente con el FM produjeron un deterioro significativo en su actuación en el laberinto de Barnes e indujeron esclerosis hipocampal bilateral. La actuación en el laberinto de Barnes se evaluó principalmente mediante el parámetro de latencia de escape (media ± SD), medido en los segundos que tardaron en encontrar y esconderse completamente en el orificio de escape. Durante todo el tiempo del segundo ensayo para aprender esta tarea, tanto los ratones infectados como los de factor fueron significativamente más lentos para encontrar y esconderse en el agujero de escape en comparación con los ratones controles. En el quinto día, todos los ratones controles (n = 6) pudieron esconderse en el orificio de escape en 28±44 s. Los

valores de latencia de los ratones control fueron significativamente menores que los de los ratones experimentales ($P < 0.05$ Con vs FM, y $P < 0.01$ Con vs Inf., Fig. 18). Los ratones infectados ($n = 4$) mostraron dificultad para moverse en el laberinto; en el cuarto día solo uno (25%) pudo esconderse a los 151 s después de alcanzar el orificio de escape. En el quinto día solo uno alcanzó el orificio de escape en 73 s y permaneció allí el resto del tiempo sin esconderse en el orificio. En el quinto día, los ratones inoculados con FM ($n = 6$) mostraron hiperactividad, alcanzando el orificio de escape a los 67 ± 38 s. Cinco ratones se habían escondido a los 73 ± 85 s después de alcanzar el orificio de escape. El sexto ratón alcanzó el orificio de escape a los 99 s, luego lo abandonó cuatro veces para explorar varios orificios y regresó, pero nunca se escondió (Fig. 18).

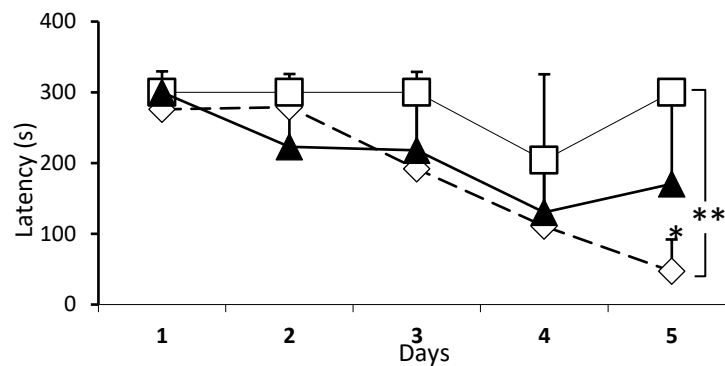


Fig. 18 Latencia de escape media \pm SD en segundos de ratones controles, Inf y FM
Medida del rendimiento de los ratones en el laberinto de Barnes. Valores de las segundas pruebas por 5 días. Grupo de control (\diamond); Grupo infectado (\square); Grupo FM (\blacktriangle). ** $P \leq 0.01$ Control vs infectado. * $P \leq 0.05$ Control vs FM.

11. Tinción con H/E del giro dentado, CA1, CA2 y CA2 de ratones de 115 dpi.

Se encontró una gran carga de parásitos en la cavidad peritoneal de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* (485 ± 78 metacestodos por ratón). La tinción con hematoxilina/eosina mostró que todas las subregiones de los hipocampos de los ratones experimentales se vieron afectadas en su arquitectura tisular, ya sea en la morfología celular o en el tejido circundante. Los giros dentados (Fig. 19 c y e), así como las células del hilus (Fig. 20 d y f), CA1, CA2 y CA3 (Fig. 20 d-i) mostraron dispersión, núcleos blanqueados, pérdida de células y muchos desgarres en la sustancia blanca circundante, en comparación con la integridad de las células y la sustancia blanca del hipocampo control. Las ramas del giro dentado de ratones experimentales (Fig. 19 c, e) formaron un ángulo más pequeño en comparación con las de los hipocampos de los controles (barras rojas Fig. 19 a,c y e). El

número de células con la morfología y la tinción alteradas en las regiones CA1, CA2 y CA3 fueron significativamente ($P < 0,001$) más que las de los ratones controles (Fig. 20 j)

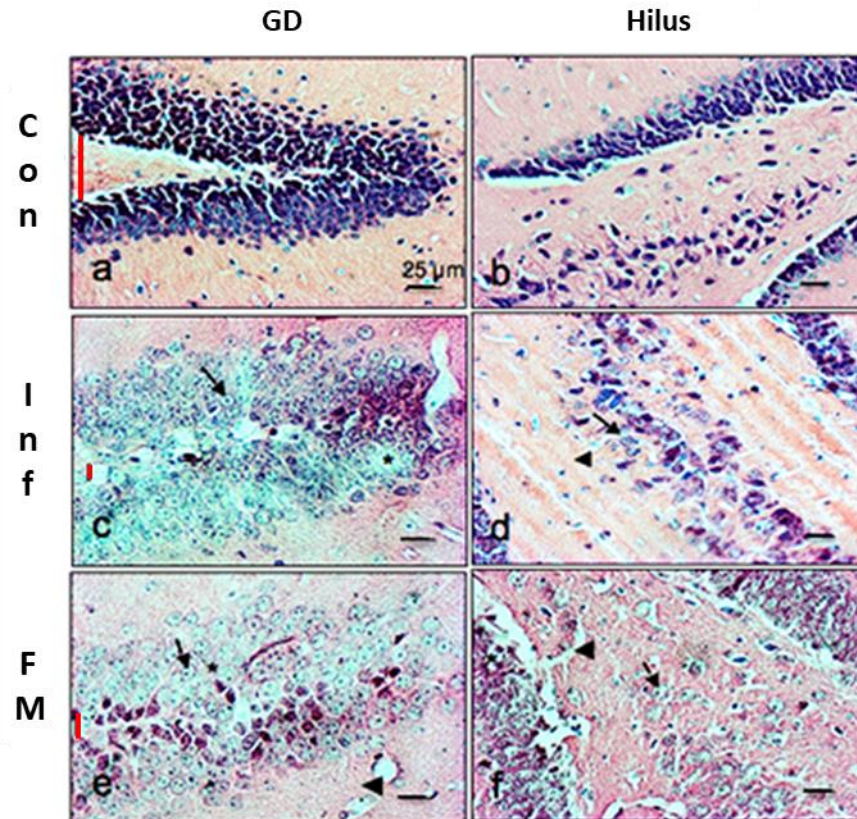


Fig. 19 Sección del giro dentado y el hilus del hipocampo teñido con H/E de ratones control, Inf y FM. Control (a y b), infectado con metacestodos de *T. crassiceps* (c y d) y un ratón inoculado con FM (e y f). Pérdida celular (*) en e y c; núcleos vacíos (flechas); desgarrs (puntas de flecha); ángulo de ramas de giro (barra vertical). Barra de escala = 25 µm. 40 ×.

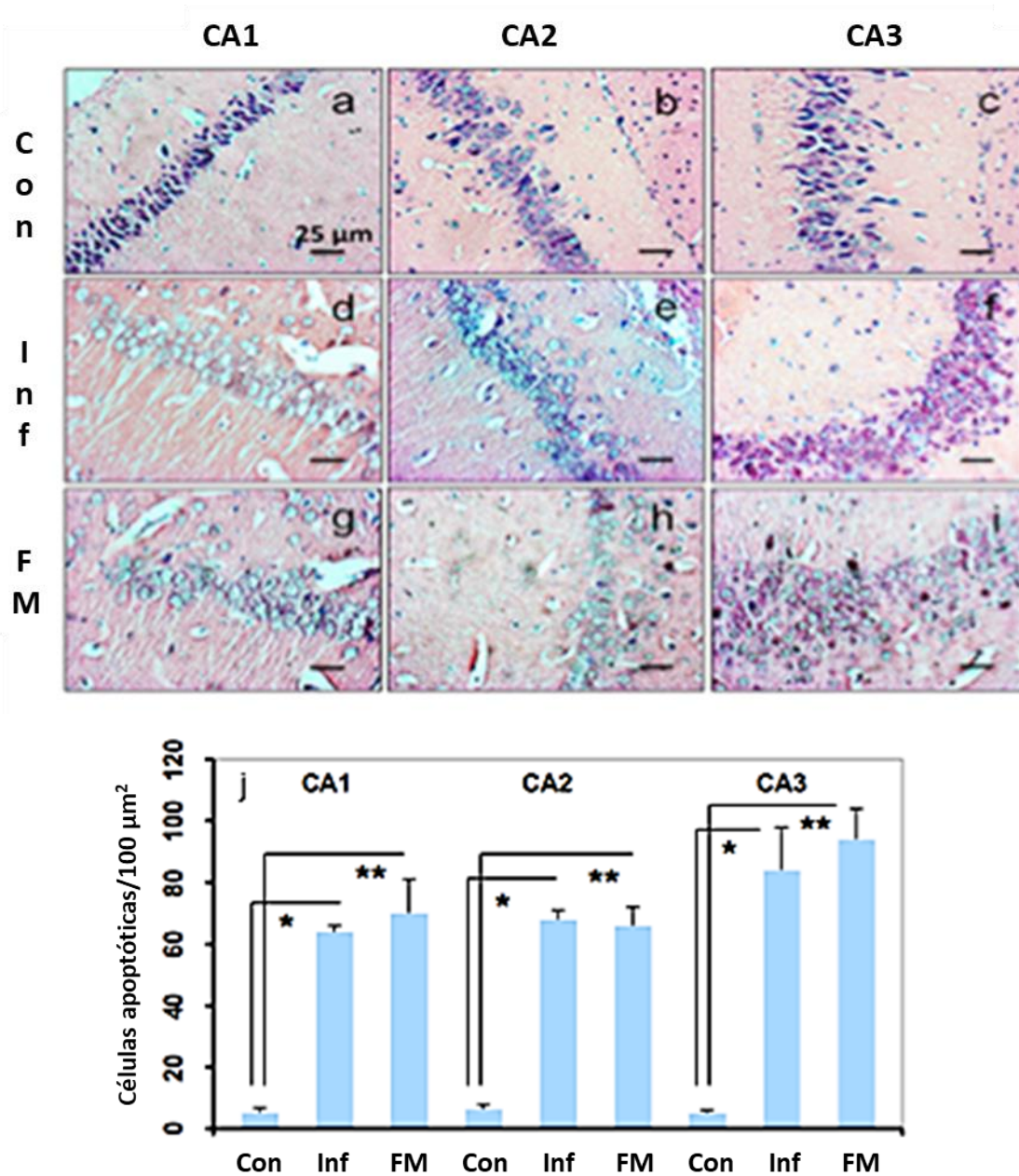


Fig. 20 Secciones cerebrales teñidas con H/E que contienen porciones de regiones CA1, CA2, CA3. Ratón de control (a – c), un ratón infectado con metacestodos de *T. crassiceps* (d – f) y un ratón inoculado con FM (g – i). Barra de escala = 25 μm. 40 ×. (j) Número de células apoptóticas / 100 μm². Las barras representan la media ± SD. * P < 0.001 infectado vs control. ** P < 0.001 FM vs Control.

12. Tinción DAPI de hipocampo de ratones de 115 dpi

La tinción con DAPI mostró picnosis o hipercondensación de la cromatina de los núcleos (flechas blancas) CA1, CA2 y CA3 de ratones infectados con *T. crassiceps* y los tratados con FM. Aparentemente, todos los núcleos en estas subregiones se colapsaron y su número fue menor que el de los ratones de control. Además, se observaron numerosos espacios vacíos

entre el reducido número de núcleos picnóticos de estas subregiones, lo que sugiere la pérdida de células (Fig. 21)

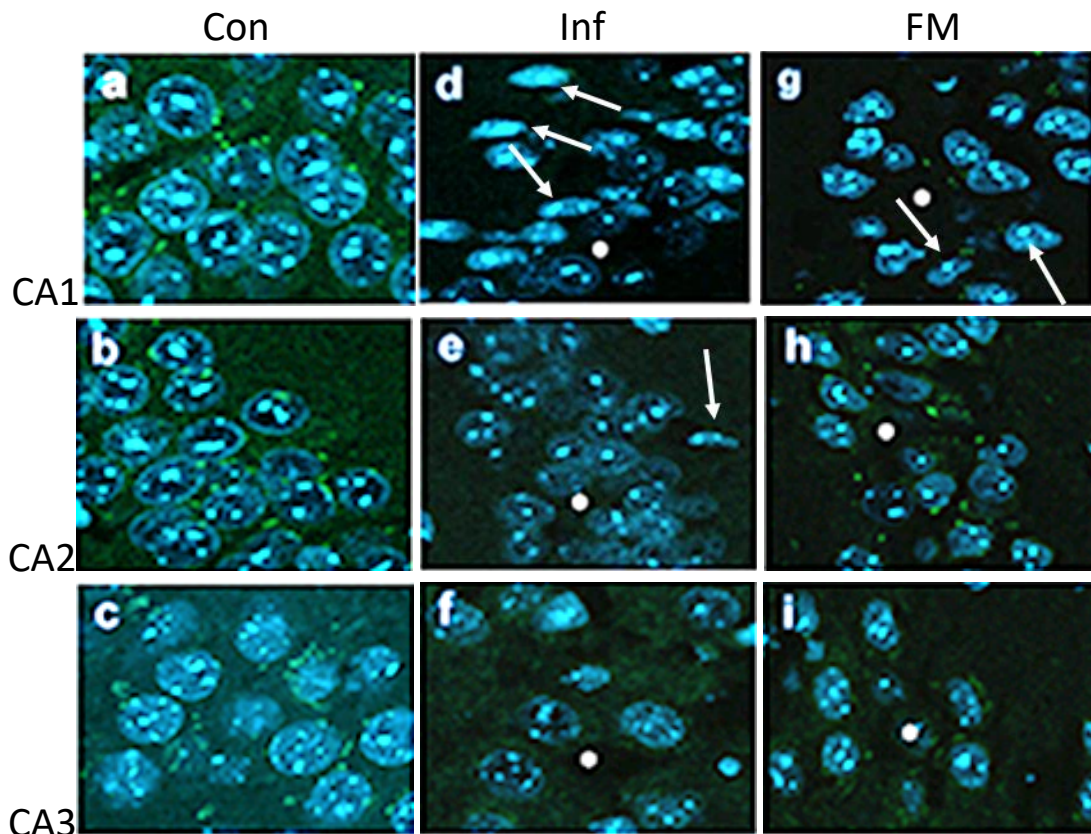


Fig. 21 Secciones cerebrales teñidas con DAPI de ratones controles, Inf, FM.

Contienen porciones de CA1, CA2 y CA3 de un ratón control (a – c), un ratón infectado con metacestodos de *T. crassiceps* (d – f) y un ratón inoculado con FM (g-i) Barra de escala = 25 μ m. 40X. Flechas blancas – hipercondensación.

13. TUNEL del hipocampo de ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* e inoculados con FM de 115 dpi

Para evaluar la fragmentación del ADN, las roturas de la cadena de ADN se marcaron utilizando oligos dUTP fluoresceinados. Esta tinción mostró células positivas para TUNEL generalizadas y significativas en las tres capas de la circunvolución dentada, el hilio y en las células de las regiones CA1, CA2 y CA3, incluida la corteza adyacente ($P < 0.01$ Inf y FM vs. Con) Fig. 22. En todos estos lugares se observaron muchos núcleos fragmentados en comparación con los núcleos TUNEL negativos de los hipocampos control. La intensidad de la fluorescencia de los núcleos en las regiones mencionadas no fue homogénea, lo que sugiere que la apoptosis se indujo en diferentes momentos. Los núcleos con una intensidad de fluorescencia más baja y de tamaño reducido podrían estar entre los primeros en

desarrollar apoptosis. También se observaron dispersión y pérdida de células (Figs. 22 y 23). Además, se encontraron numerosas células positivas para TUNEL en la corteza vecina (Fig. 23h). Un hallazgo notable fue la observación de la apoptosis de células endoteliales en varios lugares en todas las regiones estudiadas (Figs. 22 y 23).

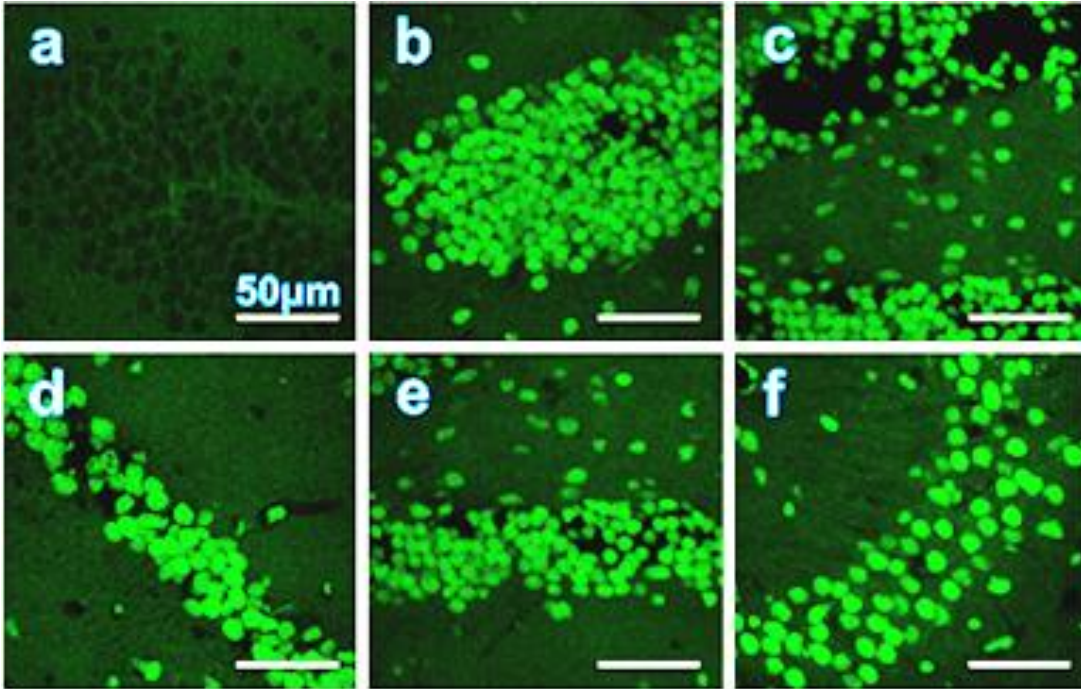


Fig. 22 Secciones cerebrales teñidas con TUNEL de ratones controles, Inf. Contienen una porción del giro dentado de un ratón de control (a), y una porción del giro dentado, hilus, CA1, CA2 y CA3 de un ratón infectado con metacestodos de *T. crassiceps* (b – f). Barra de escala = 50 µm. 60X.

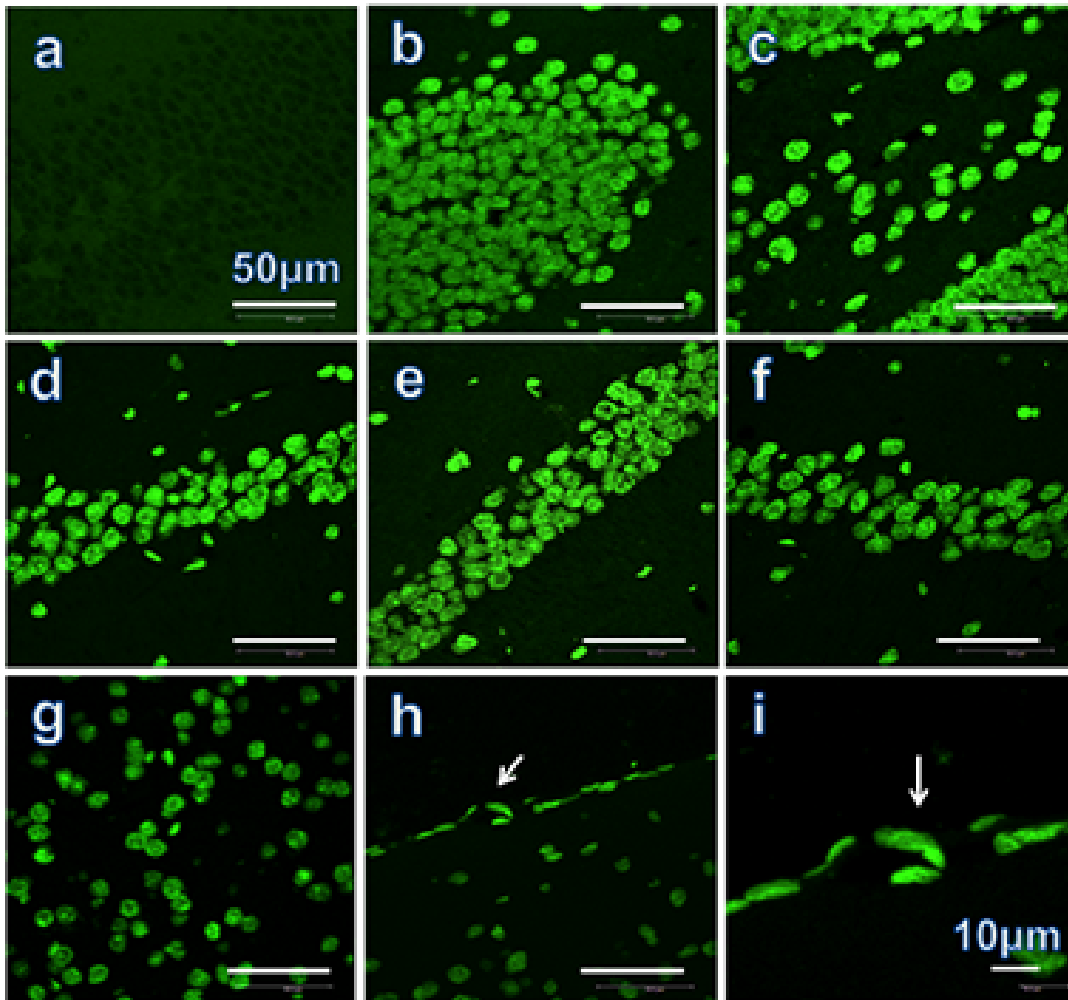


Fig. 23 Secciones cerebrales teñidas con TUNEL de ratones controles, Inf y FM
 Contienen una porción del giro dentado de un ratón de control (a), una porción de giro dentado e hilus de un ratón infectado con FM (b y c), una porción de CA1, CA2 y CA3 de un ratón inoculado con FM (d – f), una porción de la corteza adyacente de un ratón inoculado con FM (g) y el borde de la corteza adyacente que muestra células endoteliales apoptóticas dentro de las secciones del capilar (flecha) (h) Barra de escala = 50 μm . 60 X. (i) es una ampliación de (h). Barra de escala = 10 μm . 200 X.

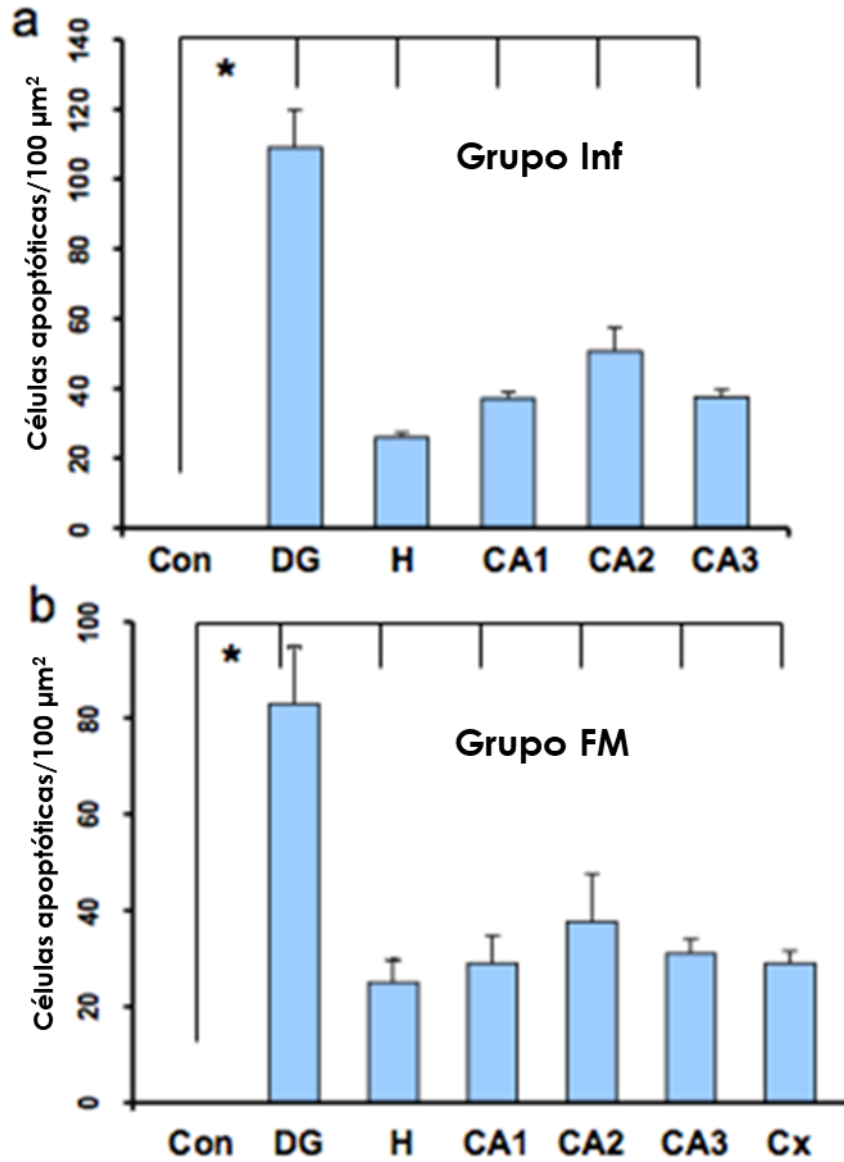


Fig. 24 Datos estadísticos de los resultados obtenidos con la tinción con TUNEL. Las barras representan la media \pm DE del giro dentado de los ratones control (a y b), el giro dentado (DG), el hilus (H), CA1, CA2 y CA3 de los ratones infectados (a), y DG, H, CA1, CA2, CA3 y Cortex (Cx) de ratones factor (b). * $P < 0.01$ DG, H, CA1, CA2, CA3 y Cx vs Con.

DISCUSIÓN

Diferentes estudios han mostrado que los productos de E/S de los helmintos provocan daño cuando estos se encuentran dentro de su hospedero. En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo se reportó que la infección con metacestodos de *T. crassiceps* y la inoculación de FM provocan un grave daño en los tejidos del testículo y ovarios murinos (Zepeda *et al.*, 2011a y 2011b; Solano *et al.*, 2015). En dichos trabajos también se discutió que el FM debe ser una molécula de bajo peso molecular para poder introducirse al torrente sanguíneo y viajar por él para así llegar a órganos inmunoprivilegiados como los testículos y los ovarios. El FM tiene un peso molecular aparente de < 1.3 KDa, lo que sugiere que éste es el que puede introducirse al torrente sanguíneo. Los estudios físicos y químicos que se le han hecho al FM indicaron la ausencia de alguna banda proteica en la electroforesis realizada y un coeficiente de extinción a 260 nm (Zepeda *et al.*, 2011b); estos datos sugieren que puede ser un carbohidrato ya que estos tienen una absorbancia máxima 260 nm. Se sabe que otros productos de E/S de los metacestodos de *T. crassiceps* son las proteasas que el parásito utiliza para degradar las proteínas de su huésped (Leon *et al.*, 2013). Estas proteasas provocan también apoptosis en las células que se encuentran en el sitio de infección (Zepeda *et al.*, 2010). Sin embargo, el peso molecular de estas proteasas es de entre 27 a 53 kDa, por lo que no es posible que puedan entrar al torrente sanguíneo. Después de haber analizado el efecto del FM en los testículos y los ovarios decidimos analizar los posibles daños y consecuencias en el bazo y en el cerebro. Ambos órganos pueden resultar afectados durante la infección por *T. solium*, por lo que nos pareció importante saber si el FM los afectaba de alguna manera.

En el bazo se encontraron diversas afectaciones en ambos grupos experimentales: los infectados intraperitonealmente con metacestodos de *T. crassiceps* y los inoculados subcutáneamente con el FM. Se observaron células apoptóticas en los cortes teñidos con H/E y con TUNEL. El número de células afectadas fue significativamente mayor en ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* que en los controles y en los inoculados con el FM. En este último grupo se encontraron también células apoptóticas, pero la diferencia entre el número de células apoptóticas no fue significativa vs. los ratones controles. En la pulpa roja de los ratones control se observó apoptosis; consideramos que esto es normal

porque ahí se encuentran numerosos vasos sanguíneos y hay un recambio celular constante. Aun así, el número de células apoptóticas fue mayor en los grupos experimentales que en el grupo control. La apoptosis en la pulpa blanca del bazo en los grupos experimentales sugieren la pérdida de las funciones de estas células. Como se sabe, el bazo es uno de los órganos donde hay reservorio de células T vírgenes que pueden ser activadas cuando las APC les presentan un antígeno. Sin embargo, si las células T se encuentran apoptóticas no pueden ser activadas. Lo anterior sugiere que la infección con metacestodos de *T. crassiceps* y la inoculación del FM pudieron provocar una inmunosupresión. Anteriormente se encontró que en el sitio de infección, es decir en el peritoneo, hubo una disminución significativa de células CD4+, CD8+ y CD19+ conforme pasaban los días postinfección (Zepeda *et al.*, 2010). La hipótesis de la inmunosupresión está sustentada por la disminución significativa de células CD4+ en el bazo de los dos grupos experimentales en comparación con los ratones control. La disminución de células CD4+ puede estar relacionada con la inhibición de IL-2, IFN γ y otras citocinas reportadas por Arechavaleta *et al.*, (1998). Así como, con la inmunosupresión humoral reportada en ratones parasitados con *T. crassiceps* e inmunizados con antígenos de *Salmonella typhimurium* y luego desafiados con bacilos virulentos de *S. typhimurium* (Rubio *et al.*, 1998), y en ratones con parasitemia y lesiones cutáneas más grandes debido a una infección previa con *T. crassiceps* y coinfección con *Leishmania major* y *Leishmania mexicana* (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2006). Otras observaciones similares incluyen la supresión de las respuestas proliferativas de células T *in vitro* y la supresión de la producción de IFN- γ e IL-4 por los productos de excreción de metacestodos de *T. crassiceps* (Spolski *et al.*, 2000) Después de la apoptosis observada en las células de la pulpa blanca quisimos ver si el factor TGF- β jugaba un papel importante en la inducción de esta muerte celular programada. Algunos estudios han reportado que las infecciones originadas por diversos parásitos utilizan células Treg a su favor (Belkaid *et al.*, 2002; Owkwor *et al.*, 2012; Scholzen *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2005). Las células CD4+ CD25- pueden ser inducidas por IL-10 o por TGF- β para convertirse en células CD4+CD25+. En este proceso se induce la expresión de Foxp3 (Chen *et al.*, 2003). El TGF- β es una citocina que tiene diversos mecanismos para no solo suprimir células T efectoras sino también para inducir células Treg. Se aprecia un

incremento de la expresión de TGF- β y Foxp3 en ambos grupos experimentales lo que sugiere que el FM juega un papel muy importante en la inducción de su expresión.

Las personas infectadas por *T. solium* no sólo presentan inmunosupresión sino también déficit de la memoria, esclerosis hipocampal y epilepsia cuando hay uno o varios metacestodos alojados en el cerebro. Se puede ver que en ambos grupos experimentales hay numerosas neuronas apoptóticas con mayor proporción en todas las subregiones del hipocampo (DG, CA1, CA2 y CA3) así como también en el núcleo talámico latero dorsal que en el grupo control, esta diferencia es significativa. Como se mencionó anteriormente, el hipocampo es la región del cerebro en la que se almacena nuevo conocimiento y la memoria espacial se genera, por lo que al haber un daño generalizado, estas funciones deben de estar afectadas. Morales Montor *et al.*, (2014) emplearon la prueba de nado forzado y encontraron que la infección intraperitoneal con *T. crassiceps* alteró el comportamiento y la memoria de corto plazo de los ratones. Así como también los niveles de neurotransmisores y citocinas en el hipocampo del ratón. Los autores de este estudio sugirieron que los cambios de comportamiento se deben a cambios hormonales en ambos sexos. Con base en el presente estudio, nosotros planteamos que este cambio de comportamiento se debe más bien a la E/S de sustancias por el parásito y una de ellas debe ser específicamente el FM.

Hay dos regiones en el cerebro en donde se pueden regenerar las células, la denominada neurogénesis que ocurre en condiciones normales: La zona subventricular del ventrículo lateral y la subgranular del giro dentado. Las células de estas regiones son requeridas para adquirir nuevo aprendizaje y memoria (Shors *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2008). Los daños que encontramos en el hipocampo nos llevaron a preguntarnos como podríamos evaluar la posible pérdida de la memoria y el aprendizaje de los ratones experimentales. Como se describe en la metodología, tras aumentar el tiempo de infección con metacestodos de *T. crassiceps* y de inoculación del FM se realizó una prueba en el laberinto de Barnes. El aumento de la latencia que se observó en los grupos experimentales sugiere un déficit de aprendizaje y memoria. Este déficit fue mayor en los ratones infectados con metacestodos de *T. crassiceps* probablemente porque los ratones ya estaban muy parasitados, así como también porque la histoarquitectura del hipocampo presentó graves afectaciones. En

cambio, los inoculados con el FM tenían una mayor movilidad, pero a pesar de haber sido entrenados el mismo tiempo que los ratones controles, no fueron capaces de encontrar el agujero de escape. Esto concuerda con los daños que se aprecian en ambos grupos experimentales, es decir, una muerte celular significativa, dispersión celular y pérdida de células en todas las subregiones. La diferencia del número de células picnóticas en los grupos experimentales en comparación con el grupo control es significativa. Se ha reportado que los enfermos de NCC pueden presentar epilepsia debido al daño causado por los parásitos. La patológica producida por la infección por metacestodo de *T. crassiceps* o por el FM de *T. crassiceps* en todas las subregiones del hipocampo se asemeja a la esclerosis del hipocampo humano, como la pérdida de volumen, que indica atrofia (Jeniffer *et al.*, 2015). El déficit de aprendizaje y la hiperactividad son manifestaciones neurológicas de daño estructural en el hipocampo, que se apoyan en otras funciones, como la atención, el lenguaje y la memoria espacial. Por otro lado, en cada subregión que se estudió se encontraron células endoteliales apoptóticas dispersadas en la materia blanca cerca de los paquetes celulares y de los bordes de la corteza adyacente. Este hallazgo sugiere que el FM pudiera estar atravesando la barrera hematoencefálica sin ninguna restricción explicando, así como es que puede llegar a órganos inmunoprivilegiados e inducir el daño observado. Una última cuestión por resaltar sería la diferencia entre los daños causados por la infección intraperitoneal con metacestodos de *T. crassiceps* y los causados por la inoculación subcutánea del FM. En la mayoría de los resultados aquí presentados se puede ver que los ratones infectados presentan una mayor afectación que los ratones inoculados con el FM. Esto podría deberse a que en los ratones infectados no sólo está presente el FM sino todas las demás sustancias que el parásito secreta. Además, el número de parásitos presentes en el peritoneo va aumentando conforme va avanzando la infección.

CONCLUSIONES

- El FM induce una histopatología en el bazo lo que lleva a una inmunosupresión disminuyendo el porcentaje de células CD4+. Induce también una inmunorregulación favoreciendo la expresión de Foxp3 a través de TGF- β .
- Todo este proceso puede crear un ambiente antiinflamatorio que favorece al desarrollo y sobrevivencia del parásito.
- El hipocampo se encuentra afectado, así como las cortezas adyacentes lo que sugiere que el FM es capaz de llegar al cerebro a travesando la barrera hematoencefálica y produciendo esclerosis hipocampal.
- El comportamiento errático en el laberinto de Barnes y el daño en el cerebro hablan de que el FM puede ser el causante del déficit de memoria similar a la observada en pacientes con NCC.
- La patología observada en el ratón infectado con *T. crassiceps* sugiere que en el humano podría estar pasando algo similar cuando atraviesa una infección por *T. solium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. (1998) A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res.*;84(2):117-22.

Bankowski Z, Howard-Jones N. (1986) International guiding principles for biomedical research involving animal. ISBN Swfr.4

Bianchin MM, Velasco TR, Wichert-Ana L, Araújo D Jr, Alexandre V Jr, Scornavacca F, Escorsi-Rosset SR, dos Santos AC, Carlotti CG Jr, Takayanagui OM, Sakamoto AC. (2015) Neuroimaging observations linking neurocysticercosis and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* Oct;116:34-9. doi: 10.1016/j.eplesyres.2015.07.001. Epub 2015 Jul 6.

Bhattarai R, Carabin H, Proaño JV, Flores-Rivera J, Corona T, Flisser A, León-Maldonado L, Budke CM. (2019) The monetary burden of cysticercosis en México. *PLoS Negl Trop Dis.* Jul 10;13(7):e0007501. doi: 10.1371/journal.pntd.0007501. eCollection 2019 Jul.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature.* Dec 5;420(6915):502-7.

Bronte V, Pittet MJ. (2013) The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity.* Nov 14;39(5):806-18. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010.

Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Avila SL, Ferreira AW. (2001) Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Clin Exp Immunol.* Nov;126(2):304-10.

Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus.* ;5(5):390-408.

Cao M, Cabrera R, Xu Y, Firpi R, Zhu H, Liu C, Nelson DR. (2007) Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *Lab Invest.* Jun;87(6):582-90. Epub 2007 Mar 19.

Chavez-Sanchez FR, Rojas-Leum M, Fortoul van der Goes TI, Tenorio-Zumarraga EP. (2017) Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y en la enfermedad. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM.* Vol. 60, n°5. Sep-oct.

Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA, McGowan P, Linsley PS. (1992) Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*;71:1093–1102.

Chen YQ, Shi HZ, Qin XJ, Mo WN, Liang XD, Huang ZX, Yang HB, Wu C. (2005) CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med.* Dec 1;172(11):1434-9. Epub 2005 Sep 8.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* Dec 15;198(12):1875-86.

Chen Z, Andreev D, Oeser K, Krljanac B, Hueber A, Kleyer A, Voehringer D, Schett G, Bozec A. (2016) Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. *Nat Commun.* Jun 7;7:11596. doi: 10.1038/ncomms11596.

Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* Aug 6;204(8):1757-64. Epub 2007 Jul 9.

Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H, Lafaille JJ. (2008) Adaptive Foxp3⁺ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity.* Jul 18;29(1):114-26. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.010.

Del Brutto OH. (2012) Neurocysticercosis. *Continuum (Minneap Minn).* Dec;18(6 Infectious Disease):1392-416. doi: 10.1212/01.CON.0000423853.47770.90.

de Souza A, Nalini A, Kovoov JM, Yeshraj G, Siddalingaiah HS, Thennarasu K. (2011) Perilesional gliosis around solitary cerebral parenchymal cysticerci and long-term seizure outcome: a prospective study using serial magnetization transfer imaging. *Epilepsia.* Oct;52(10):1918-27. doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03189.x. Epub 2011 Jul 21.

Dirección General de Epidemiología (2016) Panorama epidemiológico de la teniasis en México. Secretaría de Salud.

Dudai Y, Morris RG. (2013) Memorable trends. *Neuron.* Oct 30;80(3):742-50. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.039.

Dzhagalov I, Robey EA. (2010) Multitasking in the medulla. *Nat Immunol.* Jun;11(6):461-2. doi: 10.1038/ni0610-461.

Eisenbarth SC. (2019) Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol.* Feb;19(2):89-103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1.

Evans CA, Gonzalez AE, Gilman RH, Verastegui M, Garcia HH, Chavera A, Pilcher JB, Tsang VC. (1997) Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* Jan;56(1):33-7.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* May 1;172(9):5149-53.

Forlenza OV, Filho AH, Nobrega JP, dos Ramos Machado L, de Barros NG, de Camargo CH, da Silva MF. (1997) Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* Jun;62(6):612-6.

Forrellat-Barrios M, Gautier du Défaix H, Fernandez-Delgado N. (2000) Metabolismo del hierro. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 16(3):149-60.

Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA Jr, Zinkernagel RM. (1989) Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J Immunol.* Nov 15;143(10):3230-4.

Freeman RS. (1962) Studies of the biology of *Taenia crassiceps*. (Zeder 1800), Rudolph, 1810 (cestoda). *Can J Zool.* May;40 969-990.

Gandhi R, Farez MF, Wang Y, Kozoriz D, Quintana FJ, Weiner HL. (2010) Cutting edge: human latency-associated peptide⁺ T cells: a novel regulatory T cell subset. *J Immunol.* May 1;184(9):4620-4. doi: 10.4049/jimmunol.0903329. Epub 2010 Apr 5.

García E, Ordoñez G, Sotelo J. (1995) Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol.* Dec;33(12):3324-5.

García HH, Del Brutto OH, Nash TE, White AC Jr, Tsang VC, Gilman RH. (2005) New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Am J Trop Med Hyg.* Jan;72(1):3-9.

Gazzinelli-Guimaraes PH, Nutman TB. (2018) Helminth parasites and immune regulation. *F1000Res.* Oct23;7.pii:F1000FacultyRev-1685. doi: 10.12688/f1000research.15596.1. eCollection 2018.

Gershon RK, Kondo K. (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology.* Dec; 21(6):903-14.

Gómez-García L, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. (2006) Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res.* Sep;99(4):440-8. Epub 2006 Apr 6.

Gripper LB, Welburn SC. (2017) The causal relationship between neurocysticercosis infection and the development of epilepsy - a systematic review. *Infect Dis Poverty.* Apr 5;6(1):31. doi: 10.1186/s40249-017-0245-y.

Harnett W, Harnett MM. (2008) Lymphocyte hyporesponsiveness during filarial nematode infection. *Parasite Immunol.* Sep;30(9):447-53. doi: 10.1111/j.1365-3024.2008.01045.x.

Hernández-Mendoza L, Molinari JL, Garrido E, Cortés I, Solano S, Miranda E, Tato P. (2005) The implantation of *Taenia solium* metacestodes in mice induces down-modulation of T-cell proliferation and cytokine production. *Parasitol Res.* Mar;95(4):256-65. Epub 2005 Jan 28.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* Feb 14;299(5609):1057-61. Epub 2003 Jan 9.

Jeniffer VN, Udayakumar S, Pushpalatha K. (2015) A clinical study to identify the possible etiology of complex partial seizures using magnetic resonance imaging brain findings and its implications on treatment. *J Pediatr Neurosci.* Oct-Dec;10(4):350-4. doi: 10.4103/1817-1745.174435.

Josefowicz SZ, Rudensky A. (2009) Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* May;30(5):616-25. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.009.

Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. (1986) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* May 1;163(5):1037-50.

Kehrl JH, Taylor A, Kim SJ, Fauci AS. (1991) Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci.* ;628:345-53.

Kandel RE, Kupfermann I, Iversen S. Aprendizaje y memoria. In: Kandel RE, Schwartz HJ, Jessell MT, eds. (2001) *Principios de neurociencia.* Madrid: McGraw-Hill Interamericana;1227- 46.

Knierim JJ. (2015) The hippocampus. *Curr Biol.* Dec 7;25(23):R1116-21. doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049.

Kolb B, Whishaw IQ. (1998) Brain plasticity and behavior. *Annu Rev Psychol.* ;49:43-64.

Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Scitutto E. (1990) Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. Arch Pathol Lab Med. Sep;114(9):926-8.

Leite JP, Terra-Bustamante VC, Fernandes RM, Santos AC, Chimelli L, Sakamoto AC, Assirati JA, Takayanagui OM. (2000) Calcified neurocysticercotic lesions and postsurgery seizure control in temporal lobe epilepsy. Neurology. Nov 28;55(10):1485-91.

Nancy L, Carlos P, Mónica P, Patricia S, Mirko Z (2013) Cisteinoproteasas catepsinas L de *Taenia solium*: rol biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis. Rev Peru Med Exp Salud Publica.30(3):446-54

Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. (2019) Structure and function of the immune system in the spleen. Sci Immunol. Mar 1;4(33). pii: eaau6085. doi: 10.1126/sciimmunol.aau6085.

Lurton D, El Bahh B, Sundstrom L, Rougier A. (1998) Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. J Neurol Sci. Feb 5;154(2):133-6.

Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, Serafini G, Andreani M, Roncarolo MG, Gregori S. (2011) Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. Eur J Immunol. Jun;41(6):1652-62. doi: 10.1002/eji.201041120. Epub 2011 May 13.

McSorley HJ, Gaze S, Daveson J, Jones D, Anderson RP, Clouston A, Ruysers NE, Speare R, McCarthy JS, Engwerda CR, Croese J, Loukas A. (2011) Suppression of inflammatory immune responses in celiac disease by experimental hookworm infection. PLoS One. ;6(9):e24092. doi: 10.1371/journal.pone.0024092. Epub 2011 Sep 16.

Medina MT, Aguilar-Estrada RL, Alvarez A, Durón RM, Martínez L, Dubón S, Estrada AL, Zúniga C, Cartagena D, Thompson A, Ramirez E, Banegas L, Osorio JR, Delgado-Escueta AV, Collins JS, Holden KR. (2011) Reduction in rate of epilepsy from neurocysticercosis by community interventions: the Salamá, Honduras study. Epilepsia. Jun;52(6):1177-85. doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02945.x. Epub 2011 Jan 28.

Millogo A, Nitiéma P, Carabin H, Boncoeur-Martel MP, Rajshekhar V, Tarnagda Z, Praet N, Dorny P, Cowan L, Ganaba R, Hounton S, Preux PM, Cissé R. (2012) Prevalence of neurocysticercosis among people with epilepsy in rural areas of Burkina Faso. Epilepsia. Dec;53(12):2194-202. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03687.x. Epub 2012 Nov 13.

Minigo G, Woodberry T, Piera KA, Salwati E, Tjitra E, Kenangalem E, Price RN, Engwerda CR, Anstey NM, Plebanski M. (2009) Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. PLoS Pathog. Apr;5(4):e1000402. doi: 10.1371/journal.ppat.1000402. Epub 2009 Apr 24.

Mebius RE, Kraal G. (2005) Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. Aug;5(8):606-16.

Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. (2004) Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. J Exp Med. Jul 19;200(2):201-10.

Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Cázares JM. (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. Ann Trop Med Parasitol. Jun;84(3):205-8.

Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A. (1993) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg.* Oct;49(4):502-12.

Molinari JL, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M, Sepúlveda J. (1998) Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol Res.* ;84(3):173-80.

Montano SM, Villaran MV, Ylquimiche L, Figueroa JJ, Rodríguez S, Bautista CT, Gonzalez AE, Tsang VC, Gilman RH, Garcia HH; Cysticercosis Working Group in Peru. (2005) Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. *Neurology.* Jul 26;65(2):229-33.

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(4):195-205. doi: 10.1159/000356521. Epub 2014 Feb 6.

Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. (2005) Oral tolerance in the absence of naturally occurring Treg. *J Clin Invest.* Jul;115(7):1923-33. Epub 2005 Jun 2.

Nash TE, Garcia HH. (2011) Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nat Rev Neurol.* Sep 13;7(10):584-94. doi: 10.1038/nrneurol.2011.135.

Nishizuka Y. (1982) A novel experimental system of organ-localized autoimmune diseases in the mouse. *Acta Pathol Jpn.* ;32 Suppl 1:211-22.

Nolte MA, Hoen EN, van Stijn A, Kraal G, Mebius RE. (2000) Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *Eur J Immunol.* Feb;30(2):626-34.

Nutman TB. (2006) Asymptomatic peripheral blood eosinophilia redux: common parasitic infections presenting frequently in refugees and immigrants. *Clin Infect Dis.* Feb 1;42(3):368-9. Epub 2005 Dec 28.

Oida T, Weiner HL. (2010) TGF- β induces surface LAP expression on murine CD4 T cells independent of Foxp3 induction. *PLoS One.* Nov 24;5(11):e15523. doi: 10.1371/journal.pone.0015523.

Okwor I, Onyilagha C, Kuriakose S, Mou Z, Jia P, Uzonna JE. (2012) Regulatory T cells enhance susceptibility to experimental *Trypanosoma congolense* infection independent of mouse genetic background. *PLoS Negl Trop Dis.* ;6(7):e1761. doi: 10.1371/journal.pntd.0001761. Epub 2012 Jul 31.

Peón AN, Espinoza-Jiménez A, Terrazas LI. (2013) Immunoregulation by *Taenia crassiceps* and its antigens. *Biomed Res Int.* ;2013:498583. doi: 10.1155/2013/498583. Epub 2012 Dec 27.

Pot C, Apetoh L, Kuchroo VK. (2011) Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin Immunol.* Jun;23(3):202-8. doi: 10.1016/j.smim.2011.07.005. Epub 2011 Aug 12.

Rathore C, Thomas B, Kesavadas C, Abraham M, Radhakrishnan K. 2013 Calcified neurocysticercosis lesions and antiepileptic drug-resistant epilepsy: a surgically remediable syndrome? *Epilepsia.* Oct;54(10):1815-22. doi: 10.1111/epi.12349. Epub 2013 Aug 29.

Rodríguez-Perea AL, Montoya CJ, Olek S, Chougnat CA, Velilla PA. (2015) Statins increase the frequency of circulating CD4+ FOXP3+ regulatory T cells in healthy individuals. *J Immunol Res.* ; 2015:762506. doi: 10.1155/2015/762506. Epub 2015 Feb 22.

Roncarolo MG, Battaglia M. (2007) Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol.* Aug;7(8):585-98.

Rosenfeld CS, Ferguson SA. (2014) Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *J Vis Exp.* Feb 26;(84):e51194. doi: 10.3791/51194.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* Aug 1;155(3):1151-64.

Santiago AF, Alves AC, Oliveira RP, Fernandes RM, Paula-Silva J, Assis FA, Carvalho CR, Weiner HL, Faria AM. (2011) Aging correlates with reduction in regulatory-type cytokines and T cells in the gut mucosa. *Immunobiology.* Oct;216(10):1085-93. doi: 10.1016/j.imbio.2011.05.007. Epub 2011 May 14.

Sanz CR. (1987) Host response in childhood neurocysticercosis. Some pathological aspects. *Childs Nerv Syst.* ;3(4):206-7.

Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M. (2009) *Plasmodium falciparum* mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. *PLoS Pathog.* Aug;5(8):e1000543. doi: 10.1371/journal.ppat.1000543. Epub 2009 Aug 14.

Sciutto E, Fragoso G, Baca M, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E. (1995) Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun.* Jun;63(6):2277-81.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 410, 372–376.

Singla M, Singh P, Kaushal S, Bansal R, Singh G. (2007) Hippocampal sclerosis in association with neurocysticercosis. *Epileptic Disord.* Sep;9(3):292-9. Epub 2007 Sep 20.

Sloviter RS. (1994) The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* Jun;35(6):640-54.

Solano S, Zepeda N, Copitin N, Fernandez AM, Tato P, Molinari JL. 2015 A *Taenia crassiceps* metacystode factor enhances ovarian follicle atresia and oocyte degeneration in female mice. *J Helminthol.* Jan;89(1):49-57. doi: 10.1017/S0022149X13000588. Epub 2013 Aug 20.

Solis H, Lopez-Hernandez E. (2009) Neuroanatomía funcional de la memoria. *Arch Neurocién (Mex).* Vol. 14 No. 3:176-187.

Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE. (2000) Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* Jun;22(6):297-305.

Spurr, A. R. (1969). A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1-2), 31–43. doi:10.1016/s0022-5320(69)90033-1

Squire LR. (1987) The organization and neural substrates of human memory. *Int J Neurol.* -1988;21-22:218-22.

Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* Aug 6;204(8):1775-85. Epub 2007 Jul 9.

Sun Y, Li Y, Luo D, Liao DJ. (2012) Pseudogenes as weaknesses of ACTB (Actb) and GAPDH (Gapdh) used as reference genes in reverse transcription and polymerase chain reactions. *PLoS One.*; 7(8):e41659. doi: 10.1371/journal.pone.0041659. Epub 2012 Aug 22.

Tato P, Castro AM, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL. (1995) Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res.*; 81(3):181-7.

Tato P, White AC Jr, Willms K, Rodríguez D, Solano S, Sepúlveda J, Molinari JL. (1996) Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T. solium* metacestodes. *Parasitol Res.*; 82(7):590-7.

Varghese V, Chandra SR, Christopher R, Rajeswaran J, Prasad C, Subasree R, Issac TG. (2016) Cognitive Dysfunction and its Determinants in Patients with Neurocysticercosis. *Indian J Psychol Med.* Mar-Apr;38(2):142-6. doi: 10.4103/0253-7176.178809.

Viguié M, Lemaître F, Verola O, Cho MS, Gorochoff G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L. (2004) Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* Jul 15;173(2):1444-53.

Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. (2004) Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin Immunol.* Apr;16(2):119-26.

Walther M, Tongren JE, Andrews L, Korb D, King E, Fletcher H, Andersen RF, Bejon P, Thompson F, Dunachie SJ, Edele F, de Souza JB, Sinden RE, Gilbert SC, Riley EM, Hill AV. (2005) Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity.* Sep;23(3):287-96.

Watson PD, Voss JL, Warren DE, Tranel D, Cohen NJ. (2013) Spatial reconstruction by patients with hippocampal damage is dominated by relational memory errors. *Hippocampus.* Jul;23(7):570-80. doi: 10.1002/hipo.22115. Epub 2013 Apr 5.

Williams LM, Rudensky AY. (2007) Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* Mar;8(3):277-84. Epub 2007 Jan 14.

Willms K, Merchant MT. (1980) The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. *Parasite Immunol.* Winter;2(4):261-75.

Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. (2006) The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol.* Jun;3(3):189-95.

Zaccone P, Cooke A. (2011) Infectious triggers protect from autoimmunity. *Semin Immunol.* Apr;23(2):122-9. doi: 10.1016/j.smim.2011.01.013. Epub 2011 Feb 5.

Zepeda N, Solano S, Copitin N, Fernández AM, Hernández L, Tato P, Molinari JL. (2010) Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitol Res.* Oct;107(5):1129-35. doi: 10.1007/s00436-010-1980-1. Epub 2010 Aug 13.

Zepeda N, Copitin N, Solano S, González M, Fernández AM, Tato P, Molinari JL. (2011a) *Taenia crassiceps*: infections of male mice lead to severe disruption of seminiferous tubule cells and increased apoptosis. *Exp Parasitol.* Jan;127(1):153-9. doi: 10.1016/j.exppara.2010.07.008. Epub 2010 Jul 18.

Zepeda N, Copitin N, Solano S, Fernández AM, Tato P, Molinari JL. (2011b) *Taenia crassiceps*: A secretion-substance of low molecular weight leads to disruption and apoptosis of seminiferous epithelium cells in male mice. *Exp Parasitol.* Jul;128(3):184-91. doi: 10.1016/j.exppara.2011.03.013. Epub 2011 Apr 2.

Zhao C, Deng W, Gage FH. (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* Feb 22;132(4):645-60. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.033.

Hippocampal sclerosis induced in mice by a *Taenia crassiceps* metacestode factor

N. Zepeda¹, N. Copitin¹, J.L. Chávez², F. García³, F. Jaimes-Miranda³,
R. Rincón-Heredia³, R. Paredes³, S. Solano⁴, A.M. Fernández⁴ and J.L. Molinari¹

Research Paper

Cite this article: Zepeda N *et al* (2018). Hippocampal sclerosis induced in mice by a *Taenia crassiceps* metacestode factor. *Journal of Helminthology* 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0022149X18000755>

Received: 8 February 2018
Accepted: 26 July 2018

Key words:

apoptosis; Barnes maze; hippocampal sclerosis, metacestode factor (Fac); mouse model; neurocysticercosis; *Taenia crassiceps*; *Taenia solium*

Author for correspondence:

J.L. Molinari, E-mail: jmolinar@ifc.unam.mx

¹Departamento de Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, C.P. 04510 A.P. 70-242; ²Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, C.P. 04510 A.P. 70-242; ³Unidad de Imagenología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, C.P. 04510 A.P. 70-242 and ⁴Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510

Abstract

An experimental *Taenia crassiceps* mouse model was used to assess the role of *Taenia solium* metacestode factor (Fac) in human neurocysticercosis. Intraperitoneal infection with *T. crassiceps* metacestodes or subcutaneous inoculation with a *T. crassiceps* metacestode factor (Fac) produced significant impairment of performance (learning) in the Barnes maze and induced bilateral hippocampal sclerosis in mice. Several staining techniques revealed important cell dispersion, extensive apoptosis and cell loss in the dentate gyrus, hilus and CA1-CA3 regions of both hippocampi, as well as intense deterioration of the adjacent cortex. An outstanding disruption of its histoarchitecture in the surrounding tissue of all these regions and apoptosis of the endothelial cells were also observed.

Introduction

Human beings acquire neurocysticercosis (NCC) by ingesting foods contaminated with *Taenia solium* eggs. The acidic gastric juice breaks up the inter-embryophore cement of the eggs. Then, the sheath-covered embryos are carried to the duodenum, where the pancreatic juice and bile dissolve the external lipid layer of the sheath, allowing the entrance of water and nutrients, which activate the previously dormant embryos. The activated embryos rip their envelopes with the help of their six sharp hooks, and they promptly leave these broken structures, as described in an *in vitro* study (Molinari *et al.*, 1993). Released from their envelopes, activated embryos invade the intestine, as with *Hymenolepis nana* (Miyasato *et al.*, 1977), migrate through the bloodstream and implant in several tissues, such as the striated muscles and central nervous system, where they develop into the metacestode stage.

Neurocysticercosis is considered to be the most common parasitic infestation of the central nervous system and the single most common cause of epilepsy. Seizures, headaches and neurological deficits are described in human neurocysticercosis. Signs of psychiatric disease (65.8%), cognitive decline (87%), altered memory (25%) and attention deficits (100%) among others were reported in a heterogeneous sample of 38 patients (Forlenza *et al.*, 1997). Other features are hydrocephalous, chronic meningitis, and impairment in executive functions, verbal and non-verbal memory, praxis and verbal fluency (Varghese *et al.*, 2016).

Hippocampal atrophy without seizures in patients with calcified neurocysticercosis (cNCC) has been observed, suggesting inflammatory-mediated mechanisms provoked by cysticercosis, which may contribute or even lead to refractory mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (MTLE-HS) by mechanisms that need to be clarified (Bianchin *et al.*, 2015; Griper and Welburn, 2017). To address the role that *T. solium* metacestode factor (Fac) (Molinari *et al.*, 1990) could play in the production of hippocampal sclerosis, whose cause in human neurocysticercosis is poorly understood, we developed an experimental *Taenia crassiceps*-mouse model to study and understand the effects of an infection of mice with *T. crassiceps* metacestodes and the subcutaneous inoculation of mice with a *T. crassiceps* factor on hippocampal cells; results showed an extensive and significant apoptosis of dentate gyrus, CA1, CA2, CA3 and hilus cells compared with intact control cells (Zepeda *et al.*, 2017).

In the current research, we extended the time of infection and the inoculation with Fac for 110 days to try to induce a more severe hippocampal injury than that reported recently (Zepeda *et al.*, 2017). Histopathologically, temporal lobe epilepsy (TLE) associated with HS has been characterized by cell death and neuronal cell loss, which is most severe in the CA1 and CA3 regions and in the hilus of the dentate gyrus (DG), volume loss, reactive gliosis, and dispersion of the dentate gyrus granule cells (Sloviter, 1994; Lurton *et al.*, 1998).

Materials and methods

Treatment of mice

BALB/c mice (28 days old, 20–22 g) were maintained under standard animal housing conditions with access to Purina chow and water *ad libitum*. *Taenia crassiceps* metacystodes (WFU strain) were maintained in our laboratory via peritoneal passage in female mice, as described (Everhard *et al.*, 2004). Peritoneal fluid from healthy female controls (CPF) and *T. crassiceps* metacystode-infected mice, as well as *T. crassiceps* metacystode factor (Fac), were obtained according to Zepeda *et al.* (2011). To determine the effects of infection with *T. crassiceps* metacystodes and Fac treatment on hippocampal cells and the surrounding tissue, 18 female mice were divided into three groups. The control (Con) group (n = 6) and Factor (Fac) group (n = 6) were inoculated subcutaneously with 0.1 ml CPF, or Fac containing 50 µg of carbohydrates, as determined by the anthrone method (Ashwell, 1957) every 4 days for 100 days. The infected (Inf) group (n = 6) was infected intraperitoneally with up to 40 *T. crassiceps* metacystodes, measuring 2–3 mm in diameter and suspended in 0.2 ml phosphate buffered saline (PBS).

Barnes maze

At 110 days post infection with intraperitoneal *T. crassiceps* metacystodes or subcutaneous inoculation with *T. crassiceps* Fac, the Barnes maze procedure for small rodents was followed to estimate cognitive impairment in learning and memory (Rosenfeld and Ferguson, 2014), with minor modifications. Briefly, a bright illumination overhead was used. The maze was centred below the lights. Mice were tested without the use of a wall or cues. The maze was 90 cm in diameter and 90 cm in height, with 20 escape holes that each had a diameter of 5 cm, and there was only one hole with an escape cage. No hole was plugged in this test. After 30 minutes of habituation, each mouse was gently removed from his home cage and placed onto the maze centre. Then, the overhead lights were turned on. Every mouse's performance was recorded using a Canon VIXIA HF R70 camera (Canon, Melville, NY, USA). If the mouse failed to enter the escape cage within 5 minutes, it was guided gently to the correct location and into the escape cage, where it remained for 2 minutes. Each mouse was tested for two trials/day with an inter-trial interval of approximately 30 minutes. All mice were tested for five consecutive days. Videos were analysed carefully. The Barnes maze test was used to study the behaviour of the control, experimental cysticercotic and Fac treated-mice.

Histology and cellular apoptosis

At 115 days post treatment and infection, all mice were anaesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with saline followed by phosphate-buffered 10% formalin. Then, the brains were carefully removed, and intraperitoneal metacystodes were obtained and counted. Two coronal cuts were made in each brain: an anterior cut was made at Bregma –1.43 mm and the other at Bregma –5.19 mm (Paxinos and Franklin, 2013). The intermediate fragments of each brain were fixed with 2.5% paraformaldehyde in PBS for 12 h at room temperature. Next, the fragments of each brain were embedded in paraffin. Coronal sections that were 5 µm thick were prepared on a rotary microtome, placed on poly-L-lysine-coated microscopic slide, and subjected to haematoxylin/eosin (H/E) and DAPI staining to analyse the

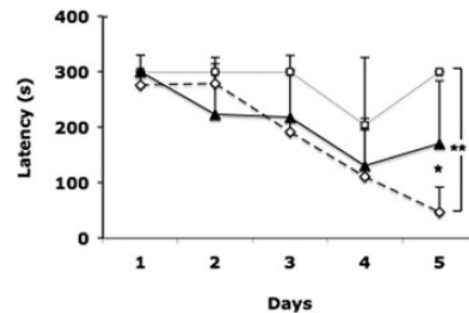


Fig. 1. Mean escape latency in seconds as a measure of performance of mice in the Barnes maze. Values of the second trials for 5 days. Control group (○); Infected group (□); Factor group (▲). ** $P < 0.01$ Control vs Infected. * $P < 0.05$ Control vs Factor.

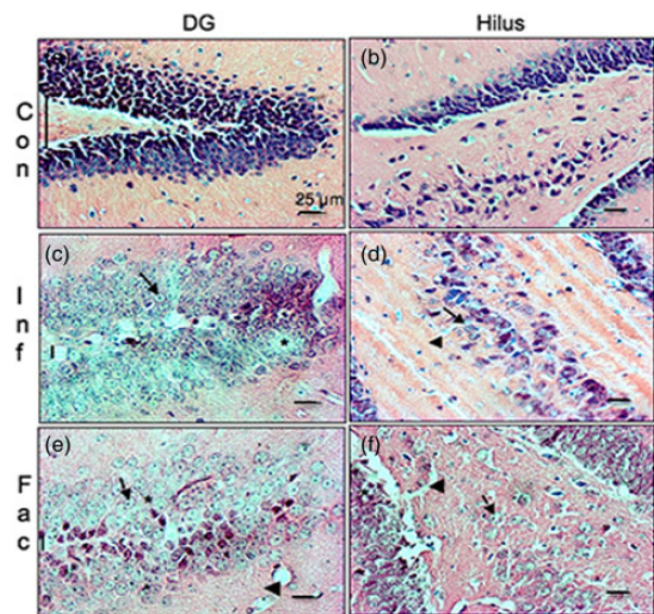


Fig. 2. Haematoxylin/eosin-stained brain section that contains part of the dentate gyrus and hilus from a control mouse (a & b), a mouse infected with *T. crassiceps* metacystodes (c & d), and a mouse inoculated with *T. crassiceps* Fac (e & f). Cell loss (*); bleached nuclei (arrows); tears (arrowheads); gyri branches angle (vertical bar). Scale bar = 25 µm. 40×.

cellular morphology and histoarchitecture of the dentate gyrus and CA1–CA3 regions. Sections stained with H/E were analysed with an Olympus IX71 microscope and IMAGE PRO-PCUS 60 software. Sections stained with DAPI were analysed with a Zeiss LSM 800 confocal microscope and ZEN version 2.1 software. The presence of DNA strand breaks was evaluated using an *in situ* cell death detection kit (Roche). TUNEL assays were analysed with a confocal microscope Leica TCS-SPS (Carl Zeiss de México–División Microscopía, Ciudad de México).

Data analysis

The numbers of haematoxylin/eosin-stained and TUNEL-positive cells were measured by manual counting (area in µm²) with the aid of Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). For statistical data, one-way analyses of variance and Tukey's test were performed using GraphPad software

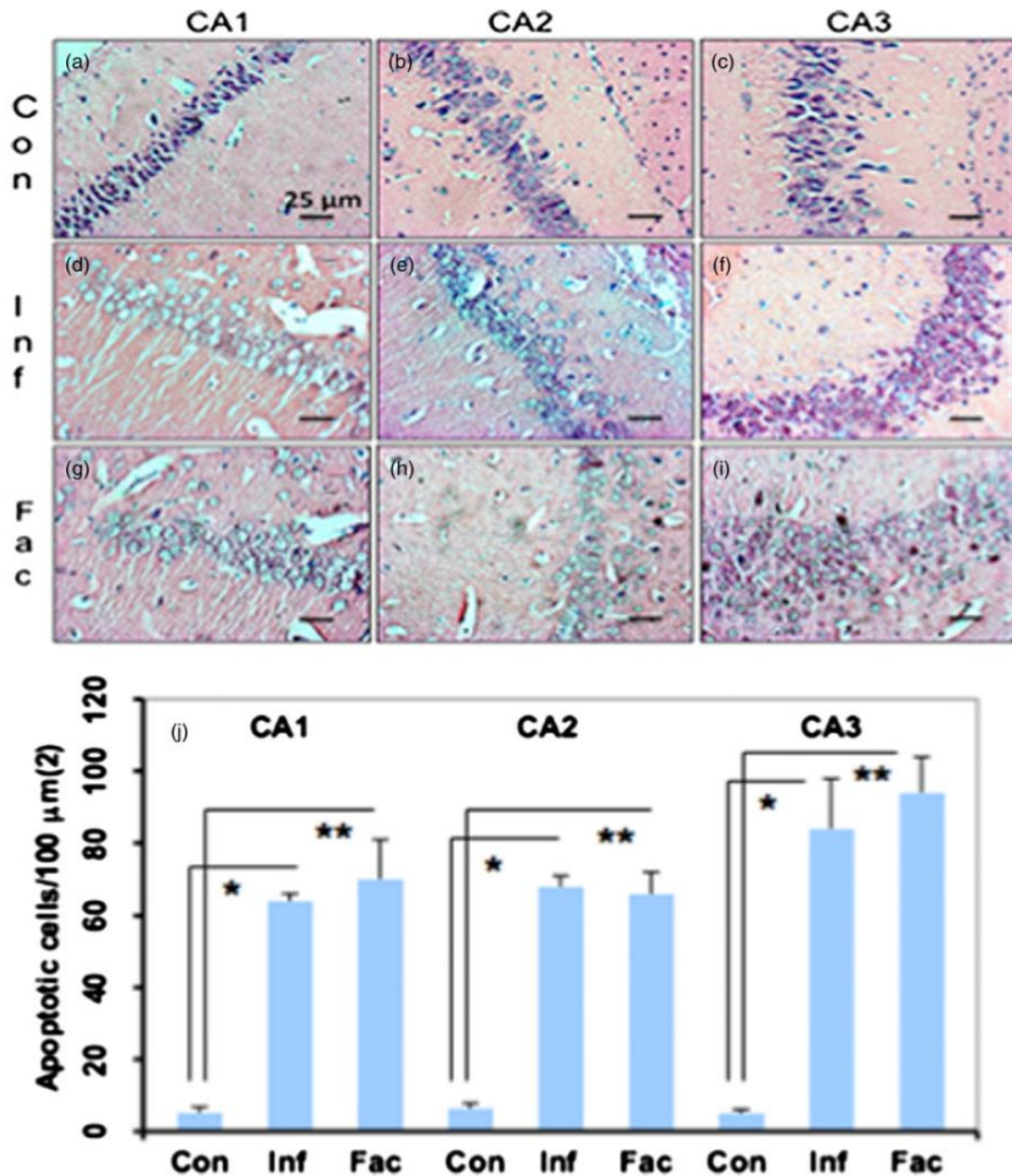


Fig. 3. Haematoxylin/eosin-stained brain sections that contain portions of CA1, CA2 and CA3 regions from a control mouse (a–c), a mouse infected with *T. crassiceps* metacystodes (d–f) and a mouse inoculated with *T. crassiceps* Fac (g–i). Scale bar = 25 μm. 40×. (j) Number of apoptotic cells/100 μm². Bars represent the mean ± SD. * $P < 0.001$ Infected vs Control. ** $P < 0.001$ Factor vs Control.

(GraphPad Instat, San Diego, CA, USA). Data are presented as the mean ± SD. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Barnes maze

Both intraperitoneal infection with *Taenia crassiceps* metacystodes and subcutaneous inoculation with a *T. crassiceps* metacystode factor (Fac) produced significant impairment on performance in the Barnes maze and induced bilateral hippocampal sclerosis in mice. The performance in the Barnes maze was mainly assessed by the escape latency parameter (mean ± SD), measured in the

number of seconds it took to reach and completely hide in the escape hole.

During all time (second trial) to learn this task, both infected and factor mice were significantly slower in reaching and hiding in the escape hole, in comparison with control mice. On the fifth day, all control mice ($n = 6$) were able to hide in the escape hole in 28 ± 44 s after reaching it. Latency values of control mice were significantly less than those of experimental mice ($P < 0.05$ Con vs Fac, and $P < 0.01$ Con vs Inf; fig. 1). Infected mice ($n = 4$) showed difficulty in moving in the maze; on the fourth day only one (25%) was able to hide at 151 s after reaching the escape hole. On the fifth day only one reached the escape hole in 73 s, and stayed there the rest of time without hiding in the hole. On

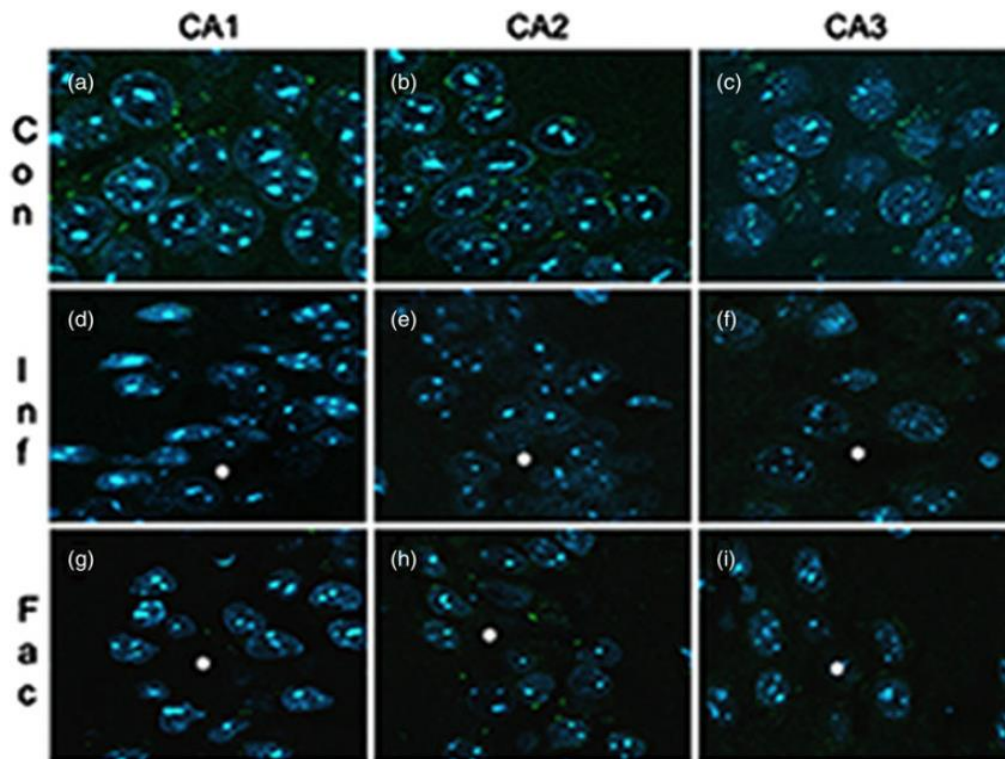


Fig. 4. DAPI-stained brain sections that contain portions of CA1, CA2 and CA3 from a control mouse (a–c), a mouse infected with *T. crassiceps* metacystodes (d–f) and a mouse inoculated with *T. crassiceps* Fac (g–i). Scale bar = 25 μm. 40x.

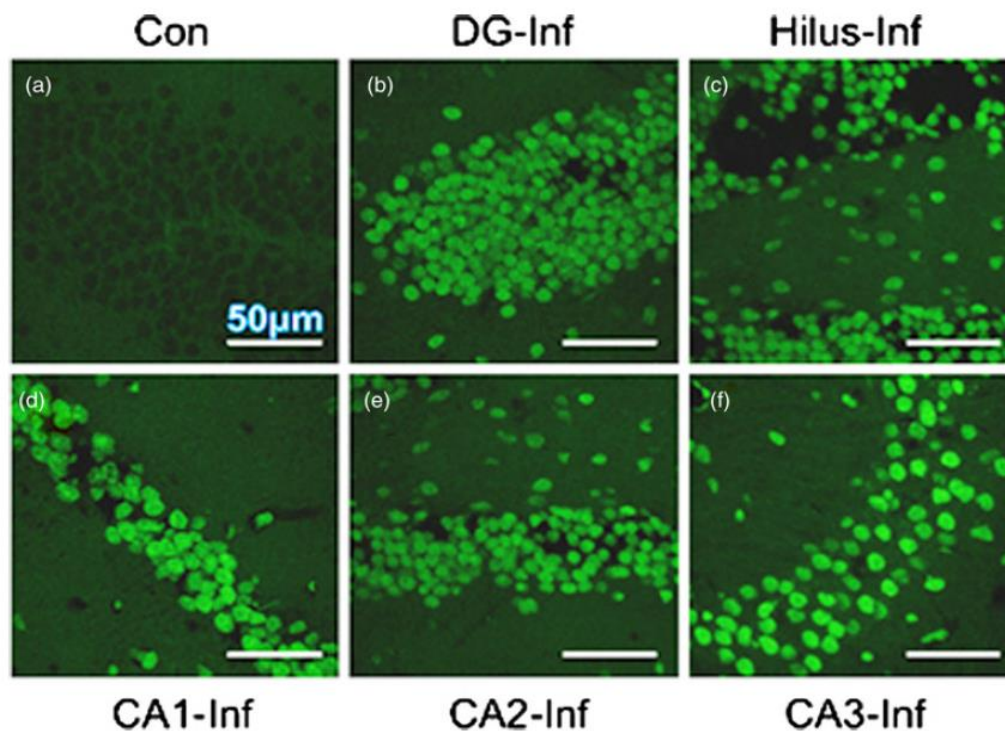


Fig. 5. TUNEL-stained brain sections that contain a portion of the dentate gyrus from a control mouse (a), and a portion of the dentate gyrus, hilus, CD1, CD2 and CD3 from a mouse infected with *T. crassiceps* metacystodes (b–f). Scale bar = 50 μm. 60x.

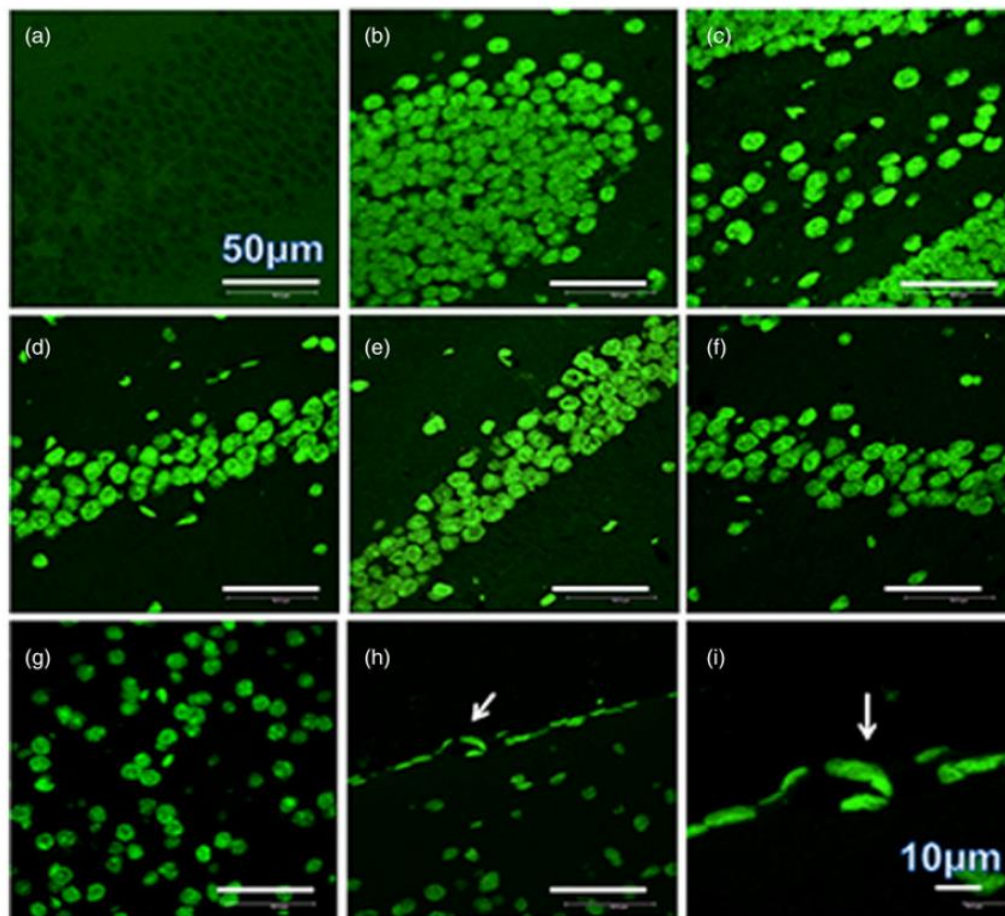


Fig. 6. TUNEL-stained brain sections that contain a portion of dentate gyrus from a control mouse (a), a portion of dentate gyrus and hilus from a mouse infected with *T. crassiceps* Fac (b and c), a portion of CD1, CD2 and CD3 from a mouse inoculated with *T. crassiceps* Fac (d–f), a portion of the adjacent cortex from a mouse inoculated with Fac (g), and the border of the adjacent cortex showing apoptotic endothelial cells within sections of the capillary (arrow) (h). Scale bar = 50 μm . 60 \times . (i) is an amplification of (h). Scale bar = 10 μm . 200 \times .

the fifth day Factor mice ($n = 6$) showed hyperactivity, reaching the escape hole at 67 ± 38 s. Only five mice had hidden at 73 ± 85 s after reaching the escape hole. The sixth mouse did reach the escape hole at 99 s, then left the hole four times to explore several holes and came back, but it never hid (fig. 1).

Histopathological studies

A heavy parasite load was found in the peritoneal cavity of mice infected with *T. crassiceps* metacystodes (485 ± 78 metacystodes per mouse). Haematoxylin/eosin staining showed that all sub-regions of hippocampi from experimental animals were affected in their tissue architecture either in the cellular morphology or in the surrounding tissue. The dentate gyri, as well as the hilus, CA1, CA2 and CA3 cells displayed dispersion, bleached nuclei, cell loss and many tears in the surrounding white matter, compared with the integrity of the cells and the white matter of the control hippocampi. Dentate gyrus branches from experimental mice (fig. 2c, e) formed a smaller angle compared to those of the control hippocampi (fig. 2a). The number of cells that had altered morphology and staining were statistically ($P < 0.001$) more than those of the control mice (fig. 3). DAPI staining displayed generalized pyknosis or hypercondensation of the chromatin of the CA1, CA2 and CA3 nuclei from *T. crassiceps* infected and Fac-treated mice. Apparently, all nuclei in these sub-regions were collapsed, and their number was

less than those of the control mice. Additionally, numerous empty spaces among the reduced number of pyknotic nuclei of these sub-regions were observed, which suggested cell loss (fig. 4). Pyknosis is the accepted sign of programmed cell death (Burgoyne, 1999). To evaluate DNA fragmentation, DNA strand breaks were labelled using fluorescein-dUTP. This staining showed generalized and significant TUNEL-positive cells in the three layers of the dentate gyrus, hilus and in cells from the CA1, CA2 and CA3 regions, including the adjacent cortex ($P < 0.01$ Inf and Fac vs. Con). In all these places, many fragmented nuclei were observed, compared to TUNEL-negative nuclei of the control hippocampi. The intensity of the fluorescence of the nuclei in the above-mentioned regions was not homogeneous, suggesting that apoptosis was induced at different times. Nuclei with a lower fluorescence intensity and of reduced size could be among the first in developing apoptosis. Dispersion and cell loss were also observed (figs 5 and 6). Numerous TUNEL-positive cells were also found in the neighbouring cortex. A remarkable finding was the observation of apoptosis of endothelial cells in several places in all the studied regions (figs 6 and 7).

Discussion

In the current research, the experimental *T. crassiceps* mouse model (Zepeda *et al.*, 2017) was used to investigate parasite mechanisms involved in the production of hippocampal sclerosis

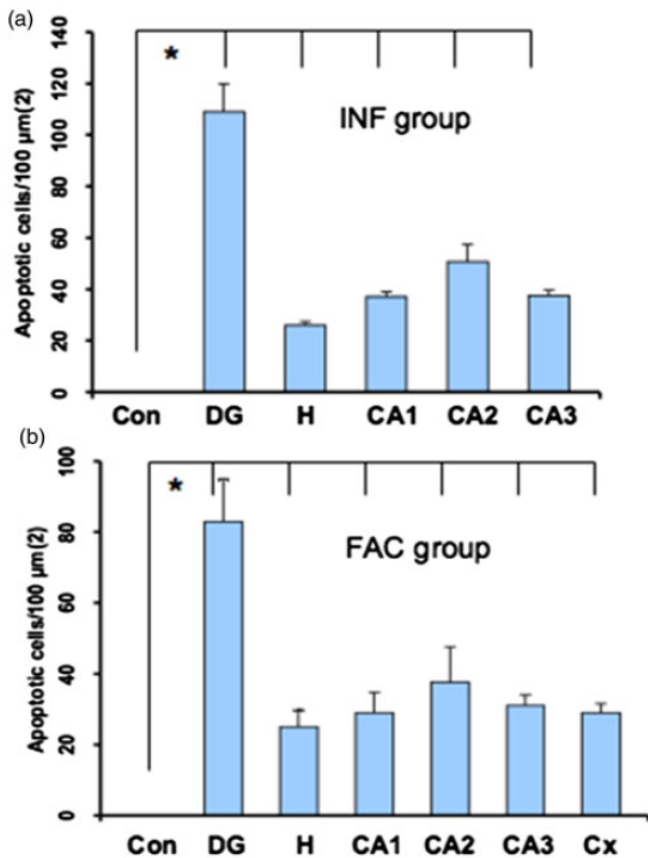


Fig. 7. Statistical data from the sections stained with TUNEL. Bars represent the mean \pm SD of the dentate gyrus from control mice (a & b), dentate gyrus (DG), hilus (H), CA1, CA2 and CA3 from infected mice (a), and DG, H, CA1, CA2, CA3 and Cortex (Cx) from factor mice (b). * $P < 0.01$ DG, H, CA1, CA2, CA3 and Cx vs Con.

(HS), in which some patients suffer from neurocysticercosis. A deficit in learning and memory functions was observed using the Barnes maze. This deficit was more pronounced in mice infected with *T. crassiceps* metacystodes, perhaps due to a heavy parasitic load and an intense intraperitoneal inflammatory reaction as described (Zepeda et al., 2010), as well as structural damage of the histoarchitecture of the hippocampi from experimental mice. This damage was characterized by significant cell death (apoptosis), cell dispersion and cell loss, in all sub-regions of the hippocampus either in the infected group or the Fac-treated animals, such as dentate gyrus, hilus, CA1, CA2, CA3, and the adjacent cortex, compared with the integrity of the cells in control mice. Structural damage was also observed in the neighbouring white matter.

The Barnes maze has been used to relate memory loss and long-term potentiation (LTP) dysfunction in the hippocampus, which are involved in Alzheimer's disease. Using the Barnes maze, Hadipour et al. (2018) found that administration of crocin in rats significantly improves spatial memory indicators such as latency time. The learning deficit in A β (beta-amyloid)-treated animals correlated with a reduction of LTP in hippocampal synapses. Crocin significantly reduced the number of TUNEL-positive cells in the CA1 sub-region compared to the A β -group. Barbe et al. (2016) utilized the Barnes maze to test for long-term memory deficits, with good success. Their results showed in the CA1-3 regions of the hippocampus of mice significantly reduced

numbers of neuronal cell bodies overall, and reduced numbers of Pur-alpha+ neuronal cell bodies and dendrites in heterozygous Pur-alpha (+/-) mice, compared to wild-type (+/+) littermates.

Here, in every sub-region studied, a very interesting finding was the observation of apoptotic endothelial cells dispersed in the white matter near the neuronal packages and in the border of the adjacent cortex. This finding suggests that the Fac apoptogenic activity on endothelial cells could impair the blood-brain barrier, allowing the entry of the Fac (that migrated via the bloodstream when the peritoneal cavity of the mouse was infected with *T. crassiceps* metacystodes or the abdominal skin of the mouse was inoculated with Fac) into the brain, so that it can reach the hippocampal cells and other regions of the brain, such as thalamic nuclei (Zepeda et al., 2017). The apoptogenic activity of Fac seems to have been cumulative, as was observed with the TUNEL staining.

The pathological characteristic produced by *T. crassiceps* metacystode infection or by *T. crassiceps* Fac in all sub-regions of the hippocampus resembles human hippocampal sclerosis, such as volume loss, which indicates atrophy (Jeniffer et al., 2015). The learning deficit and hyperactivity are neurological manifestations of structural damage in the hippocampus, which rely on other functions, such as attention, language and spatial memory. Another feature of hippocampal sclerosis described in the literature is the increase of astrocytes during the scarring process in places where there has been cell loss due to some injury (Sloviter, 1994). We looked for this feature using a rabbit antibody anti-GFAP fluorescein mouse, but we could not obtain positive results in this way. So, in the next study, we intend to test this hypothesis.

In humans, NCC damage to the hippocampus caused by the *T. solium* Fac must be a very chronic process, proportional to the number of living parasites; thus, when the neurological deficits are apparent, including epilepsy, the parasites are probably already calcified. Molinari et al. (1987) reported that in porcine cysticercosis, the suppression of T-cells was proportional to the number of cysticerci per 1 kg of parasitized meat. Human neurocysticercosis has been associated with hippocampal atrophy, and the results of a study by Del Brutto et al. (2017) suggested that NCC-related hippocampal atrophy takes a long time to develop.

Taenia crassiceps Fac are chromatographic Sephadex G-50 fractions containing substances of low molecular weight (<1250 Da) obtained by ultrafiltration of the peritoneal fluid from female mice infected intraperitoneally with *T. crassiceps* metacystodes (Zepeda et al., 2011). The complete chemical characterization of these substances has not been possible. By preliminary NMR and infrared studies, these Sephadex G-50 fractions contain at least three aromatic components, carbohydrates such as glucose, and can induce a specific antibody response in rabbits and mice, which indicate that this factor is produced by the parasite (data not published). The non-specific way this Fac induces apoptosis in different types of cells, such as testis cells (Zepeda et al., 2011), ovary cells (Solano et al., 2015), spleen cells (Zepeda et al., 2016), and hippocampal cells (Zepeda et al., 2017) is unknown. The learning deficit and the extensive apoptosis of hippocampal cells of experimental mice indicate a close relationship between both structure and function. Thus, it may be reasonable to assume *T. solium* metacystode factor is the causative agent of brain injuries such as hippocampal sclerosis in human neurocysticercosis. It will be important to contrast these results with relevant studies in human neurocysticercosis, as has been noted by Del Brutto et al. (2016).

Using the Barnes maze, experimental mice showed a learning deficit closely related to hippocampal injury and very similar to that observed in patients with neurocysticercosis. Apoptosis of hippocampal endothelial cells suggested that *T. crassiceps* metacystode factor was able to break the BBB, enter the brain and produce hippocampal sclerosis.

Acknowledgments. We are grateful to Teresa Cortés and Daniela Rodríguez for performing histological procedures, and Claudia Rivera and Héctor Malagón for providing the healthy mice. Nadia Zepeda was supported for her graduate studies by the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and CONACyT (scholarship number 262633).

Financial support. This research was supported by Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflict of interest. None.

Ethical standards. The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the laws of Mexico on the care and use of laboratory animals. Animal studies were performed under an institutional protocol similar to that of the U.S. Public Health Service's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. From the Secretariat of Agriculture (SAGARPA NOM-062-ZOO-1999).

References

- Ashwell G (1957) Colorimetric analysis of sugars. In Colowick SP and Kaplan NO (eds), *Methods in Enzymology*. III. New York, NY: Academic Press, pp. 73–84.
- Barbe MF *et al.* (2016) Memory deficits, gait ataxia and neuronal loss in the hippocampus and cerebellum in mice that are heterozygous for Pur-alpha. *Neuroscience* 337, 177–190.
- Bianchin MM *et al.* (2015) Neuroimaging observations linking neurocysticercosis and mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsy Research* 116, 34–39.
- Burgoyne LA (1999) The mechanisms of pyknosis: hypercondensation and death. *Experimental Cell Research* 248, 214–222.
- Del Brutto OH *et al.* (2016) Update on cysticercosis epileptogenic: the role of the hippocampus. *Current Neurology Neuroscience Reports* 16, 1.
- Del Brutto OH *et al.* (2017) The association between neurocysticercosis and hippocampal atrophy is related to age. *American Tropical Medicine and Hygiene* 96, 243–248.
- Everhard ME, Kuhn RE and Zelmer DA (2004) Intrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda Taeniidae) in BALB/c mice. *Journal of Parasitology* 90, 79–84.
- Forlenza OV *et al.* (1997) Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 62, 612–616.
- Griper LB and Welburn SC (2017) The causal relationship between neurocysticercosis infection and the development of epilepsy – a systematic review. *Infectious Diseases of Poverty* 6, 31.
- Hadipour M *et al.* (2018) Crocin improved amyloid beta induced long-term potentiation and memory deficits in the hippocampal CA1 neurons in freely moving rats. *Synapse* 72, e22026.
- Jeniffer VN, Udayakumar S and Pushpalatha K (2015) A clinical study to identify the possible etiology of complex partial seizures using magnetic resonance imaging brain findings and its implications on treatment. *Journal of Pediatric Neurosciences* 10, 350–354.
- Lurton D *et al.* (1998) Granule cell dispersion is correlated with early epileptic events in human temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurological Science* 154, 133–136.
- Miyasato T *et al.* (1977) Electron microscopic observations on the penetration of *Hymenolepis nana* into the intestine of the mouse. *Acta Medica Kinki University* 2, 1–18.
- Molinari JL, Tato P and Valles Y (1987) Immunosuppression T-lymphocytes in swine, modulated by *Cysticercus cellulosae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 29, 293–300.
- Molinari JL *et al.* (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 84, 205–208.
- Molinari JL *et al.* (1993) Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *Journal of Parasitology* 79, 124–127.
- Paxinos G and Franklin KBJ (2013) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th Edn. Oxford: Elsevier.
- Rosenfeld CS and Ferguson SA (2014) Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *Journal of Visualized Experiments* 84, 51194–51219.
- Sloviter RS (1994) The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology* 35, 640–654.
- Solano S *et al.* (2015) A *Taenia crassiceps* metacystode factor enhance ovarian follicle atresia and oocyte degeneration in female mice. *Journal of Helminthology* 89, 49–59.
- Varghese V *et al.* (2016) Cognitive dysfunction and its determinants in patients with neurocysticercosis. *Indian Journal of Psychological Medicine* 38, 142–146.
- Zepeda N *et al.* (2010) Decrease of peritoneal inflammatory CD4+, CD8+, CD19+ lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitology Research* 127, 1129–1135.
- Zepeda N *et al.* (2011) *Taenia crassiceps*: a secretion substance of low molecular weight leads to disruption and apoptosis of seminiferous epithelium cells in male mice. *Experimental Parasitology* 128, 184–191.
- Zepeda N *et al.* (2016) A *Taenia crassiceps* factor induces apoptosis of spleen CD4+ T cells and TGF- β and Foxp3 gene expression in mice. *Journal of Helminthology* 90, 223–231.
- Zepeda N *et al.* (2017) Apoptosis of mouse hippocampal cells induced by *Taenia crassiceps* metacystode factor. *Journal of Helminthology* 91, 215–221.