



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA  
INFLAMATORIA EN DIFERENTES  
TIEMPOS POST-INFECCIÓN EN UN  
MODELO DE NEUROCISTICERCOSIS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

DANITZA GRISELDA DAVILA VILLACORTA

LIMA - PERÚ

2024



Asesora:

PhD. Manuela Renee Verástegui Pimentel

**JURADO DE TESIS**

**Dra. ROSA PATRICIA HERRERA VELIT**

PRESIDENTE

**Dra. KATHERINE JESSICA TORRES FAJARDO**

VOCAL

**MG. JOSE LUIS AGUILAR OLANO**

SECRETARIO

## **DEDICATORIA.**

*Dedico este trabajo a mi familia, muchas gracias por estar a mi lado en cada proyecto, en cada meta que me propongo y porque siempre me incentivan para cumplirlos.*

*A mi mamá Nimia y papá Hildebrando por cada palabra de motivación; a mi nanita*


*Katty, que es como mi madre y que nunca se cansa de ayudarme y mi y mi nanito Deeybe por estar pendiente de mí, muchas gracias familia querida. A mis bellas amigas, Anika Eca (gracias infinitamente, tienes las palabras precisas para que uno deje de dudar del potencial que pueda tener), mi bella Yudith Cauna, Jessy Condori, Nathaly Claros y Valeria Rubio, quienes siempre estuvieron cerca de todo este proceso.*

## **AGRADECIMIENTO.**

*Muy agradecida a la Dra. Manuela R. Verástegui, encargada del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas (LIEI), a mis amigos y compañeros del laboratorio.*

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

Financiado por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas

 <b>UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA</b>	<b>UNIDAD DE GOBIERNO Y ADMINISTRACIÓN</b>	NP-108-UPCH
	<b>SISTEMA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD</b>	V.01.04 / 25.03.2020
	<b>NORMAS Y PROCEDIMIENTOS DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE LOS GRADOS ACADÉMICOS DE MAESTRIA Y DOCTORADO</b>	<b>ESCUELA DE POSGRADO VICTOR ALZAMORA CASTRO</b>
		Página 42 de 43

## EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN DIFERENTES TIEMPOS POST-INFECCIÓN EN UN MODELO DE NEUROCYSTICERCOSIS

### INFORME DE ORIGINALIDAD



### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia</b> Trabajo del estudiante	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>journals.plos.org</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>siis.unmsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.scielo.br</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>pure.johnshopkins.edu</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Florida International University</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>link.springer.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>scholars.uthscsa.edu</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1	Planteamiento del problema .....	6
1.1	Justificación.....	8
II	OBJETIVOS .....	10
2.1	Objetivo general .....	10
2.1	Objetivos específicos.....	10
III	MARCO TEÓRICO .....	11
3.1	Ciclo de vida de Taenia solium .....	11
3.2	Clasificación de neurocisticercosis según su ubicación .....	12
3.2.1	Neurocisticercosis intraparenquimal.....	12
3.2.2	Neurocisticercosis extraparenquimal .....	12
3.3	Respuesta inmune e inflamatoria.....	13
IV	METODOLOGÍA.....	20
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO .....	20
4.1.1	Lugar de estudio.....	20
4.1.2	Ratas.....	20
4.1.3	Consideraciones éticas .....	20
4.2	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	21

4.2.1	Obtención y activación de oncosfera de <i>Taenia solium</i> .....	21
4.2.2	Infección intracraneal de ratas .....	22
4.2.3	Perfusión transcardíaca y sacrificio de animales .....	22
4.2.4	Score de Inflamación - Tinción hematoxilina & eosina (H&E) .....	23
4.2.5	Tinción de rojo de picrosirius (RP).....	24
4.2.6	Inmunohistoquímica.....	25
4.2.7	Inmunofluorescencia indirecta – doble marcaje .....	26
4.2.8	Procesamiento y análisis de imágenes .....	26
V	RESULTADOS .....	28
5.1	Descripción de la muestra .....	28
5.2	Infiltrado celular en cerebro de ratas en diferentes tiempos post-infección.	29
5.3	Evaluación de la fibrosis y el tipo de colágeno presente en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección.....	34
5.4	Evaluación de la inmunorreactividad y distribución de microglías/macrófagos y astrocitos en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección .....	38
5.4.1	Inmunorreactividad de microglías y astrocitos en NCC .....	38
5.4.2	Distribución de microglías/macrófagos y astrocitos alrededor del quiste en NCC .....	43
VI	DISCUSIÓN .....	52
VII	CONCLUSIONES.....	59



7.1	Limitaciones .....	59
VIII	BIBLIOGRAFÍA .....	61
IX	ANEXOS .....	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del cisticerco en cerebros de ratas mediante Hematoxilina & Eosina (H&E).....	29
Figura 2. Infiltrado celular alrededor del quiste según ubicación en los diferentes tiempos post-infección (1-12: meses post-infección). ....	32
Figura 3. Infiltrado inflamatorio de moderado a severo - Score de inflamación (SI) – 1 en diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección). ....	32
Figura 4. Infiltrado inflamatorio con presencia de macrófagos organizados en empalizadas sin formación de fibrosis (SI-2) y con formación de fibrosis (SI-3) en diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección).....	33
Figura 5. Fibrosis y tipo de colágeno presente en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección).....	37
Figura 6. Inmunorreactividad de microglías/macrófagos (CD68) y astrocitos (GFAP) en cerebros de ratas con Neurocisticercosis en diferentes tiempos post-infección.....	40
Figura 7. Inmunorreactividad de microglías/macrófagos y astrocitos en quistes parenquimales. ....	47
Figura 8: Inmunorreactividad de microglías/macrófagos y astrocitos en quistes meningeales y ventriculares. ....	49

Figura 9. Distribución de microglías/macrófagos y astrocitos alrededor de quistes parenquimales en diferentes tiempos post-infección – Inmunofluorescencia doble marcaje.....	50
Figura 10. Morfología de microglías/macrófagos en quistes parenquimales en ratas con Neurocisticercosis (1-12 meses post-infección).....	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de la localización de quistes de <i>Taenia solium</i> en cerebro de ratas en los diferentes tiempos post-infección .....	28
Tabla 2. Inmunorreactividad de Microglías/ Macrófagos -CD68 en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección según la ubicación.....	41
Tabla 3. Inmunorreactividad de Astrocitos - GFAP en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección según la ubicación .....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

NCC	Neurocisticercosis
SNC	Sistema nervioso central
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
CD 68	Cluster de diferenciación 68
Iba- 1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
IL	Interleucina
Th1 ½	T helper 1 o 2
DAB	Diaminobencidina
HRP	Peroxidasa de rábano picante
DAPI	4',6 - diamino .- 2 -fenilindol
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MMP	Metaloproteinasas
IFN $\gamma$	Interferon gamma
H&E	Hematoxilina y eosina
FIA	Fluido Intestinal Artificial
IP	Intraperitoneal
P	Parenquimal
M	Meningeal
V	Ventricular
SI	Score de inflamación
MPI	meses post-infección

## RESUMEN

**Introducción:** La Neurocisticercosis es la infección parasitaria helmíntica más común que afecta el sistema nervioso central. Los estudios histopatológicos en seres humanos como en modelos animales han permitido describir algunas características de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, actualmente no existen estudios que describan el tipo de infiltrado celular en la etapa inicial y durante el desarrollo de la infección.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evaluar el patrón de infiltrados celulares, fibrosis y activación de células gliales (microglías/ macrófagos y astrocitos) en los cerebros de ratas obtenidos en diferentes tiempos post-infección.

**Métodos:** Las ratas Holtzman de 10-14 días de edad fueron infectadas intracranalmente con oncosferas activadas de *Taenia solium* y se sacrificados en diferentes meses post-infección, teniendo 10 grupos post-infección (1m, 1.5m, 2m, 2.5m, 3m, 4m, 6m, 8m, 10m y 12m). Con la tinción H&E y el score de inflamación se analizó el tipo de infiltrado celular, la tinción de rojo picrosirius el tipo de colágeno presente en la fibrosis y finalmente la respuesta inflamatoria de microglías/macrófagos y astrocitos por medio de la inmunohistoquímica.

**Resultados:** Se encontró que el tipo de infiltrado celular y macrófagos con y sin presencia de fibrosis es variable en el tejido que rodea al quiste. Tanto en quistes parenquimales (P) y meningeales (M) presentaron fibrosis a partir de los dos meses post-infección (meses post-infección, MPI) y conforme avanza el tiempo post-infección se observó un aumento de la fibrosis hasta un 80% alrededor de los quistes parenquimales y 50% alrededor de los quistes meningeales. En quistes P y M de tres MPI se observó que predomina el colágeno tipo III y conforme avanza el tiempo post-

infección se va observando con mayor predominio el colágeno tipo I. Por otro lado, en quistes M y ventriculares (V), cerca del 30 al 40% del tejido alrededor del quiste presentó infiltrado celular moderado a severo, a diferencia de los quistes P con 5 a 10% alrededor del quiste. Por otro parte, la respuesta inflamatoria de microglías/macrófagos y astrocitos fue variable en los meses post-infección. En los primeros meses existe una capa definida de células de microglías/macrófagos activados que rodea al quiste, e inmediatamente después se encuentran las células astrocíticas activadas. Conforme avanza los meses post-infección se va formando y expandiendo el tejido fibrótico alrededor del quiste co-localizando con las microglías/macrófagos. Adyacente a este tejido fibrótico se forma una capa de células astrocíticas activadas. Por otro lado, la morfología de microglías/macrófagos en los primeros MPI fue más del tipo fagocítico/ameboideo y por el contrario a partir de los seis MPI son del tipo hipertrófico/distrófico desramificada.

**Conclusiones:** Los resultados indican que existen diferencias en el tipo de respuesta inflamatoria y es dependiente de la localización del quiste en el cerebro. Observándose que en quistes P la presencia de fibrosis es mayor en comparación con quistes M. En quistes M y V predomina el infiltrado celular de moderado a severo. Además, existen diferencias en la morfología y patrón de distribución de las células gliales en los primeros meses en comparación con los últimos MPI. Por lo mencionado arriba, todos estos acontecimientos estarían contribuyendo a la patología en Neurocisticercosis.

**Palabras claves:** Neurocisticercosis, respuesta inflamatoria, fibrosis, gliosis, macrófagos.

## **ABSTRACT**

**Background:** Neurocysticercosis is the most common helminthic parasitic infection that affects the central nervous system. Histopathological studies in humans and animal models have allowed us to describe some characteristics of the inflammatory response. However, there are currently no studies that describe the type of cellular infiltrate in the initial stage and during the development of the infection.

**Objective:** The aim of this work was to evaluate the pattern of cellular infiltrates, fibrosis and activation of glial cells (microglia/macrophages and astrocytes) in the brains of rats obtained at different times post-infection.

**Methods:** Holtzman rats 10-14 days old were infected intracranially with activated *Taenia solium* oncosphere and were sacrificed in different months post-infection, having ten post-infection groups (1m, 1.5m, 2m, 2.5m, 3m, 4m, 6m, 8m, 10m y 12m). With H&E staining and the inflammation score, the type of cellular infiltrate was analyzed, the picosirius red stain was used to analyze the type of collagen present in fibrosis, and finally the inflammatory response of microglia/macrophages and astrocytes by means of immunohistochemistry.

**Results:** It was found that the type of cellular infiltrate and macrophages with and without the presence of fibrosis is variable in the tissue surrounding the cyst. Both the parenchyma (P) and the meningeal (M) cysts showed fibrosis starting two months post-infection (months post-infection, MPI) and as time post-infection progressed, an increase in fibrosis was observed up to 80% around P cysts and 50% around M cyst. In P and M cysts of three MPI the predominant type III collagen was observed and as the post-infection time progresses, type I collagen was observed with greater



predominance. On the other hand, in M and ventricular (V) cysts, about 30 to 40% of the tissue around the cyst presented moderate to severe cellular infiltration, unlike P cysts with 5 to 10% around the cyst. On the other hand, the inflammatory response of microglia/macrophages and astrocytes was variable in months post-infection. In the first months there is a defined layer of activated microglia/macrophage cells surrounding the cyst, and immediately afterwards there are activated astrocytic cells. As post-infection time progresses, fibrotic tissue forms and expands around the cyst, co-localizing with microglia/macrophages. Adjacent to this fibrotic tissue, a layer of activated astrocytic cells forms. On the other hand, the morphology of microglia/macrophages in the first MPI was more of the phagocytic/ameboid type and on the contrary from the six MPI onwards they are of the unbranched hypertrophic/dystrophic type.

**Conclusions:** The results indicate that there are differences in the type of inflammatory response and it is dependent on the location of the cyst in the brain. It was observed that in P cysts the presence of fibrosis is greater compared to M cysts. In M and V cysts, moderate to severe cellular infiltrate predominates. Furthermore, there are differences in the morphology and distribution pattern of glial cells in the first months compared to the last MPI. Due to what was mentioned above, all these events would be contributing to the pathology in Neurocysticercosis.

**Keywords:** Neurocysticercosis, inflammatory response, fibrosis, gliosis, macrophages.

## I INTRODUCCIÓN

La Neurocisticercosis (NCC) es la infección parasitaria helmíntica más común que afecta el sistema nervioso central (SNC) cuando el estadio larval de *Taenia solium* se localiza en el SNC (1,2). Esta enfermedad es endémica en América Latina y presenta una tasa de prevalencia alta de 4.9% a 22.6% (3–5). En nuestro país, donde la prevalencia es de aproximadamente 10 a 20% (2–4,6–8), la enfermedad se presenta principalmente en aquellas zonas que no cuentan con una buena infraestructura sanitaria, por ejemplo la falta de letrinas y sistemas adecuados de desagüe (9). Asociado a esto, los cerdos (hospederos intermedios del parásito) que se crían libremente tienen un fácil acceso al consumo de excretas humanas (3,10).

La enfermedad de NCC es considerada como una enfermedad crónica, debido a que el individuo infectado puede presentar los primeros síntomas después de meses o años post-infección (4,11). Se sabe que la presencia de los síntomas clínicos en NCC es dependiente de la localización, cantidad y viabilidad del parásito en el SNC (4,12,13). En NCC, la primera fase de infección el individuo suele ser asintomático y asociado a la presencia de quistes viables (14,15). Esta fase asintomática (como se reporta en algunos helmintos) podría deberse a que el parásito está modulando la respuesta inmune del hospedero (4,10,11,13). Sin embargo, no existen estudios que demuestran qué tipo de respuesta inflamatoria se observa en la etapa inicial y durante todo el proceso de infección a lo largo del tiempo. Cuando el parásito empieza a degenerar se exagera la respuesta inflamatoria, observándose los síntomas clínicos, por ejemplo el incremento de la frecuencia de crisis epilépticas, hidrocefalia, dolores de cabeza, deterioro cognitivo y meningitis (4,11).

Los estudios histopatológicos en humanos como en modelos animales en cerdos y ratones con NCC han permitido describir algunas características de la respuesta inflamatoria. Estos estudios mencionan la presencia de infiltrados celulares como leucocitos, además de la activación de células residentes en el cerebro como microglías, astrocitos y presencia de tejido fibrótico alrededor del parásito (4,16–19). Además, el análisis en muestras de tejido cerebral y de líquido cefalorraquídeo (LCR) con NCC muestran que existe una respuesta inicial T helper 1 (Th1) y posteriormente se desarrolla una respuesta mixta de Th1/Th2 (13,16–20). Sin embargo, no existen estudios que describan cómo es la progresión de la respuesta inmune del hospedero desde el alojamiento de la oncosfera de *T. solium* hasta el desarrollo de cisticerco en el cerebro.

La presente investigación plantea estudiar el tipo de infiltrado celular por la tinción hematoxilina y eosina (H&E), la formación de fibrosis, la activación de células gliales microglías/macrófagos (reactivos positivos para el marcador a CD68) y de astrocitos (reactivos positivos para el marcador a GFAP) en los diferentes tiempos post-infección en el modelo animal de ratas con Neurocisticercosis. Los resultados obtenidos permitirán conocer la cinética de la respuesta inflamatoria en base a estos biomarcadores.

### **1.1 Planteamiento del problema**

La NCC es una enfermedad que afecta al sistema nervioso central. En nuestro país la NCC es un problema serio de salud pública, ya que existen muchas zonas endémicas para esta enfermedad; presentándose en la sierra, la costa norte y la selva alta (3). Antes

de 1970, la escasez de herramientas para el diagnóstico de la NCC contribuyó para que no se considere a la enfermedad como un problema de salud pública en Perú. Hoy en día, debido a que contamos con pruebas de diagnósticas más sensibles y específicos se ha podido determinar una alta prevalencia de la enfermedad en algunas regiones de nuestro país (10 al 20%)(5,7,21). Además, es considerada como una de las principales causas de epilepsia tardía en nuestro país (3,4,11). A pesar de ello, todavía existen muchas interrogantes sobre la patogénesis de la enfermedad, no teniéndose un conocimiento claro del tipo de respuesta inflamatoria, de la acción patógena del parásito en el hospedero, entre otros. Por ello, es necesario comprender la interacción hospedero-parásito, el tipo de respuesta inmune que genera el parásito desde que ingresa al hospedero hasta que desarrolla el estadio larval o cisticerco a nivel del sistema nervioso central.

Se han usado diferentes modelos animales con el propósito de entender cómo es que se da la progresión de la respuesta inflamatoria en presencia del parásito. Sin embargo, el inconveniente de estos modelos es el uso de un cestodo diferente al que genera la NCC humana (*T. solium*) tales como el metacestode de *Mesocestoide corti* y *Taenia crassiceps* (12,18,22–26). Además, otra limitante de estos modelos es el uso del cisticerco como estadio infectante y no el estadio de oncosfera, el cual es el estadio de infección natural. Así mismo, el uso del modelo de infección natural en cerdos para la cisticercosis presenta algunas limitaciones, como la complejidad del análisis clínico asociado a la presencia de convulsiones o crisis epilépticas, déficit de memoria, entre otros (14,27). Por otro lado, el manejo del animal en el laboratorio hace que

técnicamente sea más difícil y de costo elevado, además de no contar con una diversidad de reactivos que nos permitan identificar diferentes biomarcadores asociados con la patogénesis de la NCC. El uso del modelo de ratas con NCC el cual presenta cuadro clínico similar a lo reportado en el humano (crisis epilépticas y déficit de memoria) es una herramienta que permite estudiar la patogénesis de la enfermedad (28–32).

En la actualidad no existen estudios que describan qué tipo de respuesta genera el parásito en la etapa inicial (fase de desarrollo de post-oncosfera) y durante todo el proceso de infección (fase de desarrollo de cisticerco), y cómo se da la activación de las microglías/macrófagos y astrocitos. Es por ello que el presente trabajo emplea un modelo animal para NCC en ratas producto de la infección intraparenquimal con oncosferas activadas de *T. solium*, evaluando la presencia del infiltrado celular, tejido fibrótico, tipo de colágeno y activación de células gliales en diferentes tiempos post-infección.

## **1.1 Justificación**

- Se sabe que en un inicio de la enfermedad los pacientes presentan NCC asintomática. Sin embargo, no se conoce qué tipo de respuesta inflamatoria asociada al infiltrado celular predomina en esta primera fase post-infección.

- Se desconoce cómo es la respuesta inflamatoria asociada a la activación de células gliales (microglías/macrófagos y astrocitos) desde el inicio de la infección (oncosfera) hasta el desarrollo de cisticerco.
- El modelo animal con NCC en ratas permite estudiar la respuesta inflamatoria desde la etapa inicial de la infección hasta la etapa tardía.
- Es importante conocer estos parámetros que nos permitan comprender mejor la interacción hospedero-parásito para a su vez, entender mejor la patogénesis de la enfermedad.
- Por primera vez se podría determinar qué tipo de infiltrado celular y activación de células gliales está presente desde la primera fase de infección y su progresión a lo largo del tiempo post-infección.

## **II OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

- Evaluar el patrón de infiltrados celulares, fibrosis y activación de células gliales (microglías/ macrófagos y astrocitos) en cerebros de ratas obtenidos en diferentes tiempos post-infección.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el infiltrado celular mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) en cerebros de ratas con NCC en los diferentes tiempos post-infección.
- Evaluar el tipo de colágeno presente en fibrosis mediante la tinción de rojo de picrosirius en cerebros de ratas con NCC en los diferentes tiempos post-infección.
- Determinar la presencia de microglías activadas/macrófagos (CD68) y astrocitos (GFAP) mediante la técnica de inmunohistoquímica en cerebros de ratas con NCC en diferentes tiempos post-infección.
- Determinar la distribución de microglías activadas/macrófagos y astrocitos alrededor del quiste mediante inmunofluorescencia en cerebros de ratas con NCC en los diferentes tiempos post-infección.

### III MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Ciclo de vida de *Taenia solium*

*Taenia solium* es un cestodo cuyo ciclo de vida depende de dos hospederos: el humano, considerado como el hospedero definitivo y el cerdo como el hospedero intermediario. Se habla de teniasis cuando la forma adulta de *T. solium* reside en el intestino del humano; la forma adulta posee una estructura denominada proglótides, estos proglótides contienen huevos que son continuamente eliminados junto con las heces (3).

Los cerdos al ingerir las heces con huevos liberan el embrión hexacanto (oncosfera) a nivel de la mucosa intestinal. Estas oncosferas atraviesan la mucosa intestinal, llegan a la vía hemática o linfática y mediante estas vías llegan a diferentes tejidos hasta desarrollarse en metacestode o cisticerco, de esta manera se produce la cisticercosis porcina. Cuando el humano ingiere carne de cerdo mal cocida e infectada con cisticercos de *T. solium*, el cisticerco se desarrolla en el intestino hasta su forma adulta de *T. solium*, completándose de esta manera el ciclo de vida (3).

Se considera un importante problema de salud pública cuando el parásito se aloja en el SNC, enfermedad conocida como NCC, esto ocurre cuando el humano ingiere accidentalmente huevos de *T. solium*; y cuya característica principal es la presencia de crisis epilépticas (4,28,33).



### **3.2 Clasificación de neurocisticercosis según su ubicación**

La NCC fue clasificada de acuerdo a la localización del parásito en el cerebro: Neurocisticercosis intraparenquimal y neurocisticercosis extraparenquimal (4,11).

#### **3.2.1 Neurocisticercosis intraparenquimal**

Son aquellos donde los quistes se localizan en el parénquima cerebral y es considerado el tipo más común de NCC. Estos quistes pueden estar en estado viables o en degeneración. La neurocisticercosis intraparenquimal está clínicamente mejor estudiada y con mejor prognosis que la neurocisticercosis extraparenquimal (4,11). Por otro lado, usualmente los pacientes con este tipo de NCC suelen presentar crisis epilépticas y dolores de cabeza (4,11). Estudios clínicos recomiendan tratamientos con agentes antihelmínticos para la NCC intraparenquimal. Sin embargo, existe cierta controversia en el uso de antihelmínticos, porque puede exacerbar los síntomas, siendo necesario el tratamiento complementario con corticoides. El tratamiento de quistes intraparenquimales suelen ser de periodos cortos en comparación a los quistes extraparenquimales (11).

#### **3.2.2 Neurocisticercosis extraparenquimal**

Se habla de neurocisticercosis extraparenquimal cuando los quistes están localizados principalmente en el espacio subaracnoideo y los ventrículos. Los quistes extraparenquimales son considerados los menos comunes (11). Los pacientes con NCC extraparenquimal generalmente presentan una peor prognosis en comparación con la NCC intraparenquimal. Estos pacientes suelen presentar hidrocefalia por obstrucción mecánica, problemas visuales e infartos (11). Por otro lado, el uso de

agentes antihelmínticos como tratamiento pueden o no ser útiles, es por ello que el tratamiento de quistes localizados extraparenquimal conlleva a tratamientos de periodos largos y repetitivos y acompañado con corticosteroides.

La NCC extraparenquimal-subaracnoidea es considerada la más severa, asociada a la localización del quiste. Inicialmente la respuesta inflamatoria se da en el espacio subaracnoideo. Sin embargo, esto puede afectar y comprometer las meninges (11).

La NCC extraparenquimal-ventricular es comúnmente hallada en el cuarto ventrículo. Esta localización puede ocasionar hidrocefalias ya que el quiste puede lograr crecer muchos centímetro, adquiriendo una forma amorfa y comprometiendo de esta manera el flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR) (11,34).

### **3.3 Respuesta inmune e inflamatoria**

La patología en NCC se da por la respuesta inmune-inflamatoria del cerebro frente al quiste. Además, la gran diversidad de formas clínicas de la enfermedad, sugiere que existe una participación activa del sistema inmune.

Es de suma importancia entender cómo es la fisiopatología básica de la respuesta inflamatoria del SNC frente al quiste y de esa manera identificar y entender la participación de las moléculas responsables de la respuesta inmune exacerbada. Diversos investigadores proponen que la patología en Neurocisticercosis está relacionado con la respuesta inmune-inflamatoria, la localización, el número y viabilidad del quiste en el cerebro (3,11,14,19).

La acción del sistema inmune del hospedero frente al cisticerco resulta, tanto beneficiosa, como perjudicial. Esto se debe a que con el fin de dañar y/o matar al quiste, la respuesta inmune e inflamatoria puede ser tan exacerbada que cause daño al tejido cerebral sano, generando inflamación, necrosis y fibrosis alrededor del quiste (15).

Se ha reportado en diferentes estudios en modelos animales y en pacientes humanos que el tipo celular asociado con la inflamación y el sistema inmune del hospedero frente al quiste de *T. solium* son del tipo linfocitos B y T (principalmente células T $\gamma\delta$ ), células plasmáticas, macrófagos, mastocitos, eosinófilos/neutrófilos (heterófilos, denominado al tipo celular de eosinófilos y neutrófilos en ratas) (19,35,36). Se observó que una etapa inicial de la infección en un modelo animal en ratones para NCC, la respuesta Th1 era predominante y estaba influenciada por las células T (16,25). Además, la distribución y cantidad mínima de las células B y la abundancia de células plasmáticas, se debía aparentemente a que las células B entraban al parénquima cerebral y luego éstas se diferenciaban en células plasmáticas (16,19,20,23,25,37).

Otras de las características frecuentes de la patología en NCC es la cicatriz que se forma en el tejido cerebral alrededor del quiste. Las células responsables de la formación de la cicatriz glial son los astrocitos, microglías y células precursoras de glías (29,30). Además, las células responsables de la formación de la cicatriz fibrótica o fibrosis, son los fibroblastos que tienden a invadir el sitio de lesión, es por ello que es tan frecuente encontrar fibrosis alrededor de los quistes (34,35). Las características principales reportadas en NCC es la formación de fibrosis, angiogénesis e infiltrado celular alrededor del quiste (16,34). En los trabajos de *Restrepo et al.* reportan que la respuesta

alrededor del quiste está conformado por múltiples tipos celulares y existe la presencia de depósitos de colágeno principalmente del tipo I y lejano al quiste y en poca cantidad el colágeno tipo III. Dichos autores mencionan que esta respuesta y formación de fibrosis podría contribuir de manera irreversible al daño del tejido nervioso en pacientes con NCC (16).

Por otro lado, la literatura menciona que el colágeno es el componente principal de la matriz extracelular (MEC). El colágeno tipo I y III se encuentran en la matriz extracelular en diferentes tejidos articulares (cartílago, tendones y tejido conectivo) (38). Donde el colágeno tipo I compuesto por fibrillas fuertes y rígidas y el colágeno tipo III por fibrillas inmaduras, débiles y elásticas. Además, existe diferencias en cuanto a la forma de las fibras de colágeno, donde el colágeno tipo I era gruesa y densa; sin embargo, el colágeno tipo III muy delgada. En los diferentes estudios reportan que un alto contenido de fibra de colágeno I se encuentran en aquellas muestras de características rígidas del tejido en comparación a los tejidos considerados blandos (39). Por otro lado, el colágeno tipo III no mostró diferencias al comparar el contenido de colágeno en tejidos considerados rígidos o blandos.

Además, en la literatura mencionan la relación entre tipo de colágeno, y que el entrecruzamiento del colágeno tipo I y III es importante ya que proporciona resistencia de tracción. Sin embargo, el aumento de colágeno tipo I hace que el entrecruzamiento del tejido se vuelva más rígido y esto asociado a ciertas características patológicas relacionadas a la cicatrización fibrótica (39–42). Se ha reportado en enfermedades fibrótica y tumores sólidos el colágeno que predomina en la fase tardía es del tipo I el cual está asociado a procesos o patologías avanzadas en dichas enfermedades(43).

Además, en la literatura se menciona la participación de eventos como la gliosis y la formación de fibrosis están relacionadas con impedir la regeneración axonal (44). Por otro lado, en NCC reportan inflamación axonal por la presencia de esferoides (29).

Por otro lado, en la literatura se menciona que en la etapa inicial/temprana de enfermedades fibróticas, la ausencia de tejido fibrótico y su relación con los macrófagos tipo M1, característica asociada a una lesión aguda; por otro lado, en enfermedades fibróticas en etapas tardías están asociadas a la población de macrófagos tipo M2, y estos a su vez se asocian a la presencia de fibrosis y con un tipo particular de colágeno (45,46). Por ello se postula que los macrófagos son importantes reguladores que participan en la reparación tisular y la formación de fibrosis (47), y dependiendo del tipo de macrófagos, presentan funciones diferentes en el inicio y la progresión del desarrollo de la patología fibrótica. Otros estudios mencionan la participación conjunta de ambos tipos de macrófagos M1 y M2 en el desarrollo de la fibrosis. Además, el balance del tipo de metaloproteinasas (MMPs) sintetizado por parte de un tipo de macrófago es importante tanto como una actividad anti-fibrótica (MMP1, 2, 3, 12, 13, – macrófagos tipo M1) (48,49) y otros como pro-fibróticas (metaloproteinasas como MMP-7), siendo estimuladores para la formación y desarrollo de la fibrosis (48).

En investigaciones en modelos animales con NCC, se observó que al comparar cerebros no infectados sanos (controles) con cerebros infectados, éstos últimos presentaban un incremento en el número y tamaño de células microgliales/macrófagos

alrededor del quiste (29). Además, la activación de microglías/macrófagos promueven una respuesta tipo Th1 lo que conlleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias como interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) e interleuquina -18 (IL-18). Por otro lado, en este mismo estudio encuentran que posiblemente la IL13 podría participar en el proceso de deposición de colágeno, característica presente en NCC (16,22,50).

Las microglías y astrocitos, conocido como células gliales, son células consideradas como la primera línea de defensa en el sistema nervioso central (20,50–55). Las microglías representan aproximadamente el 10% del total de las células en el SNC; además es considerada el tipo celular de fagocitos mononucleares más abundante a nivel del SNC. La activación de estas células conlleva a cambios en su morfología desde un estado inactivo (morfología ramificada) a un estado activo y/o tipo fagocítico - ameboideo /hipertrófico /distrófico (51,52); en esta última morfología activada es difícil diferenciar los macrófagos provenientes del infiltrado celular o periférica con los residentes del SNC (50,55). Se sabe que las microglías contribuyen en la defensa del SNC, reclutando leucocitos provenientes de la circulación alrededor de la lesión (54). Inicialmente se consideraba que la respuesta de las microglías frente al patógeno era solamente beneficioso. Sin embargo, estudios revelaron que la exacerbada respuesta y acción de las microglías contribuyen en el daño del tejido sano así como a un daño neuronal (56).

Se ha descrito en cerebros de pacientes y en modelos porcinos para NCC, la sobreexpresión de macrófagos alrededor del sitio de infección, con poca o ninguna reacción distante al quiste (29,34). Por otro lado, se menciona la importancia de la

activación de macrófagos en el reclutamiento de células inflamatorias alrededor del quiste (17,20,55).

Por otro lado, los astrocitos representan aproximadamente el 50 a 75% del total del número de células en el SNC, sirven como soporte y diferenciación de las neuronas y formación de la barrera hematoencefálica (20,54). Además, se considera que los astrocitos cumplen un rol importante en la regulación de la respuesta pro y antiinflamatoria. Por ello, la respuesta de células astrocíticas (astrogliosis) es considerada tanto beneficiosa, al regular el efecto proinflamatorio de las células microgliales (57) como perjudicial, ya que afecta la regeneración axonal al inhibir los efectos de los componentes astrocíticos (53,54) que contribuye al daño tisular. Se llama astrogliosis al aumento de la reactividad y el número de astrocitos en la lesión tisular (58). Particularmente, en NCC se ha descrito entre una de las características de la enfermedad la presencia de astrogliosis alrededor del quiste (22,29,34). Por ejemplo, en un estudio en cerdos infectados naturalmente con huevos de *T. solium* se observó la sobreexpresión de GFAP (marcador para astrocitos) alrededor de los quistes (17). En otro estudio en cerdos infectados experimentalmente, se encontró una respuesta inmune-inflamatoria exacerbada, ya que hubo un incremento de la reactividad de astrocitos positivos para GFAP junto con el incremento de infiltrado celular alrededor del quiste (9,20,22). Del mismo modo, en un modelo murino infectados con *Mesocostoides corti* y en el modelo en ratas infectadas con oncosferas de *T. solium*, se encontró que los astrocitos presentaban un aumento en el número, tamaño y reactividad hacia GFAP alrededor del quiste, indicando astrogliosis (29,37). Adicionalmente, en

los trabajos de *Alvarez et al.* (estudio realizado en un modelo murino con *Mesocestoide corti*) se llegó a determinar que la presencia de astrogliosis empezó a los 3 días post-infección (37).

Los estudios realizados en muestras histológicas de pacientes con NCC y en modelos animales, han hecho posible la descripción del tipo de respuesta inmune-inflamatoria del tejido alrededor del quiste (16,18,19,29,34). Además, estos estudios han permitido establecer que existe una estrecha relación entre la sintomatología con la localización, el número y viabilidad de los quistes en el cerebro (11,59).



## **IV METODOLOGÍA**

### **4.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **4.1.1 Lugar de estudio**

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), el cual cuenta con un bioterio donde las ratas permanecieron hasta su sacrificio. Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI) y laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) se llevó a cabo la infección y sacrificio de los animales, así como las diferentes técnicas histológicas.

#### **4.1.2 Ratas**

En este estudio se utilizaron 250 ratas Holtzman de 10-14 días de edad provenientes del bioterio de la UPCH. Luego de la inoculación cerebral intraparenquimal los animales fueron trasladados al bioterio de la FMV – UNMSM para su alojamiento. Los animales recibieron alimentación balanceada *ad libitum* durante todo el periodo de experimentación y fueron supervisados por un médico veterinario.

#### **4.1.3 Consideraciones éticas**

La investigación se realizó cumpliendo las consideraciones éticas de la UPCH, con la aprobación por parte del Comité Institucional de Éticas para el Uso de Animales (CIEA), con código de inscripción 100958.

## 4.2 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

### 4.2.1 Obtención y activación de oncosfera de *Taenia solium*

Para la obtención y activación de oncosfera de *T. solium* se siguió el protocolo estandarizado por el laboratorio y descrito por *Verástegui et al.* (10,60). Se usó una cabina de flujo laminar exclusivo para la extracción de huevos de *T. solium*, se procedió a reconocer las proglótides grávidas; de los cuales se extrajo los huevos maduros y almacenados en dicromato de potasio al 2.5% a 4°C hasta su uso. Luego los huevos fueron lavados 3 veces con 7ml de agua destilada, se centrifugó a 3500rpm por 5 minutos. Se agregó a los huevos aproximadamente 10ml de hipoclorito de sodio al 0.75% (para eliminar restos de tejidos). Luego se centrifugó a 3500rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, al pellet formado de color oscuro-blanco nuevamente se le agregó 7ml de hipoclorito de sodio al 15% y se dejó reposar por 3 minutos (esto sirvió para eclosionar las oncosferas *in vitro*). Luego se observó al microscopio para verificar la liberación de las oncosferas. Una vez obtenidas las oncosferas, se lavó con medio RPMI-1640 por 2 veces. Luego se procedió a activar las oncosferas con Fluido Intestinal Artificial que contenía 1% de pancreatina, 1% de bilis de cerdos y 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en medio RPMI-1640 a pH 8.04 por 1 hora a 37°C.

Todo el material que se usó tanto para la obtención y activación de oncosfera de *T. solium* fueron colocados en una jarra con lejía al 10% por 24 horas con el fin de matar los huevos/oncosfera (61). Durante todo el procedimiento se usó guantes, mascarillas, gorros y pipetas exclusivas para este procedimiento.

#### **4.2.2 Infección intracraneal de ratas**

Se usó 250 ratas de las cuales 212 ratas Holtzman fueron inoculadas intracraneal con oncosferas activadas de *T. solium* y 38 ratas control con solución salina.

El procedimiento de inoculación fue el siguiente, las ratas de 10-14 días de edad fueron infectadas con 120 oncosfera activadas de *T. solium* en 50µl de solución salina, para la inoculación cerebral intraparenquimal se usó jeringas para tuberculina con una profundidad de 4mm, se tomó como sitio de referencia el bregma (28); a las ratas controles se les inoculó 50ul de solución salina. Los animales fueron alimentados *ad libitum*. Por otro lado, *Verástegui et al.* (36) reportó que el porcentaje de efectividad de infección para el modelo animal en ratas para la NCC es de aproximadamente 80%.

#### **4.2.3 Perfusión transcardíaca y sacrificio de animales**

Para el sacrificio, se realizó teniendo en cuenta los meses post-infección; obteniendo 10 grupos: un mes, un mes y medio, dos meses, dos meses y medio, tres meses, cuatro meses, seis meses, ocho meses, diez meses y doce MPI, también denominados como 1m, 1.5m, 2m, 2.5m, 3m, 4m, 6m, 8m, 10m y 12m post-infección. Los animales fueron anestesiados con ketamina (100mg/kg, intraperitoneal, IP) y xilacina (10mg/kg, IP), una vez anestesiados completamente se procedió a realizar la perfusión por medio de la aorta ascendente primero con buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.3 con aproximadamente 210ml y luego con paraformaldehido al 4% (140ml aproximadamente). Se procedió a extraer el cerebro del cráneo, el cual fue posteriormente fijado toda la noche en paraformaldehido al 4% (62). Luego de la fijación, se procedió a deshidratar los cerebros en una batería ascendente de alcohol de

70°, 90°, 95° hasta el alcohol absoluto; luego se pasó por la batería de xilol y finalmente fueron incluidos en parafina. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 3-5µm con un micrótomo LEICA.

Para los cerebros de los grupos de un mes y un mes y medio post-infección los quistes fueron identificados con la tinción H&E, debido al tamaño de los quistes (aproximadamente entre 100 a 800µm). A partir de los dos meses y medio la identificación de los quiste en cerebro fue macroscópica, es decir se observa los quistes en los cerebros incluidos en parafina (10).

#### **4.2.4 Score de Inflamación - Tinción hematoxilina & eosina (H&E)**

La tinción H&E permitió visualizar la alteración en la arquitectura del tejido cerebral; además, la viabilidad y ubicación de los quistes (parénquima (P), meninge (M) y ventrículo (V)) y el tipo de infiltrado celular.

Se analizó el tipo de infiltrado celular utilizando el siguiente score de inflamación (SI):

- **Score de Inflamación 0 (SI-0):** infiltrado inflamatorio mínimo (linfocitos y heterófilos (eosinófilos y neutrófilos)) (< 25 células inflamatorias/campo a 40x)
- **Score de Inflamación 1 (SI-1):** infiltrado inflamatorio de moderado a severo (linfocitos y heterófilos (eosinófilos y neutrófilos)) (>25 células inflamatorias/campo a 40x).
- **Score de Inflamación 2 (SI-2):** presencia de macrófagos organizados en empalizadas sin la formación de fibrosis; además, no se observa granuloma ni células gigantes multinucleadas.

- **Score de Inflamación 3 (SI-3):** presencia de macrófagos organizados en empalizadas con la formación de fibrosis; además no se observa granuloma ni células gigantes multinucleadas.
- **Score de Inflamación 4 (SI-4):** presencia de granuloma y/o de células gigantes multinucleada.

Para la tinción de H&E, las láminas en parafina fueron calentadas en estufa a 60°C. Luego se procedió a desparafinar en una batería de Xilol (I y II por 3 minutos cada uno) y una batería decreciente de alcoholes (100%, 96%, 90% y 80% por 3 minutos cada uno). Posteriormente las láminas fueron sumergidas en hematoxilina por 1 minuto e inmediatamente en agua corriente por 2 minutos. Se pasó por baño maría a 37°C por 2 minutos. Para la diferenciación se dejó 1 minuto en alcohol de 80% e inmediatamente se pasó por eosina por 30 segundos. Posteriormente por los alcoholes de 95% y 90% y xilol por 1 minuto cada uno. Finalmente se montó las láminas con entellan (Anexo 1).

#### **4.2.5 Tinción de rojo de picrosirius (RP)**

Mediante esta tinción (Rojo de Picrosirius – RP) es posible diferenciar el tipo de fibras de colágeno pudiendo ser del tipo I (rojo/amarillo) y III (verde). Para este procedimiento se siguió el protocolo sugerido por el kit cat# 24901. Las láminas en parafina fueron calentadas en estufa a 60°C. Luego se procedió a desparafinar en una batería de Xilol (I y II por 3 minutos cada uno) y una batería decreciente de alcoholes (100%, 96%, 90% y 80% por 3 minutos cada uno). Se mezcló la solución A y solución

B de la Hematoxilina de Weigert en partes iguales; se incubó la mezcla por 8 minutos. Luego se lavó con agua destilada y posteriormente se colocó la solución A (Ácido fosfomolibdico) por 2 minutos. Se continuó lavando con agua destilada por 5 minutos. Se agregó la solución B (Picrosirius red F3BA) por 60 minutos. Se decantó el contenido sin lavar. Se agregó la solución C (N- Hidroclorhidrico) por 2 minutos. Luego se agregó etanol 70% por 45 segundos. Además, se deshidrató las láminas con tejido en un batería de alcohol creciente (70%, 90%, 96%, 100%) por 20 segundos cada uno y finalmente por xilol por 2 minutos para ser montado con entellan (anexo 2). Se usó esta tinción de rojo de picrosirius para identificar el tipo de colágeno presente alrededor del quiste, se usó microscopio óptico de luz polarizada para la identificación del tipo de colágeno.

#### **4.2.6 Inmunohistoquímica**

Se realizó la inmunohistoquímica en láminas incluidas en parafina para los biomarcadores de CD68 y GFAP (anexo 3). Las láminas se pusieron en estufa a 60°C y posteriormente fueron desparafinadas (como se mencionó para la tinción H&E y RP). Se realizó el desenmascaramiento de epítomos con buffer citrato pH 6 para cada biomarcador, luego las láminas fueron lavadas 3 veces con PBS pH 7.3. Se procedió al bloqueo de peroxidasas endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Se lavó nuevamente con PBS pH 7.3, se agregó el bloqueo de proteínas por 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente y se incubó toda la noche a 4°C con el respectivo anticuerpo primario para cada marcador (IgG de ratón anti-CD68 e IgG de conejo anti-GFAP). Posteriormente se lavaron las láminas para agregar el anticuerpo secundario conjugado con HRP y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se continuó

con los lavados para luego agregar la solución de revelado (DAB-DAKO), contra teñidas con hematoxilina y montadas con entellan (anexo 4 y 5).

#### **4.2.7 Inmunofluorescencia indirecta – doble marcaje**

Se realizó la inmunofluorescencia indirecta de doble marcaje en láminas en parafina para los biomarcadores de CD68 y GFAP. Se realizó el desenmascaramiento de epítomos con buffer citrato 10mM a pH 6 por 30 minutos. Posteriormente se incubó con sueros durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS pH 7.3 y se agregó la mezcla de los anticuerpos primarios para CD68 y GFAP (IgG de ratón anti-CD68 e IgG de conejo anti-GFAP, respectivamente, anexo 3) y se incubó toda la noche a 4°C. Luego se procedió a lavar con PBS y se incubaron las láminas con la mezcla del anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa flúor 594 e IgG de burro anti-IgG de conejo marcado con Alexa flúor 488, anexo 3) por unos 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavó cuidadosamente y se montó las láminas con DAPI (anexo 6). Se realizó la inmunofluorescencia de doble marcaje para determinar cómo es la distribución de células gliales de las microglías/macrófagos y astrocitos alrededor del quiste.

#### **4.2.8 Procesamiento y análisis de imágenes**

Las imágenes para microglías/macrófagos (microglías reactivo positivo - CD68) y astrocitos (astrocitos reactivos positivos – GFAP) fueron adquiridas usando el microscopio Zeiss Axio Lab, con la cámara Basler acA2040 y el software manualWSI, las adquisiciones de las imágenes fueron a 40x. En el caso de los tejidos de cerebros infectados se tomaron las fotos alrededor de los quistes, hasta una distancia de 300µm.

En el caso de los tejidos de cerebros sanos (controles) se tomaron las fotos en regiones semejantes a la ubicación donde se encontraron localizados los quistes en cerebros infectados (abarcando un tamaño y ubicación similar a los ocupados en el cerebro con quistes).

Para el procesamiento y análisis de las imágenes para microglías – CD68 y astrocitos – GFAP se usó el software ImageJv1.47t. Este software tiene la opción de deconvolución de color, que nos permitió obtener tres tipos de imágenes; la imagen de color marrón correspondiente al DAB, morado a la hematoxilina y el gris, color de fondo de la toda la imagen. Las imágenes de color marrón fueron convertidas a sistema binario. En este punto escogemos el mejor punto de reactividad y se usa el mismo para todas las láminas. Por último, se obtuvo la medición del porcentaje de área inmunorreactiva, esta área inmunorreactiva representa el porcentaje de área en base a pixeles del color negro por área total de la imagen.



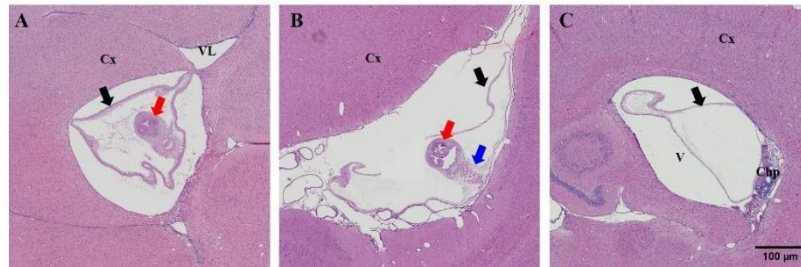
## V RESULTADOS

### 5.1 Descripción de la muestra

Para este estudio se sacrificaron 250 animales, 212 fueron inoculadas intracraneal con oncosfera de *T. solium* y 38 cerebros inoculados con solución salina (controles). De los 212 animales infectados se obtuvo 170 cerebros con quistes (1 a 3 quistes viables) (tabla 1) (teniendo una efectividad de infección de aproximadamente el 80%). De los 170 cerebros de ratas infectadas, se identificó un total de 289 quistes viables, de los cuales 172 fueron quistes parenquimales (P), 65 quistes meningeales (M) y 52 quistes ventriculares (V) (tabla 1, fig. 1).

**Tabla 1. Distribución de la localización de quistes de *Taenia solium* en cerebro de ratas en los diferentes tiempos post-infección**

Grupo post-infección (meses)	Total #cerebros controles	Parenquimal #cerebros infectados (# quistes)	Meningeal #cerebros infectados (#quistes)	Ventricular #cerebros infectados (#quistes)	Total #cerebros infectados (#quistes)
1 mes	4	13 (20)	5 (5)	3 (3)	17 (28)
1.5 meses	4	7 (9)	6 (6)	4 (4)	12 (19)
2 meses	4	13 (18)	5 (5)	5 (5)	17 (28)
2.5 meses	4	14 (27)	7(7)	6 (7)	20 (41)
3 meses	3	9 (14)	8 (8)	8 (9)	20 (31)
4 meses	4	11 (16)	4 (4)	7 (7)	17 (27)
6 meses	4	12 (24)	6 (6)	2 (4)	20 (34)
8 meses	3	7 (14)	7 (7)	4 (5)	15 (26)
10 meses	4	6 (10)	7 (8)	2 (2)	12 (20)
12 meses	4	11 (20)	9 (9)	5 (6)	20 (35)
	<b>38</b>	<b>(172)</b>	<b>(65)</b>	<b>(52)</b>	<b>170 (289)</b>



**Figura 1. Ubicación del cisticerco en cerebros de ratas mediante Hematoxilina & Eosina (H&E).** A. Quiste parenquimal ubicado en corteza (2.5 MPI). B. Quiste meningeal con compresión en la corteza (3 MPI). C. Quiste ventricular ubicado en el ventrículo lateral (4 MPI). *Flecha negra: señala el tegumento íntegro del quiste, flecha roja: señala ventosas-escólex y flecha azul: los canales espirales. cx: corteza, Chp: plexo coroideo, V: ventrículo, VL: ventrículo lateral. MPI: meses post-infección. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um.*

## 5.2 Infiltrado celular en cerebro de ratas en diferentes tiempos post-infección

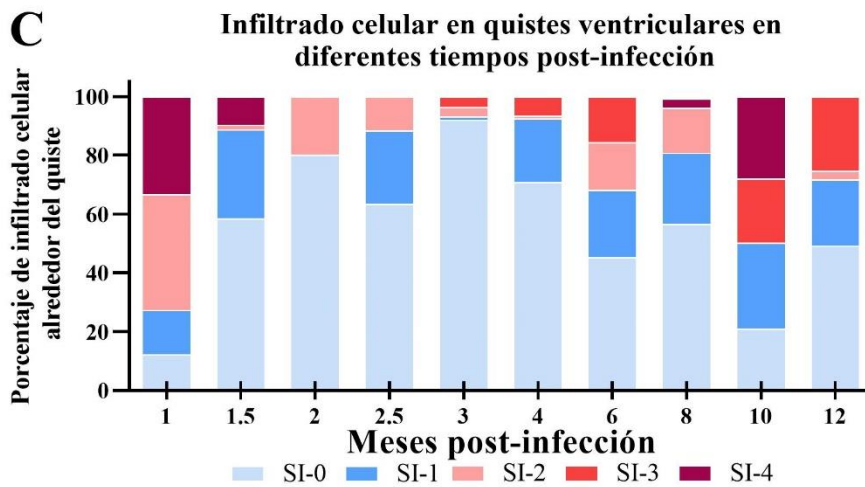
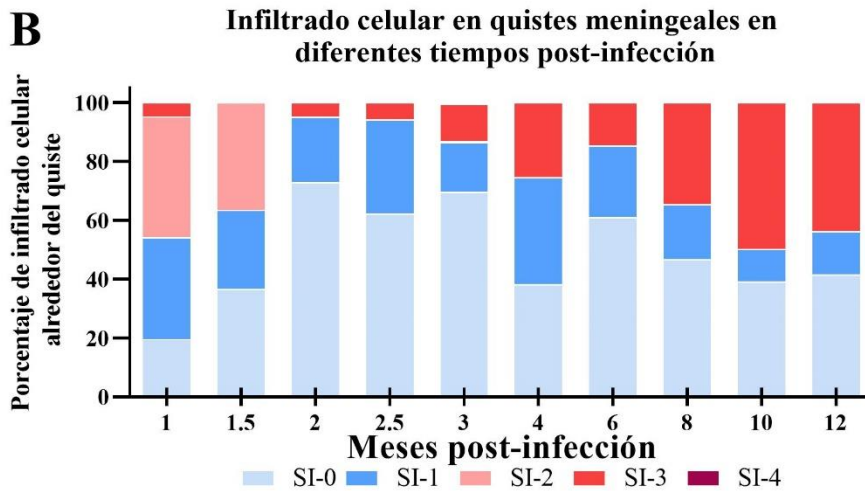
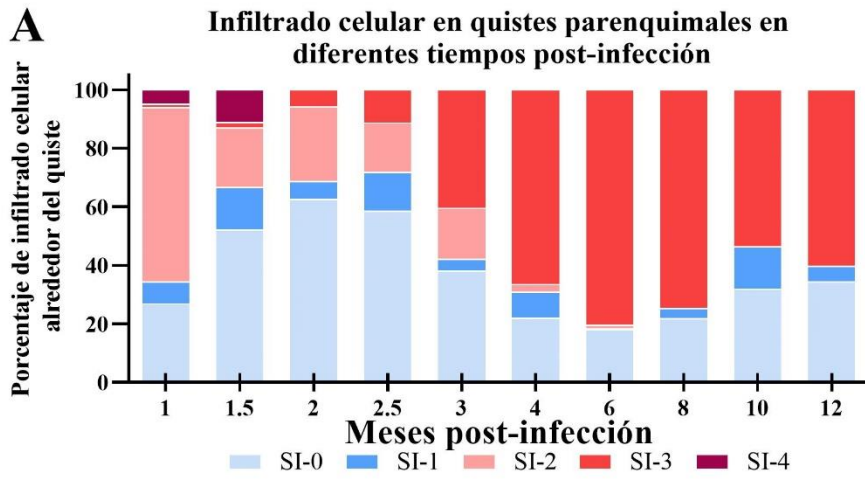
Según la ubicación del quiste en el cerebro, el infiltrado celular varía. En quistes parenquimales, se observó que al mes post-infección más del 60% del área alrededor del quiste presentó un score de inflamación-2 (SI-2), caracterizado por macrófagos organizados en empalizadas sin fibrosis (media  $\pm$  SEM;  $59.546 \pm 9.326$ ), a partir de este tiempo el porcentaje del SI-2 fue disminuyendo hasta el 1% a los seis meses post-infección (media  $\pm$  SEM;  $1.154 \pm 1.154$ ; fig. 2A y 4, anexo 7 y 12).

Sin embargo, el score de inflamación 3- (SI-3), caracterizado por la presencia de macrófagos en empalizadas con fibrosis fue incrementándose en el tiempo, observándose cerca del 40% del área alrededor del quiste a los 3 MPI (media  $\pm$  SEM;  $40.41 \pm 11.82$ ) y llegando hasta un 80% a los 6 MPI (media  $\pm$  SEM;  $80.420 \pm 5.928$ ) (fig. 2A y 4, anexo 7 y 13).

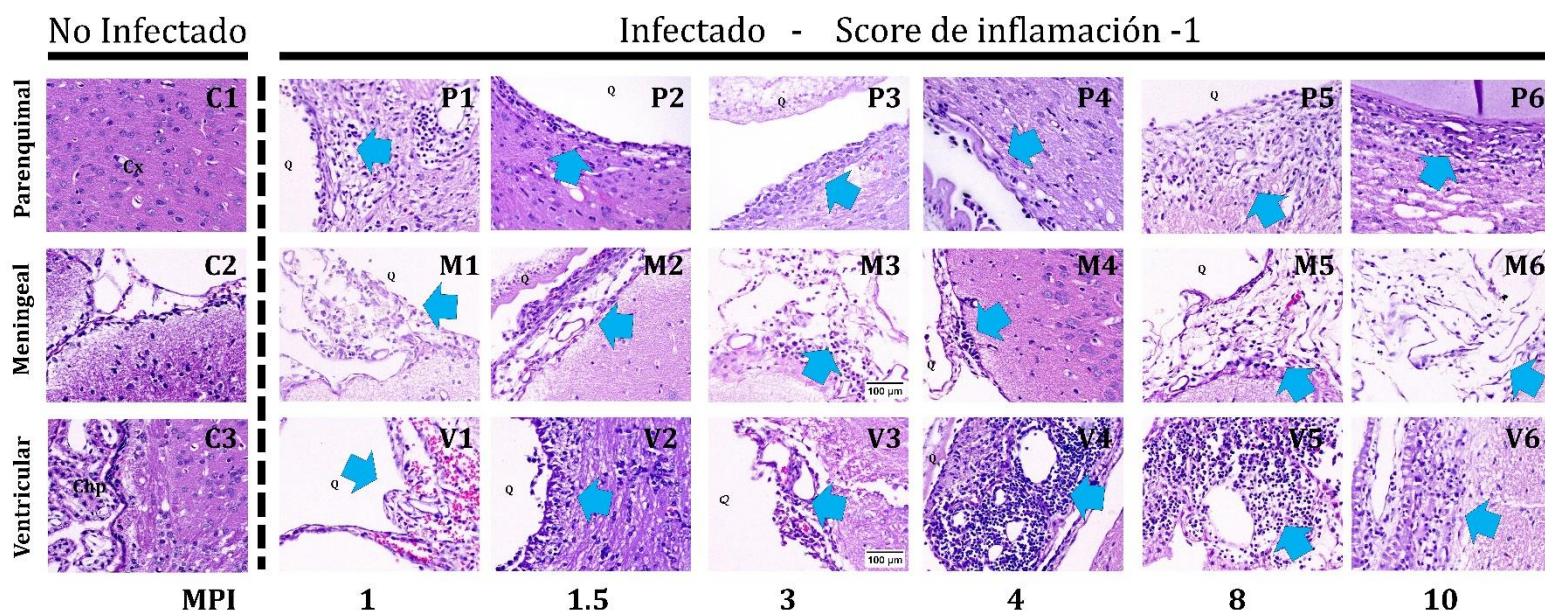
Cuando el quiste está localizado en las meninges se observa que al cuarto mes post-infección cerca al 36% del área alrededor del quiste presenta el score de inflamación 1 (SI-1), caracterizado por un infiltrado celular de moderado a severo (linfocitos y heterófilos (eosinófilos y neutrófilos) (media  $\pm$  SEM,  $36.4175 \pm 22.3478$ ) (fig. 2B y fig. 3, anexo 8 y 11). Así mismo, se ha observado en quistes meningeales un score de inflamación 3 (SI-3) desde los dos meses post-infección (media  $\pm$  SEM;  $4.852 \pm 4.852$ ), incrementándose en el tiempo y teniendo un máximo del 50% a los diez meses post-infección (media  $\pm$  SEM;  $49.84875 \pm 8.322524$ ) (fig. 2B, fig. 4, anexo 8 y 13).

En cerebros con quistes ventriculares, también se observó un infiltrado celular de moderado a severo entre el 20 a 30% alrededor del quiste (SI-1;) (fig. 2C, fig. 3, anexo 9 y 11). Además, la presencia de macrófagos empalizados sin fibrosis (SI-2) (fig. 2C, fig. 4, anexo 9 y 12) y con fibrosis (SI-3, solo algunos meses post-infección) (fig. 2C, anexo 9 y 13), están entre 5 a 10% alrededor de los quistes en los diferentes tiempos post-infección).

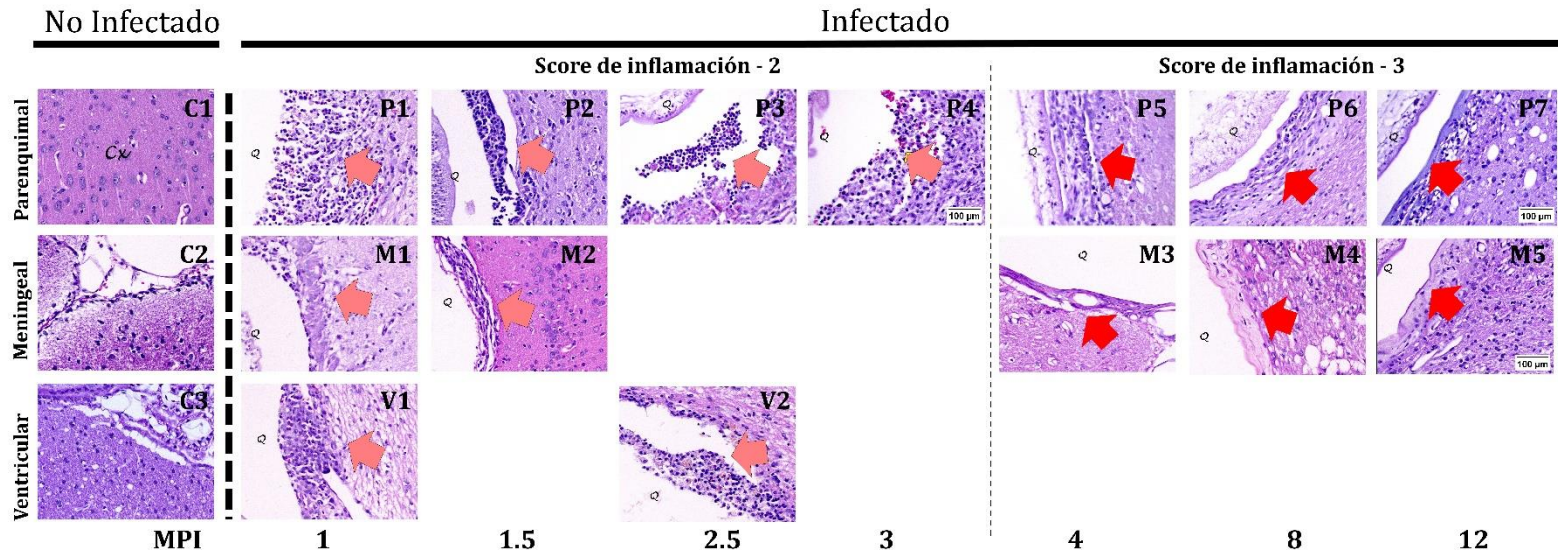
Del análisis del score de inflamación se observó que en quistes parenquimales, meningeales y ventriculares el score de mínimo infiltrado celular (SI-0) está entre el 30% al 80% del área alrededor del quiste en los diferentes tiempos post-infección (fig. 2, anexo 7, 8, 9 y 10). Así mismo, es importante mencionar que se encontró una población de macrófagos a lo largo del tiempo post-infección en las tres ubicaciones, pero cabe resaltar que desde los dos meses post-infección la población de macrófagos fue asociada a la presencia de fibrosis.



**Figura 2. Infiltrado celular alrededor del quiste según ubicación en los diferentes tiempos post-infección (1-12: meses post-infección).** A. Quiste parenquimal. B. Quiste meningeales. C. Quiste ventriculares. **SI-0** ( ■ ): infiltrado inflamatorio mínimo (linfocitos y heterófilos), **SI-1** ( ■ ): infiltrado inflamatorio de moderado a severo (linfocitos y heterófilos), **SI-2** ( ■ ): presencia de macrófagos organizados empalizados sin la formación de fibrosis, **SI-3** ( ■ ): presencia de macrófagos organizados empalizados con la formación de fibrosis, **SI-4** ( ■ ): presencia de granuloma y/o de células gigantes multinucleada.



**Figura 3. Infiltrado inflamatorio de moderado a severo - Score de inflamación (SI) – 1 en diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección).** Quistes parenquimales: P1 a P6, quistes meningeales: M1-M6 y quistes ventriculares: V1-V6. MPI: meses post-infección, C1-C3: controles – no infectados. Flecha azul: señalando el infiltrado celular con SI-1. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um.



**Figura 4. Infiltrado inflamatorio con presencia de macrófagos organizados en empalizadas sin formación de fibrosis (SI-2) y con formación de fibrosis (SI-3) en diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección). Quistes parenquimales (P1-P7): P1 - P4 con SI-2 y P5 - P7 con SI-3. Quiste meningeales (M1-M5): M1- M2 con SI-2 y M3 - M5 con SI-3. Quistes ventriculares (V1-V2): V1 a V2 con SI-2. C1-C3: controles – no infectados. Flecha palo rosa: señalando el infiltrado celular con SI-2 y flechas rojas: señalando el infiltrado celular con SI-3. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um.**

De estos resultados podemos concluir que la presencia de macrófagos empalizados con fibrosis (SI-3, barra roja) en quistes parenquimales (de 40 hasta un 80% alrededor del quiste, fig. 2A, fig. 4, anexo 7 y 13) es mayor en comparación a los quistes meningeales (del 10 - 50% alrededor del quiste, fig. 2B, fig. 4, anexo 8 y 13) y ventriculares (del 5 a 10% alrededor del quiste) (fig. 2C, anexo 9 y 13). Por otro lado, una característica resaltante de los quistes meningeales y ventriculares es la presencia un mayor porcentaje del score de inflamación del tipo de infiltrado celular de moderado a severo (SI-1) (30% alrededor del quiste en los diferentes tiempos post-infección) (fig. 2B y 2C, fig. 3) en comparación a los quistes parenquimales (10% en los diferentes tiempos post-infección) (fig. 2A y 3).

### **5.3 Evaluación de la fibrosis y el tipo de colágeno presente en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección**

La tinción roja de picosirius (RP) permite observar el tipo de colágeno presente en la fibrosis; esta tinción puede diferenciar colágeno tipo I (color rojo/amarillo) y/o tipo III (color verde). Mediante esta coloración y observado en un microscopio óptico con luz visible (M.O.L.V) se pudo determinar que los quistes parenquimales, meningeales y ventriculares presentan fibrosis alrededor del quiste a partir de los dos meses post-infección (figura 5, anexo 14).

Además, como se observa en la figura 5 y anexo 14 (microscopio óptico con luz visible-M.O.L.V) para quistes parenquimales, la presencia de tejido fibrótico se empieza a evidenciar a los dos meses post-infección y conforme avanza el tiempo post-infección

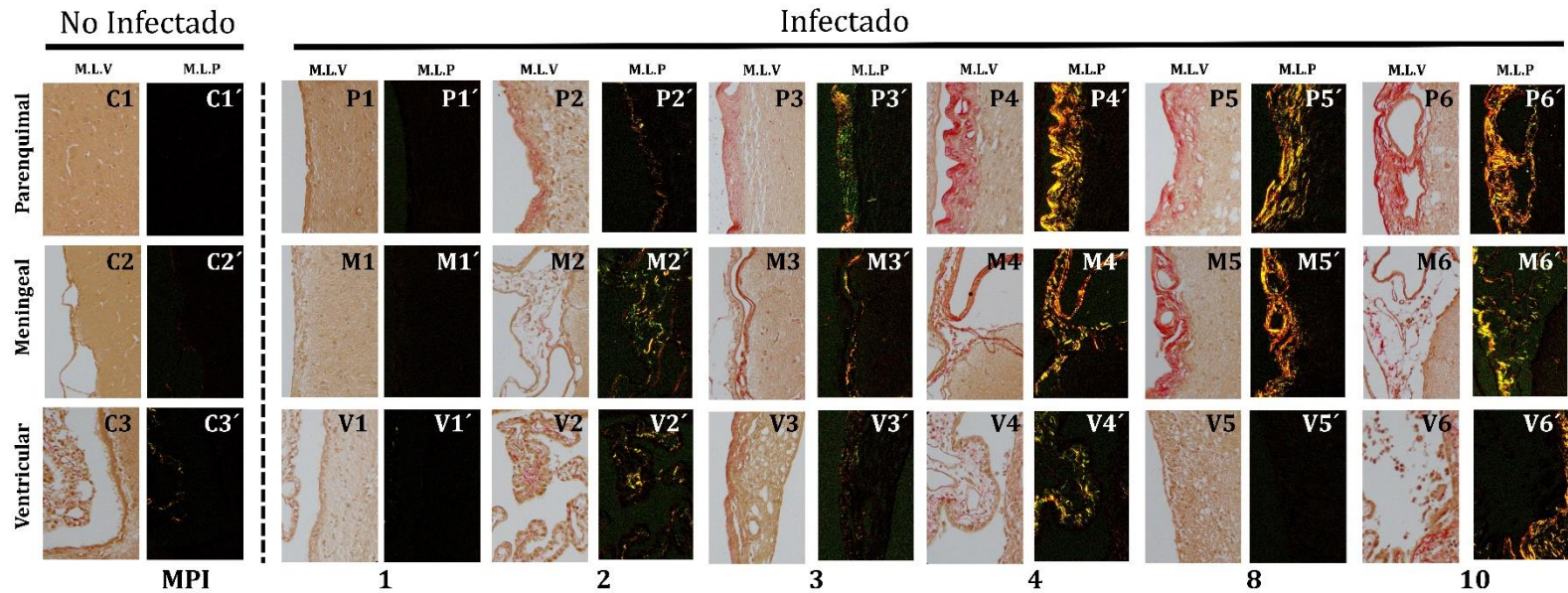
esta fibrosis se observa más gruesa y compacta (color rojo – microscopio en luz visible).

Así mismo, usando el microscopio con luz polarizada (M.O.L.P) se determinó el tipo de colágeno presente en la fibrosis, como se observa en la figura 5P2'-P3', cerebros con quistes parenquimales de dos meses a tres meses post-infección el tipo de colágeno que predomina en el tejido fibrótico es el III, el cual se caracteriza por ser una fibrosis menos compacta. Por otro lado, conforme avanza el tiempo post-infección se va observando con mayor predominancia la presencia del colágeno tipo I (cerca del 90% de color rojo/amarillo), y mucho más compacta (fig. 5P4'-P6' y anexo 14).

En el caso de los quistes meningeales existe fibrosis, pero con un ligero menor porcentaje en comparación a los quistes parenquimales (quistes parenquimales (fig. 5P2'-P6'), datos coherentes con los encontrados en las tinciones de H&E, fig. 4). Observándose la presencia de una fibrosis con ambos tipos de colágeno (I y III), pero con predominancia del tipo I desde los cuatro MPI. En quistes ventriculares el tejido fibrótico solo se vio en algunos grupos post-infección (M.O.L.V. – M.O.L.P), presentando escasa fibrosis y siendo predominante el tipo III desde dos meses a cuatro meses post-infección y tipo I desde los seis a doce meses post-infección (M.O.L.P.). Por otro lado, en el grupo control para quistes meningeales y ventriculares se observó escasa cantidad (normal) de colágeno en las meninges y el plexo coroideo, respectivamente (fig. 5C1-C3) – no infectado - control). Además, no se evidenció inflamación en dichas muestras control.



Finalmente, estos resultados refuerzan los datos obtenidos de las lecturas de la tinción H&E, donde se indicó que la formación de fibrosis en quistes parenquimales, meningeales y ventriculares comienza a los dos meses post-infección. Así mismo, el tipo de colágeno varía en los diferentes tiempos post-infección.



**Figura 5. Fibrosis y tipo de colágeno presente en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección). Quistes parenquimales:** quistes de un mes post-infección sin fibrosis (P1 y P1'); quistes de dos a tres meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo III (P2'- P3' -M.L. P); quistes de cuatro a doce meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo I (P4'-P6' - M.L.P). **Quistes meningeales:** quistes de un mes post-infección sin fibrosis M1-M1'; quistes de dos a tres meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo III (M2'- M3' - M.L.P); quistes de cuatro a doce meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo I (M4'-M6' - M.L.P). **Quistes ventriculares:** quistes de un mes post-infección sin fibrosis (V1-V1'); quistes de dos a cuatro meses post-infección con fibrosis y colágeno tipo I y con predominante del tipo III (V2'- V4' - M.L.P); quistes de seis a doce meses post-infección con fibrosis y colágeno del tipo I (V5'-V6' - M.L.P). *M.L.V (microscopio óptico de luz visible), M.L.P (microscopio óptico de luz polarizada), fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 40um.*

## **5.4 Evaluación de la inmunorreactividad y distribución de microglías/macrófagos y astrocitos en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección**

### **5.4.1 Inmunorreactividad de microglías y astrocitos en NCC**

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratas para evaluar la inmunorreactividad y distribución de microglías/macrófagos (reactivos a CD68) y astrocitos (reactivos a GFAP).

Se encontró que los cerebros controles para todos los grupos de análisis desde un mes hasta los doce meses post-infección, presentaron escasa o nula inmunorreactividad positiva a CD68 en comparación a los cerebros de ratas infectadas (rangos de medias: 0.02-0.075) (fig. 6A, 7, 8, tabla 2, anexo 15). Así mismo, la inmunorreactividad positiva a GFAP fue baja en cerebros controles, teniendo una morfología astrocítica del tipo inactivo o de reposo en comparación a los cerebros de ratas infectadas (rangos de medias: 2.07-4.03) (fig. 6B, 7, 8, tabla 3, anexo 16).

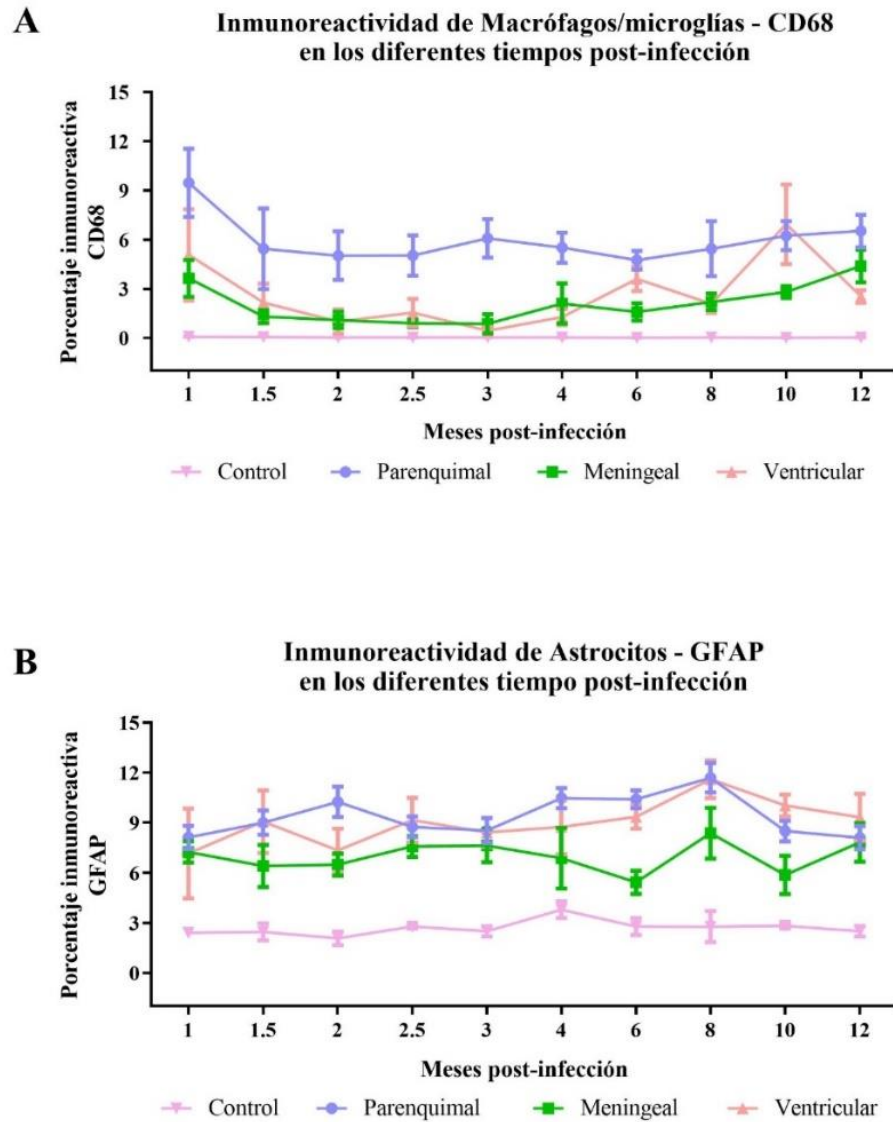
Para microglías/macrófagos (CD68) se encontró diferencias significativas en todos los grupos post-infección al comparar cerebros infectados de quistes parenquimales versus el grupo control (tabla 2). Sin embargo, en quistes meningeales y ventriculares versus el grupo control solo se encontró diferencias significativas para algunos meses post-infección (tabla 2).

Por otro lado, al comparar entre quistes parenquimales en los diferentes tiempos post-infección, no se encontró diferencias significativas. Pero es importante resaltar que a un mes post-infección la inmunorreactividad a CD68 es alta en comparación a los otros

tiempos post-infección (fig. 6A). Por otro lado, entre quistes meningeales y ventriculares se encontraron diferencias significativas para algunos grupos post-infección (entre meningeales: grupos de doce meses con dos meses y medio y tres meses post-infección; entre ventriculares: tres meses con un mes, seis, diez y doce meses post-infección) (fig. 8, tabla 2).

Por otra parte, se observó que existe mayor inmunorreactividad a CD68 en los quistes parenquimales de 6 a 9% del área inmunorreactiva (rangos de medias: 4.75-9.47) en comparación con los localizados en meninges y ventrículo que se encuentra entre 2 a 5% del área inmunorreactiva (rangos de medias para meningeales (0.87-4.40) y ventrículos (0.44 -6.94)) (fig. 6A, 7, y 8, tabla 2).

Con respecto a la inmunorreactividad para astrocitos (GFAP) se encontró diferencias significativas en GFAP al comparar quistes ubicados en parénquima, meninges y ventrículo con el grupo control (tabla 3). Además, se observó que, al comparar entre una misma ubicación, la inmunorreactividad es casi constante a lo largo del tiempo post-infección (de 6 a 9% del área inmunorreactiva) (no encontrándose diferencias significativas dentro de una misma ubicación) (fig. 6B, tabla 3).



**Figura 6. Inmunorreactividad de microglías/macrófagos (CD68) y astrocitos (GFAP) en cerebros de ratas con Neurocisticercosis en diferentes tiempos post-infección. A. Reactividad para microglías – CD68. B. Reactividad para astrocitos – GFAP. P: parenquimal ( ● ), M: meningeal ( ■ ), V: ventricular ( ▲ ) y Control ( ▼ ).**

**Tabla 2. Inmunorreactividad de Microglías/ Macrófagos -CD68 en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección según la ubicación**

Comparación de la expresión de la media del porcentaje de área inmunoreactiva de Microglías/macrófagos-CD68 en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección según ubicación																
Grupo (Meses)	Controles				Porcentaje de área inmunoreactiva de CD68 alrededor del quiste											
	Control	±	SEM	#Cerebros (#secciones)	Parenquimal	±	SEM	#Cerebros (#quistes)	Meningeal	±	SEM	#Cerebros (#quistes)	Ventricular	±	SEM	#Cerebros (#quistes)
1 mes	0.075 <sup>a1</sup>	±	0.019	4 (16)	9.470 <sup>a2</sup>	±	2.074	13 (20)	3.642 <sup>ac12</sup>	±	1.124	5(5)	5.07 <sup>a12</sup>	±	2.784	3(3)
1.5 meses	0.068 <sup>a1</sup>	±	0.045	4 (16)	5.443 <sup>a2</sup>	±	2.467	7 (9)	1.308 <sup>ac3</sup>	±	0.390	6(6)	2.154 <sup>ab12</sup> <sub>3</sub>	±	1.165	4(4)
2 meses	0.03 <sup>a1</sup>	±	0.015	4 (16)	5.026 <sup>a2</sup>	±	1.481	13(18)	1.090 <sup>ac12</sup>	±	0.500	5(5)	1.002 <sup>ab12</sup>	±	0.724	5(5)
2.5 meses	0.033 <sup>a1</sup>	±	0.009	4 (16)	5.034 <sup>a2</sup>	±	1.226	14 (27)	0.894 <sup>ac3</sup>	±	0.241	7(7)	1.548 <sup>ab4</sup>	±	0.841	6(7)
3 meses	0.03 <sup>a1</sup>	±	0.015	3 (12)	6086 <sup>a2</sup>	±	1.173	9 (14)	0.873 <sup>a13</sup>	±	0.585	8(8)	0.443 <sup>b134</sup>	±	0.241	8(9)
4 meses	0.035 <sup>a1</sup>	±	0.019	4 (16)	5.517 <sup>a2</sup>	±	0.925	11 (16)	2.108 <sup>ac12</sup>	±	1.315	4(4)	1.283 <sup>ab13</sup>	±	0.500	7(7)
6 meses	0.025 <sup>a1</sup>	±	0.009	4 (16)	4.753 <sup>a2</sup>	±	0.565	12 (24)	1.595 <sup>ac13</sup>	±	0.527	6(6)	3.607 <sup>a124</sup>	±	0.745	2(4)
8 meses	0.033 <sup>a1</sup>	±	0.005	3 (12)	5.446 <sup>a2</sup>	±	1.677	7 (14)	2.202 <sup>ac3</sup>	±	0.504	7(7)	2.094 <sup>ab4</sup>	±	0.553	4(5)
10 meses	0.02 <sup>a1</sup>	±	0.01	4 (16)	6.243 <sup>a2</sup>	±	0.885	6 (10)	2.808 <sup>bc13</sup>	±	0.360	7(8)	6.94 <sup>a4</sup>	±	2.43	2(2)
12 meses	0.03 <sup>a1</sup>	±	0.009	4 (16)	6.532 <sup>a2</sup>	±	0.998	11 (20)	4.397 <sup>b2</sup>	±	1.003	9(9)	2.533 <sup>a3</sup>	±	0.394	5(6)

Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de una misma localización ( $p < 0,05$ ).

Números diferentes indican diferencias significativas entre ubicaciones (P, M, V y control), dentro del mismo grupo ( $p < 0,05$ ). (Test Kruskal-

Wallis-dunnstest

**Tabla 3. Inmunorreactividad de Astrocitos - GFAP en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección según la ubicación**

Comparación de la expresión de la media del porcentaje de área inmunoreactiva de Astrocitos en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección según ubicación																
Grupo (Meses)	Controles				Porcentaje de área inmunoreactiva de GFAP alrededor del quiste											
	Control	±	SEM	#Cerebros (#secciones)	Parenquimal	±	SEM	#Cerebros (#quistes)	Meningeal	±	SEM	#Cerebros (#quistes)	Ventricular	±	SEM	#Cerebros (#quistes)
1 mes	2.40 <sup>a1</sup>	±	0.319	4 (16)	8.12 <sup>a2</sup>	±	0.685	13 (20)	7.25 <sup>a2</sup>	±	0.651	5(5)	7.16 <sup>a12</sup>	±	2.688	3(3)
1.5 meses	2.46 <sup>a1</sup>	±	0.508	4 (16)	9.01 <sup>a23</sup>	±	0.017	7 (9)	6.41 <sup>a13</sup>	±	1.260	6(6)	9.07 <sup>a23</sup>	±	1.876	4(4)
2 meses	2.07 <sup>a1</sup>	±	0.404	4 (16)	10.25 <sup>a2</sup>	±	0.917	13(18)	6.49 <sup>a12</sup>	±	0.658	5(5)	1.00 <sup>a12</sup>	±	0.724	5(5)
2.5 meses	2.78 <sup>a1</sup>	±	0.101	4 (16)	8.75 <sup>a2</sup>	±	0.617	14 (27)	7.59 <sup>a2</sup>	±	0.622	7(7)	9.16 <sup>ab2</sup>	±	1.333	6(7)
3 meses	2.50 <sup>a1</sup>	±	0.303	3 (12)	8.54 <sup>a2</sup>	±	0.747	9 (14)	7.63 <sup>a2</sup>	±	0.999	8(8)	8.42 <sup>a2</sup>	±	0.867	8(9)
4 meses	3.79 <sup>a1</sup>	±	0.491	4 (16)	10.48 <sup>ab2</sup>	±	0.610	11 (16)	6.87 <sup>a12</sup>	±	1.804	4(4)	8.74 <sup>a12</sup>	±	1.621	7(7)
6 meses	2.78 <sup>a1</sup>	±	0.503	4 (16)	10.41 <sup>b2</sup>	±	0.539	12 (24)	5.425 <sup>a13</sup>	±	0.700	6(6)	9.35 <sup>a23</sup>	±	0.702	2(4)
8 meses	4.033 <sup>a1</sup>	±	1.500	3 (12)	11.70 <sup>b2</sup>	±	0.883	7 (14)	8.373 <sup>a13</sup>	±	1.527	7(7)	11.61 <sup>a23</sup>	±	1.129	4(5)
10 meses	2.82 <sup>a1</sup>	±	0.153	4 (16)	8.50 <sup>c23</sup>	±	0.620	6 (10)	5.87 <sup>a13</sup>	±	1.148	7(8)	10.03 <sup>a2</sup>	±	0.660	2(2)
12 meses	2.50 <sup>a1</sup>	±	0.309	4 (16)	8.10 <sup>c2</sup>	±	0.694	11 (20)	7.82 <sup>a2</sup>	±	1.157	9(9)	9.328 <sup>a2</sup>	±	1.400	5(6)

Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de una misma localización ( $p < 0,05$ ). Números diferentes indican diferencias significativas entre ubicaciones (P, M, V y control), dentro del mismo grupo ( $p < 0,05$ ). (Test Kruskal-Wallis-dunntest)

#### **5.4.2 Distribución de microglías/macrófagos y astrocitos alrededor del quiste en NCC**

Con respecto a la distribución de microglías/macrófagos y astrocitos en el tejido cerebral de ratas infectadas (P, M y V) se encontró una fuerte inmunorreactividad de CD68 alrededor y cerca del quiste; en algunos casos esta inmunorreactividad se observa focalizado en determinadas zonas del tejido que rodeo al quiste y asociado a la ubicación del escólex y en otros casos se observa esta inmunorreactividad distribuida de manera más homogénea alrededor de todo el tejido que borde el quiste (anexo 17). Esta distribución de microglías/macrófagos fue mejor diferenciada para quistes parenquimales en comparación a los quistes meningeales y ventriculares.

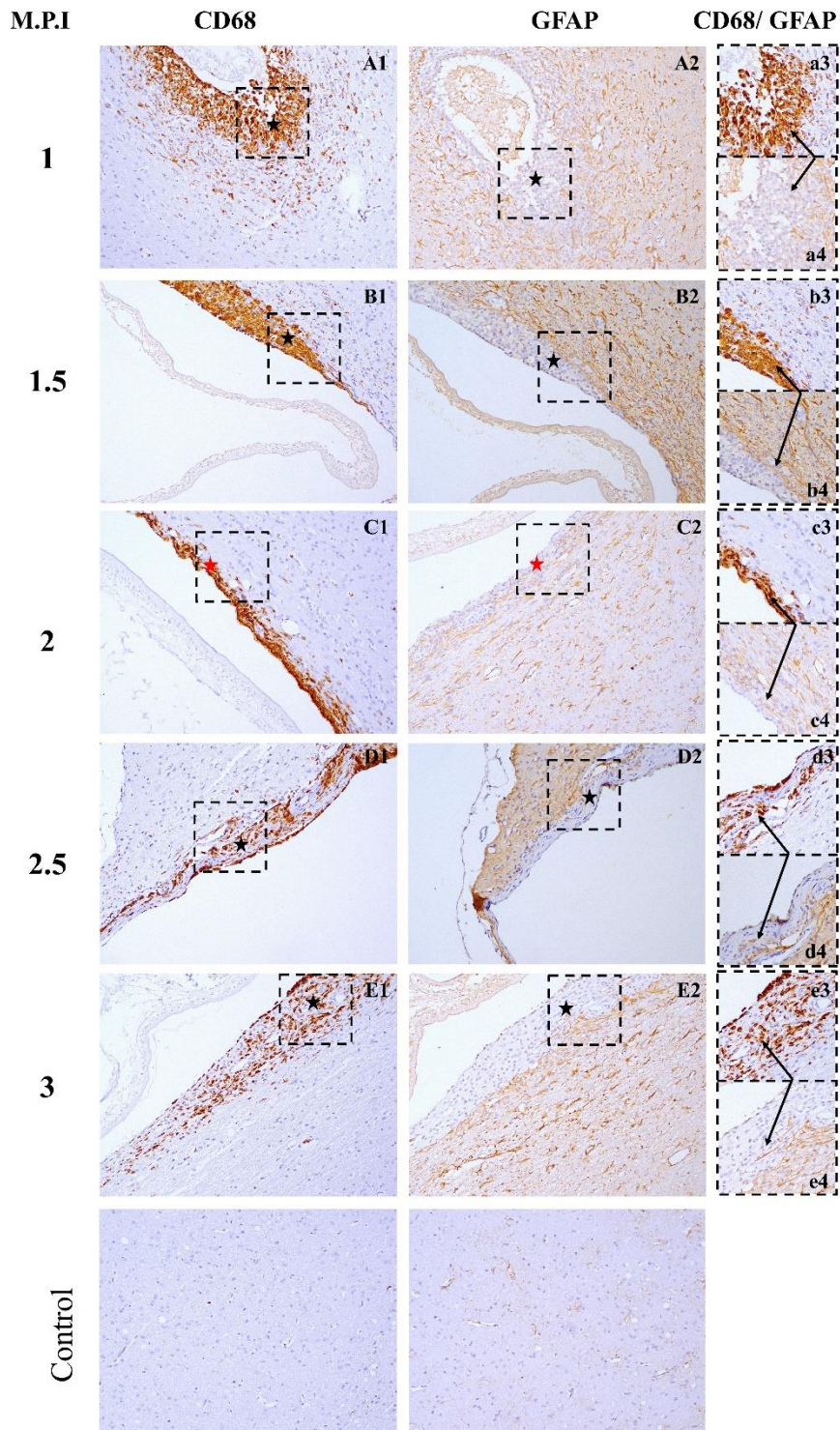
En quistes parenquimales las microglías/macrófagos inmunorreactivos a CD68 de un mes hasta los dos MPI se encuentran formando una capa de células microgliales que rodea el quiste (inmediatamente después del tegumento del parásito) (fig. 7 y 9), mientras que los astrocitos inmunorreactivos a GFAP se encuentran después de la capa de células de microglías/macrófagos - CD68 (fig. 7 y 9). Sin embargo, en aquellas zonas donde no hubo inmunorreactividad para CD68 (reactividad no focalizada), los astrocitos se encontraban próximo al quiste.

Por otro lado, se observó que en presencia del tejido fibróticos (desde los dos meses post-infección) las células inmunorreactivas a CD68 se encuentran en el tejido fibrótico que bordea el quiste, mientras que las células inmunorreactivas a GFAP se encuentran inmediatamente después de la capa del tejido fibrótico. Así mismo, se observó que algunas muestras después de los seis meses post-infección las células astrocíticas y



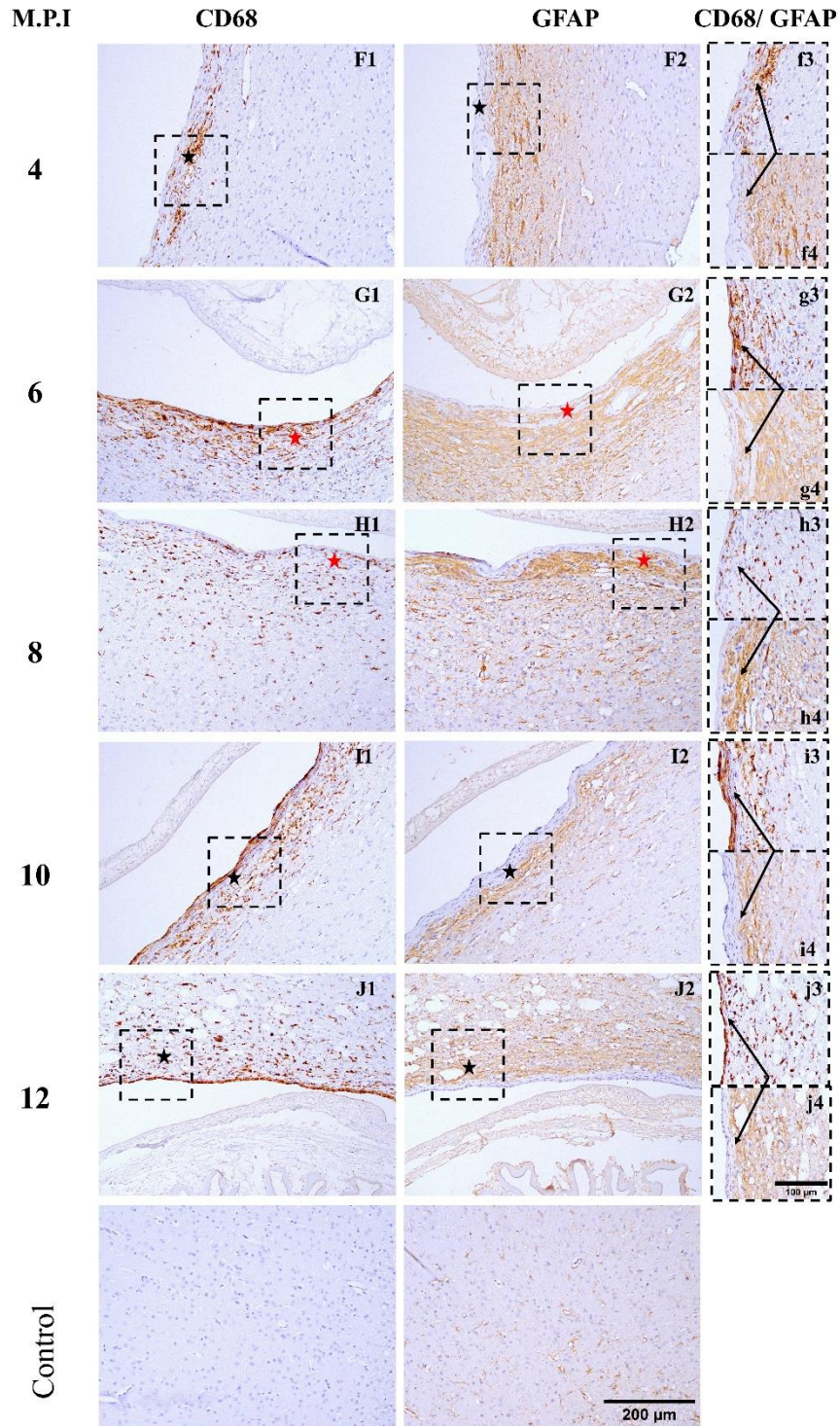
microglías pueden difundir en el tejido fibrótico alrededor del quiste, observándose que células microgliales se extienden (migran) hacia la región más distante del quiste, mientras que los astrocitos migran hacia el tejido fibrótico (fig. 9). De estos resultados, podemos concluir que la formación del tejido fibrótico influye en la distribución de las células gliales alrededor del quiste en los tiempos post-infección.

## INMUNOREACTIVIDAD DE MICROGLIAS/MACRÓFAGOS Y ASTROCITOS EN QUISTES PARENQUIMALES



).

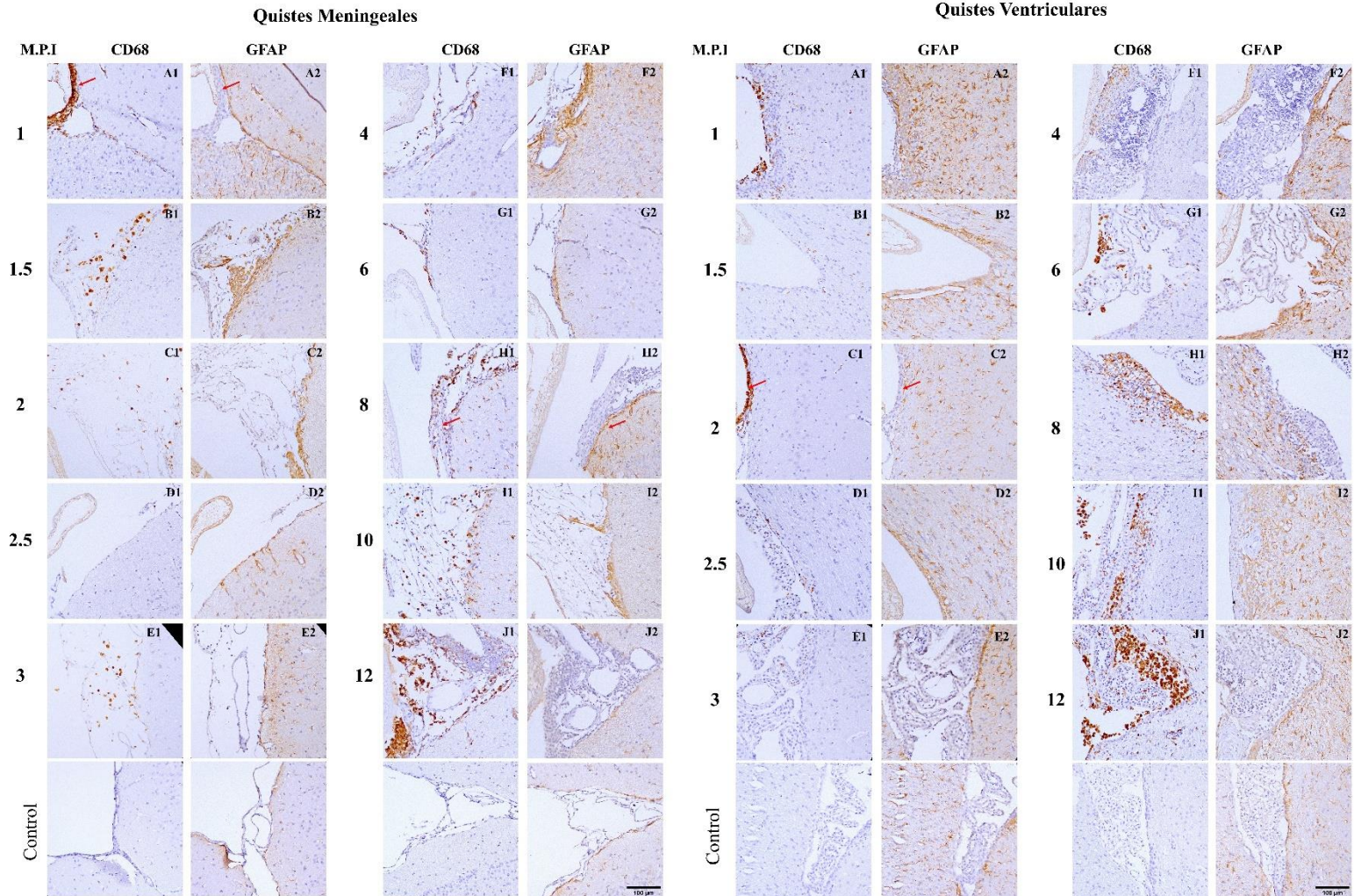
## INMUNOREACTIVIDAD DE MICROGLIAS/MACRÓFAGOS Y ASTROCITOS EN QUISTES PARENQUIMALES



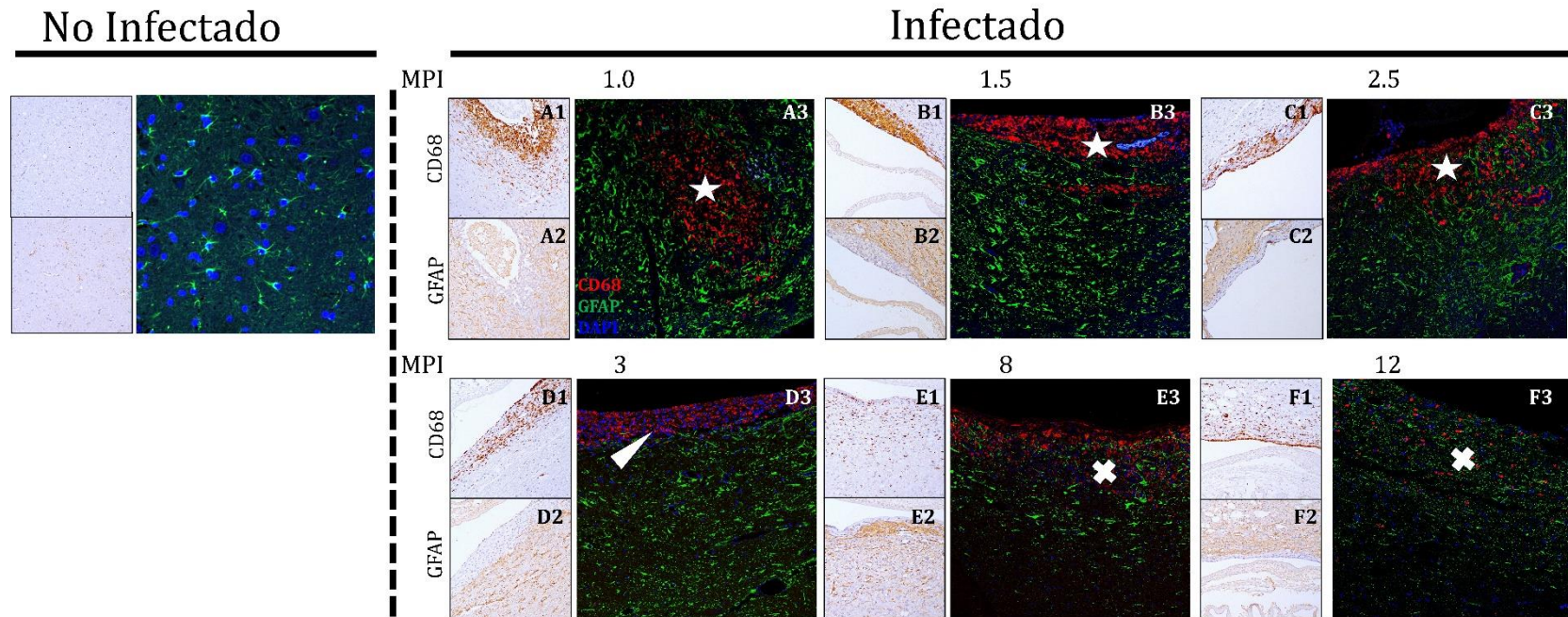
**Figura 7. Inmunorreactividad de microglías/macrófagos y astrocitos en quistes parenquimales.** El grupo control no mostró reactividad positiva a CD68, mientras que para GFAP mostraron reactividad positiva con forma estrellada. **Panel A, B, C.** Quistes de un mes, dos y dos meses y medio post-infección. A1, B1 y C1: Reactividad de las células de microglías (CD68), (A2, B2 y C2: la reactividad de los astrocitos (GFAP) fue inmediatamente después de la capa de células de microglías/macrófagos (estrella negra). **Panel D, E, y F.** Quistes de dos meses y medio, tres y cuatro meses post-infección. La reactividad de las microglías alrededor del quiste y co-localizando con la fibrosis (D1, E1 y F1), la reactividad de los astrocitos fue después de la capa de fibrosis (D2, E2, y F2). **Panel G, H, I y J.** Quistes de seis, ocho, diez y doce meses post-infección. La reactividad de microglías es más dispersa alrededor del quiste (G1, H1, I1 y J1). Astrocitos inmunorreactivos co-localizando en algunas zonas con la capa de microglías/fibrosis (estrella roja) y astrocitos no co-localizan con la fibrosis (**I2 y J2**). *a1-j1 y b1-j2: imagen ampliada. Estrella negra: capa delimitante entre células microgliales y astrocíticas. Estrella roja: no hay capa delimitante de microglías y astrocitos. fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 200um y 100um.*

**INMUNOREACTIVIDAD DE MICROGLIAS/MACRÓFAGOS  
Y ASTROCITOS**

**INMUNOREACTIVIDAD DE MICROGLIAS/MACRÓFAGOS Y  
ASTROCITOS**



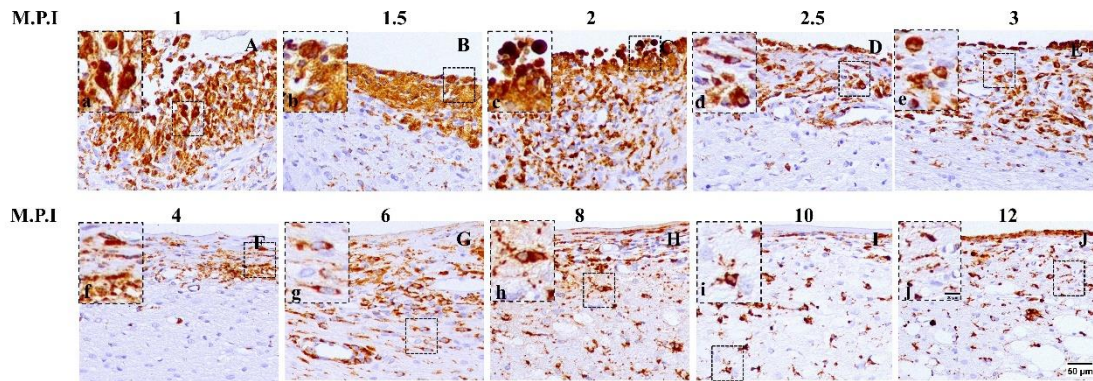
**Figura 8: Inmunorreactividad de microglías/macrófagos y astrocitos en quistes meningeales y ventriculares.** El grupo control en quistes meningeales y ventriculares para microglías (CD68) no mostró ninguna inmunorreactividad; en astrocitos (GFAP) la inmunorreactividad fue escasa y con morfología estrellada. **A1:** microglías con intensa reacción alrededor de quiste y **A2:** astrocitos con intensa reacción inmediatamente después de la capa de células de microglías/macrófagos (quistes meningeales (imagen izquierda) y ventriculares (imagen derecha)); **Panel B, C, D, E, F y G:** escasa reactividad a microglías y astrocitos alrededor del quiste meningeales y ventriculares. **Panel H, I y J** se observó un incremento de la reactividad para las microglías y astrocitos alrededor del quiste meningeales y ventriculares. *Panel A-J: quiste de un mes post-infección hasta los 12 meses post-infección. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um.*



**Figura 9. Distribución de microglías/macrófagos y astrocitos alrededor de quistes parenquimales en diferentes tiempos post-infección – Inmunofluorescencia doble marcaje. Panel A y B.** Quiste de un mes y mes y medio post-infección, microglías – CD68 (rojo) inmediatamente alrededor del quiste (estrella blanca), astrocitos – GFAP (verde) alrededor de las microglías. **Panel C.** Quiste de dos meses y medio post-infección, microglías (rojo) y astrocitos (verde) están alrededor del quiste; no se observa una marcada delimitante de células microglías como en A y B. **Panel D.** Quistes de tres MPI, presencia de microglías (rojo) en la fibrosis (capa de color azul, cabeza de flecha blanca), posterior a la fibrosis se encuentran los astrocitos (verde). **Panel E y F.** Quistes de ocho y doce MPI. Astrocitos y microglías se encuentra alrededor del quiste (cruz blanca). *MPI: meses post-infección. A1-F1: CD68 (inmunohistoquímica), A2-F2: GFAP (inmunohistoquímica), A3-F3: CD68 y GFAP (inmunofluorescencia). Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um*

Por otro lado, se observó que la morfología de las células microgliales/macrófagos de los quistes parenquimales varía en los diferentes tiempos post-infección. Las células inmunorreactivas a CD68 de los grupos de un mes hasta los dos meses post-infección presentan principalmente una morfología tipo ameboideo (fig.10 A-C). Mientras que quistes de dos meses a seis meses post-infección predomina la forma de varilla hipertróficas (fig. 10 D-F) y desde los ocho meses post-infección con la morfología tipo hipertrófica y distrófica desramificada en formas de cuencas (fig. 10 G-J).

**MORFOLOGÍA DE MICROGLÍAS/MACRÓFAGOS EN CEREBROS DE RATAS CON  
NEUROCISTICERCOSIS - QUISTES PARENQUIMALES**



**Figura 10. Morfología de microglías/macrófagos en quistes parenquimales en ratas con Neurocisticercosis (1-12 meses post-infección). A, B y C.** Quistes de un mes, un mes y medio y dos MPI: morfología ameboidea/fagocítica. **D, E y F.** Quistes de dos meses y medio, tres y cuatro MPI, con diversa morfología entre ellas del tipo ameboideo, hipertrófica ramificada y des ramificada (d – tipo hipertrófico, e – tipo ameboideo y f -hipertrófico (d, e y f imagen ampliada de D, E y F). **G, H e I.** Quistes de seis, ocho y diez MPI con morfología del tipo denominado como microglía distrófica desramificada con procesos hinchados. (g - tipo hipertrófico elongado, h – distrófico desramificado e i – hipertrófico (g, h e i imagen ampliada de G, H e I). **J.** Quiste de doce meses post-infección con morfología tipo cuencas, denominado como microglías distróficas, microglía pequeña y desramificada en mayor cantidad que I (i-tipo distrófico). MPI: meses post-infección. a, b, c, d, e, f, g, h, i y j imagen ampliada de A, B, C, D, E, F, G, H, I y J). Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 50um.



## VI DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó por primera vez la respuesta inflamatoria asociado a infiltrado celular, la formación de tejido fibrótico, la activación y distribución de células gliales en diferentes fases de desarrollo del metacestodo (quistes viables) de *T. solium* en el sistema nervioso central en un modelo de rata con NCC. Observándose que el tipo de infiltrado celular y macrófagos con y sin presencia de fibrosis y la activación y distribución de las células gliales es variable en el tejido que rodea al quiste. Esta respuesta variable está asociada con la localización del quiste y el tiempo post-infección.

En el presente estudio se encontró para quistes parenquimales en los primeros meses post-infección (un mes, un mes y medio y dos MPI) una población elevada de macrófagos con ausencia de fibrosis en el tejido que borde el quiste (alrededor del 40-80%). Sin embargo, a partir de los tres MPI la población de macrófagos se encuentra asociado a la presencia del tejido fibrótico (alrededor del 40-80%); igual que lo reportado por *Matos-Silva et al.*, quien también encuentra un infiltrado celular asociado a fibrosis (16,25,34). El hecho que *Álvarez, Matos-Silva et al.* no reporten macrófagos sin fibrosis se puede deber a que ellos evalúan la respuesta inflamatoria después de los tres meses de infección en animales/cerdos naturalmente infectados, que se asemejaría más a un tipo de respuesta inflamatoria tardía/crónica, y no a una respuesta inflamatoria aguda relacionada a la fase temprana de la infección. Dado que en los primeros meses post-infección no se observa fibrosis, pero si la presencia de macrófagos, podríamos plantear la hipótesis que esos macrófagos pertenecen al tipo M1 o llamado macrófagos

“activos clásicos”. Estos macrófagos, estarían asociados a una respuesta del tipo proinflamatoria por el tipo de respuesta e infiltrado celular sin fibrosis, semejante a lo reportado en estudios de enfermedades fibróticas en etapas tempranas de la enfermedad (45–47,63).

Por otro lado, alrededor de los quistes meningeales y ventriculares se observa un infiltrado celular de moderado a severo (alrededor del 30%); esto puede deberse a que las meninges son zonas altamente irrigadas por vasos sanguíneos y tienen una alta exposición al sistema inmune periférico (16). En quistes meningeales se ha reportado un elevado número de células tales como linfocitos B y T maduros, mastocitos, células polimorfonucleares y células plasmáticas, sugiriendo la exposición con el sistema periférico (8,16,18,19). A nivel ventricular, la exacerbada respuesta inflamatoria se debe a la presencia de vasos sanguíneos en los plexos coroideos (16,19,37,64–66).

En este estudio se ha evidenciado la presencia de tejido fibrótico, el cual se asocia al tipo de colágeno que está presente en el tejido (46,47). En este estudio la formación de fibrosis y el tipo de colágeno presente fue evaluado por tinción H&E y rojo picosirius (RP), observándose una capa de colágeno de color rojo/amarillo para el colágeno tipo I, mientras que el color verde para el colágeno tipo III (42). Nuestros resultados muestran que el tipo de colágeno que predomina en la fase tardía es del tipo I, el cual está asociado a procesos o patologías avanzadas en algunas enfermedades fibróticas y tumores sólidos (42,67).

La presencia de un tipo de colágeno en particular, podría estar contribuyendo con la patología en NCC y la relación con la presencia de convulsiones y/o crisis epilépticas en estos pacientes (8,16,67). En un estudio de *Christenses et al.* se encontró que en cerdos con NCC, el desarrollo de crisis epilépticas está asociado con la proporción de colágeno presentes en comparación a aquellos animales infectadas sin crisis epilépticas y en animales controles (67,68). Es por ello que es necesario llevar a cabo un estudio más detallado para dilucidar la importancia de la síntesis o regulación de moléculas que están relacionadas con la formación de colágeno, el tipo de macrófagos presentes y su relación con la presencia de crisis epilépticas en NCC.

Por otro lado, se observó que la distribución de células microglías/macrófagos, astrocitos y el tejido fibrótico es variado en los diferentes tiempos post-infección. Este es el primer estudio donde se demuestra que en los primeros meses post-infección existe una capa definida de células de microglías/macrófagos activados que rodea al quiste, e inmediatamente se encuentran las células astrocíticas activadas. Así mismo conforme avanza el tiempo post-infección se va formando y expandiendo el tejido fibrótico alrededor del quiste. Las microglías/macrófago se localizan en dicho tejido fibrótico, este hallazgo no ha sido reportado antes ya que los estudios han sido realizados después de los tres meses post-infección, tanto en estudios de infección experimental o infección natural en cerdos donde la fibrosis está presente. Después de dos meses post- infección se observa, adyacente el tejido fibrótico, la capa de células astrocíticas activadas (hipertróficos y dendritas elongadas - procesos astrocíticos), la cual ha sido reportada en otros estudios de NCC (16,17,22,25,29,34). Además, desde los seis meses post-infección se logra observar la migración de las células de

microglías/macrófagos hacia la capa astrocítica, y en algunos casos la migración de los astrocitos hacia la capa fibrótica. En este sentido, este estudio muestra por primera vez cómo se van localizando las células gliales a lo largo del tiempo en el tejido que rodea el parásito en el SNC. Cabe remarcar que en trabajos anteriores, el estudio de la distribución de las células gliales no ha sido llevado a cabo en etapas tempranas de la infección (29,69).

Estudios realizados en NCC y en otros tipos de lesiones a nivel del SNC, reportan que las microglías/macrófagos son las primeras células en activarse alrededor de una lesión y adyacente a dichas células microgliales se encuentran los astrocitos (70,71). Por ello, aunque existen otras células que participan en este proceso de cicatrización glial/fibrótica en el SNC, las microglías/macrófagos, astrocitos y componentes del tejido fibrótico como los fibroblastos son los principales tipos celulares que participan en dicha cicatrización (22,34,44).

Además, cabe resaltar que la inmunorreactividad para microglías/macrófagos (CD68) en el grupo de un mes post-infección fue aproximadamente el doble comparado a los otros tiempos post-infección (aunque no hubo diferencias estadísticas). Por otro lado, la morfología de estas células fue del tipo ameboideo. Este tipo de morfología ameboideo en la etapa temprana de la infección podría deberse a que se trata de microglías/macrófagos del tipo M1, que son característicos de una respuesta inmune frente a una lesión temprana o aguda (47,72). Así mismo se ha reportado tanto en modelos animales como en pacientes con patologías fibróticas como fibrosis pulmonar y la fibrosis hepática, que en etapas tardías el tipo de población de macrófagos sufre

un cambio hacia una población del tipo M2 o “activación alternativa”, donde el fenotipo de macrófagos/microglías M2 estaría asociado a la formación de fibrosis (45,46); en nuestro estudio observamos que a partir de los tres meses post-infección se va desarrollando el tejido fibrótico alrededor del quiste el cual co-localiza con las microglías/macrófagos; además, el tipo de morfología de estas microglías/macrófagos van cambiando desde una forma ameboidea hacia una forma tipo hipertrófica/distrófica ramificado y desramificado, típico de una activación alternativa o tipo M2 (45,73). Esta característica diferente al de los primeros meses post-infección podría deberse a que la población de macrófagos/microglías está cambiando morfológicamente en el tiempo en el cual predominan macrófagos/microglías del tipo M2 (12,31,65), el cual estaría relacionada a una respuesta tardía o crónica, la expresión de citoquinas tipo Th2 y su relación con la formación del tejido fibrótico (45,46).

Además, estudios realizados en muestras de individuos con NCC, modelos animales naturalmente infectados (cerdos infectados con cestodo de *T. solium*) y modelos animales infectados experimentalmente (murinos infectados con cestodo de *T. solium*, *T. crassiceps* o *Mesocestoide corti*), se observó una relación estrecha entre la formación del granuloma fibrótico y el tipo de respuesta inflamatoria (22,23,65). Por lo que, diversos estudios sugieren que el desarrollo de la fibrosis y la patología en NCC dependen del tipo de macrófago que predomine (M1 o M2) en la respuesta inmune (65,72,74). Por otro lado, estudios realizados en un modelo de NCC en porcino, reportan que el tipo de respuesta inflamatoria está muy relacionada a fibrosis (16,17,75), y esto podría deberse a que se está evaluando la respuesta inflamatoria en

una etapa tardía o crónica de infección, dado que son animales naturalmente infectados y no se conoce el tiempo exacto de infección (22).

Por otro parte, en estudios *in vitro*, se ha reportado que cultivos de células de macrófagos incubados con antígenos de helmintos (*H. polygyrus* y *Ascaris suum*), presentan una polarización de la población de macrófagos de M1 a M2, observándose un aumento en la expresión de arginasa-1 en macrófagos tipo M2, sugiriendo de esta manera su participación en la formación de fibrosis (72,76,77). Además, en un estudio preliminar realizado por nuestro grupo de investigación (datos no publicados), usando un modelo de ratas en NCC, se encontró que los niveles de TGF $\beta$ -1 en muestras de LCR en animales de cuatro meses post-infección se encuentran aumentados en comparación al grupo control sano. Así mismo, en un estudio publicado por *Carmen et al.*, encuentran un incremento de la expresión de mRNA de los marcadores relacionados a la formación de tejido fibrótico como TGF $\beta$ -1, COL1A1, COL3A1 y arginasa en el tejido que rodea el quiste, indicando un tipo de respuesta tipo Th2 (31,45,72). Estos estudios reforzarían nuestra hipótesis que en una etapa tardía post-infección, después de los tres meses, se observa una respuesta inflamatoria asociada al tipo de macrófago M2 y por lo tanto su participación a la formación de tejido fibrótico. Sin embargo, es necesario realizar estudios usando marcadores específicos para validar esta hipótesis.

Los estudios reportados en enfermedades fibróticas, muestran la gran importancia de los diferentes tipos de poblaciones de macrófagos en diferentes etapas de evolución de

la enfermedad (46). En estos estudios de enfermedades fibróticas al igual que el presente estudio de cinética de NCC, se observa que en los diferentes tiempos post-infección, una respuesta del tipo histiocítica, es decir con presencia de macrófagos. Concluyéndose que en NCC también la presencia de diferentes tipos de población de macrófagos podrían estar involucrada en el tipo de respuesta inflamatoria y formación de fibrosis, y de esta manera contribuyendo en la patología de NCC. Debido a ello, sería importante determinar qué tipo de macrófagos está presente tanto en la fase inicial y tardía de la infección.

En este estudio la presencia de diferentes poblaciones celulares de microglías/macrófagos, astrocitos, infiltrado celulares y presencia o ausencia de tejido fibrótico a diferentes tiempos post-infección (un mes a doce MPI), se da en respuesta a un daño agudo y crónico. Dependiendo del tiempo post-infección, los diferentes componentes proteicos que va liberando el parásito durante su proceso de desarrollo larval de oncosfera a cisticerco (oncosfera, post-oncosfera y cisticercos) lo cual podría asociarse al tipo de respuesta inflamatoria que se observa en los diferentes tiempos post-infección. De acuerdo a los trabajos reportado por *Chile N. et al.*, se sabe que el parásito va cambiando en la expresión de proteína en los diferentes tiempos de desarrollo (oncosfera - post- oncosfera y cisticerco) y estas podrían ser las responsables de modular la respuesta inmune del hospedero a lo largo del tiempo post-infección en la NCC (10,12,64,65).

## **VII CONCLUSIONES**

1. El tipo de infiltrado celular y macrófagos en tejido cerebral que rodea al quiste sin y con presencia de fibrosis es variado en los diferentes tiempos post-infección y dependiente de la localización del quiste.
2. Los quistes meningeales y ventriculares presentan una mayor proporción de infiltrado celular de moderado a severo.
3. La formación de tejido fibrótico (parenquimales, meningeales y ventriculares) empieza a los dos meses post -infección y está asociado a la presencia de macrófagos.
4. El tipo de colágeno en el tejido fibrótico al inicio de la formación (dos meses y medio a tres MPI) es del tipo III y desde los cuatro MPI predomina el tipo I.
5. En los primeros meses post-infección en quistes parenquimales (un mes a dos MPI, e incluso algunos de tres MPI) la inmunorreactividad de microglías/macrófagos es focalizada en dirección de la ubicación del escólex.
6. Las microglías en quistes parenquimales se encuentran adyacente al tegumento del quiste en los primeros meses post-infección y los astrocitos se encuentran después de la formación de la capa de las células microgliales.
7. Las microglías/macrófagos en quistes parenquimales se encuentran ubicadas en el tejido fibrótico después de los dos meses post-infección.
8. Los astrocitos migran hacia el tejido fibrótico en la etapa tardía (seis meses post-infección).

### **7.1 Limitaciones**

1. El presente estudio de NCC en ratas usa la infección intracraneal como vía de infección, y no la vía natural oral.



2. El presente estudio de NCC utiliza un hospedero que no es el hospedero natural de *T. solium*.
3. En el presente estudio no se logró analizar el infiltrado celular o presencia de gliosis en cerebros de ratas con NCC antes de un mes post-infección, entre 24h a un mes (primeros días post-infección), lo cual permitiría una visión más clara de cómo se va activando la respuesta inmune a través del tiempo. Esto se debe a que en esta etapa inicial es muy difícil ubicar los parásitos en el cerebro debido al tamaño (30 a 96 $\mu$ m).
4. No se logró tener un tamaño muestral homogéneo en cada mes post-infección.
5. Los quistes se ubican en los cerebros en diferentes núcleos celulares y esto puede afectar en la población de las células gliales e infiltrado celular.

## VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Del Brutto OH, Rajshekhar V, White AC, W. Tsang VC, Nash TE, Takayanagui OM, *et al.* Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*. 2001 Jul 24;57(2):177–83.
2. Verastegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velásquez J, Farfán M, *et al.* *Taenia solium* oncosphere adhesion to intestinal epithelial and Chinese hamster ovary cells in vitro. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5158–66.
3. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW, *et al.* Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010 Dec;27(4):592–7.
4. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol*. 2014 Dec;13(12):1202–15.
5. Maquera-Afaray J, Capaquira E, Conde L. [Disseminated cysticercosis: report of a case in Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014 Apr;31(2):370–4.
6. Del Brutto OH, Nash TE, White AC, Rajshekhar V, Wilkins PP, Singh G, *et al.* Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J Neurol Sci*. 2017 Jan;372:202–10.
7. Lescano AG, Garcia HH, Gilman RH, Gavidia CM, Tsang VCW, Rodriguez S, *et al.* *Taenia solium* Cysticercosis Hotspots Surrounding Tapeworm Carriers: Clustering on Human Seroprevalence but Not on Seizures. Bethony JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jan 27;3(1):e371.

8. Rodríguez S, O'Neal SE, Garcia HH, Ayvar V, Gonzalez AE, Gilman RH, *et al.* Neurocysticercosis among People Living Near Pigs Heavily Infected with Cysticercosis in Rural Endemic Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Feb 7;98(2):558–64.
9. Fleury A, Trejo A, Cisneros H, García-Navarrete R, Villalobos N, Hernández M, *et al.* Taenia solium: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. Garcia HH, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Aug 7;9(8):e0003980.
10. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, *et al.* In Vitro Study of Taenia solium Postoncospherical Form. Brehm K, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Feb 10;10(2):e0004396.
11. Nash TE, Mahanty S, Garcia HH, The Cysticercosis Group in Peru. Corticosteroid use in neurocysticercosis. *Expert Rev Neurother.* 2011 Aug;11(8):1175–83.
12. Moura VBL, Lima SB, Matos-Silva H, Vinaud MC, Loyola PRAN, Lino RS. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. *Parasitology.* 2016 Mar;143(3):334–42.
13. Uddin J, Gonzalez AE, Gilman RH, Thomas LH, Rodriguez S, Evans CAW, *et al.* Mechanisms Regulating Monocyte CXCL8 Secretion in Neurocysticercosis and the Effect of Antiparasitic Therapy. *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):4478–84.
14. Guerra-Giraldez C, Marzal M, Cangalaya C, Balboa D, Orrego MÁ, Paredes A, *et al.* Disruption of the blood–brain barrier in pigs naturally infected with Taenia

solium, untreated and after anthelmintic treatment. *Exp Parasitol.* 2013 Aug;134(4):443–6.

15. Sun Y, Chauhan A, Sukumaran P, Sharma J, Singh BB, Mishra BB. Inhibition of store-operated calcium entry in microglia by helminth factors: implications for immune suppression in neurocysticercosis. *J Neuroinflammation.* 2014 Dec;11(1):210.

16. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, *et al.* Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun.* 2001 Jul;69(7):4554–60.

17. Londoño DP, Alvarez JI, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet Parasitol.* 2002 Nov;109(3–4):249–59.

18. Mishra BB, Gundra UM, Wong K, Teale JM. MyD88-Deficient Mice Exhibit Decreased Parasite-Induced Immune Responses but Reduced Disease Severity in a Murine Model of Neurocysticercosis. *Infect Immun.* 2009 Dec;77(12):5369–79.

19. Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol.* 1998 Aug;89(1–2):64–72.

20. Uddin J, Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Friedland JS. Monocyte-Astrocyte Networks and the Regulation of Chemokine Secretion in Neurocysticercosis. *J Immunol.* 2005 Sep 1;175(5):3273–81.

21. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White AC, *et al.* Neurocysticercosis: Neglected but Not Forgotten. Engels D, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2012 May 29;6(5):e1500.
22. Sikasunge CS, Johansen MV, Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood–brain barrier permeability. Vet Parasitol. 2009 Mar;160(3–4):242–50.
23. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an Early Protective TH1-Type Immune Response to a Late Permissive TH2-Type Response in Murine Cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 1998 Feb;84(1):74.
24. Barcelos IS da C, Mineo JR, Silva DA de O, Ferreira MS, de Moura LP, Biondi GF, *et al.* Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. Trop Med Int Health. 2001 Mar;6(3):219–26.
25. Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula ÉC de, Oliveira AL, Moura VBL, Vinaud MC, *et al.* Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. Arq Neuropsiquiatr. 2012 Feb 24;70(4):287–92.
26. Alvarez JI, Teale JM. Evidence for differential changes of junctional complex proteins in murine neurocysticercosis dependent upon CNS vasculature. Brain Res. 2007 Sep;1169:98–111.

27. Cangalaya C, Bustos JA, Calcina J, Vargas-Calla A, Suarez D, Gonzalez AE, *et al.* Perilesional Inflammation in Neurocysticercosis - Relationship Between Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging, Evans Blue Staining and Histopathology in the Pig Model. Tanowitz HB, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jul 26;10(7):e0004869.
28. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, *et al.* Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. Am J Pathol. 2015 Aug;185(8):2259–68.
29. Mejia Maza A, Carmen-Orozco RP, Carter EC, Dávila-Villacorta DG, Castillo G, Morales JD, *et al.* Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. Brain Pathol. 2019 May;29(3):425–36.
30. Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Cauna Y, Bernal-Teran EG, Bitterfeld L, Sutherland GL, *et al.* Blood-brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis: XXXX. J Neurosci Res. 2019 Feb;97(2):137–48.
31. Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Delgado-Kamiche AD, Celiz RH, Trompeter G, Sutherland G, *et al.* Changes in inflammatory gene expression in brain tissue adjacent and distant to a viable cyst in a rat model for neurocysticercosis. Abd-Alla AMM, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Apr 27;15(4):e0009295.
32. Baquedano LE, Bernal EG, Carrion DJ, Delgado AD, Gavidia CM, Kirwan DE, *et al.* Impaired spatial working memory and reduced hippocampal neuronal density in a rat model of neurocysticercosis. Front Cell Neurosci. 2023 Jun 1;17:1183322.

33. Garcia HH, Gilman R, Herrera G, Diaz F, Miranda E, Gilman R, *et al.* Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. *The Lancet*. 1993 Jan;341(8839):197–200.
34. Alvarez JI, Colegial CH, Castaño CA, Trujillo J, Teale JM, Restrepo BI. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J Neuroimmunol*. 2002 Jun;127(1–2):139–44.
35. Scitutto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunol*. 2007 Dec;29(12):621–36.
36. Verastegui *et al.* - 2015 - Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taeni*.pdf.
37. Alvarez JI, Teale JM. Breakdown of the blood brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. *J Neuroimmunol*. 2006 Apr;173(1–2):45–55.
38. Hušáková M, Bay-Jensen AC, Forejtová Š, Zegzulková K, Tomčík M, Gregová M, *et al.* Metabolites of type I, II, III, and IV collagen may serve as markers of disease activity in axial spondyloarthritis. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):11218.

39. Tang J, Zhang Y, Zhang MB, Li YM, Fei X, Song ZG. Tissue elasticity displayed by elastography and its correlation with the characteristics of collagen type I and type III in prostatic stroma. *Asian J Androl*. 2014;16(2):305.
40. Brianezi L, Ornelas E, Gehrke F de S, Fonseca FLA, Alves B da CA, Sousa LV de A, *et al*. Effects of Physical Training on the Myocardium of Oxariectomized LDLr Knockout Mice: MMP 2/9, Collagen I/III, Inflammation and Oxidative Stress. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 7]; Available from: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2020000100100](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2020000100100)
41. Cho BS, Roelofs KJ, Ford JW, Henke PK, Upchurch GR. Decreased collagen and increased matrix metalloproteinase-13 in experimental abdominal aortic aneurysms in males compared with females. *Surgery*. 2010 Feb;147(2):258–67.
42. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, *et al*. Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. *J Histochem Cytochem*. 2014 Oct;62(10):751–8.
43. Ninh VK, El Hajj EC, Ronis MJ, Gardner JD. N-Acetylcysteine prevents the decreases in cardiac collagen I/III ratio and systolic function in neonatal mice with prenatal alcohol exposure. *Toxicol Lett*. 2019 Oct;315:87–95.
44. Cooper JG, Jeong SJ, McGuire TL, Sharma S, Wang W, Bhattacharyya S, *et al*. Fibronectin EDA forms the chronic fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2018 Aug;116:60–8.



45. Smigiel KS, Parks WC. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. *Curr Rheumatol Rep*. 2018 Apr;20(4):17.
46. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016 Mar;44(3):450–62.
47. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2017 Jul 17;18(7):1545.
48. Witherel CE, Abeyayehu D, Barker TH, Spiller KL. Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis. *Adv Healthc Mater*. 2019 Jan 18;1801451.
49. Schuster R, Rockel JS, Kapoor M, Hinz B. The inflammatory speech of fibroblasts. *Immunol Rev*. 2021 Jul;302(1):126–46.
50. Gundra UM, Mishra BB, Wong K, Teale JM. Increased Disease Severity of Parasite-Infected TLR2<sup>-/-</sup> Mice Is Correlated with Decreased Central Nervous System Inflammation and Reduced Numbers of Cells with Alternatively Activated Macrophage Phenotypes in a Murine Model of Neurocysticercosis. Urban JF, editor. *Infect Immun*. 2011 Jul;79(7):2586–96.
51. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2012 Apr 2;122(4):1164–71.
52. Goldmann T, Prinz M. Role of Microglia in CNS Autoimmunity. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:1–8.

53. Mariani MM, Kielian T. Microglia in Infectious Diseases of the Central Nervous System. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009 Dec;4(4):448–61.
54. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, *et al*. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 2012 Jul;349(1):169–80.
55. Chauhan A, Quenum FZ, Abbas A, Bradley DS, Nechaev S, Singh BB, *et al*. Epigenetic Modulation of Microglial Inflammatory Gene Loci in Helminth-Induced Immune Suppression: Implications for Immune Regulation in Neurocysticercosis. *ASN Neuro*. 2015 Jul 1;7(4):175909141559212.
56. Quenum Zangbede FO, Chauhan A, Sharma J, Mishra BB. Galectin-3 in M2 Macrophages Plays a Protective Role in Resolution of Neuropathology in Brain Parasitic Infection by Regulating Neutrophil Turnover. *J Neurosci*. 2018 Jul 25;38(30):6737–50.
57. Lee M, Schwab C, McGeer PL. Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*. 2011 Jan;59(1):152–65.
58. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2010 Jan;119(1):7–35.
59. Gripper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease—A review. *Acta Trop*. 2017 Feb;166:218–24.

60. Verastegui M, Gilman RH, Gonzales A, Garcia HH, Gavidia C, Falcon N, *et al.* Taenia solium oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2002 Aug;108(1):49–62.
61. Chapalamadugu KC, Busboom JR, Nelson ML, Hancock DD, Tang J, Jasmer DP. Taenia taeniaeformis: Effectiveness of staining oncospheres is related to both temperature of treatment and molecular weight of dyes utilized. *Vet Parasitol.* 2008 Feb;151(2–4):203–11.
62. Hoffman GE, Le WW, Sita LV. The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical Methods. *Curr Protoc Neurosci* [Internet]. 2008 Oct [cited 2022 Jul 21];45(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142301.ns0212s45>
63. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol.* 2020;11:1142.
64. Adalid-Peralta L, Arce-Sillas A, Fragoso G, Cárdenas G, Rosetti M, Casanova-Hernández D, *et al.* Cysticerci Drive Dendritic Cells to Promote *In Vitro* and *In Vivo* Tregs Differentiation. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:1–9.
65. Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM. *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology.* 2010 Mar;137(3):359–72.
66. McCleery E, Allen SE, Moyano LM, Gamboa R, Vilchez P, Muro C, *et al.* Population Screening for Urine Antigens to Detect Asymptomatic Subarachnoid

Neurocysticercosis: A Pilot Study in Northern Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2020 Sep 2;103(3):1125–8.

67. Christensen NM, Trevisan C, Leifsson PS, Johansen MV. The association between seizures and deposition of collagen in the brain in porcine *Taenia solium* neurocysticercosis. *Vet Parasitol.* 2016 Sep;228:180–2.

68. Bustos JA, Arroyo G, Gilman RH, Soto-Becerra P, Gonzales I, Saavedra H, *et al.* Frequency and Determinant Factors for Calcification in Neurocysticercosis. *Clin Infect Dis.* 2021 Nov 2;73(9):e2592–600.

69. Gao N, Wang J, Zhang Q, Zhou T, Mu W, Hou P, *et al.* Aberrant Distributions of Collagen I, III, and IV in Hirschsprung Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020 Apr;70(4):450–6.

70. Snook ER, Fisher-Perkins JM, Sansing HA, Lee KM, Alvarez X, MacLean AG, *et al.* Innate Immune Activation in the Pathogenesis of a Murine Model of Globoid Cell Leukodystrophy. *Am J Pathol.* 2014 Feb;184(2):382–96.

71. Huang L, Wu ZB, ZhuGe Q, Zheng W, Shao B, Wang B, *et al.* Glial Scar Formation Occurs in the Human Brain after Ischemic Stroke. *Int J Med Sci.* 2014;11(4):344–8.

72. Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol.* 2019 Mar;97(3):258–67.

73. Luo XG, Ding JQ, Chen SD. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2010 Mar 24;5:12.

74. Huang E, Peng N, Xiao F, Hu D, Wang X, Lu L. The Roles of Immune Cells in the Pathogenesis of Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 22;21(15):5203.
75. Alvarez JI, Londoño DP, Alvarez AL, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. Granuloma Formation and Parasite Disintegration in Porcine Cysticercosis: Comparison with Human Neurocysticercosis. *J Comp Pathol.* 2002 Oct;127(2–3):186–93.
76. Little K, Llorián-Salvador M, Tang M, Du X, Marry S, Chen M, *et al.* Macrophage to myofibroblast transition contributes to subretinal fibrosis secondary to neovascular age-related macular degeneration. *J Neuroinflammation.* 2020 Dec;17(1):355.
77. Rath M, M<sup>1</sup>/<sub>4</sub>ller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Oct 27 [cited 2023 Mar 28];5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00532/abstract>

## **IX ANEXOS**

### **Anexo 1: TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA (H&E)**

**Hematoxilina de Harris empresa: catálogo: 1.092.531.022. Solución de Tinción de Eosina al 5%, empresa: Sigma - Merck, catálogo: R03040-74**

### **DESPARAFINACIÓN E HIDRATACIÓN**

Se colocó las láminas en la estufa a 60° C y luego al Xilol I solo metiendo y sacando al momento. Se terminó de calentar en la estufa y se procedió a colocar las láminas en los siguientes solventes: Xilol I, Xilol II, alcohol absoluto II, alcohol 95° I y alcohol 95° II. *Un minuto por cada paso.*

Para el último paso procederá a hidratar con agua de caño en chorro.

### **TINCIÓN**

Hematoxilina de Harris por 2 minutos. Luego, lavar con agua destilada hasta que el agua esté limpia. Sumergirlas en agua ácida 1% (alcohol de 70° + ac. clorhídrico) solamente introduciendo y retirando inmediatamente. Después, lavar con agua amoniacal (carbonato de litio en solución saturada) por 1 minuto, el cual tornará el color de la muestra a azulino. Lavar con agua destilada para retirar los restos de agua amoniacal. Contra tinción con Eosina alcohólica al 5% (coloración citoplasmática) por 30 a 20 segundos.

### **DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE**

Las láminas se colocaron en una batería crecientes de alcoholes: Alcohol de 80°, alcohol de 90°, alcohol de 96° y alcohol absoluto. Secado en estufa por 5 minutos.

Luego se pasó las láminas por: xilol I y Xilol II. Finalmente se montaron las láminas con solución Entellan (MERCK)

## **Anexo 2: ROJO PICROSIRIUS**

**Marca: Polyscience, Kit cat# 24901.**

### **DESPARAFINIZACIÓN**

Se colocó las láminas a estufa 57-60°C por media hora. Luego se colocó en los siguientes solventes: Xilol I (1 minutos por una vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces) y Xilol III (2 minutos por 3 veces). Alcohol absoluto I y II, alcohol 96° I y II, alcohol 90° I y II, alcohol de 80° I.

### **TINCIÓN**

Mezclar la solución A y solución B en partes iguales de la Hematoxilina de Weigert; se colocó la mezcla por 8 minutos (*luego se lavó con agua destilada*). Agregar la solución A (Ácido fosfomolibdico) por 2 minutos (*luego se lavó con agua destilada*). Agregar la solución B (Picrosirius red F3BA) por 60 minutos (*se decantó el contenido sin lavar*). Agregar la solución C (N- Hidroclorhidrico) por 2 minutos. Agregar etanol 70% por 45 segundos.

### **DESHIDRATACIÓN Y MONTAJE**

Las láminas se colocaron en una batería crecientes de alcoholes: Alcohol de 80°, alcohol de 90°, alcohol de 96° y alcohol absoluto (*Secado en estufa por 5 minutos*). Luego se pasó las láminas por: Xilol I y Xilol II. Finalmente se montaron las láminas con solución Entellan (MERCK).

**Anexo 3: Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para microglías y astrocitos.**

Anticuerpos Primarios		Secundarios - HRP		Secundarios – Alexa Fluor	
Código	Descripción	Código	Descripción	Código	Descripción
Cd68 (MCA341 GA - Cd68 Bio-Rad)	IgG de ratón anti -	KPL, 04-18-15	IgG de ratón marcada con peroxidasa	ThermoFisher Scientific A11005	IgG de cabra anti – IgG de ratón marcado con Alexa fluor 594
GFAP (PA3-16727 ThermoFisher Scientific)	IgG de conejo anti - GFAP	KPL, 5220-0336	IgG de conejo marcada con peroxidasa	ThermoFisher Scientific A21206	IgG de burro anti – IgG de conejo marcado con Alexa fluor 488



## **Anexo 4: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA CD68 (CLUSTER DE DIFERENCIACIÓN 68)**

### **DESPARAFINIZACIÓN**

Se colocó las láminas a estufa 57-60°C por media hora. Luego se colocó en los siguientes solventes: Xilol I (1 minutos por una vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces) y Xilol III (2 minutos por 3 veces). Alcohol absoluto I y II, alcohol 96° I y II, alcohol 90° I y II, alcohol de 80° I

### **DESENMASCARAMIENTO**

Se colocaron los coplin con láminas y el citrato a pH6 (10Mm) + Tween 20 al 0.05%, una vez que hirvió se consideró 30 minutos. *\*Se lavaron las láminas 4 veces con H<sub>2</sub>O destilada.*

### **BLOQUEO DE PEROXIDASAS ENDÓGENAS**

Se usó peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 1x, se dejó incubando por 30 minutos (*se lavaron las láminas 4 veces con PBS 1x*).

### **BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES**

Se incubaron las láminas con la solución por 1 hora, la solución se preparó en PBS-tritón x-100 al 0.05%. Se usaron los siguientes reactivos para el bloqueo: 2.5% suero de cabra, 2.5% suero de caballo, 2.5% BSA y 2.5% leche (*se lavaron las láminas 4 veces con PBS 1x*).

### **INCUBACIÓN ANTICUERPO PRIMARIO**

Se incubaron las láminas con la solución por 16 horas a 4°C, la solución se preparó en PBS-tritón X-100 al 0.05%. Se usaron los siguientes reactivos para el anticuerpo primario: 5%

suero de cabra y 5% suero de caballo. La dilución del anticuerpo IgG de ratón anti-CD68 fue de 1:500.

### **INCUBACIÓN ANTICUERPO SECUNDARIO**

Se usó un kit de la empresa Dako (K0675), se incubaron las láminas con la solución por 1 hora a temperatura ambiente, la solución se preparó de la siguiente manera: 10% suero de cabra, 10% suero de rata, 30% PBS y 50% kit de Biotina (*el kit contiene el anticuerpo secundario específico para IgG de cabra anti ratón*).

### **INCUBACIÓN CON EL CONJUGADO**

Se usó el kit de la empresa Dako (K0675), se incubaron las láminas con la solución por 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó de 4-5 gotas de la solución estreptavidina-HRP.

### **REVELADO Y DESHIDRATACIÓN**

Se preparó la solución de revelado: 1g de DAB + 3ml de solución tamponada; se dejó incubando con esta solución por 4'45'' (4 minutos con 45 segundos) e inmediatamente se lavó con agua destilada. La contra tinción se realizó con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 30 segundos.

Las láminas se colocaron en una batería crecientes de alcoholes (70°, 90°, 96° y alcohol absoluto) por 2 minutos en cada uno, luego se pasó las láminas por Xilol I y II por 3 minutos cada uno. Finalmente se montaron las láminas con solución Entellan (MERCK).

## **Anexo 5: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA GFAP (PROTEÍNA ACIDA FIBRILAR GLIAL)**

## **DESPARAFINIZACIÓN**

Se colocó las láminas a estufa 57-60°C por media hora. Luego se colocó en los siguientes solventes: Xilol I (1 minutos por una vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces) y Xilol III (2 minutos por 3 veces). Alcohol absoluto I y II, alcohol 96° I y II, alcohol 90° I y II, alcohol de 80° I

## **DESENMASCARAMIENTO**

Se puso a hervir el citrato a pH6 (10Mm) + Tween 20 al 0.05%, una vez que hirvió se puso las láminas por 15 minutos (*se lavaron las láminas 4 veces con H<sub>2</sub>O destilada*).

## **BLOQUEO DE PEROXIDASAS ENDÓGENAS**

Se usó peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 1x, se dejó incubando por 30 minutos (*se lavaron las láminas 4 veces con PBS 1x*).

## **BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES**

Se incubaron las láminas con la solución por 1 hora, la solución se preparó en PBS-tritón x-100 al 0.05%. 5% BSA y 2.5% leche (*se lavaron las láminas 4 veces con PBS 1x*).

## **INCUBACIÓN ANTICUERPO PRIMARIO**

Se incubaron las láminas con la solución por 16 horas a 4°C, la solución se preparó en PBS-tritón X-100 al 0.05%, la solución se preparó de la siguiente manera: 5% suero de caballo y 5% suero de cabra. Dilución de anticuerpo IgG de conejo anti-GFAP fue de 1:1000

## **INCUBACIÓN ANTICUERPO SECUNDARIO**

Se incubaron las láminas con la solución por 1 hora a temperatura ambiente, la solución se preparó en PBS, la solución se preparó de la siguiente manera: 5% suero de cabra. Dilución de anticuerpo IgG de cabra anti conejo marcado con HRP 1:300

## **REVELADO Y DESHIDRATACIÓN**

Se preparó la solución de revelado: 1g de DAB + 3ml de solución tamponada; se dejó incubando con esta solución por 1'20'' (1 minuto con 20 segundos) e inmediatamente se lavó con agua destilada. La contra tinción se realizó con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 30 segundos.

Las láminas se colocaron en una batería crecientes de alcoholes (70°, 90°, 96° y alcohol absoluto) por 2 minutos en cada uno, luego se pasó las láminas por Xilol I y II por 3 minutos cada uno. Finalmente se montaron las láminas con solución Entellan (MERCK).

## **Anexo 6: PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA – DOBLE MARCAJE PARA CD68 (ratón) Y GFAP (conejo)**

### **DESPARAFINIZACIÓN**

Se colocó las láminas a estufa 57-60°C por media hora. Luego se colocó en los siguientes solventes: Xilol I (1 minutos por una vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces) y Xilol III (2 minutos por 3 veces). Alcohol absoluto I y II, alcohol 96° I y II, alcohol 90° I y II, alcohol de 80° I.

### **DESENMASCARAMIENTO**

Se puso a hervir el citrato a pH6 (10Mm) + Tween 20 al 0.05%, una vez que hirvió se puso las láminas por 15 minutos (*se lavaron las láminas 4 veces con H<sub>2</sub>O destilada*).

### **BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES**

Se incubaron las láminas con la solución por 1 hora, la solución se preparó en PBS-tritón x-100 al 0.05%, la solución se preparó de la siguiente manera 5% Suero de Burro y 2% Ovo (g) *(se lavaron las láminas 4 veces con PBS 1x)*.

### **INCUBACIÓN ANTICUERPO PRIMARIO CD68 (1:500) Y GFAP (1:1000)**

Se incubaron las láminas con la solución por 16 horas a 4°C, la solución se preparó en PBS-tritón X-100 al 0.05%, la solución se preparó de la siguiente manera 5% suero de caballo y 5% suero de burro.

### **INCUBACIÓN ANTICUERPO SECUNDARIO**

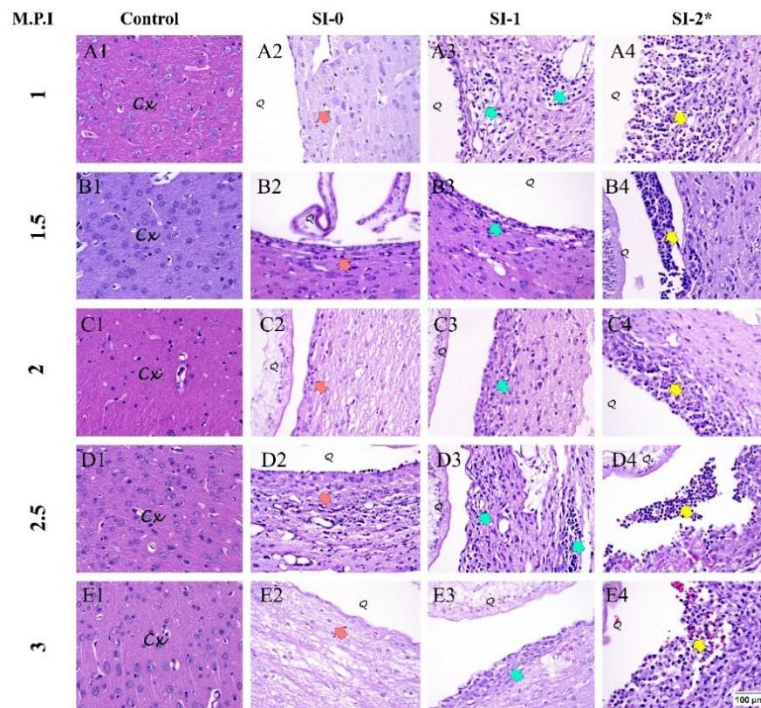
IgG de cabra anti ratón marcado con Alexa 594 1:300, IgG de burro anti conejo marcado con Alexa 488 1:700. Se incubaron las láminas con la solución por 1 hora a temperatura ambiente, la solución se preparó en PBS, la solución se preparó de la siguiente manera: 5% suero de burro.

### **MONTAJE**

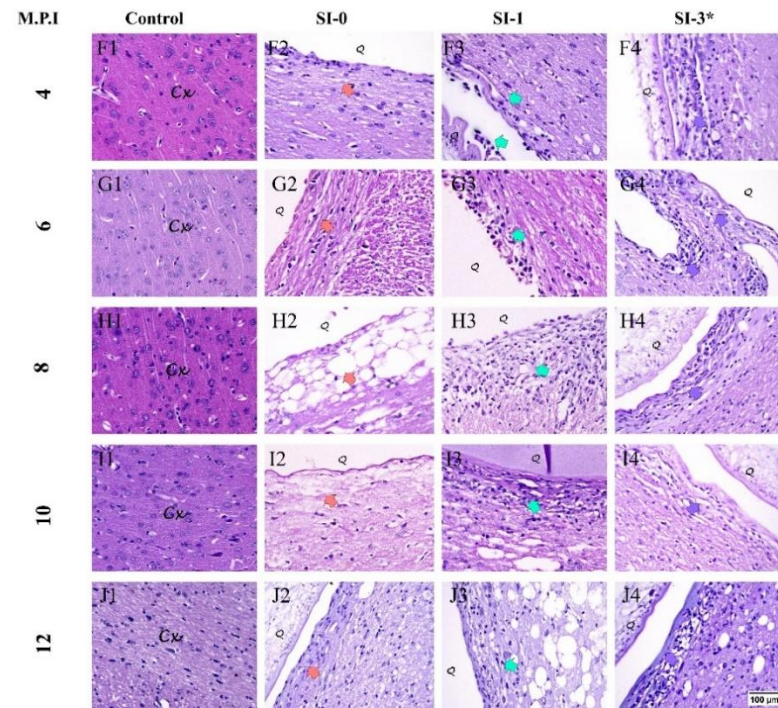
Se agregaron 20uL de DAPI por lámina cubriendo completamente el tejido e inmediatamente después se colocó el cubreobjetos sobre la lámina. Finalmente se sellaron con esmalte (Colocar las láminas en unas cámaras oscuras y conservar entre 4 a 20°C hasta la lectura).

**Anexo 7: Quistes Parenquimales - score de Inflamación (SI) en los diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección).** A1- J1, Cerebro control para los diferentes grupos post-infección. A2 – J2: SI-0 (■), Score de inflamación con mínimo infiltrado inflamatorio. A3-J3: SI-1 (■), score con infiltrado inflamatorio de moderado a severo para los diferentes grupos post-infección. A4-E4: SI-2 (■), score de inflamación presencia de macrófagos organizados empalizados sin la formación de fibrosis. F4 – J4: SI-3 (■), score con presencia de macrófagos organizados empalizados con la formación de fibrosis. Cx: corteza, Q: quiste. Láminas con tinción Hematoxilina y eosina (H&E). \*columna que puede ser SI-2 o SI-3. **Panel A-J:** quiste de un mes post-infección hasta los doce meses post-infección. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100µm.

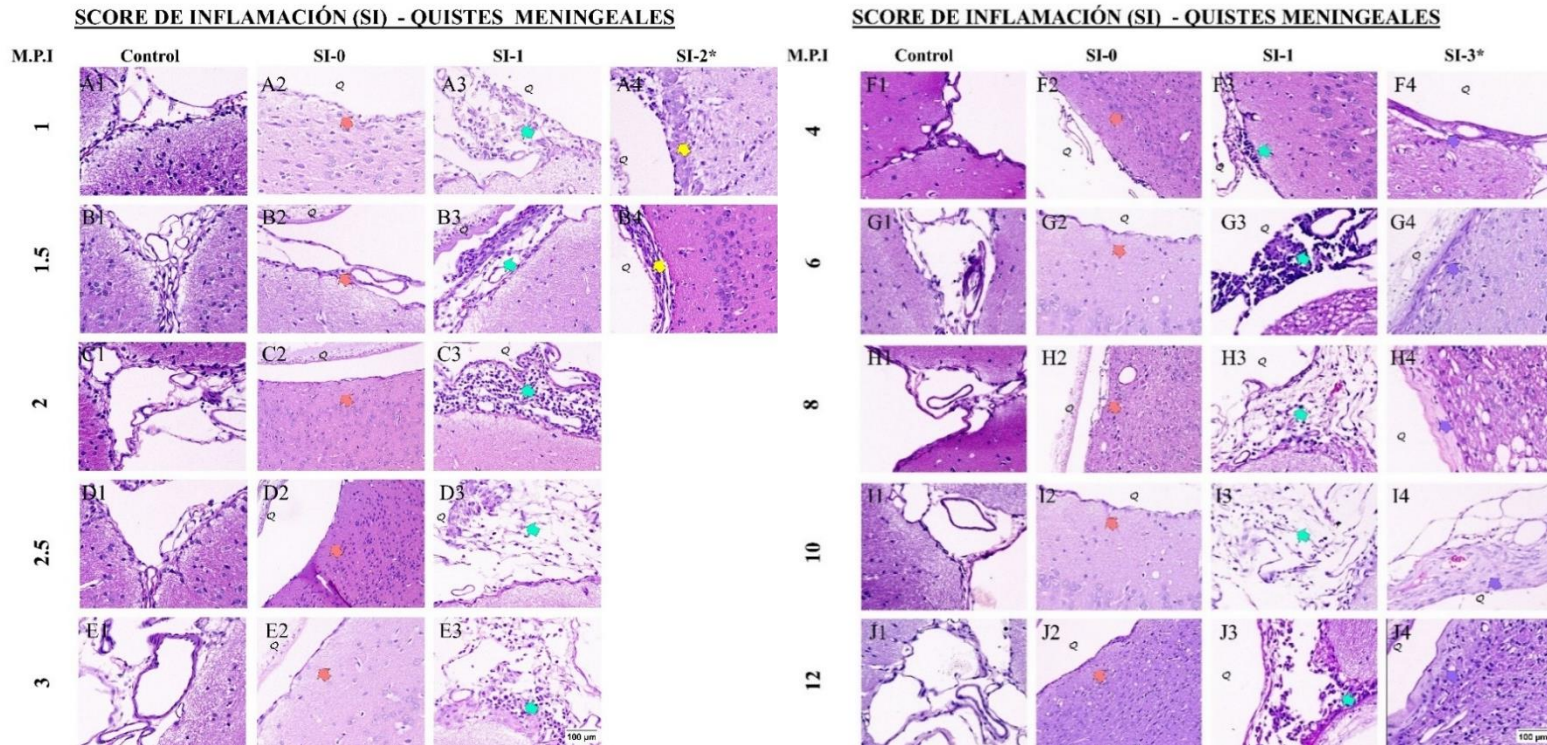
**SCORE DE INFLAMACIÓN (SI) - QUISTES PARENQUIMALES**



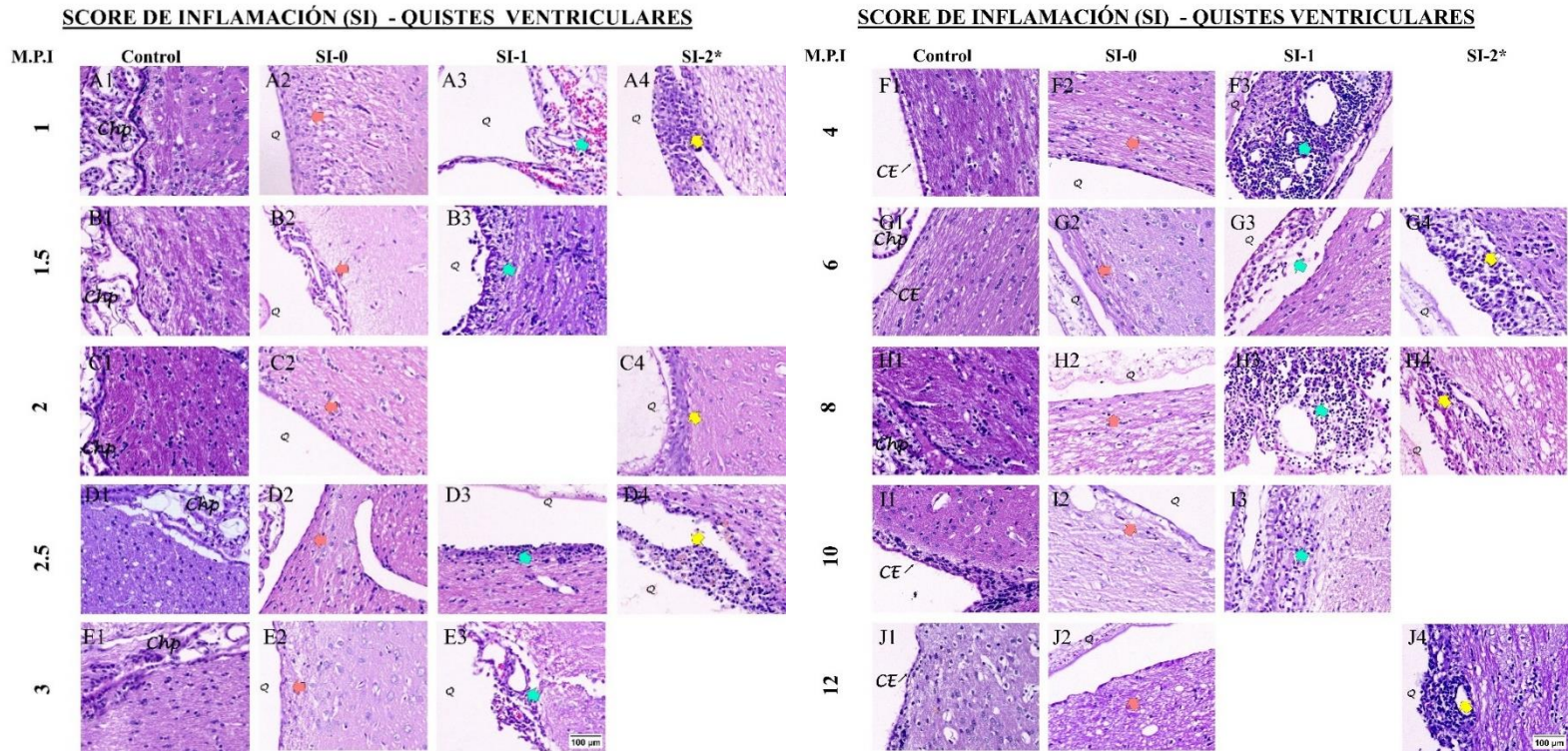
**SCORE DE INFLAMACIÓN (SI) - QUISTES PARENQUIMALES**



**Anexo 8: Quistes Meningeales - score de Inflamación (SI) en los diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección).** A1- J1, Cerebro control para los diferentes grupos post-infección. A2 – J2: SI-0 (■), Score de inflamación con mínimo infiltrado inflamatorio. A3-J3: SI-1 (■), score con infiltrado inflamatorio de moderado a severo para los diferentes grupos post-infección. A4-E4: SI-2 (■), score de inflamación presencia de macrófagos organizados empalizados sin la formación de fibrosis. F4 – J4: SI-3 (■), score con presencia de macrófagos organizados empalizados con la formación de fibrosis. Cx: corteza, Q: quiste. Láminas con tinción Hematoxilina y eosina (H&E). \*columna que puede ser SI-2 o SI-3. **Panel A-J:** quiste de un mes post-infección hasta los doce meses post-infección. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um



**Anexo 9: Quistes Ventriculares - score de Inflamación (SI) en los diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección).** A1- J1, Cerebro control para los diferentes grupos post-infección. A2 – J2: SI-0 (■), Score de inflamación con mínimo infiltrado inflamatorio. A3-J3: SI-1 (■), score con infiltrado inflamatorio de moderado a severo para los diferentes grupos post-infección. A4-E4: SI-2 (■), score de inflamación presencia de macrófagos organizados empalizados sin la formación de fibrosis. F4 – J4: SI-3 (■), score con presencia de macrófagos organizados empalizados con la formación de fibrosis. Cx: corteza, Q: quiste. Láminas con tinción Hematoxilina y eosina (H&E). \*columna que puede ser SI-2 o SI-3. **Panel A-J:** quiste de un mes post-infección hasta los doce meses post-infección. Fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 100um





**Anexo 10. Comparación del Score de Inflamación SI-0: infiltrado inflamatorio mínimo en diferentes tiempos post-infección.**

Grupo (meses)	Comparación del infiltrado inflamatorio mínimo teniendo en cuenta la localización del quiste y el tiempo post-infección– Score SI-0												
	Porcentaje de área alrededor del quiste sin formación de fibrosis									Controles			
	Parenquimal ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Meningeal ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Ventricular ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Control ± SEM		#Cerebros (#cortes)	
1 mes	26.95 <sup>a1</sup>	± 8.028	13(20)	19.516 <sup>a1</sup>	± 12.271	5(5)	12.12 <sup>a1</sup>	± 12.12	3(3)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
1.5 meses	52.1 <sup>ab12</sup>	± 11.871	7(9)	36.492 <sup>a12</sup>	± 15.097	6(6)	58.33 <sup>ab2</sup>	± 25.000	4(4)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
2 meses	62.54 <sup>bc2</sup>	± 7.266	13(18)	72.872 <sup>a2</sup>	± 10.212	5(5)	80.00 <sup>ab2</sup>	± 20.000	5(5)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
2.5 meses	58.56 <sup>b2</sup>	± 7.266	14(27)	62.204 <sup>a2</sup>	± 9.170	7(7)	63.43 <sup>ab2</sup>	± 14.724	6(7)	0 <sup>a12</sup>	± 0	4(16)	
3 meses	37.1 <sup>ab13</sup>	± 10.841	9(14)	69.560 <sup>a23</sup>	± 10.932	8(8)	91.92 <sup>b2</sup>	± 5.500	8(9)	0 <sup>a1</sup>	± 0	3(12)	
4 meses	22.11 <sup>a1</sup>	± 8.160	11(16)	38.102 <sup>a12</sup>	± 22.400	4(4)	70.73 <sup>ab2</sup>	± 11.551	7(7)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
6 meses	18.16 <sup>a1</sup>	± 5.959	12(24)	60.917 <sup>a2</sup>	± 14.206	6(6)	45.17 <sup>ab2</sup>	± 13.749	2(4)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
8 meses	21.84 <sup>a12</sup>	± 10.591	7(14)	46.591 <sup>a2</sup>	± 11.820	7(7)	56.45 <sup>ab12</sup>	± 16.619	4(5)	0 <sup>a1</sup>	± 0	3(12)	
10 meses	31.86 <sup>ab1</sup>	± 11.820	6(10)	39.033 <sup>a1</sup>	± 10.627	7(8)	20.95 <sup>ab1</sup>	± 20.950	2(2)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
12 meses	34.34 <sup>ab1</sup>	± 8.936	11(20)	41.419 <sup>a1</sup>	± 12.403	9(9)	49.15 <sup>ab1</sup>	± 10.707	5(6)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de una misma ubicación (p<0,05).*

*Números diferentes indican diferencias entre ubicaciones (P, M, V y control), dentro del mismo grupo (p<0,05). (Test Kruskal-Wallis-dunn test)*

**Anexo 11. Comparación del Score de Inflamación SI-1: infiltrado inflamatorio de moderado a severo en diferentes tiempos post-infección**

Grupo (meses)	Comparación del infiltrado inflamatorio de moderado a severo teniendo en cuenta la localización del quiste y el tiempo post-infección– Score SI-1											
	Porcentaje de área alrededor del quiste sin formación de fibrosis									Controles		
	Parenquimal ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Meningeal ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Ventricular ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Control ± SEM	#Cerebros (#cortes)	
1 mes	7.39 <sup>ab12</sup>	± 5.144	13(20)	34.64 <sup>a2</sup>	± 19.180	5(5)	15.15 <sup>a12</sup>	± 15.150	3(3)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)
1.5 meses	14.62 <sup>ab1</sup>	± 7.088	7(9)	26.92 <sup>a1</sup>	± 14.003	6(6)	30.28 <sup>a1</sup>	± 22.014	4(4)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)
2 meses	6.21 <sup>ab1</sup>	± 2.963	13(18)	22.21 <sup>a2</sup>	± 6.837	5(5)	0	± 0	5(5)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)
2.5 meses	13.36 <sup>a12</sup>	± 3.800	14(27)	32.01 <sup>a2</sup>	± 9.389	7(7)	24.90 <sup>a1</sup>	± 15.130	6(7)	0 <sup>a12</sup>	± 0	4(16)
3 meses	4.05 <sup>ab1</sup>	± 1.880	9(14)	16.91 <sup>a2</sup>	± 4.603	8(8)	1.18 <sup>a12</sup>	± 1.183	8(9)	0 <sup>a13</sup>	± 0	3(12)
4 meses	8.71 <sup>ab1</sup>	± 5.005	11(16)	36.42 <sup>a2</sup>	± 22.348	4(4)	21.65 <sup>a23</sup>	± 7.760	7(7)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)
6 meses	0.26 <sup>b1</sup>	± 0.263	12(24)	24.48 <sup>a2</sup>	± 9.446	6(6)	22.93 <sup>a2</sup>	± 15.672	2(4)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)
8 meses	3.45 <sup>ab2</sup>	± 2.444	7(14)	18.79 <sup>a1</sup>	± 5.172	7(7)	24.03 <sup>a12</sup>	± 14.022	4(5)	0 <sup>a12</sup>	± 0	3(12)
10 meses	14.54 <sup>ab1</sup>	± 10.195	6(10)	11.12 <sup>a1</sup>	± 4.206	7(8)	29.17 <sup>a1</sup>	± 14.760	2(2)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)
12 meses	5.41 <sup>ab13</sup>	± 2.678	11(20)	14.68 <sup>a23</sup>	± 7.759	9(9)	22.45 <sup>a2</sup>	± 8.456	5(6)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de una misma ubicación (p<0,05).*

*Números diferentes indican diferencias entre ubicaciones (P, M, V y control), dentro del mismo grupo (p<0,05). (Test Kruskal-Wallis-dunntest)*

**Anexo 12. Comparación del Score de Inflamación SI-2 - Presencia de macrófagos organizados en empalizados sin formación de fibrosis en diferentes tiempos post-infección en ratas con NCC**

Grupo (meses)	Comparación de la presencia de macrófagos organizados en empalizados sin formación de fibrosis teniendo en cuenta la localización del quiste y el tiempo post-infección- Score SI-2												
	Porcentaje de área alrededor del quiste sin formación de fibrosis									Controles			
	Parenquimal ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Meningeal ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Ventricular ± SEM		#Cerebros (#quistes)	Control ± SEM		#Cerebros (#cortes)	
1 mes	59.55 <sup>a2</sup>	± 9.327	13(20)	41.00 <sup>a12</sup>	± 24.103	5(5)	39.40 <sup>a12</sup>	± 30.753	3(3)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
1.5 meses	20.26 <sup>bc1</sup>	± 11.620	7(9)	36.59 <sup>a1</sup>	± 20.288	6(6)	1.67 <sup>a1</sup>	± 1.668	4(4)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
2 meses	25.46 <sup>bc1</sup>	± 8.095	13(18)	0 <sup>b1</sup>	± 0	5(5)	20.00 <sup>a1</sup>	± 20.000	5(5)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
2.5 meses	16.72 <sup>bc1</sup>	± 4.403	14(27)	0 <sup>cb2</sup>	± 0	7(7)	11.67 <sup>a1</sup>	± 7.584	6(7)	0 <sup>a12</sup>	± 0	4(16)	
3 meses	17.54 <sup>bcd1</sup>	± 7.664	9(14)	0.40 <sup>b1</sup>	± 0.401	8(8)	3.17 <sup>a1</sup>	± 3.174	8(9)	0 <sup>a1</sup>	± 0	3(12)	
4 meses	2.78 <sup>de1</sup>	± 1.928	11(16)	0 <sup>b1</sup>	± 0	4(4)	0.89 <sup>a1</sup>	± 0.893	7(7)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
6 meses	1.15 <sup>f1</sup>	± 1.154	12(24)	0 <sup>b1</sup>	± 0	6(6)	16.10 <sup>a2</sup>	± 10.514	2(4)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
8 meses	0 <sup>f1</sup>	± 0	7(14)	0 <sup>b1</sup>	± 0	7(7)	15.37 <sup>a2</sup>	± 9.799	4(5)	0 <sup>a1</sup>	± 0	3(12)	
10 meses	0 <sup>f1</sup>	± 0	6(10)	0 <sup>b1</sup>	± 0	7(8)	0 <sup>a1</sup>	± 0	2(2)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	
12 meses	0 <sup>ef1</sup>	± 0	11(20)	0 <sup>b1</sup>	± 0	9(9)	2.93 <sup>a1</sup>	± 2.902	5(6)	0 <sup>a1</sup>	± 0	4(16)	

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de una misma ubicación (p<0,05).*

*Números diferentes indican diferencias entre ubicaciones (P, M, V y control), dentro del mismo grupo (mes (p<0,05) (Test Kruskal-Wallis-dunntest).*

**Anexo 13. Comparación del Score de Inflamación SI-3 - Presencia de macrófagos organizados en empalizados con formación de fibrosis en diferentes tiempos post-infección en ratas con NCC**

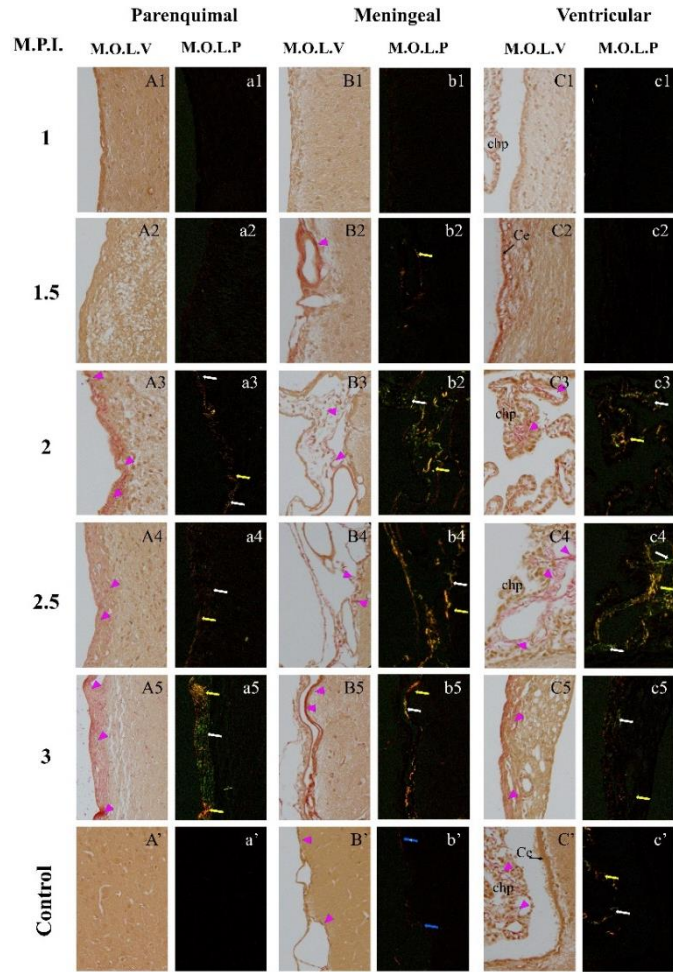
Comparación de la presencia de macrófagos organizados en empalizados con formación de fibrosis teniendo en cuenta la localización del quiste y el tiempo post-infección- Score SI-3																
Grupo (meses)	Porcentaje de área alrededor del quiste con formación de fibrosis										Controles					
	Parenquimal SEM	±	1.112	#Cerebro s (#quistes)	Meningeal SEM	±	4.848	#Cerebro s (#quistes)	Ventricular SEM	±	0	#Cerebro s (#quistes)	Control ±	SEM	#Cerebr os (#cortes)	
1 mes	1.112 <sup>a1</sup>	±	1.112	13(20)	4.848 <sup>a1</sup>	±	4.848	5(5)	0 <sup>a1</sup>	±	0	3(3)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
1.5 meses	1.916 <sup>a1</sup>	±	1.916	7(9)	0 <sup>a1</sup>	±	0	6(6)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(4)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
2 meses	5.788 <sup>a1</sup>	±	5.326	13(18)	4.852 <sup>a1</sup>	±	4.852	5(5)	0 <sup>a1</sup>	±	0	5(5)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
2.5 meses	10.467 <sup>ab1</sup>	±	4.498	14(27)	5.789 <sup>a1</sup>	±	5.789	7(7)	0 <sup>a1</sup>	±	0	6(7)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
3 meses	40.416 <sup>b1</sup>	±	11.820	9(14)	12.500 <sup>a1</sup>	±	12.500	8(8)	3.722 <sup>a1</sup>	±	3.722	8(9)	0 <sup>a1</sup>	±	0	3(12)
4 meses	66.401 <sup>c2</sup>	±	10.385	11(16)	25.480 <sup>ab12</sup>	±	21.232	4(4)	6.726 <sup>a1</sup>	±	4.582	7(7)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
6 meses	80.420 <sup>c2</sup>	±	5.928	12(24)	14.608 <sup>ab1</sup>	±	6.967	6(6)	15.810 <sup>a1</sup>	±	9.406	2(4)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
8 meses	74.711 <sup>c2</sup>	±	11.062	7(14)	34.626 <sup>ab12</sup>	±	12.182	7(7)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(5)	0 <sup>a1</sup>	±	0	3(12)
10 meses	53.593 <sup>bc2</sup>	±	12.268	6(10)	49.848 <sup>b2</sup>	±	8.323	7(8)	21.845 <sup>a12</sup>	±	21.845	2(2)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)
12 meses	60.254 <sup>bc2</sup>	±	9.729	11(20)	43.903 <sup>ab12</sup>	±	14.971	9(9)	25.485 <sup>a12</sup>	±	13.806	5(6)	0 <sup>a1</sup>	±	0	4(16)

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos de una misma ubicación (p<0,05).*

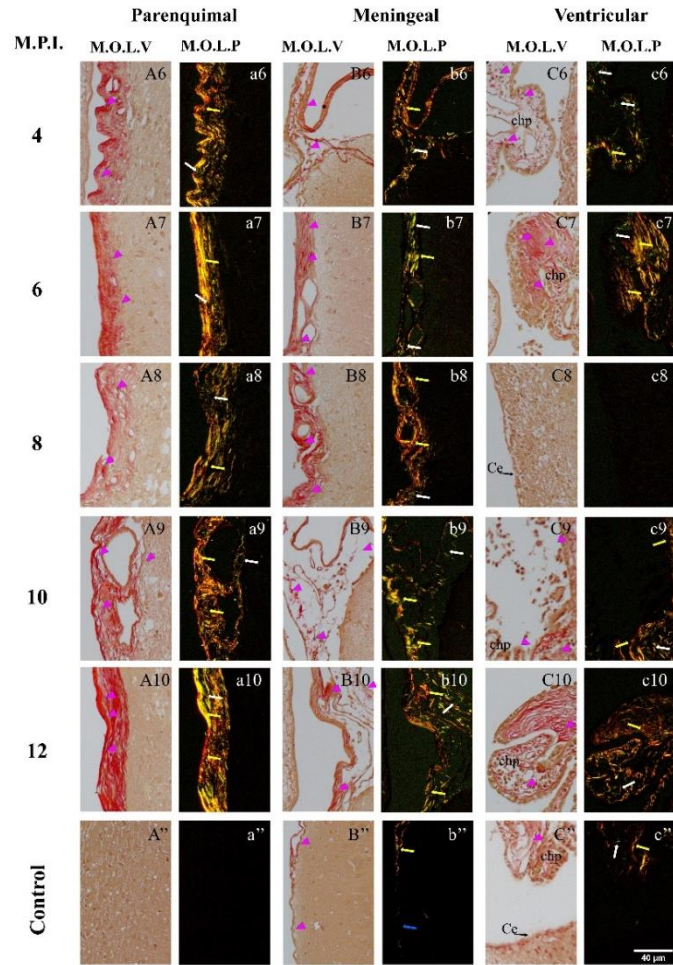
*Números diferentes indican diferencias entre ubicaciones (P, M, V y control), dentro del mismo grupo (p<0,05) (Test Kruskal-Wallis-dunntest).*

**Anexo 14. Fibrosis y tipo de colágeno presente en cerebros de ratas con neurocisticercosis en los diferentes tiempos post-infección (1-12 meses post-infección). Quistes parenquimales:** Quistes de un mes y medio post-infección sin fibrosis (M.O.L.P: a3-a5). Quistes de dos a tres meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo III (M.O.L.P: a3-a5). Quistes de cuatro a doce meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo I (M.O.L.P: a6-a10). **Quistes meningeales:** Quistes de un mes a un mes y medio post-infección sin fibrosis (M.O.L.V: B1-B2 y M.O.L.P: b1 - b2). Quistes de dos a tres meses post-infección con fibrosis y colágeno predominante del tipo III (M.O.L.P: b2-b5). Quistes de cuatro a doce meses post-infección con fibrosis (y colágeno predominante del tipo I (M.O.L.P: b6-b10). **Quistes ventriculares:** Quistes de un mes a dos meses post-infección sin fibrosis (M.O.L.V: C1-C2 y M.O.L.P: c1-c2). Quistes de dos a cuatro meses post-infección con fibrosis y colágeno tipo I y con predominante del tipo III (M.O.L.P: c3-c6). Quistes de seis a doce meses post-infección con fibrosis y colágeno del tipo I (M.O.L.P: c7 – c10). *M.O.L.V (microscopio óptico de luz visible), M.O.L.P (microscopio óptico de luz polarizada), fotomicrografía tomada a 20x. Barra de escala 40um.*

TINCIÓN DE ROJO PICROSIRIUS



TINCIÓN DE ROJO PICROSIRIUS



**Anexo 15. Área inmunorreactiva de Microglías/Macrófagos -CD68 en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección**

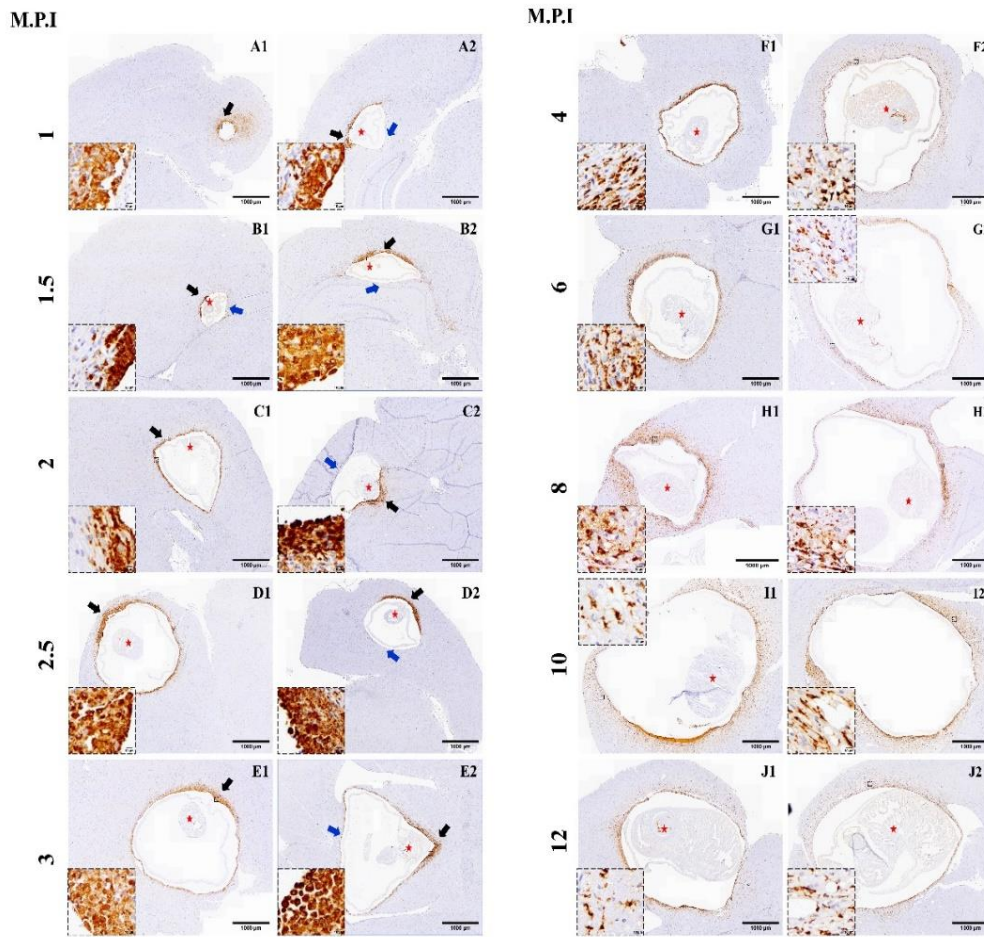
Comparación de la inmunoreactividad de microglías/macrófagos (CD68) en diferentes tiempos post-infección									
Meses (meses)	Porcentaje de área inmunorreactiva alrededor del quise				Controles				Man-W (p-value)
	Infectado	±	SEM	#cerebros (# quistes)	Control	±	SEM	#cerebros control (#secciones)	
1 mes	7.325	±	1.329	17(28)	0.075	±	0.019	4(16)	0.0015
1.5 meses	3.768	±	1.362	12(19)	0.068	±	0.045	4(16)	0.0025
2 meses	2.777	±	0.548	17(28)	0.03	±	0.015	4(16)	0.0014
2.5 meses	3.512	±	0.851	20(41)	0.033	±	0.009	4(16)	0.0011
3 meses	3.363	±	0.769	20(31)	0.03	±	0.015	3(12)	0.0117
4 meses	3.567	±	0.538	17(27)	0.035	±	0.019	4(16)	0.0026
6 meses	3.854	±	0.454	20(34)	0.025	±	0.009	4(16)	0.0013
8 meses	3.671	±	0.904	15(26)	0.033	±	0.012	3(12)	0.0055
10 meses	5.085	±	0.660	12(20)	0.02	±	0.01	4(16)	0.0062
12 meses	5.307	±	0.674	20(35)	0.03	±	0.011	4(16)	0.0063

## Anexo 16. Área inmunorreactiva de astrocitos - GFAP en cerebros de ratas en diferentes tiempos post-infección

Comparación de la inmunoreactividad de Astrocitos (GFAP) en diferentes tiempos post-infección									
Grupo (meses)	Porcentaje de área inmunoreactividad alrededor del quiste				Controles				Man – W (p – value)
	Infectado	±	SEM	#Cerebros (#quistes)	Control	±	SEM	#Cerebros (#secciones)	
1 mes	7.859	±	0.557	17 (28)	2.403	±	0.332	4 (16)	0.0017
1.5 meses	8.243	±	0.699	12 (19)	2.455	±	0.508	4 (16)	0.0025
2 meses	9.061	±	0.702	17 (28)	2.07	±	0.403	4 (16)	0.0014
2.5 meses	8.638	±	0.479	20 (41)	2.783	±	0.120	4 (16)	0.0010
3 meses	8.278	±	0.483	20 (31)	2.500	±	0.304	3 (12)	0.0047
4 meses	9.521	±	0.624	17 (27)	3.788	±	0.491	4 (16)	0.0060
6 meses	9.463	±	0.524	20 (34)	2.778	±	0.503	4 (16)	0.0014
8 meses	10.574	±	0.755	15 (26)	4.033	±	1.500	3 (12)	0.0146
10 meses	7.731	±	0.607	12 (20)	2.818	±	0.153	4 (16)	0.0053
12 meses	8.237	±	0.540	20 (35)	2.495	±	0.309	4 (16)	0.0012



**MICROGLÍAS/MACRÓFAGOS EN CEREBROS DE RATAS CON  
NEUROCISTICERCOSIS EN LOS DIFERENTES TIEMPOS POST- INFECCIÓN -  
QUISTE PARENQUIMALES**



**Anexo 17. Inmunorreactividad de microglías/macrófagos – CD68 en quistes parenquimales para los diferentes tiempos post-infección. A-E:** inmunorreactividad focalizada alrededor del escólex (flecha negra), reactividad escasa o ausente (flecha azul). **F-J:** inmunorreactividad alrededor de todo el quiste y de manera homogénea, con mayor distribución alrededor del quiste independiente de la ubicación del escólex. El recuadro pequeño representa un aumento del área seleccionada de la inmunorreactividad para CD68 y representa cómo cambian distribución la morfología de las microglías/macrófagos a través del tiempo post-infección. **Panel A-J:** quiste de un mes post-infección hasta los 12 meses post-infección. Estrella negra: escólex, flecha negra: alta reactividad alrededor del escólex, flecha azul: poca o ausencia de la reactividad alrededor del quiste. Escala de barra 1000um; escala de barra de la foto más pequeña 10um.