

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía

“Alberto Cazorla Talleri”



TÍTULO:

**Detección de autofagia en neuronas y células gliales en ratas con
Neurocisticercosis**

Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología

TESISTAS:

Dina Luz Patilla Chihuan

Dina María Alondra Ramírez Cubas

ASESORA:

PhD. Manuela Renee Verástegui Pimentel

LIMA-PERÚ

2021

Dedicatoria

De Dina María Alondra Ramírez Cubas

A mi Nona, por dejarme los mejores recuerdos de mi niñez.

A mi abuelo Tomás, por su eterna humanidad.

Y para aquellos que buscan la antorcha que ilumina el mundo, para ustedes.

De Dina Luz Patilla Chihuan

A mis padres, por el amor, valores y enseñanzas brindados.

A mis hermanos, por ser parte de mi desarrollo personal y profesional.

Y a todos mis amigos que me acompañaron en este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Quisiéramos aprovechar esta sección para extender nuestro más profundo agradecimiento a las muchas partes involucradas que hicieron posible la ejecución de este proyecto y nos permitieron desarrollar nuestras capacidades.

En primera instancia a PRONABEC (Beca 18) por brindarnos la oportunidad de superación a jóvenes con diferentes situaciones y habilidades; y abrirnos las puertas hacia, ahora, nuestra alma mater la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

A la Dra. Manuela Verástegui quien ha sido nuestra guía en esta travesía, y nos dio la oportunidad de desenvolvemos en el campo de la investigación científica.

Al equipo del laboratorio de investigación de enfermedades infecciosas (LIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia de quienes aprendimos, sobre todo, el valor de la amistad y el verdadero significado del compañerismo.

Finalmente, a nuestras familias por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1. Neurocisticercosis en Modelo de Rata	13
2.2. Autofagia	16
2.2.1. Detección de la autofagia y biomarcadores	19
2.2.1.1. Beclin-1	20
2.2.1.2. LC3B	21
2.2.1.3. P62	23
2.2.2. Autofagia en SNC	23
2.2.3. Autofagia y Neuroinflamación	27
III. HIPÓTESIS	28
IV. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo general	28
4.2. Objetivos específicos	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Muestras de Cerebro de rata	29
5.2. Tamaño De muestra	30
5.3. Análisis Histopatológico	31
5.4. Anticuerpos primarios	32
5.5. Inmunohistoquímica	32
5.6. Inmunofluorescencia	33
5.6.1. Control positivo de autofagia inducidas por inanición en líneas celulares HCT8	33
5.6.2. Inmunofluorescencia en cerebros de ratas	34
5.7. Estadística	36
VI. RESULTADOS	36
6.1. Inmunoreactividad del marcador LC3B	37
6.2. Inmunoreactividad del marcador Beclin-1	38

6.3.	Inmunoreactividad del marcador P62	39
6.4.	Expresión constitutiva de LC3B en cerebros de ratas sin NCC	40
6.5.	Expresión de LC3B en cerebros de ratas con NCC en una región lejana y cercana al cisticerco	41
6.6.	Colocalización del marcador LC3B con grupos celulares (astrocitos, microglías y neuronas) y p62	42
VII.	DISCUSIÓN	45
VIII.	CONCLUSIONES	53
IX.	ANEXOS	54
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
Figura 1: Tinción de Hematoxilina y Eosina para cerebro de ratas con Neurocisticercosis (NCC)	14
Figura 2: Tejido cerebral de rata infectada experimentalmente con <i>Taenia solium</i>	15
Figura 3: Representación gráfica de una región cercana al cisticerco en cerebro de rata con NCC	16
Figura 4: Ilustración breve de la autofagia	17
Figura 5: Dinámica molecular de la autofagia	18
Figura 6: Beclin-1 y autofagia	21
Figura 7: LC3B y p62 en autofagia	22
Figura 8: Características de la autofagia neuronal	25
Figura 9: Tinción inmunofluorescente para LC3B en células HCT8	34
Figura 10: Inmunoreactividad para la proteína LC3B	37
Figura 11: Inmunoreactividad para la proteína Beclin-1	38
Figura 12: Inmunoreactividad para la proteína p62/SQSTM1	39
Figura 13: Inmunofluorescencia de LC3B en cerebros de ratas no infectadas en corteza (A), cuerpo estriado (striatum) (B) y cerebelo (C)	41
Figura 14: Inmunofluorescencia de LC3B en dos regiones de corteza del cerebro de rata con NCC	42
Figura 15: Colocalización del marcador de autofagosomas LC3B en células neuronales y gliales	44
Figura 16: Modelo esquemático propuesto para autofagia en NCC	49

ÍNDICE DE ANEXOS

	<i>Página</i>
ANEXO 1: Lista de anticuerpos utilizados	54
ANEXO 2: Protocolo de estandarización del marcador LC3-B, Beclin-1 y p62 para Inmunohistoquímica	55
ANEXO 3: Protocolo de estandarización del marcador LC3-B y p62 para Inmunofluorescencia	56
ANEXO 4: Protocolo de estandarización de los marcadores NeuN, GFAP, IBA-1 y NF para Inmunofluorescencia	57
ANEXO 5: Tabla de distribución del número de ratas y quistes según sexo	58
ANEXO 6: Tabla de comparaciones múltiples de Dunn's para el marcador LC3B en inmunohistoquímica	59
ANEXO 7: Tabla de comparaciones múltiples de Dunn's para el marcador Beclin-1 en inmunohistoquímica	60
ANEXO 8: Tabla de comparaciones múltiples de Dunn's para el marcador p62 en inmunohistoquímica	61
ANEXO 9: Tabla de Estadística Descriptiva para el marcador LC3B en inmunohistoquímica	62
ANEXO 10: Tabla de Estadística Descriptiva para el marcador Beclin-1 en inmunohistoquímica	63
ANEXO 11: Tabla de Estadística Descriptiva para el marcador p62 en inmunohistoquímica	64
ANEXO 12: Porcentaje de colocalización en cebreros de ratas controles, infectadas y tratadas	65
ANEXO 13: Imágenes de estandarización de LC3B, Beclin-1, p62 y NF en Inmunohistoquímica	66
ANEXO 14: Imágenes de Histopatología en modelo de rata con NCC	67
ANEXO 15: Imágenes de Colocalización LC3B con NeuN, NF y GFAP en una región cercana y lejana al cisticerco.	68

RESUMEN

La Neurocisticercosis (NCC) es una infección helmíntica que afecta al sistema nervioso central (SNC) causada por la forma larvaria (cisticerco) de *Taenia solium*. Es una enfermedad pleomórfica y aunque se han realizado numerosos estudios para comprender los eventos implicados en NCC, estos son difíciles de estudiar en humanos y siguen siendo un reto de investigación. Ante ello, el uso de modelos animales ha permitido comprender parcialmente la patogénesis de NCC. Así, se ha reportado, isquemia, disfunción de la barrera hematoencefálica, angiogénesis, muerte celular y neuroinflamación. Esto último puede agravarse con el tratamiento antiparasitario debido a la degeneración y muerte del parásito, producto de la liberación descontrolada de antígenos excretorios-secretorios del cisticerco. La autofagia juega un papel fundamental en las decisiones tanto de muerte como de supervivencia en neuroinflamación y además constituye una defensa crítica contra muchas infecciones y estados degenerativos. La neuroinflamación puede causar un deterioro autofágico, lo que a su vez podría provocar daño neuronal como se ha descrito en trastornos neurodegenerativos. Sin embargo, en NCC no se ha descrito ni caracterizado la autofagia. Por lo tanto, en este estudio se plantea evaluar la presencia de este importante proceso homeostático en neuronas y células gliales de ratas infectadas con NCC mediante las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Para ello, se usarán tres biomarcadores de autofagia Beclin-1, LC3B, implicadas en la formación del complejo autofagosómico y p62, en la degradación autofágica. La comprensión de los mecanismos que subyacen a la autofagia en las neuronas y glías podría ser útil para buscar nuevos tratamientos efectivos para la NCC.

Palabras clave: Neurocisticercosis, autofagia, Beclin-1, LC3B y p62.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a helminthic infection affecting the central nervous system (CNS) caused by the larval (cysticercus) form of *Taenia solium*. It is a pleomorphic disease; due to the diversity of the clinical picture. Although numerous studies have been conducted to understand the events involved in NCC, these are difficult to study in humans and remain a research challenge. Given this, the use of animal models has partially understood the pathogenesis of NCC. Thus, ischemia, blood-brain barrier dysfunction, angiogenesis, cell death, and neuroinflammation have been reported. The latter can be aggravated by antiparasitic treatment due to the degeneration and death of the parasite, product of the uncontrolled release of excretory-secretory antigens from the cysticercus. A vital arbiter of both death and survival decisions in neuroinflammation is autophagy, which is also a critical defense against many infections and degenerative states. Neuroinflammation can cause autophagic impairment, which in turn could lead to neuronal damage as has been described in neurodegenerative disorders. However, autophagy has not been described or characterized in NCC. Therefore, in this study it is proposed to evaluate the presence of this important homeostatic process in neurons and glial cells of rats infected with NCC using immunofluorescence and immunohistochemistry techniques. For this, three Beclin-1 autophagy biomarkers, LC3B, involved in the formation of the autophagosomal complex and p62, in autophagic degradation will be used. Understanding the mechanisms underlying autophagy in neurons and glia could be helpful in finding new effective treatments for NCC.

Keywords: Neurocysticercosis, autophagy, Beclin-1, LC3B y p62

I. INTRODUCCIÓN

La Neurocisticercosis (NCC) es una infección neurológica causada por la etapa larvaria (cisticerco) del cestodo *Taenia solium*. Este parásito involucra dos hospederos en su ciclo de vida: los humanos y los cerdos (1, 2,3). La NCC se da cuando el humano se convierte en hospedero intermediario accidental mediante la ingesta de huevos de *Taenia solium*, los cuales llegan hasta el estómago donde eclosionan liberando la forma embrionaria conocida como oncósfera (4,5). Las oncósferas atraviesan el tracto gastrointestinal y migran a través de los vasos sanguíneos hasta distintos órganos como el músculo estriado, el tejido subcutáneo y las órbitas, pero con una notable y desconocida predilección por el cerebro. En el cerebro, al hallar un vaso terminal las oncósferas se establecen, y desarrolla el cisticerco o quiste el cual está formado por una membrana vesicular que contiene un escólex invaginado (4, 6,7). La neurocisticercosis constituye un problema de salud pública en las regiones endémicas (21). Según la OMS aproximadamente 50 millones de personas en el mundo tienen epilepsia, siendo NCC responsable de aproximadamente el 30% de los casos de epilepsia en países endémicos y alrededor del 3% a nivel mundial (22,23). En el Perú la NCC es un problema de salud pública, debido a la alta prevalencia con una tasa del 10 % al 12 % en las zonas rurales (26, 27,28).

El cuadro clínico de NCC tiene un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas que pueden ir desde una infección asintomática hasta la muerte (15, 30). Esta heterogeneidad clínica depende de diversos factores como la localización, el número, la etapa de evolución y viabilidad de los parásitos, así como del sexo, la edad y la reacción inflamatoria del huésped. La localización de los cisticercos se clasifica en parenquimales, que se presentan con cuadros de epilepsia acompañados de convulsiones recurrentes como manifestación principal; y extraparenquimales acompañado de hidrocefalia, meningitis y ventriculitis, que en la mayoría de los pacientes sus pronósticos suelen ser mortales si no se logra recibir tratamiento a tiempo (12, 13, 31).

Además de la localización del parásito, la respuesta inflamatoria es el principal fenómeno responsable de la sintomatología (11,15). Sin embargo, las personas infectadas con NCC pueden permanecer asintomáticas durante períodos prolongados, un fenómeno que está relacionado con la evasión inmunitaria iniciada por cisticercos viables. Esta evasión consiste en: el enmascaramiento de los antígenos del cisticerco por las inmunoglobulinas del hospedero, el bloqueo del sistema del complemento mediante la liberación de antígenos como la taeniastatina y la paramiosina, la secreción de cisteína proteasas, metaloproteasas y serina proteasas que degradan las inmunoglobulinas del huésped e interfieren con la proliferación de linfocitos (15,16,17). Los cisticercos viables pueden sobrevivir durante años o incluso décadas con síntomas neurológicos intermitentes, esto les permite permanecer sin ser detectados en el cuerpo durante un periodo de tiempo indefinido (29).

En la actualidad existe una falta de conocimiento sobre los mecanismos de infección, el desarrollo del cisticerco, la activación de la respuesta inmune y la patogénesis de la NCC, los cuales siguen siendo un reto en investigación (8,31). Ante ello, el uso de modelos animales (roedores, cerdos y monos) es una alternativa que permite comprender la patogénesis de NCC (15). Los estudios patológicos usando modelos animales reportaron isquemia, disfunción de la barrera hematoencefálica, cambios espongióticos, angiogénesis, presencia de infiltrados celulares y gliosis. Asimismo, daño neuronal donde se observó hinchazón axonal o esferoides en el parénquima cerebral que rodea a los cisticercos (15-18). La neuroinflamación juega un papel clave en NCC y puede agravarse con la administración del tratamiento farmacológico antiparasitario debido a la degeneración y muerte del parásito. Estos eventos incrementan la respuesta inflamatoria perilesional en el hospedero mediante mecanismos como gliosis, infiltrado celular, cápsula fibrosa producto de la liberación descontrolada de antígenos del cisticerco (37, 61).

A nivel de SNC los eventos inflamatorios comienzan con la activación de microglías y astrocitos residentes que son estimulados por neuronas lesionadas o moléculas propias del parásito (74). En NCC estas moléculas con potencial inmunogénico son: el líquido

vesicular del quiste, los antígenos del tegumento y productos excretorios-secretorios del cisticerco (17). Por otro lado, Las células gliales activadas, a su vez, liberan varios mediadores como INF- γ , IL-12, IL-1 β que pueden actuar de manera autocrina/paracrina y se dirigen a neuronas y oligodendrocitos transeúntes (114). Sin embargo, la respuesta neuroinflamatoria varía entre cada tipo de célula y pueden incluir perpetuar la liberación del mediador inflamatorio, alterar la función de la célula diana e incluso inducir la muerte celular (74, 84). La autofagia juega un papel fundamental en las decisiones de muerte y supervivencia celular en neuroinflamación, que además constituye una defensa crítica contra muchas infecciones y estados degenerativos (44,63-65). Se debe tener en consideración que estos eventos de muerte celular provocados por autofagia han sido reportados en trastornos neoplásicos, neurodegenerativos, infecciosos, traumáticos, isquémicos, metabólicos y desmielinizantes (54, 85, 92, 93, 97).

En los últimos años, los hallazgos *in vivo* como *in vitro* demostraron que la autofagia tiene efectos importantes en la inducción de la reacción inflamatoria en el SNC (74, 80, 82) y además la evidencia sugiere que la disfunción de dicha autofagia causa la acumulación de proteínas anormales y/o orgánulos dañados. Esta acumulación se ha relacionado con la disfunción sináptica sobre todo en estructuras únicas de axones y dendritas que particularmente son más vulnerables a estos eventos (64,68). Numerosos reportes evidencian que en NCC la neuroinflamación puede causar la acumulación focal de estos agregados llenos de orgánulos y citoesqueleto alterado conocidos como esferoides, que preceden de una degeneración axonal (94). Coincidentemente uno de los principales mecanismos catabólicos para la depuración de estos acúmulos proteicos resulta ser la autofagia. Por lo tanto, dado los alcances de las funciones de la autofagia en la inflamación, la inmunidad y la neurodegeneración, nos preguntamos si la presencia de cisticercos alojados en cerebros de ratas desencadenaría un efecto significativo en la autofagia y qué poblaciones celulares están siendo afectadas (astrocitos, microglías y/o neuronas) en comparación con cerebros sanos.

Para probar esta hipótesis, evaluamos mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la presencia de biomarcadores implicados en las etapas del flujo

autofágico en el tejido cerebral de ratas con NCC. Beclin-1, proteína involucrada en la formación del fagóforo. LC3B, proteína localizada interna y externamente en las membranas de los autofagosomas, las cuales son el estándar de oro para la cuantificación de autofagia en células de mamíferos (61,73). Por último, p62/SQSTM1 para evaluar la degradación autofágica (62). Cabe resaltar que el estudio realizado es netamente exploratorio por la complejidad de vías involucradas en los procesos celulares regulados por autofagia.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Neurocisticercosis en Modelo de Rata

Existe un gran desafío al momento de explorar y comprender los procesos celulares y moleculares que subyacen en la progresión de NCC, debido a la gran variabilidad en la presentación de la patología, cuadros asintomáticos, localización, etc. (15,16, 17). Ante ello, los modelos animales de NCC ofrecen el potencial de superar muchas de estas limitaciones: permiten la infección experimental de animales en un ambiente controlado y el estudio de la progresión de la enfermedad con y sin intervenciones de tratamiento. Facilitan los estudios longitudinales, ya que el curso temporal de la enfermedad, especialmente en animales pequeños, es mucho más corto y puede acelerarse experimentalmente. Lo más importante es que los modelos animales permiten un acceso sin restricciones al tejido cerebral y al líquido cefalorraquídeo, lo que permite una exploración celular y molecular más extensa. Los principales modelos animales comprenden ratones, ratas, cobayas, perros, gatos y cerdos (21, 116).

En consecuencia con lo anteriormente mencionado, diferentes grupos de estudios desarrollaron diferentes modelos animales (16, 27). Dentro de los cuales se resalta el modelo animal de rata desarrollado por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo del LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú en el año 2015. Este es un modelo novedoso y viable de

Neurocisticercosis en ratas utilizando una infección intracraneal con oncósferas activadas de *T. solium*. La edad de la rata y la carga de parásitos son cruciales para el éxito de la infección debido a la madurez de la respuesta inmune en este modelo animal (15,16).

Al igual que en los humanos, las oncósferas activadas invaden con éxito las regiones parenquimatosa y extraparenquimatosa del cerebro, en la Figura 1 se observa las diferentes localizaciones de los cisticercos en el cerebro de rata.



Figura 1: Tinción de Hematoxilina y Eosina para cerebro de ratas con Neurocisticercosis. (A) cisticercos (flecha) ubicado en el tejido parenquimatosa en las proximidades de la corteza. (B) cisticercos (flecha) ubicado en el espacio submeníngeo que comprende la corteza cerebral. (C) cisticercos localizado en el ventrículo lateral (VI) (15).

Asimismo, se pueden evaluar los cambios que se llevan a cabo alrededor del cisticercos gracias a las múltiples técnicas histopatológicas. Se conoce que, los quistes una vez ubicados en el cerebro del hospedero presentan múltiples características patológicas incluyendo tejido fibrótico alrededor de este, con notables fibras densas de colágeno y gran número de fibroblastos (15, 41). Además de ruptura de la barrera hematoencefálica, células infiltradas inflamatorias, infiltrado perivascular, angiogénesis y vacuolización del neuropilo conocido como cambio espongiótico que son espacios llenos de líquido en el tejido parenquimal que rodea un cisticercos (15, 18). Los cambios esponjosos llegan hasta 600 micras desde el borde de los cisticercos, extendiéndose más

allá de la zona de gliosis e inflamación. La Figura 2 muestra los principales eventos alrededor del cisticerco.

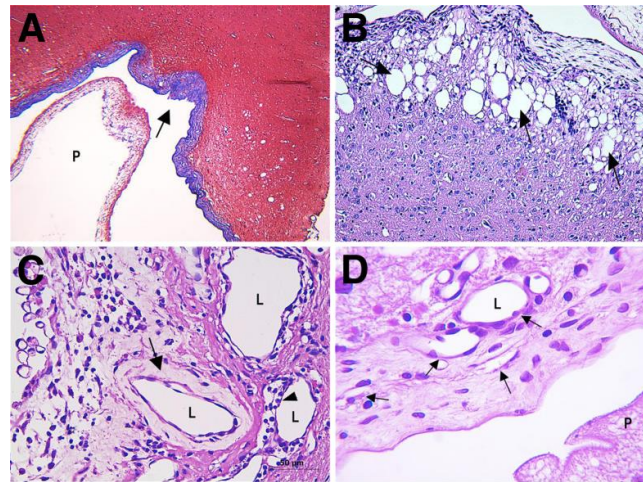


Figura 2: Tejido cerebral de rata infectada experimentalmente con *Taenia solium*

A: Tinción tricrómica de Masson que identifica la capa de colágeno (azul). cambio esponjoso; las flechas indican la vacuolización del neuropilo en el tejido cerebral que rodea al quiste. (C) la flecha indica las paredes engrosadas de los vasos sanguíneos pequeños y la punta de la flecha indica el infiltrado perivascular, evento relacionado con la disfunción de la barrera hematoencefálica. **D:** Las flechas indican angiogénesis con pequeños vasos sanguíneos que se extienden hacia el tejido fibrótico.

Otro hallazgo significativo fue la detección de hinchazones axonales en forma de esferoides en áreas que rodean a los cisticercos. Los esferoides se definen como inflamaciones focalizadas de un axón con un diámetro promedio de 20 micras, y varicosidades si son más pequeñas (94, 95). En la mayoría de casos están llenos de orgánulos y citoesqueleto dañado. Además, suelen encontrarse en áreas de gliosis y cambios esponjosos cercanos característicos del tejido alrededor del cisticerco (Figura 3). Particularmente, los esferoides están emergiendo como un hallazgo importante en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica, encefalopatías metabólicas, esclerosis múltiple y otras enfermedades desmielinizantes relacionadas con la degeneración axonal (94,95). Esto, respalda la probabilidad de vías comunes compartidas en la degeneración axonal de NCC con estas enfermedades.

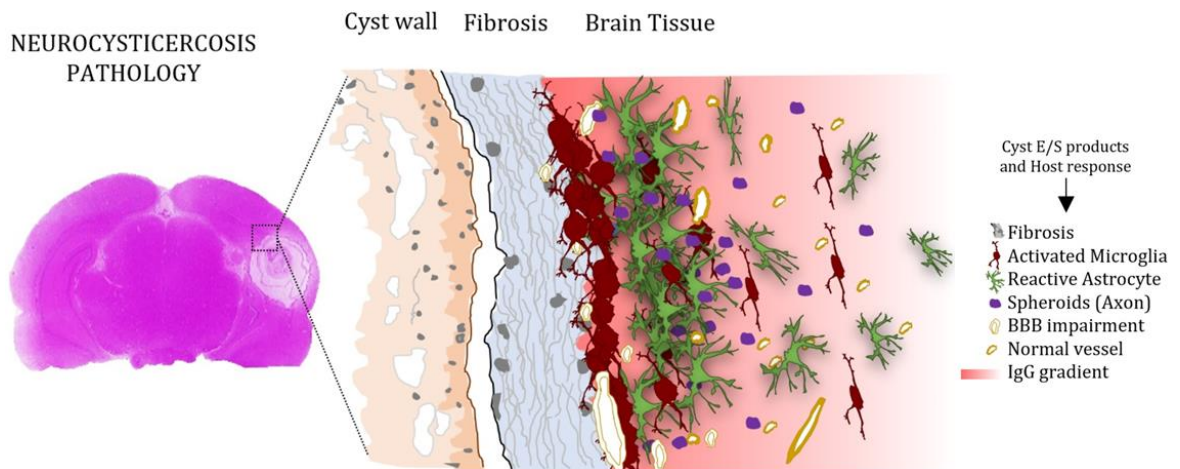


Figura 3: Representación gráfica de una región cercana al cisticerco en cerebro de rata con NCC. Nótese la formación de esferoides que coinciden con las áreas de mayor gliosis y cambios esponjosos (18).

Además de los beneficios en el campo histológico este modelo nos permite, a bajo costo, explorar y probar diferentes fármacos y esquemas de tratamientos. En la actualidad, un estudio que comparó dos tratamientos antihelmínticos (Albendazol - Praziquantel y Oxfendazol - Praziquantel) en ratas con neurocisticercosis, demostró que el tratamiento más efectivo fue la administración de dos dosis diarias 100 mg/Kg Oxfendazol (OXF) con 100 mg/Kg Praziquantel (PZQ) por 7 días generando un mayor daño a los cisticercosis (41).

2.2 Autofagia

La autofagia es un proceso celular altamente conservado, ubicuo y basal en todas las células eucariotas que mantiene la homeostasis en respuesta al estrés celular (112,113). La homeostasis celular se controla equilibrando procesos de degradación lisosómica y reciclaje celular de componentes intracelulares, incluidas las proteínas solubles, proteínas agregadas, orgánulos dañados, complejos macromoleculares y patógenos. La autofagia se caracteriza por envolver estos componentes en unas vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas, estructuras que además son el estándar de oro para la cuantificación de autofagia en células de mamíferos (Figura 4) (44,45, 46).

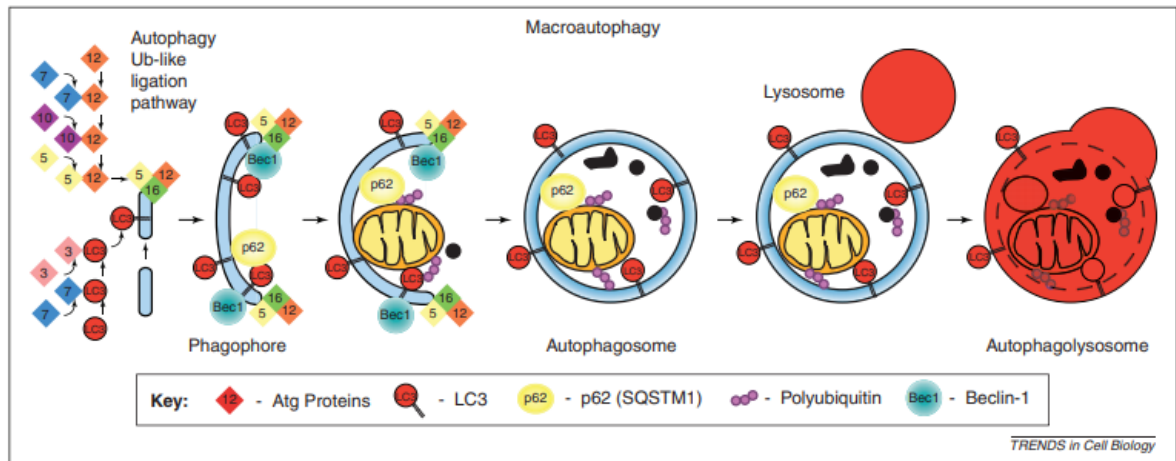


Figura 4: Ilustración breve de la autofagia. El proceso autofágico comienza con la formación del fagóforo, seguido de su elongación y cierre para formar el autofagosoma que luego se fusiona con los lisosomas, lo que resulta en la degradación del contenido (flujo autofágico) (115).

A nivel molecular, la formación de fagóforos o nucleación es el primer paso en el proceso autofágico y se inicia mediante el alargamiento de las membranas pre-autofagosomales al incorporar fosfolípidos desde diversas fuentes como el retículo endoplasmático, los endosomas e incluso las mitocondrias (47). Este evento surge gracias al ensamblaje y la activación entre un complejo de tipo serina-treonina quinasa conocido como ULK, y su interacción con un complejo multiproteico clase III con actividad fosfatidilinositol 3-quinasa llamado PI3K-III. Éste último contiene Beclin-1 (BECN1) y una subunidad catalítica de fosfatidilinositol 3-quinasa tipo 3 (PIK3C3); conocida como VPS34, que produce fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), componente intrínseco para la inducción y expansión de las membranas autofagosomales. La red de interacción Beclin-1, Vps34 y VSP15 es crítica para la regulación de la autofagia y por lo tanto, es esencial para la integridad celular (48,49). El siguiente paso conocido como alargamiento autofagosomal, comienza cuando el complejo PI3K-III recluta dos sistemas de conjugación, interrelacionados, de tipo ubiquitina: el primero implica la formación del complejo Atg5-Atg12 (Atg, genes relacionados con la autofagia) donde Atg 12 se activa por las acciones de la enzima activadora de ubiquitina E1, Atg 7. Luego Atg 12 se transfiere a proteína portadora de ubiquitina similar a E2, Atg10 y se une

covalentemente a una lisina interna de la proteína Atg 5. El segundo complejo implica la conversión de la forma soluble de LC3 o Atg8 a la forma asociada a la membrana autofagosomal LC3B o LC3-II después de la conjugación con fosfatidiletanolamina (PE) a través de su escisión proteolítica a cargo de Atg4, Atg7, y la enzima similar a E2, Atg3 (50,51). Después del cierre del autofagosoma, este se fusiona con los lisosomas a través de uniones tipo SNARE (receptores de proteínas de fijación soluble del factor sensible a la N-etilmaleimida) para degradar su contenido gracias a la actividad proteolítica de las enzimas lisosómicas (Figura 5). A estos últimos pasos se les conoce como fusión y degradación autofágica mediada por p62 que funciona anclando las proteínas ubiquitinadas a la membrana del autofagosoma, promoviendo la degradación de moléculas no deseadas. P62 o Sequestosome 1 (SQSTM1), es una proteína celular expresada de forma ubicua que sirve como un adaptador de carga autofágica, por ello se puede usar para monitorear la degradación autofágica. Funciona como una proteína de anclaje entre la maquinaria autofágica y las proteínas ubiquitinadas. Las proteínas que son ubiquitinadas unidas a p62 se incorporan al autofagosoma para su posterior degradación en los autolisosomas (52,53).

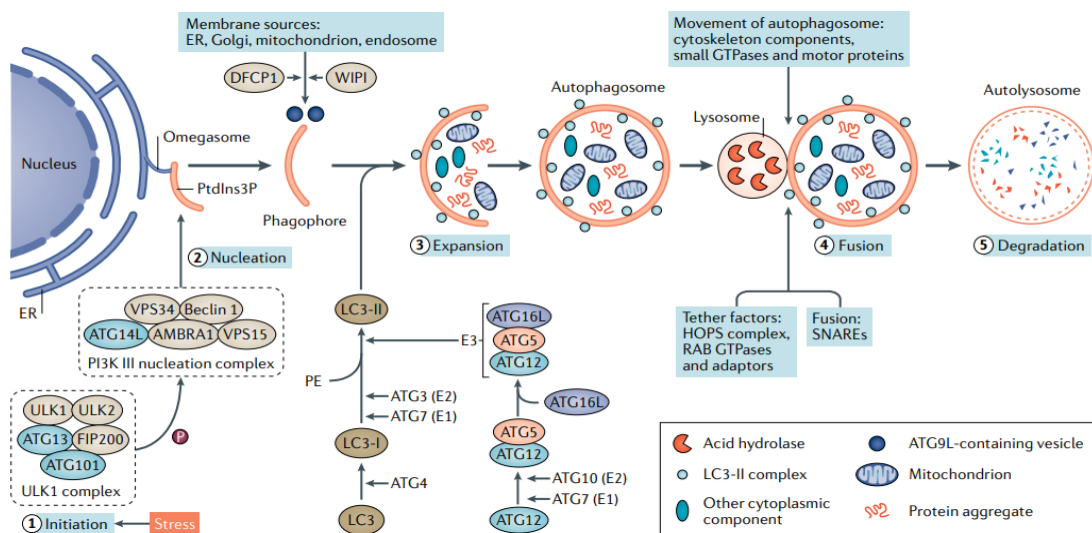


Figura 5: Dinámica molecular de la autofagia. El proceso inicia por el ensamblaje y activación del complejo ULK, y su interacción PI3K-III, que contiene Beclin 1 y VPS34, que produce PI3P, componente intrínseco para la inducción y expansión de las membranas autofagosomales. Luego, el alargamiento autofagosomal comienza cuando el complejo PI3K-III recluta dos sistemas de conjugación: el complejo Atg5- Atg12 y la conversión de la forma soluble de LC3 o Atg8, a la forma asociada a la membrana autofagosomal LC3B.

Después se da el cierre del autofagosoma, el cual se fusiona con lisosomas a través de uniones tipo SNARE para degradar su contenido (116).

2.2.1 Detección de la autofagia y biomarcadores

El monitoreo experimental de la autofagia es complejo, ya que depende de la formación secuencial de estructuras transitorias (fagóforo, autofagosoma y autolisosoma), proceso conocido como flujo autofágico. El Premio Nobel de Fisiología o Medicina 2016, Yoshinori Ohsumi, abordó este problema mediante el estudio de la autofagia en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* sometidas a inanición por microscopía electrónica de transmisión (TEM) identificando los genes ATG, los cuales han revolucionado por completo la investigación de la autofagia (117,118). Además, Ohsumi junto con su colega el Dr. Mizushima evaluaron la progresión de la autofagia en mamíferos mediante el uso de un ratón transgénico LC3 etiquetado con GFP, lo que permitió realizar el seguimiento por medio de la microscopía de fluorescencia in vivo y la visualización del autofagosoma (56, 96,112, 113,119). Por otro lado, algunos autores señalan que pese a que la TEM es considerada el método preferido, porque tiene la ventaja de permitir una evaluación directa de los autofagosomas en las células cultivadas y de animales, también presenta algunas limitaciones como por ejemplo: interpretar imágenes TEM es bastante subjetivo y puede ser difícil distinguir autofagosomas de lisosomas, endosomas u otras estructuras en la célula, la detección de autofagia en tejido inflamado por TEM es aún más problemática (119). Algunas células inflamatorias, como los monocitos y los macrófagos, tienen un fuerte potencial fagocítico, lo que dificulta determinar mediante TEM si las vacuolas en su citoplasma son el resultado de autofagia o un mecanismo subyacente (56, 60). Además, debido a que la TEM lleva mucho tiempo y no es adecuada para la rutina diaria, muchos grupos intentan identificar la autofagia en el tejido mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia convencional (121).

En animales, la detección de este flujo puede evaluarse utilizando LC3B y p62 como indicadores (56, 120, 121). LC3B es actualmente el marcador de autofagosoma más utilizado porque la cantidad de LC3B refleja el número de autofagosomas. Además, para evaluar la autofagia es esencial determinar cuánto LC3B se degrada esto es posible gracias al marcador de degradación p62, también llamado Sequestosome 1 (SQSTM1),

utilizado ampliamente para controlar la actividad autofágica, ya que p62 se une directamente a LC3B y es degradado selectivamente por autofagia (54 , 55 , 56, 121). Incluso, la acumulación de p62 se encuentra entre las características más conocidas de los tejidos deficientes en autofagia y puede visualizarse mediante inmunohistoquímica al igual del LC3B (121,120).

Otros métodos utilizados en animales son: el uso de ratones GFP-LC3 que expresan GFP-LC3 exógena en todo el cuerpo para controlar la autofagia in vivo, ratones que expresan mRFP-GFP-LC3 (o mCherry-GFP-LC3) y ratones informadores de mitofagia utilizando la sonda mt-mKeima, un compuesto fluorescente que se acumula en endosomas y lisosomas tardíos (121).

El mejor método para detectar la autofagia dependerá de la cuestión y las condiciones experimentales. Dada esta premisa y en base a las muestras evaluadas en este proyecto (tejido cerebrales de ratas) la metodología elegida fue evaluar la autofagia a través de 3 marcadores fundamentales por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, descritos a continuación.

2.2.1.1 Beclin-1

Beclin-1 o Atg 6 es una proteína de aproximadamente 60 kDa y formada por 450 aminoácidos. Se localiza principalmente dentro de las estructuras citoplasmáticas como el retículo endoplasmático, las mitocondrias y la membrana perinuclear (58).

Cumple un rol fundamental durante la inducción de la autofagia, ya que permite la localización de proteínas autofágicas en PAS (Pre-Autophagosomal Structure, por sus siglas en inglés) una estructura pre-autofagosomal que al interactuar con la fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III (PI3KC3), en conjunto con otros cofactores, promueve la formación de un complejo principal entre Beclin-1, VSP34 y VSP15 que finalmente interviene en el proceso de nucleación de vesículas autofágicas (Figura 6) (59).

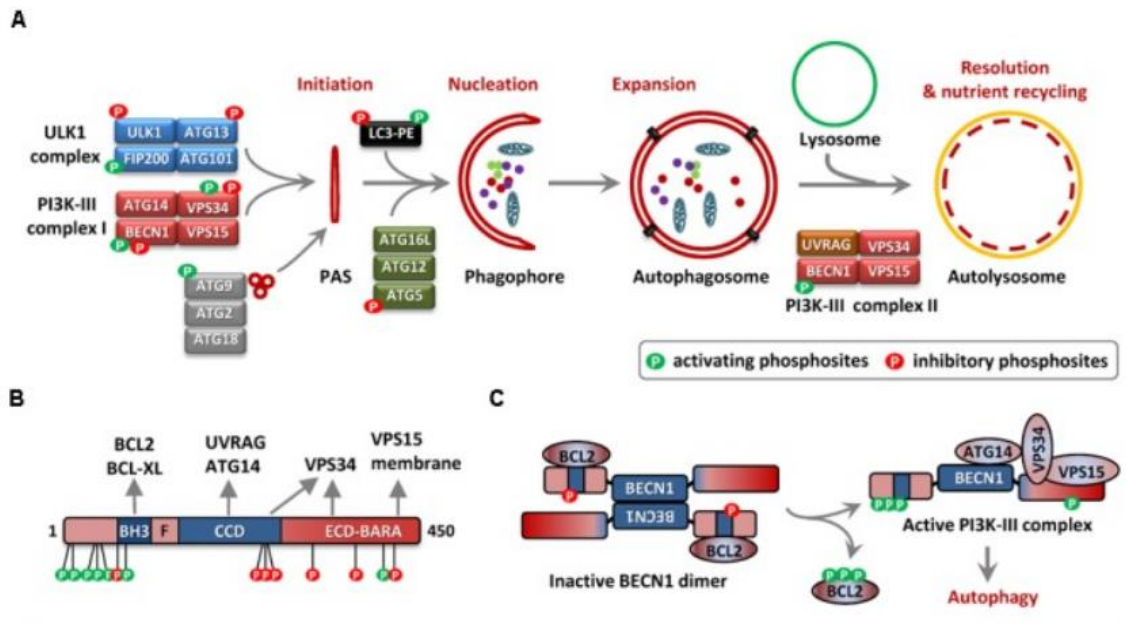


Figura 6. Beclin-1 y autofagia.(A) El esquema describe las fases del flujo autofágico, donde. (B) Muestra la estructura primaria de Beclin-1 o BECN1 que muestra el motivo BH3 de unión a BCL2 / BCL-XL (residuos 105-130), el dominio helicoidal flexible (F, residuos 141-171) y el dominio de la espiral en espiral central (CCD, residuos 175-265). El dominio conservado evolutivo (residuos 248–337) y el dominio relacionado con la autofagia (BARA) repetido β / α (265–450aa). Nótese las ubicaciones de los sitios de fosforilación pro-autofagia (verde) e inhibitoria (rojo). (C) Se representa la conversión dependiente de la fosforilación del homodímero BECN1 inactivo/complejo BCL2 en un complejo PI3K-III activo. La fosforilación del dominio BECN1-BH3 mediada por STK4 (regulador negativo de la autofagia), la triple fosforilación de BCL2 que libera BCL2 de BECN1, eventos de fosforilación representativos en el dominio N-terminal (NTD) que promueven la disociación de BECN1-BCL2 y activan la PI3K se presentan actividades (regulación positiva) (128).

2.2.1.2 LC3B

LC3 tiene 3 isoformas diferentes: LC3A, LC3B y LC3C. LC3-A y LC3-B se denominan LC3-I y LC3-II, respectivamente. Cuando se activa la autofagia, se produce la modificación lipídica de LC3-I (sustrato) uniéndose covalentemente con fosfatidiletanolamina (PE)

generando LC3-II. LC3B Se ha utilizado ampliamente para monitorear la autofagia y se asocia específicamente con todos los tipos de membranas autofágicas, incluidos el fagóforo, el autofagosoma y el autolisosoma (un orgánulo híbrido formado por la fusión del autofagosoma y el lisosoma). Por lo tanto, la cantidad de LC3B se correlaciona bien con el número de autofagosomas, lo que proporciona un buen indicador de autofagia (52, 60, 121).

LC3 se sintetiza inicialmente en una forma no procesada, pro-LC3, que se escinde en su terminal C por ATG4 para formar LC3-I citoplásmica. LC3-I luego se conjuga con PE para convertirse en una forma unida a membrana, LC3B; este paso implica una reacción similar a la ubiquitinación mediada por ATG7 (E1) y ATG3 (E2). LC3B lipidada se une a la membrana interna y externa del autofagosoma, y se degrada después de la fusión con los lisosomas. Por lo tanto, la conversión de LC3 (LC3-I a LC3-II) y la degradación lisosomal de LC3B reflejan la progresión de la autofagia (Figura 7) (48, 49, 61).

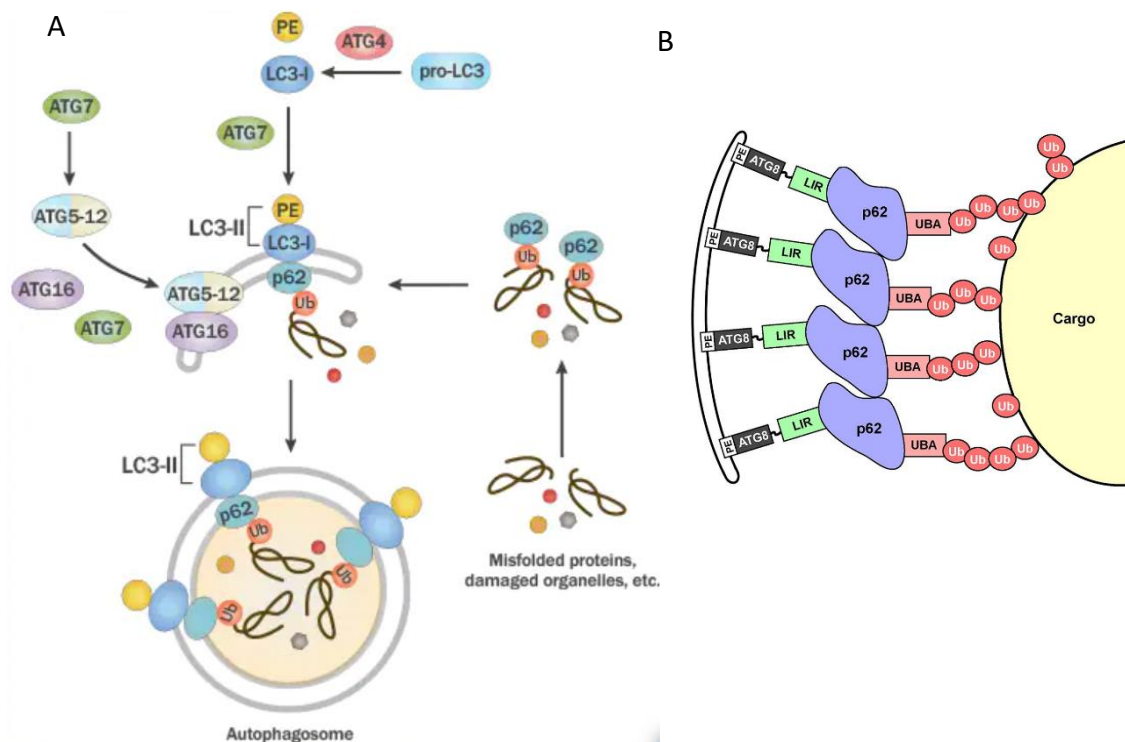


Figura 7. LC3B y p62 en autofagia. (A) Atg4 escinde pro-LC3 para formar LC3-I que luego se conjuga con PE (por Atg7) para la generación de LC3-II (LC3B). Este último se recluta en la membrana autofagósomica para ayudar a la elongación de la membrana. ATG7 también media en la formación del complejo ATG5-ATG12-ATG16 y este último junto

con LC3B es crítico para la formación de autofagosomas. (B) La proteína adaptadora p62/SQSTM1 se une a proteínas ubiquitinadas y a LC3B para mediar en la autofagia la localización de los compartimentos autofágicos, transportando proteínas ubiquitinadas y orgánulos para su degradación (128).

2.2.1.3 p62 o Sequestosome 1

Sequestosome 1 (SQSTM1), es una proteína celular expresada de forma ubicua que sirve como un adaptador de carga autofágica, por ello se puede usar para monitorear el flujo autofágico. p62 posee un dominio de unión a ubiquitina C-terminal (UBA) y una secuencia corta de región denominada LIR responsable de la interacción con LC3. Funciona como una proteína de anclaje entre la maquinaria autofágica y las proteínas ubiquitinadas. Las proteínas que son ubiquitinadas unidas a p62 se incorporan al autofagosoma completo para su posterior degradación en los autolisosomas (Figura 8). Dado que p62 se elimina principalmente por autofagia, su expresión se correlaciona inversamente con la actividad autofágica, ya que la pérdida de genes Atg o factores necesarios para la fusión de autofagosomas con lisosomas resultan en un marcado aumento de agregados positivos para p62. Asimismo, la acumulación de p62 se ha utilizado como marcador para la supresión de la autofagia y, de forma similar, un nivel de p62 reducido indica activación autofágica (Figura 7) (55, 58, 62, 130).

2.2.2 Autofagia en SNC

La autofagia juega un papel esencial en la fisiología y fisiopatología del cerebro. Las neuronas son particularmente dependientes de la autofagia para mantener la homeostasis celular. Sin embargo, las neuronas suelen tener ciertas limitaciones una de estas es que al ser células postmitóticas implica que no pueden eliminar las proteínas dañadas o mal plegadas y orgánulos disfuncionales (basura celular), a través de la división celular, estrategia utilizada por las células mitóticas. Esto quiere decir que la disfunción de la autofagia neuronal generaría una acumulación de proteínas disfuncionales u orgánulos dañados, eventos que suelen ser un sello distintivo de varias enfermedades neurodegenerativas (63, 64, 65). Además, las neuronas también

enfrentan otros desafíos debido a su morfología, ya que son células altamente polarizadas con dos compartimentos morfológicos y bioquímicamente distintos que contienen proteínas específicas, un compartimento somático y axonal. El soma, sede central de la neurona, se considera el sitio principal de síntesis y degradación de proteínas. Por otro lado, el axón transmite información desde otras células imponiendo altas demandas metabólicas (64, 66, 67). Teniendo estas principales limitaciones ¿cómo se coordina la autofagia en cada compartimento de la neurona?

Gracias al uso de marcadores dinámicos como el GFP-LC3B en ratones transgénicos, se conoce que en condiciones basales los autofagosomas se generan preferentemente en el extremo distal del axón. Esta formación, sugerentemente, sea porque el axón terminal es una región rica en actividad, ya que se remodela activamente durante las fases de extensión y retracción durante el crecimiento de las neuronas y como resultado, existe una mayor demanda de reciclaje de membranas y los orgánulos en esta región, lo que podrían hacerla más vulnerable. Por lo tanto, la demanda de autofagosomas en este compartimento se incrementa (68, 69, 123). También se pueden requerir niveles elevados de autofagia en el axón distal para reciclar orgánulos que se distribuyen preferentemente en este compartimento, como es el caso de las mitocondrias más antiguas que residen en mayor proporción en los extremos distales del axón. Esto sugiere que los orgánulos en el axón distal pueden ser más susceptibles al envejecimiento y daño. Por lo tanto, la autofagia elevada puede proporcionar un mecanismo para reciclar las mitocondrias envejecidas y dañadas en la región distal de los axones (69, 123). Un ejemplo que refuerza la alta actividad de la autofagia en los axones distales fue a través del uso de un modelo de ratón de neurodegeneración excitotóxica, donde los autofagosomas se acumularon mayormente en los axones distales de las neuronas de Purkinje (124). Al utilizar un ratón knockout específico de células de Purkinje de *Atg7* se causó la degeneración del axón distal, lo que indica un papel crítico para la autofagia en el mantenimiento de las regiones terminales del axón (123,124).

Una vez formados los autofagosomas se transportan a través de una vía retrógrada hacia el soma. Este movimiento retrógrado, se ha confirmado en ensayos *in vivo* e *in vitro* y requiere de un motor basado en microtúbulos y dineina, la cual es una proteína motora

que impulsa el movimiento de los autofagosomas a través de estos microtúbulos. Una vez que los autofagosomas llegan al soma se fusionan con endosomas y lisosomas tardíos, lo que conduce a autolisosomas cada vez más ácidos y eventualmente capaces de degradación. Sin embargo, el soma no solo abarca los autolisosomas sino que contiene múltiples poblaciones de autofagosomas en diferentes estados de maduración, incluidos los autofagosomas generados localmente (63, 64, 70, 71).

Los lisosomas, también están presentes en el axón, pero carecen del complemento completo de enzimas degradativas que se encuentran en los lisosomas somales. Es probable que a medida que un autofagosoma se transporta retrógradamente a lo largo del axón, pueda fusionarse con lisosomas adicionales y otros competentes. En apoyo de esta posibilidad, bloquear el tráfico retrógrado de autofagosomas es suficiente para bloquear su acidificación y su degradación de cargas engullidas, que por ende conlleva a una autofagia disfuncional o trunca (71, 72, 73).

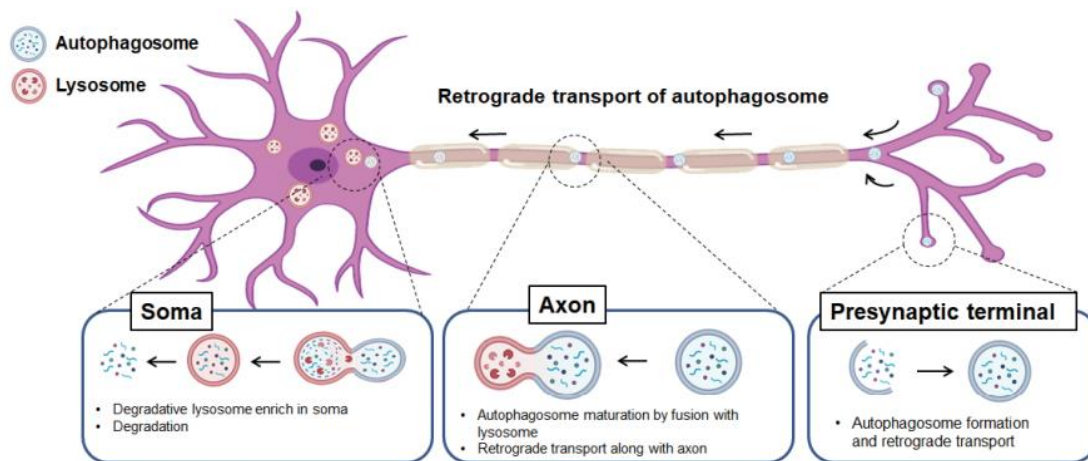


Figura 8: Características de la autofagia neuronal. Autofagia compartimentalizada específica en neuronas. Biogénesis del autofagosoma en las terminales pre sinápticas, maduración del autofagosoma por transporte retrógrado a lo largo del axón y degradación del autofagosoma en el soma (129).

Además de las neuronas, las glías representan un abrumador 80 a 90% de las células del cerebro e influyen en muchos aspectos del desarrollo neuronal, el metabolismo, la función sináptica y la reparación después de una lesión. Se consideran reguladoras clave de la homeostasis neuronal. Las alteraciones en la comunicación neurona-glía están relacionadas con la progresión de enfermedades neurodegenerativas. La implicancia de

la autofagia en la interacción es aún incipiente, una hipótesis muy sugerente es si los autofagosomas se transfieren de las neuronas a la glía o viceversa. Se ha demostrado que los autofagosomas se secretan a partir de células no neuronales lo que plantea la posibilidad de que puedan transportar basura celular entre las células neuronales y gliales del cerebro (65, 66, 74).

A diferencia de las neuronas, las células gliales se replican y responden de manera más robusta a los cambios de nutrientes y, por lo tanto, también pueden demostrar características similares a las células periféricas. Los limitados estudios disponibles indican que las glías, como los astrocitos y los oligodendrocitos, pueden generar una mejor respuesta autofágica en la degradación de las proteínas acumuladas de una manera dependiente e independiente de mTORC1, inhibidor de autofagia, pero la eficacia de esta respuesta no está del todo clara (75,76).

Los subtipos gliales también pueden haber adaptado la autofagia para promover funciones especializadas. Los oligodendrocitos aumentan la mielinización en respuesta a una regulación positiva de la autofagia tanto en modelos mutantes de desmielinización como en animales control. Las células periféricas de Schwann muestran una respuesta similar a la autofagia, asociadas con la regeneración de axones. Estos datos sugieren que la glía puede recuperar membranas y proteínas mediante autofagia para promover eventos mielinizantes (77,78).

Los astrocitos encargados del mantenimiento de la homeostasis cerebral representan varias funciones críticas como el tráfico y reciclaje de neurotransmisores, el metabolismo de nutrientes e iones y la defensa contra el estrés oxidativo. Por ello requieren de un control exhaustivo en la degradación diferencial de proteínas. La actividad del proteosoma se ha informado como el principal proceso degradativo en los astrocitos. A diferencia de las neuronas donde la actividad del proteosoma es menor y la autofagia es mayor (64, 65, 79). Es importante mencionar que los estudios de autofagia en astrocitos se están explorando recientemente, por ello existen muchos vacíos en la información. Sin embargo, se ha reportado formación de autofagosomas frente a la privación de nutrientes en astrocitos cultivados. Asimismo se ha visto que el bloqueo de la autofagia con cloroquina (un fármaco que altera la fusión del

autofagosoma con los lisosomas) exagera la muerte de los astrocitos mediado por autofagia (127).

Existe una estrecha interrelación compartida entre las neuronas y la glía por lo tanto, explorar el papel de la autofagia en cada uno de los componentes celulares del sistema nervioso central, así como en las interacciones entre los diferentes tipos de células, podría ayudar a comprender la base celular de las enfermedades cerebrales y entre estas NCC.

2.2.3 Autofagia y Neuroinflamación

La neuroinflamación puede causar un deterioro autofágico, lo que a su vez podría provocar una degeneración de la neurona en el cerebro medio de ratas con trastornos neurodegenerativos (80,81). La autofagia defectuosa se asocia con afecciones patológicas como las enfermedades degenerativas, la inflamación, las enfermedades infecciosas y el cáncer. En NCC se sugiere que existen mediadores proinflamatorios (IL-1 β) con potencial neurotóxico durante el desarrollo y progresión de la infección (82,83). Estos mismos mediadores como el IL-1 β muestran vínculos estrechos entre la inflamación y la autofagia en el cerebro donde varios informes convergentes mostraron que la autofagia interfiere con la activación del inflamasoma (complejo involucrado en la maduración de IL-1 β) al atacar a los agregados ubicuos de componentes del inflamasoma para su destrucción (84). Además, se ha demostrado que la vía de señalización de NF- κ B está involucrada en la inducción de la autofagia. Por ejemplo, en caso de hipoxia, las células cancerosas epiteliales activan las vías de estrés oxidativo, lo que da como resultado la activación de autofagia. Sin embargo, depende mucho del contexto celular, la duración y la intensidad de la actividad de NF- κ B (86). Por otro lado, se demostró que las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y IFN- γ activan la autofagia bajo estímulos infecciosos. Estos hallazgos muestran más evidencias de que la autofagia tiene efectos importantes en la inducción y modulación de la reacción inflamatoria en enfermedades neurodegenerativas e infecciosas (85,86).

III. HIPÓTESIS

La presencia del cisticerco en cerebros de ratas tratadas y no tratadas farmacológicamente (Oxfendazol-Praziquantel) desencadena la expresión alterada de marcadores de autofagia en neuronas y células gliales en contraste con los cerebros de ratas no infectadas.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de los marcadores de autofagia en cerebros de ratas con NCC (tratada y no tratada) en comparación con cerebros de ratas sanas.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar y comparar la expresión de marcadores de autofagia (LC3B, Beclin-1 y p62) en cerebros de ratas con NCC y cerebros de ratas sanas.
- Evaluar y comparar la expresión de marcadores de autofagia (LC3B, Beclin-1 y p62) en cerebros de ratas con NCC con tratamiento farmacológico (OXF+PZQ 24 horas y OXF+PZQ 2 meses post-tratamiento) y el grupo sin tratamiento.
- Identificar el grupo celular entre neuronas, microglías y astrocitos que expresan el marcador de autofagia LC3B en cerebros de ratas con NCC

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras cerebrales de ratas que se usaron para este estudio fueron proporcionadas por el LID-Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas–Área de Inmunología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las muestras pertenecen a un estudio previo titulado “Tratamiento antiparasitario en un modelo animal de Neurocisticercosis”, código SIDISI 66826 que contó con la aprobación del comité

institucional de ética para el uso de animales (CAR-CIEA-022-2020) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

5.1 Muestras de cerebros de rata de un estudio previo

Se utilizaron los tejidos de cerebro de rata de un estudio previo, en el cual se compararon dos tratamientos antihelmínticos (Albendazol + Praziquantel versus Oxfendazol + Praziquantel) para el modelo animal de rata con NCC. En el estudio previo se evaluaron 70 ratas Holtzman obtenidas del bioterio de animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú) para evaluar la eficacia del tratamiento antihelmíntico. Estas ratas fueron colocadas en un ambiente bajo las mismas condiciones de temperatura y luz controlada, con alimento y agua ad libitum.

Las ratas de 10 - 15 días de nacimiento fueron infectadas con alrededor de 500 oncósferas activadas de *T. solium* vía intracraneal, mientras que a los controles se les inyectaron solamente 100 ul de solución fisiológica salina (15). Luego de 4 meses, una vez que las oncósferas inyectadas se establecieron en el cerebro y desarrollaron cisticercos se les administró tratamiento antihelmíntico praziquantel (PZQ) 100 mg/Kg como suspensión oral de Montana (SANIQUANTEL® 10%) y el oxfendazol (OXF) 100 mg/Kg como suspensión oral de Montana (DEWORMA®10%) durante 7 días en dos dosis diarias, seguidos de 100 mg/Kg de OXF por 8 días. Una vez transcurrido estos periodos las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas a las 24 horas y a los 2 meses post tratamiento, donde se obtuvieron los cerebros de estas por perfusión. Las ratas del grupo sin tratamiento recibieron una solución de 0.5% de carboximetilcelulosa, con Tween-80 al 10% como vehículo con el mismo patrón de administración que las tratadas.

Cuadro 1. Distribución de ratas del estudio previo del ensayo con OXF+PZQ.

Grupos	n° ratas (Estudio Previo)
Controles (Ctrl)	5
Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H)	3
Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M)	5
Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H)	16
Infectados Tratados 24 H (IT 24H)	14

Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M)	14
Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M)	13
Total	70

Los tejidos del cerebro se incrustaron en parafina y se cortaron en secciones coronales de 3 μm de espesor. Las secciones seriales de los cerebros se desparafinaron y rehidrataron para una tinción estándar con hematoxilina y eosina con la finalidad de identificar las características del cisticerco y realizar un análisis histopatológico.

5.2 Tamaño de muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizaron los tejidos de cerebro de rata del estudio previo tomando en consideración los siguientes criterios para homogeneizar el grupo de evaluación: ratas solo con cisticercos parenquimales y con máximo 3 cisticercosis por tejido cerebral, integridad del tejido y conservación del tejido cerebral embebido en parafina. Para evaluar la localización del cisticerco se utilizaron imágenes teñidas con Hematoxilina-Eosina y se observaron al microscopio de campo claro (Anexo 14), luego fueron impresas en papel y se contabilizó la cantidad de cisticercos por cada imagen, se seleccionaron solo las ratas que cumplieran con los criterios mencionados. La integridad de las muestras se definió como material y/o tejido completo e intacto, sin daños externos y almacenados correctamente, resultando un total de 42 ratas acorde con los criterios mencionados.

Cuadro 2: Distribución de ratas de acuerdo a los criterios de valoración y la selección de muestras:

Grupos	n° ratas (Estudio Previo)	Ratas con ≤ 3 quistes parenquimales (n)	Ratas quistes parenquimales + integridad (n)
Controles (Ctrl)	5	5	5
Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H)	3	3	3
Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M)	5	5	5
Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H)	16	7	6
Infectados Tratados 24 H (IT 24H)	14	9	8

Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M)	14	8	8
Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M)	13	8	7
Total	70	45	42
Total de muestra utilizada para análisis = 42			

La selección de las muestras fue por conveniencia, ya que el objetivo del proyecto fue comprobar si se cumplen las hipótesis planteadas inicialmente. Sin embargo, para corroborar el tamaño de la muestra seleccionada se realizó el cálculo en un programa estadístico online “Sample Size Calculator for Comparing Two Independent Means” <http://statulator.com/SampleSize/ss2M.html>

Cuadro 3: Distribución de ratas de controles e infectadas para la evaluación del tamaño de muestra buscado.

Grupos	N° ratas (Estudio Previo)	N° ratas evaluadas
Controles	13	13
Infectados	57	29
Total	70	42

Asumiendo una desviación estándar combinada de 0,4 unidades. El estudio requeriría un tamaño de muestra de: 5 para cada grupo (es decir, un tamaño de muestra total de 10, asumiendo tamaños de grupo iguales), para lograr una potencia del 80% y un nivel de significancia del 5%, para detectar una verdadera diferencia en las medias entre el grupo control y grupo de infectados de 0,75 (es decir, 1 - 0,25) unidades.

En otras palabras, si se selecciona una muestra aleatoria de 5 de cada población y se determina que las medias del grupo control y grupo de infectados son 1 y 0,25 unidades, respectivamente, y la desviación estándar es 0,4 unidades, tendría un 80% de potencia para declarar que los dos grupos tienen medias significativamente diferentes, es decir, un valor p de menos de 0,05.

5.3 Análisis Histopatológico

Con fines informativos los cambios esponjosos (espongiosis) se caracterizaron como espacios llenos de líquido de tamaño variable en el tejido cerebral que rodea un quiste.

La gravedad del daño de los cisticercos se basó en la pérdida de integridad de la membrana vesicular del cisticerco y se clasificó utilizando una tinción de Hematoxilina Eosina. Además, se caracterizó la formación de fibras de colágeno alrededor del cisticerco mediante una tinción Tricrómica de Masson (Anexo 14) (41).

5.4 Anticuerpos primarios

Los anticuerpos anti-LC3B y anti-Beclin-1 se adquirieron de Abcam policlona, Código: ab48394 y Código: ab62557, respectivamente. Los anticuerpos policlona constituyen una mezcla de anticuerpos que son secretados por diferentes linajes celulares tipo B de conejo. Por otro lado, el anticuerpo p62/SQSTM1, con código ab91526 para detectar la degradación autofágica fue monoclonal, esto quiere decir que los anticuerpos provinieron de un solo linaje de células B por ello son más puros y presentan menos inespecificidades (124). Los anticuerpos de anti-GFAP policlona de ratón para astrocitos, anti-IBA policlona de cabra para microglia tanto activas como en estado basal, anti- NF policlona de ratón para neurofilamentos y anti-NeuN policlona de ratón para marcaje de neuronas (Anexo 1).

5.5 Inmunohistoquímica

Una vez obtenidas las láminas portaobjetos con el tejido de cerebro se desparafinaron por medio de una batería creciente de alcoholes. Luego, se expuso el antígeno a 97°C con Citrato 5X Tween 20 al 0,05% durante 30 minutos. Una vez lavadas con PBS 1X, se bloqueó la peroxidasa endógena por 30 minutos. Para la solución de bloqueo se usó BSA (Bovine serum albumin, por sus siglas en inglés) al 5%, leche al 2% junto con distintas combinaciones de sueros, de acuerdo a la especie de cada marcador, de cabra, rata, caballo y burro al 5% en PBS Triton al 0,05%; y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones del cerebro se incubaron durante toda la noche con 1:1000 de conejo anti-LC3B (abcam), 1:1000 de mouse anti- p62/SQSTM1 (novus) y 1:500 de conejo anti-Beclin1 independientemente. Las secciones se lavaron con PBS-1X cinco veces y se incubó, con su anticuerpo secundario diluido en PBS 1X durante 1 hora (cabra anti- ratón IgG marcado con HRP y cabra anti- conejo IgG marcado con HRP). La

reacción antígeno-anticuerpo se detectó con el sustrato cromógeno Diaminobencidina DAB (Dako, Carpinteria, CA), el precipitado de color marrón representa una reacción positiva. Posteriormente se realizó la contratinción con Hematoxilina de Harris por 5 segundos. Después de la deshidratación en una serie de diluciones graduadas de etanol (70%, 90%, 96° y 100%), las secciones se limpiaron con xilol y se montaron usando un medio de montaje Entellan New. Las imágenes de IHC se obtuvieron utilizando una cámara AxioCam ERc5 acoplada a un microscopio de campo claro de la marca Leica. Para los cerebros infectados se evaluó el área total circundante al cisticerco (600 μ m) (96). Mientras que para los controles no infectados se utilizaron las áreas analizadas de cerebros infectados como molde. Las imágenes se procesaron utilizando ImageJ v1.21 y un método de deconvolución antes de la medición del área inmunorreactiva (proporción entre el número de píxeles teñidos sobre el número total de píxeles en cada imagen) para cada marcador LC3B (200x), Beclin-1 (200x) y p62 (200x). (Anexo 2, Anexo 13)

5.6 Inmunofluorescencia

5.6.1 Control positivo de autofagia inducida por inanición en líneas celulares HCT8

La expresión del marcador citosólico LC3B se evaluó mediante inmunofluorescencia después de la inducción de autofagia en células HCT8 (Adenocarcinoma ileocecal humano). Para inducir la formación de autofagosomas en esta línea celular se estandarizó un protocolo de inanición. Las células control estuvieron expuestas a medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, mientras que el grupo a evaluar solo se les adiciono medio RPMI 1640 sin suero bovino fetal por un periodo de 1 hora, 4 horas y 6 horas. Por inmunofluorescencia se observó un aumento progresivo del marcador de autofagia LC3B 1:300 en las células que se encontraban sometidas a medio sin suero durante periodos de tiempo prolongados. En las células control, que no fueron sometidas a condiciones de inanición, LC3B se expresa de manera ubicua y se detecta un patrón difuso con una leve tinción punteada tanto en el núcleo como en el citoplasma en condiciones basales. La privatización del suero durante más horas aumentó la expresión de LC3B. Como resultado, este patrón cambia ampliamente de difuso a

notablemente punteado y citoplásmico (Figura 9).

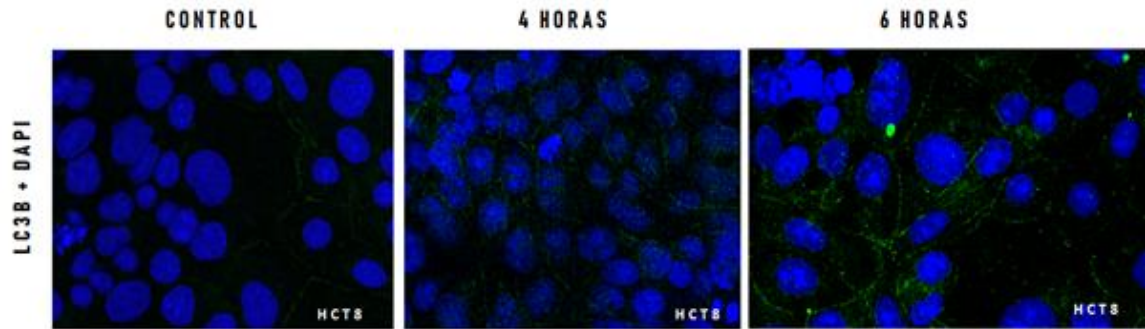


Figura 9: Tinción inmunofluorescente para LC3B en células HCT8. Las células HCT8 (human ileocecal colorectal adenocarcinoma) fueron sometidas a periodos de inanición de 4 y 6 horas y luego teñidas con el marcador de autofagosomas LC3B 1:500. LC3B (verde) y DAPI (marcador de núcleos, azul). Imágenes observadas a un aumento de 40X.

5.6.2 Inmunofluorescencia en cerebros de ratas

Las secciones del cerebro se permeabilizaron por desenmascaramiento con Citrato 5X Tween 20 0,05% durante 30 minutos, luego se lavaron cinco veces con PBS 1X. Para la solución de bloqueo se usó BSA o Albumina sérica bovina al 5%, ovoalbúmina 2% junto con distintas combinaciones de sueros, de acuerdo a la especie de cada marcador, de cabra, rata, caballo y burro al 5% en PBS Triton al 0,05% y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se lavaron cinco veces con PBS 1X.

Se estandarizó cada anticuerpo primario: anti-GFAP en ratón, proteína ácida fibrilar glial o marcador de astrocitos, con una dilución de 1:400, esta concentración mostró patrones mejor definidos y background inexistente en las láminas corridas. En las neuronas, evaluamos la proteína NeuN ubicada en los núcleos y el citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas con una dilución de 1:1000 anti-NeuN en ratón. En microglías totales utilizamos molécula adaptadora ionizante de unión al calcio 1 o IBA-1, resultando una dilución 1:400 de anti-IBA en cabra. Finalmente, para evaluar la región axonal de las neuronas estandarizamos la proteína neurofilamento, un tipo de filamento intermedio expresado ampliamente en los axones neuronales en una dilución de 1: 1000 anti-NF en ratón (Anexo 3, 4, 15)

Se añadió los anticuerpos anti-LC3B de conejo (1:1000) y anti-p62 (1:500) se incubó toda la noche durante 16 horas aproximadamente 4°. Las secciones se lavaron con PBS-1X cinco veces y se incubó, bajo condiciones fotosensibles, con su anticuerpo secundario respectivo durante 1h (burro anti-conejo IgG Alexa Fluor® 488, anti-ratón IgG Alexa Fluor® 488, anti-cabra IgG Alexa Fluor® 488). Las secciones teñidas se cubrieron con un cubreobjetos usando ProLong Gold Antifade Mountant con DAPI (Life Technologies) y se observaron con un microscopio confocal (Axio Observed A1; Zeiss, Oberkochen, Alemania). Las imágenes se obtuvieron con una cámara AxioCam MRC (Zeiss) con el software Zen Pro versión 2012.

Para fines descriptivos y explicativos se determinó el porcentaje de colocalización utilizando el área que representaba un espectro amarillo.

Se analizaron por conveniencia 16 cerebros de ratas de un total de 42, divididos en siete grupos: 2 ratas del grupo Control (Ctrl), 2 ratas del grupo de Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H), 2 ratas del grupo de Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M), 2 ratas del grupo Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H), 2 ratas del grupo Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M), 3 ratas del grupo Infectados Tratados 24 H (IT 24H) y 3 ratas del grupo Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M). Se obtuvieron un total de 80 imágenes RGB o a color (Red, Green and Blue, por sus siglas en inglés) con un doble marcaje entre LC3B y NeuN (16 imágenes, 20x), LC3B y GFAP (16 imágenes, 20x), LC3B e IBA-1 (16 imágenes, 20x), LC3B y NF (16 imágenes, 20x), LC3B y p62 (16 imágenes, 20x), las cuales fueron procesadas utilizando las herramientas de ImageJ v1.21. LC3B se marcó con un fluoróforo verde, mientras que el resto de marcadores, con un fluoróforo rojo; la superposición entre ambos colores resultó amarillo.

De cada imagen se evaluó una sección de 600 x 600 micras en una región aleatoria y cercana al quiste. Una región cercana al cisticerco se definió como no menos de 400 micras alrededor de este. Para determinar el área total de color de las regiones evaluadas, las imágenes se convirtieron a blanco y negro utilizando la herramienta Imagen 8 bits, donde el área blanca estuvo definida como el total de la región inmunoreactiva o con color, mientras que el área negra representó el fondo o el área sin inmunoreactividad. Por otro lado, para determinar el área de color amarillo, se

utilizó la herramienta Color Treshold (Umbral del color) de ImageJ v1.21. que permitió seleccionar partes de una imagen RGB que se encuentran en un rango de color específico, en este caso amarillo. Todas las áreas fueron obtenidas en micras y se determinó el porcentaje de colocación utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Colocalización = \frac{\text{Área amarilla (um)} \times 100 \%}{\text{Área blanca (um)}}$$

Dado que la cantidad de muestra evaluada no fue representativa, no se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos (Anexo 12).

5.7 Estadística

Los datos fueron analizados por Stata 14 y Prism Graphpad versión 8, presentados como la media \pm desviación estándar. Se evaluaron los datos con la Prueba de Shapiro Wilk para la normalidad. Posteriormente, se utilizaron una prueba de Kruskal Wallis y una de comparaciones múltiples de Dunn's para evaluar las diferencias significativas entre los grupos. Se consideró que $P < 0,05$ indica una diferencia estadísticamente significativa.

VI. RESULTADOS

Se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de los marcadores de autofagia, LC3B, Beclin y p62 en un total de 42 cerebros de rata, divididos en siete grupos: Controles (Ctrl), Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H), Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M), Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H), Infectados Tratados 24 H (IT 24H), Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M), Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M). Para el caso de los cerebros de rata infectados se evaluaron 45 quistes distribuidos en los diferentes grupos de cerebros infectados con NCC.

El inmunomarcaje de LC3B, Beclin-1 y p62 alrededor de los quistes en las ratas infectados presentó diferencias significativas con los grupos controles, los valores de p se muestran en las gráficas. La alta expresión se observó principalmente en las zonas con presencia de cambio espongiótico como se observa en las Figuras 10, 11 y 12.

6.1 Inmunoreactividad del marcador LC3B

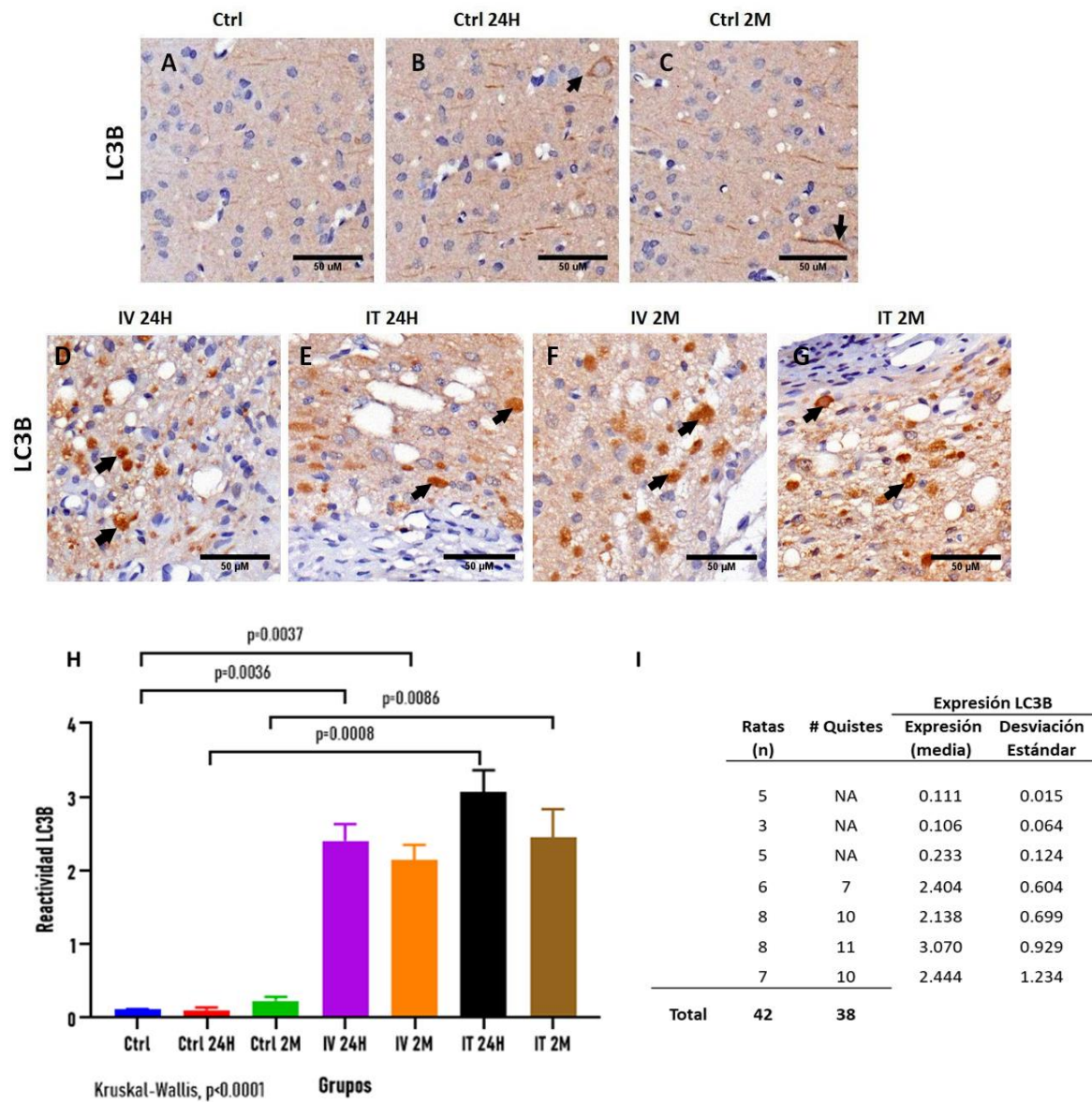
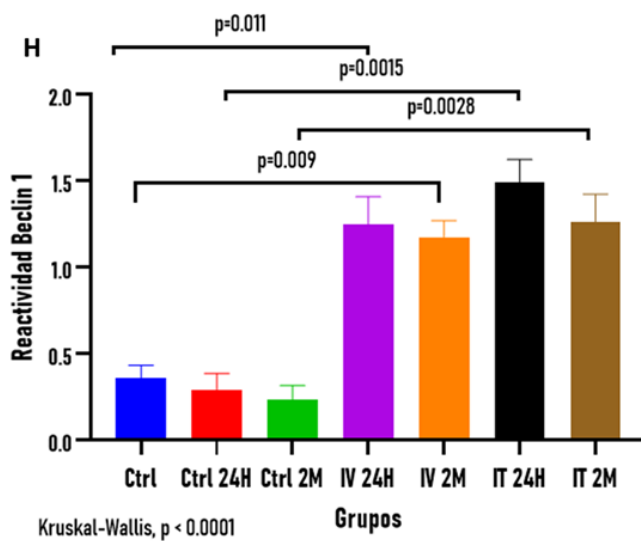
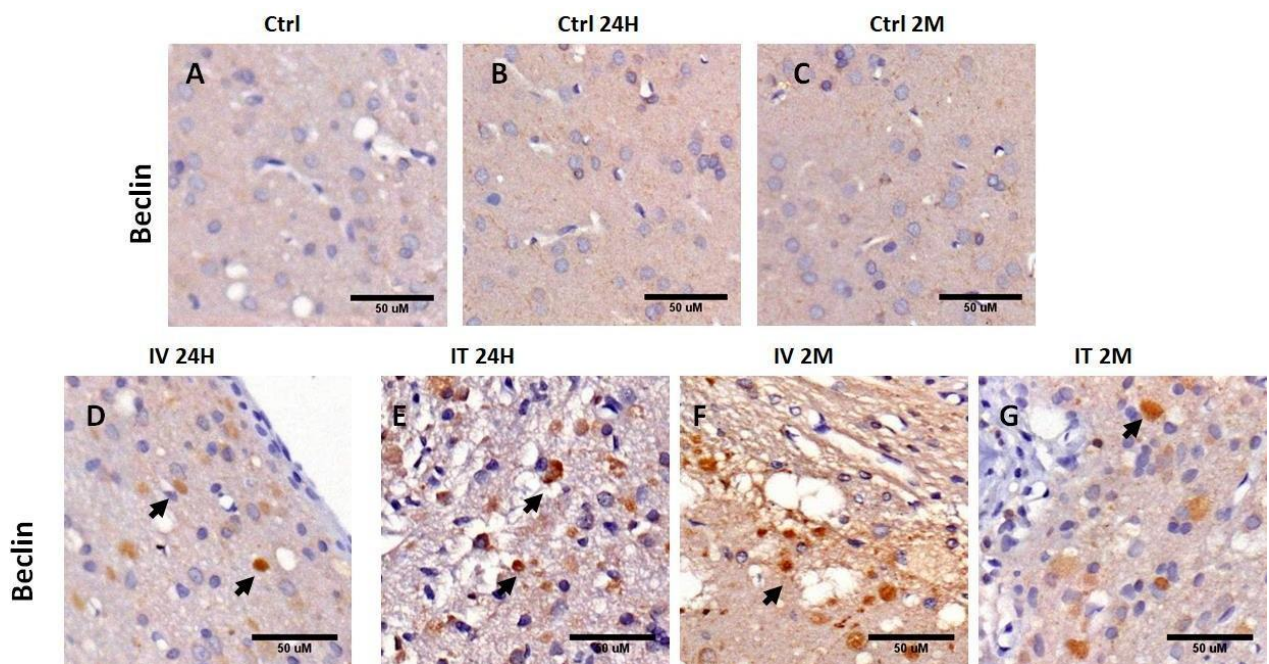


Figura 10: Inmunoreactividad para LC3B. Imagen representativa del grupo control (A), grupo control Tratamiento 24 H (B), grupo control Tratamiento 2M (C) para el marcador LC3B, se observa intenso marcaje en todo el cuerpo neuronal principalmente en corteza cerebral como indican las flechas negras. Las imágenes D, E, F, G son representativas del grupo de infectadas con vehículo o tratamiento, se observa un intenso inmunomarcaje compacto en forma de esferas alrededor del cisticerco como indican las flechas negras. Finalmente, la imagen H, muestra las inmunoreactividad del marcador LC3B en términos

de media \pm DE de todos los quistes analizados por grupo, la significancia estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.0001$), seguido de una prueba de comparaciones múltiples. Se observaron diferencias significativas entre infectados y no infectados, más no entre los grupos de tratamiento. Barra de escala de 50 μ m. (Anexo 6)

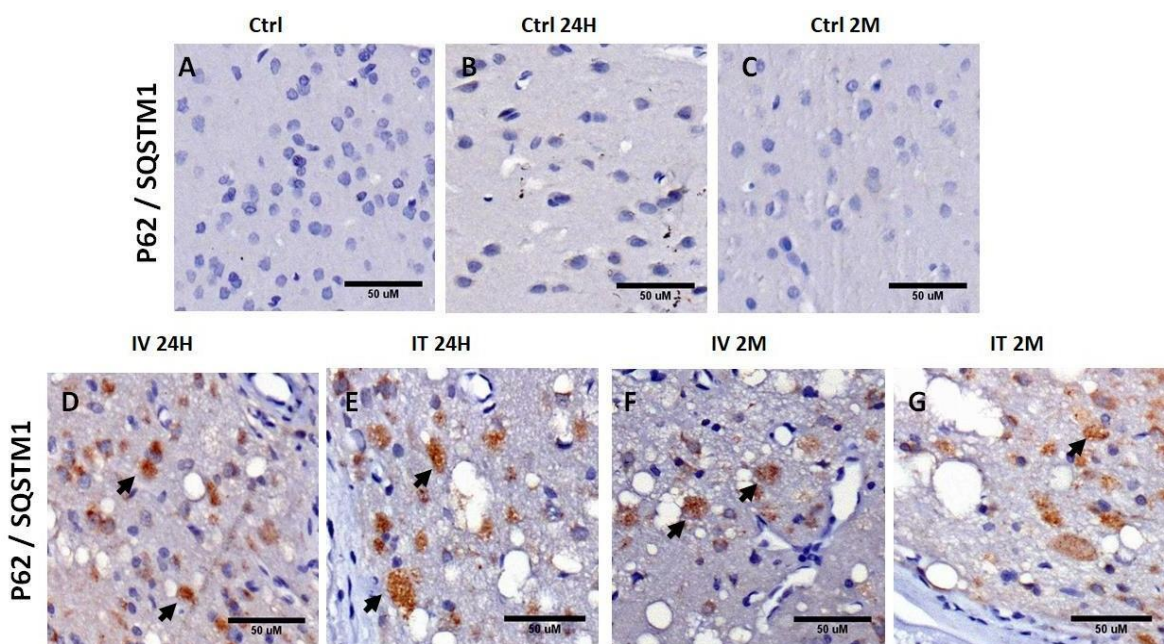
6.2 Inmunoreactividad del marcador Beclin-1



Ratas (n)	# Quistes	Expresión Beclin-1	
		Expresión (media)	Desviación Estándar
5	NA	0.360	0.168
3	NA	0.294	0.161
5	NA	0.232	0.191
6	7	1.249	0.392
8	10	1.176	0.300
8	11	1.495	0.410
7	10	1.263	0.510
Total	42	38	

Figura 11: Inmunoreactividad para la proteína Beclin-1. Imagen representativa del grupo control (A), grupo control Tratamiento 24 H (B), grupo control Tratamiento 2M (C) para el marcador Beclin 1, se observa leve marcaje principalmente en soma neuronal como indican las flechas negras. Las imágenes D, E, F, G son representativas del grupo de infectadas con vehículo o tratamiento, se observa un intenso inmunomarcaje compacto en determinadas zonas y difusa en otras, alrededor del cisticerco como indican las flechas negras. Finalmente, la imagen H, muestra las inmunoreactividad del marcador Beclin en términos de media \pm DE de todos los quistes analizados por grupo, la significancia estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.0001$), seguido de una prueba de comparaciones múltiples. Existen diferencias altamente significativas entre infectados y controles, pero no entre grupos de tratamiento, ni entre controles. Barra de escala 50 μ m. (Anexo 7)

6.3 Inmunoreactividad del marcador p62



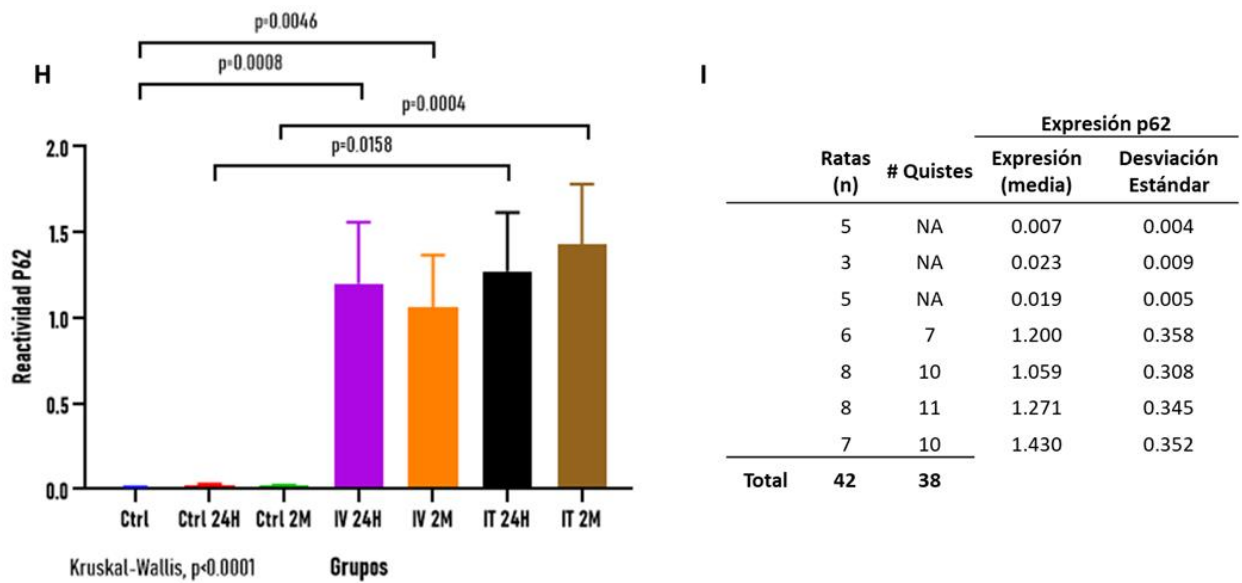


Figura 12: Inmunoreactividad para la proteína p62/SQSTM1. Imagen representativa del grupo control (A), grupo control Tratamiento 24 H (B), grupo control Tratamiento 2M (C) para el marcador p62/SQSTM1, ausencia de inmunomarcaje para las imágenes de control. Las imágenes D, E, F, G son representativas del grupo de infectadas con vehículo o tratamiento, se observa un inmunomarcaje compacto en determinadas zonas y difuso en otras con forma esferoide alrededor del cisticerco como indican las flechas negras. Finalmente, la imagen H, muestra las inmunoreactividad del marcador p62 en términos de media \pm DE de todos los quistes analizados por grupo, la significancia estadística se evaluó mediante la prueba de Kruskal wallis ($p < 0.0001$), seguido de una prueba de comparaciones múltiples. Existen diferencias altamente significativas entre infectados y controles, pero no entre grupos de tratamiento, ni entre controles. Barra de escala 50 μ m. (Anexo 8)

6.4 Expresión constitutiva de LC3B en cerebros de ratas sin NCC

Se evaluó la expresión del marcador LC3B en cerebros de ratas no infectadas con NCC en tres regiones principales del cerebro: corteza (A), cuerpo estriado (B) y cerebelo (C). Nótese que en la Figura 13 la expresión del marcador LC3B sigue el patrón de las células

que constituyen cada región. En la corteza se observa tenue pero bien definido el marcaje de las neuronas desde el soma hacia el axón. Se observa el mismo patrón en cuerpo estriado y cerebelo.

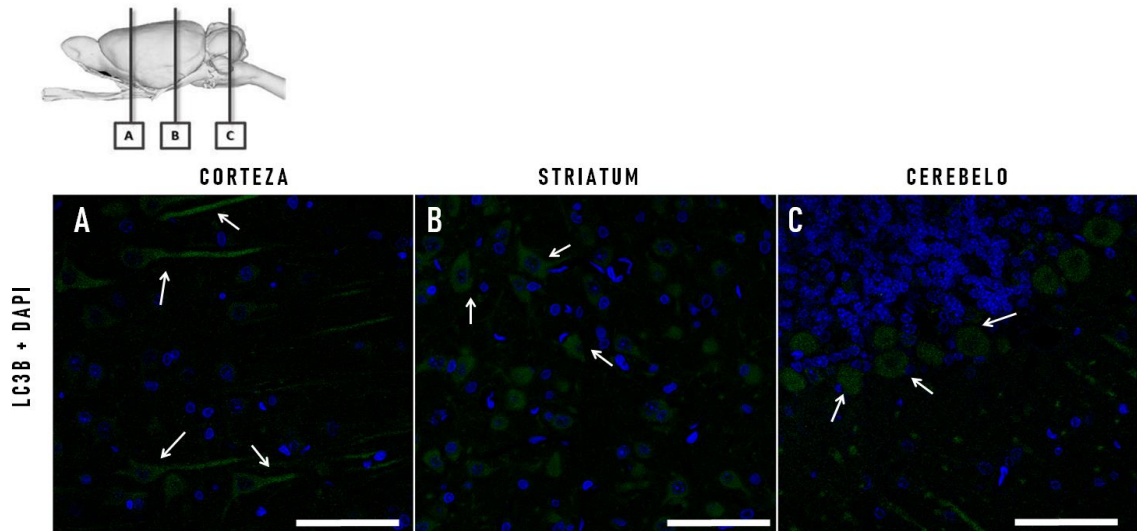


Figura 13: Inmunofluorescencia de LC3B en cerebros de ratas no infectadas en corteza (A), Cuerpo estriado (striatum) (B) y cerebelo (C). El análisis de doble tinción para LC3B (verde) y DAPI (marcador de núcleos, azul). Las flechas señalan los distintos tipos de grupos celulares predominantes en cada región cerebral, destacando la forma característica de cada una. Imágenes tomadas a un aumento de 40X. Barra de escala de 50 μ m.

6. 5 Expresión de LC3B en cerebros de ratas con NCC en una región lejana y cercana al cisticerco

La Figura 14 muestra 2 regiones de corteza, una cercana y otra lejana del cisticerco elegidas aleatoriamente para evaluar la expresión de LC3B. Se observa un patrón de acúmulos del LC3B de aspecto redondeado en la región cercana a la ubicación del cisticerco, mientras que en las regiones lejanas la intensidad del marcaje disminuye y conserva la forma definida del grupo celular de la región evaluada.

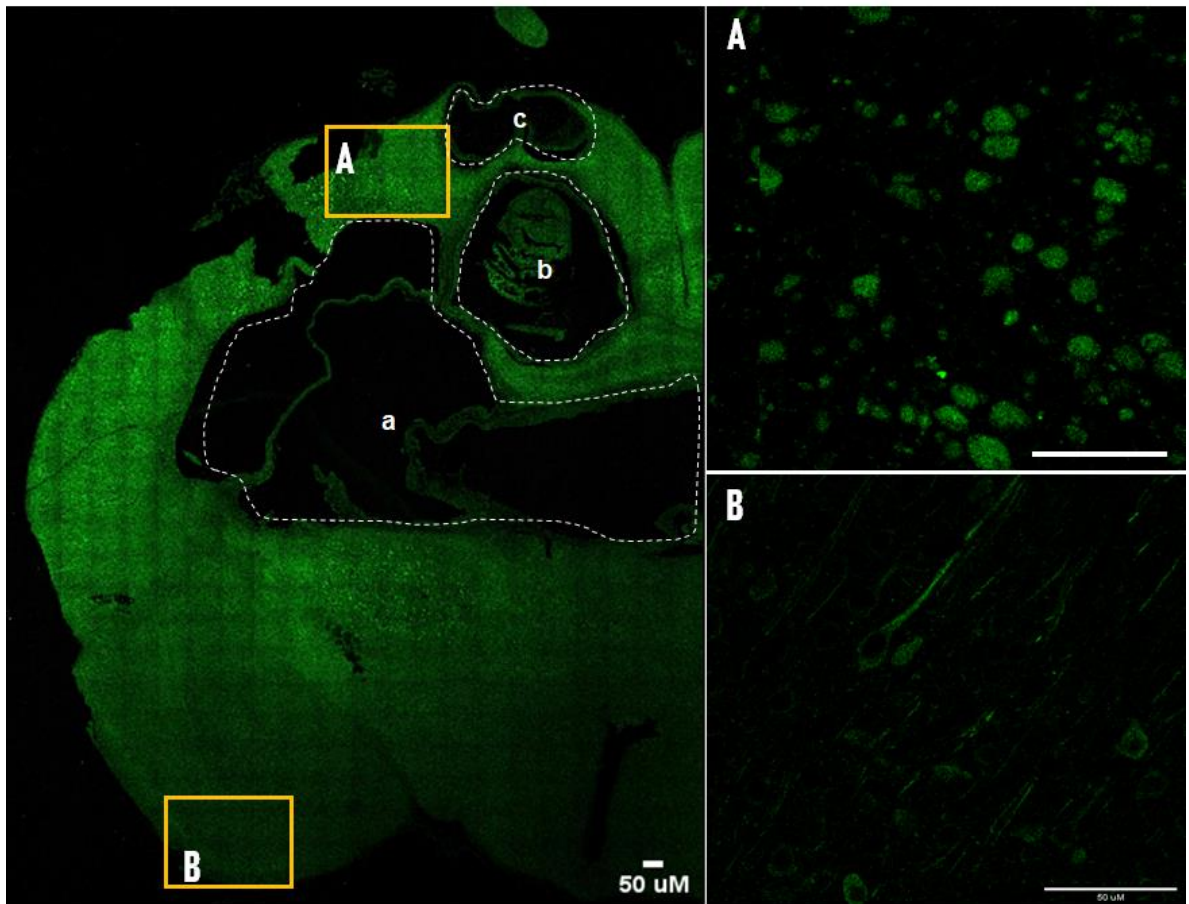


Figura 14: Inmunofluorescencia de LC3B en dos regiones de corteza del cerebro de rata con NCC. (A) representa una región de corteza cercana a los cisticercos a, b y c, definida como no menos de 400 micras alrededor de estos, donde se observó un aumento de la expresión del marcador LC3B (verde) acumulados en forma de esferas de tamaño heterogéneo. (B) representa una región de corteza lejana de los cisticercos a, b y c. El marcador de autofagosomas mostró expresión constitutiva sin formación de cúmulos o esferas aglomeradas. Imágenes tomadas a un aumento de 10X y 40X. Barra de escala de 50 um.

6.6 Colocalización del marcador LC3B con grupos celulares (astrocitos, microglías y neuronas) y p62.

Mediante inmunofluorescencia se evaluó la colocalización del marcador LC3B en células

neuronales, microglías, astrocitos y neurofilamento, así como con p62 en un total de 16 cerebros de ratas, divididos en siete grupos: 2 ratas del grupo Control (Ctrl), 2 ratas del grupo Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H), 2 ratas del grupo Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M), 2 ratas del grupo Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H), 2 ratas del grupo Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M), 3 ratas del grupo Infectados Tratados 24 H (IT 24H) y 3 ratas del grupo Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M). La Figura 15 muestra la expresión del biomarcador LC3B en verde, los núcleos celulares en azul marcados con DAPI y tanto los grupos neuronales, gliales y p62 en rojo.

En la figura 15 la expresión del marcador de astrocitos GFAP presentó una forma pleomórfica y un gran cuerpo de células planas, largas que forman una red en forma de estrella alrededor del cisticerco en cerebros infectados; sin embargo, no se observó colocalización en ninguno de los siete grupos evaluados.

Para evaluar la presencia del marcador LC3B en microglías totales utilizamos una molécula adaptadora ionizante de unión al calcio 1 o IBA-1. La figura 15 muestra una región cercana al cisticerco de un cerebro infectado con un incremento en la expresión y en la forma de las microglías, las cuales se observan con un aspecto más ameboide y menos ramificado en las zonas con presencia de cambio espongiótico, pero no se observó colocalización en los siete grupos.

Con la finalidad de determinar la expresión del marcador LC3B en las neuronas, evaluamos la proteína NeuN ubicada en los núcleos y el citoplasma perinuclear de la mayoría de las neuronas. En los cerebros controles se observó mayor porcentaje de colocalización en neuronas con sus característicos cuerpos celulares y axones. Sin embargo, en cerebros infectados este porcentaje de colocalización disminuyó y se observaron neuronas poco definidas con cambios atróficos en los somas y, sobre todo, en regiones axonales. Finalmente se evaluó la región axonal de las neuronas utilizando la proteína neurofilamento NF, un tipo de filamento intermedio expresado ampliamente en los axones neuronales. La figura 15 muestra que en tejido cerebral sano la proteína de neurofilamento está presente en su forma normal distribuida a lo largo del axón de la mayoría de las neuronas. Mientras que en cerebros infectados se observan acumulaciones de agregados de neurofilamento de forma esférica conocidos como

esferoides y colocalizan con el marcador LC3B.

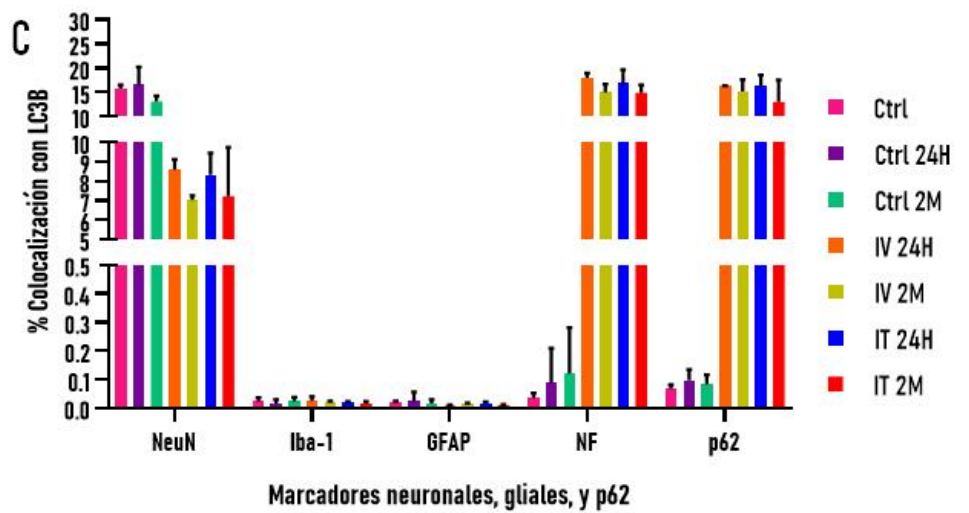
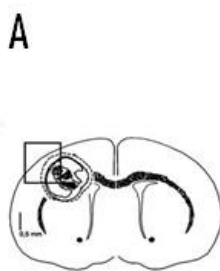
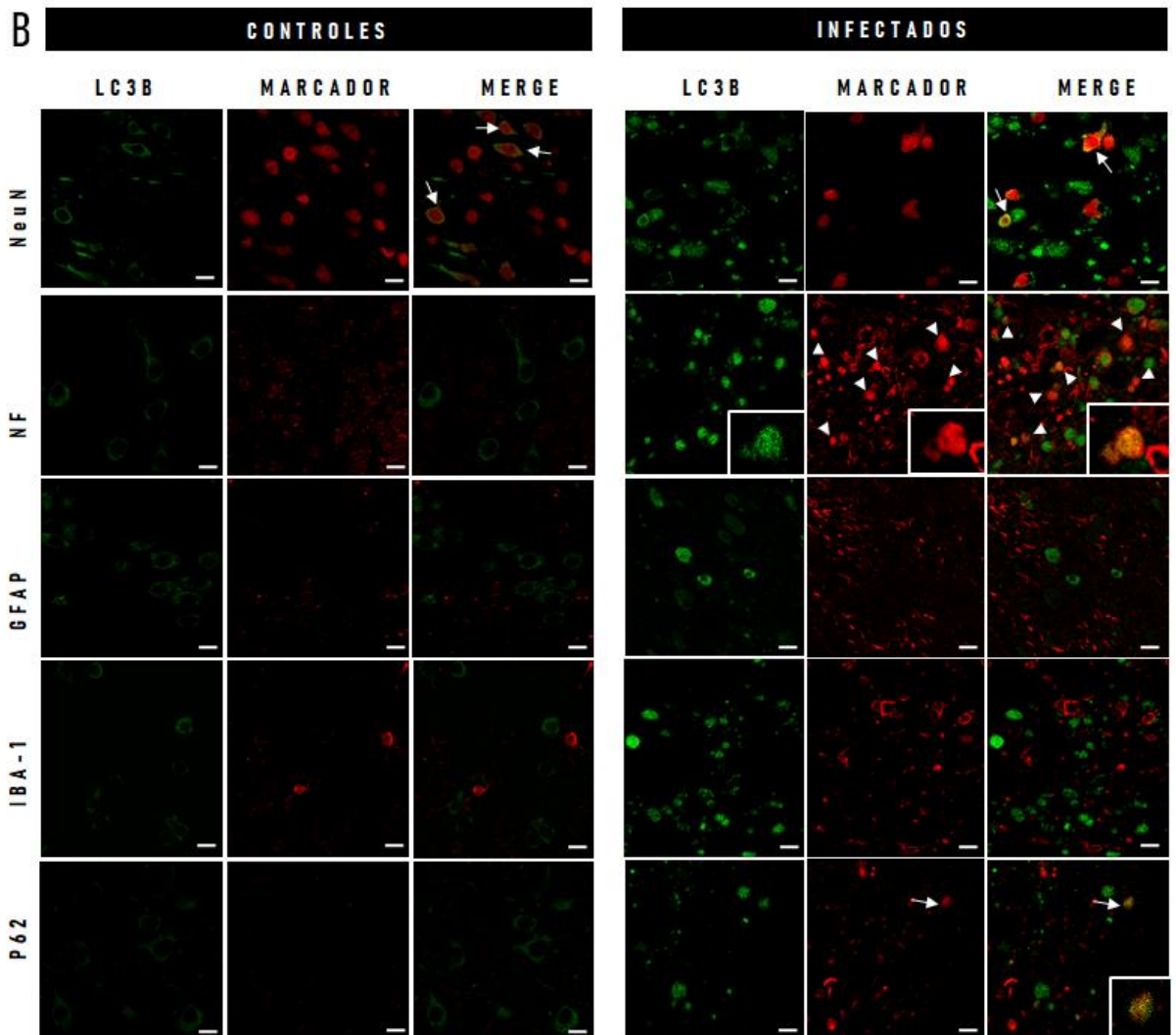


Figura 15: Colocalización del marcador de autofagosomas LC3B en células neuronales y gliales. (A) Región aleatoria cercana al cisticerco. (B) Colocalización de LC3B con NeuN (Proteína Nuclear Neuronal), NF (Neurofilamento), GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial), IBA-1 (Molécula Adaptadora de Unión a Calcio Ionizada -1) y p62 (Proteína de degradación autofágica). Barra de escala 10 um. Imágenes observadas a un aumento de 40X. (C) Porcentajes de colocalización entre LC3B y grupos neuronales y gliales en controles (Ctrl), Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H), Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M), Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H), Infectados Tratados 24 H (IT 24H), Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M), Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M).

VII. DISCUSIÓN

La autofagia es un mecanismo homeostático altamente regulado para la degradación masiva de los contenidos citoplasmáticos (44,45). Se ha implicado en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas relevantes para enfermedades neurológicas. Sin embargo, en NCC se desconoce su caracterización e implicancia. En el presente trabajo, se utilizaron cerebros de ratas controles, infectados con NCC y tratados (OXF+ PZQ 24 horas y 2 meses) para analizar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de los marcadores LC3B, Beclin-1 y p62. Asimismo, mediante inmunofluorescencia evaluamos la presencia y caracterización de autofagosomas positivos para LC3B en neuronas y células gliales.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la expresión de los marcadores estructurales de los autofagosomas LC3B y Beclin- 1 en el tejido que rodea al cisticerco. En comparación, los cerebros controles presentaron niveles nulos o bajos de reactividad. Asimismo, encontramos que los niveles de p62 se ven incrementados en los cerebros infectados versus los cerebros controles existiendo una diferencia estadísticamente significativa. Estos hallazgos son coherentes con la bibliografía revisada, ya que en cerebros controles los niveles de p62/SQSTM1, un producto de degradación exclusiva de la vía de autofagia, son escasos. A niveles basales, en un

proceso normal de autofagia la disminución de los niveles de p62 es un indicativo de la degradación lisosomal y finalización del flujo autofágico (54, 55,62). Mientras que en condiciones de estrés o disfunción del flujo autofágico la expresión de p62 se ve incrementada. La mayor inmunoreactividad de estos marcadores (LC3B, Beclin 1 y p62) en cerebros de ratas con NCC también se observan en traumatismo craneoencefálico, traumatismo cortical controlado y enfermedades neurodegenerativas. En estas afecciones se confirmó un incremento de los marcadores LC3B y p62 provocado por una disfunción del flujo autofágico, lo que da como resultado una acumulación masiva de autofagosomas dentro de neuronas en degeneración (87). La mayor inmunoreactividad de LC3B y p62 está relacionada a una alteración del flujo autofágico en el cerebro lesionado, este evento estaba asociado con la gravedad de la lesión o una peor recuperación (88, 89, 90). La acumulación de autofagosomas y un ineficiente aclaramiento autofágico da como resultado una mayor reactividad de marcadores autofágicos, consecuente con los resultados obtenidos.

Evaluamos la alteración de los marcadores autofágicos y su asociación con el tratamiento farmacológico (OXF+PZQ) en dos periodos de tiempo (24 horas y 2 meses). No se observaron diferencias significativas entre la inmunoreactividad de los marcadores LC3B, Beclin-1 y p62 entre los infectados tratados e infectados con el vehículo en ambos tiempos de tratamiento. Sin embargo, los resultados mostraron que la mayor expresión de los marcadores autofágicos se inclinó hacia los cerebros infectados tratados a las 24 horas. Por ejemplo, en modelos murinos con NCC se ha reportado que la acción sinérgica del tratamiento antihelmíntico de Oxfendazol más Praziquantel genera mayor daño a los cisticercos. En las primeras 24 horas se produce una exacerbación en la liberación de antígenos y va disminuyendo con el paso del tiempo (41,91). Además, la inflamación alrededor del cisticercos aumenta y se observa mayor severidad del cambio espongiótico en el parénquima cerebral. La exposición al estrés y la liberación de antígenos, provocado por la degeneración del parásito, probablemente desencadenaría una respuesta autofágica; proceso que no ha sido explorado preliminarmente en NCC.

Si bien es cierto, la autofagia basal en el SNC es escasa, juega un papel fundamental en el recambio constitutivo del contenido citosólico y la eliminación de proteínas dañadas en neuronas específicas del cerebro (22,50). Posiblemente, la explicación de esta escasez se deba al eficaz y buen funcionamiento de la maquinaria autofágica y sus constituyentes, haciendo que los autofagosomas no logren acumularse en neuronas sanas a niveles detectables. Otra explicación sería que la autofagia basal es constitutiva y recicla el citoplasma y sus constituyentes, de manera no selectiva y continua, para equilibrar la síntesis con la degradación y mantener la homeostasis neuronal (21). Por ello es vital su buen flujo y funcionamiento. Una alteración en la autofagia neuronal podría perjudicar el control de calidad, dando lugar a la acumulación aberrante de proteínas mal plegadas y/o agregados tóxicos observados frecuentemente en enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (67,92, 93).

En este estudio encontramos que entre las células neuronales y gliales evaluadas en el tejido cerebral de ratas con NCC, exclusivamente las neuronas y sus axones son los grupos donde se observó un incremento de los marcadores autofágicos. La inmunofluorescencia mostró que en cerebros sanos los núcleos neuronales o somas, evaluados con NeuN, presentaron apariencia normal y colocalizaron con los autofagosomas LC3B a niveles basales. En cerebros infectados, aunque la acumulación de autofagosomas aumentó, la proporción de somas neuronales que colocalizan con LC3B disminuyó visualmente, esto indicaría que los autofagosomas se estarían acumulando en menor proporción en los somas de las neuronas.

Los autofagosomas se generan, preferentemente, en los extremos distales de los axones y por transporte retrógrado se dirigen al soma para fusionarse con los lisosomas y formar el autolisosoma, donde se llevará a cabo la degradación. La disminución de autofagosomas en el cuerpo neuronal vistas aquí, podría representar una disfunción en el transporte de autofagosomas hacia este compartimento y por ende al último paso del flujo autofágico, la degradación. Para evaluar esta posibilidad hace falta recurrir a marcadores específicos que reflejen la interrupción o el daño en el transporte axonal, por ejemplo el Gen SOD-1, dineína y kinesina utilizados para evaluar el déficit en el

transporte anterógrado y retrógrado en diferentes enfermedades neurodegenerativas (96, 94).

Adicionalmente, nuestros resultados evidenciaron acumulación localizada de neurofilamento (NF) en los axones de las neuronas de cerebros infectados, donde la colocalización de autofagomas y NF incrementó visualmente ~~96%~~ alrededor del cisticerco con respecto a los cerebros controles. Estas acumulaciones son conocidas como esferoides o inflamaciones focales de un axón si tienen un diámetro de 20 μ m y varicosidades si presentan menor tamaño (94,95) y por lo general, suelen estar llenas de orgánulos y citoesqueleto alterado. Recientemente, un estudio demostró que los esferoides no se limitan al modelo de rata, sino que también están presentes en tejido cerebral de cerdos y humanos con NCC. Además, hallaron acumulación de NF dentro de los esferoides axonales, condición consecuente de la interrupción del transporte axonal (94). Coincidentemente la aparición de estos esferoides axonales, y su reactividad es similar a la encontrada en varias enfermedades neurodegenerativas y de lesión traumática, esto respalda la probabilidad de que quizá existan vías comunes compartidas en la degeneración axonal de NCC con estas enfermedades. Se ha demostrado que varios mecanismos conducen a la degeneración axonal incluyendo el trauma físico del axón, el estrés oxidativo y la inflamación (78, 88, 90). En nuestro estudio, dado que se utilizó un modelo de rata, el tamaño relativamente grande de los cisticercos en el cerebro posiblemente conllevó a la compresión física del axón y probablemente contribuyó al deterioro del transporte axonal y consecuentemente a la formación de esferoides axonales (78). Además, se ha demostrado que la acumulación de neurofilamento se relaciona progresivamente con la interrupción del transporte axonal e incluso este deterioro o interrupción del transporte conduce a la degeneración axonal (94-97). Esto último puede estar ocurriendo en NCC. Por ello, sugerimos un modelo esquemático de flujo autofágico alternativo en neuronas que rodean al cisticerco donde el transporte axonal está siendo interrumpido producto de la formación de esferoides acumulados en las regiones medias del axón. Como resultado, los autofagosomas se concentran en las hinchazones axonales y no logran dirigirse hacia el soma para la proteólisis lisosomal.

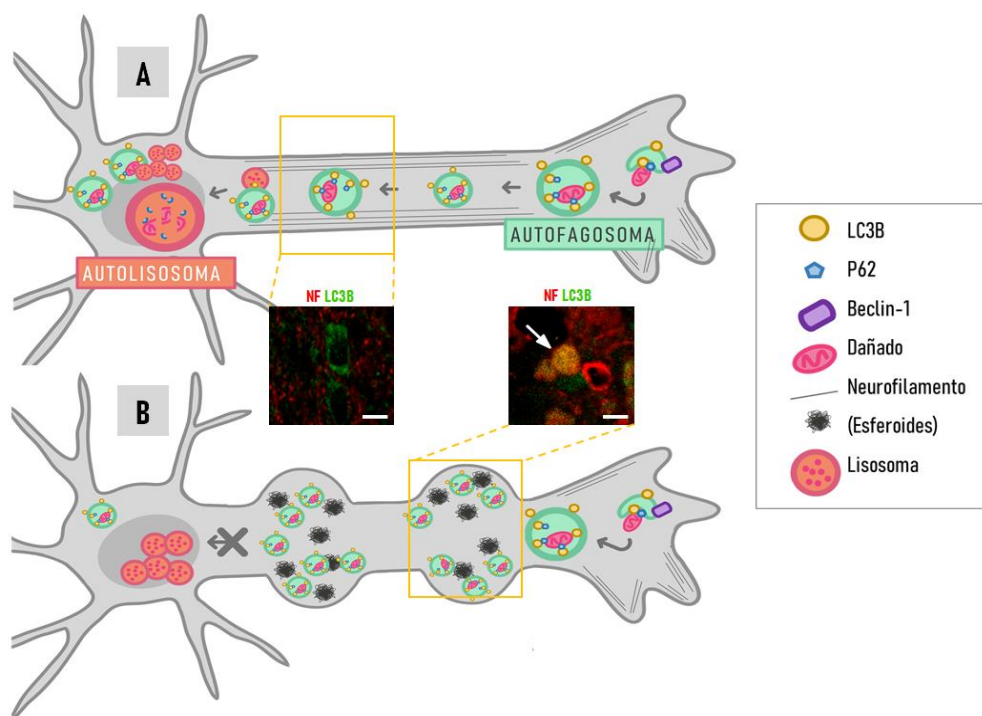


Figura 16. Modelo esquemático propuesto para autofagia en NCC. Flujo autofágico alternativo en neuronas sanas y neuronas que rodean el cisticerco en el cerebro de ratas con NCC. (A) Flujo autofágico en una neurona sana y (B) una neurona de un cerebro con NCC. Nótese la formación de hinchazones axonales llenas de material acumulado. Las imágenes de colocalización LC3 (verde) y NF (rojo) en neuronas sanas e infectadas que soportan el modelo gráfico. Barra de escala 10 micras.

Además de las neuronas, se evaluaron astrocitos y microglías con GFAP e Iba-1, respectivamente mediante inmunofluorescencia. No se observó colocalización con LC3B en ninguno de estos grupos celulares a pesar de la sobreexpresión de GFAP e Iba-1 alrededor del cisticerco, eventos reportados como gliosis astrocítica o scar glial en NCC (15,18). El rol de la autofagia a nivel neuronal en condiciones basales y patológicas ha sido ampliamente estudiado, pero en eventos patológicos la autofagia en las células gliales no está bien caracterizada (65,66). Las glías constituyen una alta proporción en cuanto a población celular, aproximadamente 3:1 glia/neurona y cumplen un rol

fundamental en los procesos neuroinflamatorios (98). Al igual que las neuronas, las células gliales representan una colección diversa y especializada de tipos de células y, por lo tanto, también pueden demostrar una dependencia temporal y de subtipo. Asimismo, los astrocitos y microglia se pueden encontrar en estados activos e inactivos, evento que dificulta la caracterización de diversos procesos celulares como la autofagia (74, 65, 99). A diferencia de las neuronas, las células gliales se replican y responden de manera más robusta a los cambios de nutrientes y, por lo tanto, también pueden demostrar características similares a las de las células periféricas (75,100).

Estudios en enfermedades neurodegenerativas, así como en isquemia y accidente cerebrovascular, sugieren que la autofagia puede modular la respuesta inflamatoria microglial; sin embargo, no está claro si esta regulación es positiva o negativa. Los estudios disponibles indican que las microglia, el actor principal del sistema inmunológico innato en el cerebro, orquesta la respuesta inflamatoria cerebral, respondiendo al daño del SNC y regulando la liberación de mediadores inflamatorios solubles, así como fagocitando detritos específicos (75, 101, 102). La evidencia acumulada sugiere que la maquinaria de autofagia modula la fagocitosis en macrófagos y microglia, los genes de la autofagia pueden modular la captación fagocítica mediante la regulación de la expresión de los receptores de engullimiento de la superficie (54, 103). En contraste a esto, algunos datos sugieren que puede existir una superposición funcional entre la autofagia y la fagocitosis como sucede en enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento, donde la inhibición de una desencadena la activación de la otra, evento que podría estar sucediendo en NCC (104,54). En relación con ello, la autofagia puede regular negativamente la formación del inflamasoma, mediante la digestión de sus sustratos (54).

Los limitados estudios en astrocitos revelan que estos tienen una mayor eficiencia de eliminación de proteínas que las neuronas, esto puede constituir un mecanismo de protección intrínseco para eliminar proteínas mal plegadas en las neuronas (54, 65). Este evento se ha reportado en agregados de α -sinucleína y enfermedades priónicas, donde podría existir comunicación entre neuronas y astrocitos para la liberación de agregados

tóxicos, mediante la absorción y eliminación en astrocitos (105,106). En relación con esto, los agregados de α -sinucleína se propagan de manera eficiente de neuronas a astrocitos y entre los propios astrocitos, pero no de astrocitos a neuronas. También se han observado fenómenos similares en agregados de Huntingtina (HTT) en *Drosophila* (107). Por otro lado, se ha informado que la actividad del proteosoma, vía degradativa de proteínas, podría ser menor en las neuronas en comparación con los astrocitos. Utilizando reporteros fluorescentes se demostró que en cultivos primarios el proteosoma es menos activo en neuronas que en astrocitos y que, en el cerebro del ratón, una disminución dependiente de la edad en la actividad del proteosoma es más prominente en las neuronas que en las células gliales (108,109). Asimismo, usando una sonda óptica de persecución de pulsos se observó que la eliminación de HTT mutante ocurre más rápidamente en astrocitos que en neuronas tanto en cultivos primarios como en cerebro de ratón (110).

Aunque la autofagia es un proceso ubicuo y los componentes de la maquinaria de la autofagia se expresan ampliamente, la regulación de la autofagia puede ser específica de un órgano, región cerebral, tipo o subtipo celular. Por lo tanto, no es sorprendente que la autofagia pueda estar regulada diferencialmente en las neuronas en comparación con las células gliales, como lo observado en el presente trabajo. Sin embargo, se necesitan más estudios para investigar en detalle cómo la autofagia se regula de manera diferente en astrocitos, neuronas y microglías.

Finalmente, encontramos mayor inmunoreactividad de los marcadores autofágicos en los cerebros infectados en comparación con los cerebros controles. Esta reactividad presentó una inclinación hacia el grupo de ratas infectadas con tratamiento 24 horas; pero no se obtuvo significancia estadística. Posiblemente, el tamaño de muestra influyó en este resultado, puesto que el grupo evaluado sólo consideró cerebros con quistes parenquimales. Por ello sugerimos ampliar el número de muestra. Por otro lado, la acumulación de autofagosomas se presentó en el soma neuronal y en regiones donde se observa daño axonal o esferoides en cerebros de ratas con NCC. Sin embargo, muchas de estas acumulaciones no colocalizaron con ninguno de los marcadores neuronales y gliales evaluados. Posiblemente por la falta de evaluación de otros tipos celulares como

los oligodendrocitos u otros tipos de marcadores que detectan subtipos neuronales. Por ejemplo NeuN a pesar de ser detectada en la mayoría de los tipos de células neuronales de ratones adultos, no se expresa en células cerebelosas de Purkinje, las células mitrales del bulbo olfatorio, las células fotorreceptoras de la retina y las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, las cuales no fueron evaluadas en este proyecto (111). Por otro lado, para corroborar y distinguir entre respuestas autofágicas activas y bloqueo de autofagia, es necesario tener en cuenta el flujo autofágico utilizando modelos animales in vivo, y el uso de inhibidores y distintas metodologías de detección como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), una técnica eficiente para la evaluación de la autofagia *in situ*. El uso de marcadores policlonales, representa, también, una limitación debido a su alta especificidad multiepítope. El reconocimiento de múltiples epítomos a menudo induce una alta reactividad cruzada con proteínas que contienen patrones conservados, especialmente con proteínas homólogas entre especies. Por lo tanto, la presencia de una gran cantidad de anticuerpos inespecíficos a menudo conduce a niveles de fondo elevados (124). Considerando esta limitación, contrarrestamos la inespecificidad de los anticuerpos policlonales estableciendo un protocolo de estandarización basado en el bloqueo de proteínas endógenas con el fin de prevenir la unión no específica de los anticuerpos primario y/o secundario (Anexo 2, 3,4).

Dados los resultados presentados sugerimos evaluar la disfunción del transporte axonal y su implicancia con la autofagia en NCC.

VIII. CONCLUSIONES

- Se observó un incremento significativo respecto al control negativo sin NCC en la expresión de los marcadores autofágicos LC3B, Beclin- 1 y p62 en el área circundante al cisticerco.
- No se observaron diferencias significativas entre los infectados tratados (OXF + PZQ 24 horas y OXF + PZQ 2 meses) e infectados con vehículo. Sin embargo, se evidenció un incremento en la expresión de los marcadores autofágicos inclinado hacia cerebros infectados tratados a las 24 horas.
- La acumulación de autofagosomas positivos para LC3B colocalizan con el soma y con regiones de hinchazón axonal o esferoides en cerebros de ratas con NCC.
- La acumulación de autofagosomas positivos para LC3B no colocalizan con astrocitos ni microglías en cerebros de ratas con NCC.

IX. ANEXOS

ANEXO 1: Lista de anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Marca	Código	Clonalidad	IHC/ IFI
Rabbit mAB anti-LC3	Abcam	ab48394	Policlonal	IHC
Rabbit mAB anti-Beclin-1	Abcam	ab62557	Policlonal	IHC
Mouse mAB anti-p62	Novus	H00008878-M01	Monoclonal	IHC
Mouse mAB anti-NeuN	Abcam	ab104225	Monoclonal	IFI
Mouse mAB anti-NF	Merck	MAB5262	Monoclonal	IFI
Mouse mAB anti-GFAP	Merck	IF03L	Monoclonal	IFI
Goat mAB anti-IBA-1	Abcam	ab5076	Policlonal	IFI
Goat anti-mouse IgG HRP labeled	Invitrogen	161815	NA	IHC
Goat anti-rabbit IgG HRP labeled	KLP (seraCare)	741516	NA	IHC
Goat anti-mouse IgG Alexa fluor 488® labeled	Invitrogen	A11029	Policlonal	IFI
Donkey anti-rabbit IgG Alexa fluor 488® labeled	Invitrogen	A21206	Policlonal	IFI
Donkey anti-goat IgG Alexa fluor 488® labeled	Invitrogen	A11055	Policlonal	IFI
Goat anti-rabbit IgG Alexa fluor 594® labeled	Invitrogen	A11012	Policlonal	IFI

ANEXO 2: Protocolo de estandarización del marcador LC3-B, Beclin-1 y p62 para Inmunohistoquímica

		LC3B	BECLIN-1	P62
	Código	ab48394	ab62557	H00008878-M01
Desparafinación	Estufa	45 min	45 min	45 min
	Xilol I x 3	3 min	3 min	3 min
	Xilol II x 2	3 min	3 min	3 min
	Xilol III x 3	3 min	3 min	3 min
	Batería Decreciente de OH	2 min	2 min	2 min
Desenmascaramiento	Citrato 1x +Tween 20	Copplin	Copplin	Copplin
	Tiempo	30 min	30 min	30 min
3 Lavados de 5 min				
Bloqueo de peroxidases endógenas	3% H2O2 + PBS 1x	30 min	30 min	30 min
3 Lavados de 5 min				
Bloqueo Proteínas Endógenas	PBS 1x + Triton 0.05%	BSA 5%	BSA 5%	BSA 2%
		Burro 5%	Burro 5%	Cabra 5%
		Cabra 5%	Cabra 5%	Leche 2%
		Leche 2%	Leche 2%	
	Tiempo	60 min	60 min	60 min
3 Lavados de 5 min				
Anticuerpo Primario	PBS 1x + Triton 0.05%	Cabra 5%	Cabra 5%	Cabra 5%
		Rata 5%	Rata 5%	Rata 5%
		Caballo 1%	Caballo 1%	Caballo 1%
		Leche 2%	Leche 1%	
	Dilución	1:1000	1:500	1:1000
Tiempo	4 °C Overnigth	4 °C Overnigth	4 °C Overnigth	
3 Lavados de 5 min				
Anticuerpo Secundario	PBS 1x	Cabra 5%	Cabra 5%	Cabra 5%
		Rata 5%	Rata 5%	Rata 5%
		Caballo 5%	Caballo 5%	Caballo 5%
	Dilución	1:400	1:400	1:400
	Tiempo	60 min	60 min	60 min
3 Lavados de 5 min				
Revelado	Solución	PBS 1X	PBS 1X	PBS 1X
		H2O2 3%	H2O2 3%	H2O2 3%
	DAB	Cromógeno	Cromógeno	Cromógeno
Deshidratación	Batería Creciente OHs/ Xilol I y II	1 min / 3 min	1 min / 3 min	1 min / 3 min
Montaje	Solución	Entellan	Entellan	Entellan

ANEXO 3: Protocolo de estandarización del marcador LC3-B y p62 para Inmunofluorescencia

		LC3B	P62
	Código	ab48394	H00008878-M01
Desparafinación	Estufa	45 min	45 min
	Xilol I x 3	3 min	3 min
	Xilol II x 2	3 min	3 min
	Xilol III x 3	3 min	3 min
	Batería Decreciente de OH	2 min	2 min
Desenmascaramiento	Citrato 1x +Tween 20	Copplin	Copplin
	Tiempo	30 min	30 min
3 Lavados de 5 min			
Bloqueo Proteínas Endógenas	PBS 1x + Triton 0.05%	BSA 5%	BSA 2%
		Burro 5%	Cabra 5%
		Cabra 5%	Leche 2%
		Ovoalbúmina 2%	Ovoalbúmina 2%
	Tiempo	60 min	60 min
3 Lavados de 5 min			
Anticuerpo Primario	PBS 1x + Triton 0.05%	Cabra 5%	Cabra 5%
		Rata 5%	Rata 5%
		Caballo 5%	Caballo 5%
		Ovoalbúmina 2%	Ovoalbúmina 2%
	Dilución	1:1000	1:1000
	Tiempo	4 °C Overnigth	4 °C Overnigth
3 Lavados de 5 min			
Anticuerpo Secundario Alexa fluor 488 FOTOSENSIBLE	PBS 1x	Cabra 5%	Cabra 5%
		Rata 5%	Rata 5%
		Caballo 5%	Caballo 5%
	Dilución	1:400	1:400
	Tiempo	60 min	60 min
3 Lavados de 5 min			
Montaje	Solución	DAPI	DAPI

ANEXO 4: Protocolo de estandarización de los marcadores NeuN, GFAP, IBA-1 y NF para Inmunofluorescencia

		NeuN	NF	GFAP	IBA-1
	Código	ab104225	MAB5262	IF03L	ab5076
Desparafinación	Estufa	45 min	45 min	45 min	45 min
	Xilol I x 3	3 min	3 min	3 min	3 min
	Xilol II x 2	3 min	3 min	3 min	3 min
	Xilol III x 3	3 min	3 min	3 min	3 min
	Batería Decreciente de OH	2 min	2 min	2 min	2 min
Desenmascaramiento	Citrato 1x +Tween 20	Copplin	Copplin	Copplin	Copplin
	Tiempo	30 min	30 min	30 min	30 min
3 Lavados de 5 min					
Bloqueo Proteínas Endógenas	PBS 1x + Triton 0.05%	BSA 5%	BSA 2%	Burro 5%	Burro 5%
		Burro 5%	Cabra 5%	Cabra 5%	Caballo 5%
		Cabra 5%	Leche 2%		
		Ovoalbúmina 2%	Ovoalbúmina 2%	Ovoalbúmina 2%	
	Tiempo	60 min	60 min	60 min	60 min
3 Lavados de 5 min					
Anticuerpo Primario	PBS 1x + Triton 0.05%	Cabra 5%	Cabra 5%	Cabra 5%	Burro 5%
		Rata 5%	Rata 5%	Burro 5%	
		Caballo 1%	Caballo 1%		
		Ovoalbúmina 1%	Ovoalbúmina 1%	Ovoalbúmina 1%	Ovoalbúmina 1%
	Dilución	1:1000	1:1000	1:400	1:400
	Tiempo	4 °C Overnigth	4 °C Overnigth	4 °C Overnigth	4 °C Overnigth
3 Lavados de 5 min					
Anticuerpo Secundario Alexa fluor 488 FOTOSENSIBLE	PBS 1x	Cabra 5%	Cabra 5%	Cabra 5%	Cabra 5%
		Rata 5%	Rata 5%	Rata 5%	Rata 5%
		Caballo 5%	Caballo 5%	Caballo 5%	Caballo 5%
	Dilución	1:400	1:400	1:400	1:400
	Tiempo	60 min	60 min	60 min	60 min
3 Lavados de 5 min					
Montaje	Solución	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI

ANEXO 5: Tabla de distribución del número de ratas y quistes según sexo.

Grupos	ratas evaluadas (n)	# Quistes	Sexo (Hembras:Machos)
Controles (Ctrl)	5	NA	3:2
Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H)	3	NA	1:2
Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M)	5	NA	3:2
Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H)	6	7	3:3
Infectados Tratados 24 H (IT 24H)	8	10	4:4
Infectados con vehiculo 2 Meses (IV 2M)	8	11	4:4
Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M)	7	10	3:4
Total	42	38	21:21

ANEXO 6: Tabla de comparaciones múltiples de Dunn's para el marcador LC3B en inmunohistoquímica.

Prueba de Dunn	Significativo?	Resumen	Valores de p individuales
Ctrl vs. Ctrl 24H	No	ns	0.9657
Ctrl vs. Ctrl 2M	No	ns	0.5802
Ctrl vs. IV 24H	Yes	**	0.0036
Ctrl vs. IV 2M	Yes	**	0.0037
Ctrl vs. IT 24H	Yes	****	<0.0001
Ctrl vs. IT 2M	Yes	**	0.0011
Ctrl 24H vs. Ctrl 2M	No	ns	0.6628
Ctrl 24H vs. IV 24H	Yes	*	0.0152
Ctrl 24H vs. IV 2M	Yes	*	0.0186
Ctrl 24H vs. IT 24H	Yes	***	0.0008
Ctrl 24H vs. IT 2M	Yes	**	0.0076
Ctrl 2M vs. IV 24H	Yes	*	0.0205
Ctrl 2M vs. IV 2M	Yes	*	0.0243
Ctrl 2M vs. IT 24H	Yes	***	0.0005
Ctrl 2M vs. IT 2M	Yes	**	0.0086
IV 24H vs. IV 2M	No	ns	0.7684
IV 24H vs. IT 24H	No	ns	0.2731
IV 24H vs. IT 2M	No	ns	0.8668
IV 2M vs. IT 24H	No	ns	0.1183
IV 2M vs. IT 2M	No	ns	0.6065
IT 24H vs. IT 2M	No	ns	0.3064

ANEXO 7: Tabla de comparaciones múltiples de Dunn's para el marcador Beclin-1 en inmunohistoquímica.

Prueba de Dunn	Significativo?	Resumen	Valores de p individuales
Ctrl vs. Ctrl 24H	No	ns	0.8559
Ctrl vs. Ctrl 2M	No	ns	0.7449
Ctrl vs. IV 24H	Yes	*	0.0112
Ctrl vs. IV 2M	Yes	**	0.0092
Ctrl vs. IT 24H	Yes	***	0.0003
Ctrl vs. IT 2M	Yes	**	0.0074
Ctrl 24H vs. Ctrl 2M	No	ns	0.9202
Ctrl 24H vs. IV 24H	Yes	*	0.0182
Ctrl 24H vs. IV 2M	Yes	*	0.0178
Ctrl 24H vs. IT 24H	Yes	**	0.0015
Ctrl 24H vs. IT 2M	Yes	*	0.015
Ctrl 2M vs. IV 24H	Yes	**	0.004
Ctrl 2M vs. IV 2M	Yes	**	0.0029
Ctrl 2M vs. IT 24H	Yes	****	<0.0001
Ctrl 2M vs. IT 2M	Yes	**	0.0028
IV 24H vs. IV 2M	No	ns	0.8317
IV 24H vs. IT 24H	No	ns	0.4388
IV 24H vs. IT 2M	No	ns	0.8943
IV 2M vs. IT 24H	No	ns	0.25
IV 2M vs. IT 2M	No	ns	0.9267
IT 24H vs. IT 2M	No	ns	0.2909

ANEXO 8: Tabla de comparaciones múltiples de Dunn's para el marcador p62 en inmunohistoquímica.

Prueba de Dunn	Significativo?	Resumen	Valores de p individuales
Ctrl vs. Ctrl 24H	No	ns	0.519
Ctrl vs. Ctrl 2M	No	ns	0.5096
Ctrl vs. IV 24H	Yes	***	0.0008
Ctrl vs. IV 2M	Yes	**	0.0046
Ctrl vs. IT 24H	Yes	***	0.0002
Ctrl vs. IT 2M	Yes	****	<0.0001
Ctrl 24H vs. Ctrl 2M	No	ns	0.9413
Ctrl 24H vs. IV 24H	Yes	*	0.0298
Ctrl 24H vs. IV 2M	Yes	*	0.0209
Ctrl 24H vs. IT 24H	Yes	*	0.0158
Ctrl 24H vs. IT 2M	Yes	**	0.004
Ctrl 2M vs. IV 24H	Yes	**	0.008
Ctrl 2M vs. IV 2M	Yes	*	0.0385
Ctrl 2M vs. IT 24H	Yes	**	0.0026
Ctrl 2M vs. IT 2M	Yes	***	0.0004
IV 24H vs. IV 2M	No	ns	0.3946
IV 24H vs. IT 24H	No	ns	0.8808
IV 24H vs. IT 2M	No	ns	0.4234
IV 2M vs. IT 24H	No	ns	0.2601
IV 2M vs. IT 2M	No	ns	0.0687
IT 24H vs. IT 2M	No	ns	0.4611

ANEXO 9: Tabla de Estadística Descriptiva para el marcador LC3B en inmunohistoquímica.

	Ctrl	Ctrl 24H	Ctrl 2M	IV 24H	IV 2M	IT 24H	IT 2M
Ratas (n)	5	3	5	7	11	10	10
Mínimo	0.092	0.033	0.063	1.375	1.066	1.576	0.172
25% Percentil	0.100	0.033	0.119	2.089	1.487	2.333	1.452
Mediana	0.110	0.129	0.226	2.283	2.369	2.948	2.417
75% Percentil	0.123	0.155	0.350	2.935	2.664	3.981	3.522
Máximo	0.135	0.155	0.377	3.170	3.071	4.364	4.024
Media	0.111	0.106	0.233	2.404	2.138	3.070	2.444
Desviación Estándar	0.015	0.064	0.124	0.604	0.699	0.929	1.234
Error estándar de la media	0.007	0.037	0.055	0.228	0.211	0.294	0.390
Más bajo 95% CI	0.092	-0.054	0.079	1.845	1.668	2.406	1.561
Superior 95% CI	0.130	0.265	0.386	2.963	2.607	3.734	3.326
Rangos de la media	5.200	5.667	10.400	30.570	28.450	38.600	31.800

ANEXO 10: Tabla de Estadística Descriptiva para el marcador Beclin-1 en inmunohistoquímica.

	Ctrl	Ctrl 24H	Ctrl 2M	IV 24H	IV 2M	IT 24H	IT 2M
Ratas (n)	5	3	5	7	11	10	10
Mínimo	0.171	0.110	0.037	0.737	0.700	0.964	0.585
25% Percentil	0.182	0.110	0.037	0.941	0.934	1.253	0.936
Mediana	0.434	0.361	0.283	1.228	1.146	1.335	1.133
75% Percentil	0.500	0.411	0.401	1.529	1.442	1.589	1.666
Máximo	0.549	0.411	0.473	1.878	1.620	2.480	2.155
Media	0.360	0.294	0.232	1.249	1.176	1.495	1.263
Desviación Estándar	0.168	0.161	0.191	0.392	0.300	0.410	0.510
Error estándar de la media	0.075	0.093	0.085	0.160	0.095	0.119	0.161
Más bajo 95% CI	0.151	-0.107	-0.005	0.837	0.962	1.207	0.898
Superior 95% CI	0.568	0.695	0.469	1.660	1.390	1.738	1.627
Rangos de la media	8.600	6.667	5.600	31.000	29.400	36.730	30.000

ANEXO 11: Tabla de Estadística Descriptiva para el marcador p62 en inmunohistoquímica.

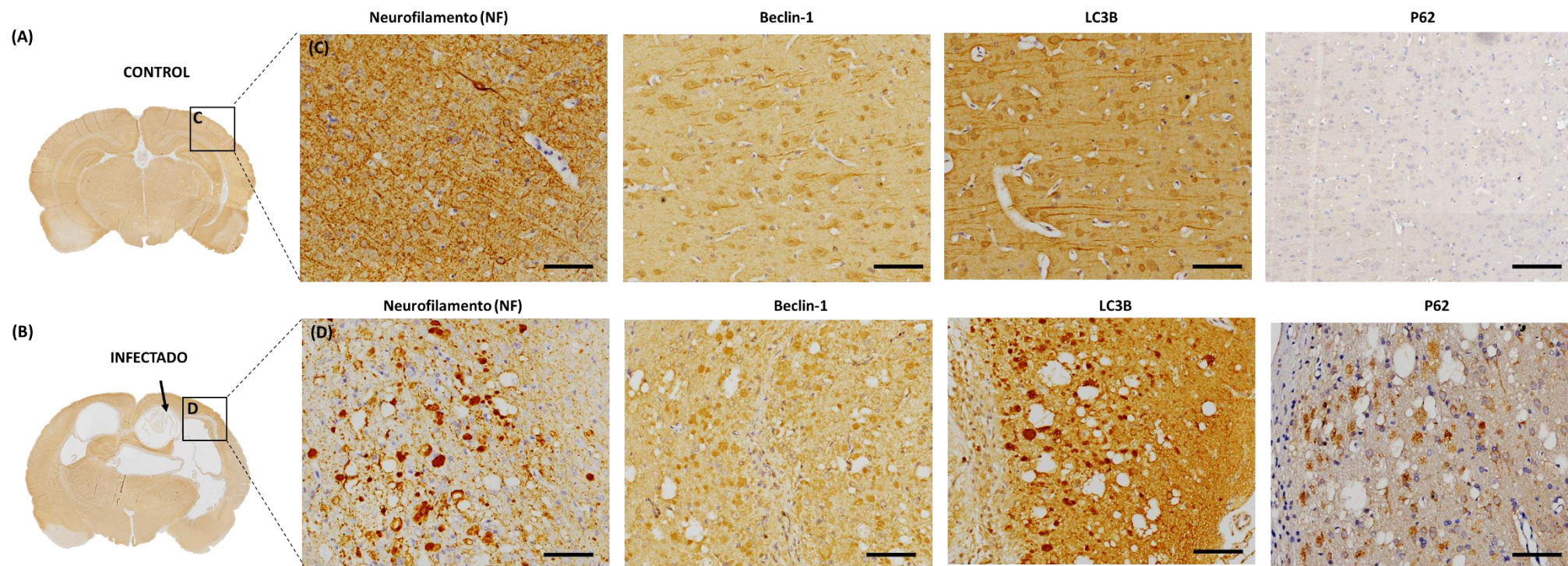
	Ctrl	Ctrl 24H	Ctrl 2M	IV 24H	IV 2M	IT 24H	IT 2M
Ratas (n)	5	3	5	7	11	10	10
Mínimo	0.002	0.015	0.015	0.691	0.679	0.865	0.987
25% Percentil	0.004	0.015	0.015	0.966	0.816	1.066	1.147
Mediana	0.007	0.021	0.018	1.173	1.055	1.147	1.287
75% Percentil	0.012	0.032	0.024	1.308	1.192	1.382	1.836
Máximo	0.013	0.032	0.025	1.853	1.724	1.969	1.924
Media	0.007	0.023	0.019	1.200	1.059	1.271	1.430
Desviación Estándar	0.004	0.009	0.005	0.358	0.308	0.345	0.352
Error estándar de la media	0.002	0.005	0.002	0.135	0.097	0.104	0.111
Más bajo 95% CI	0.002	0.001	0.013	0.869	0.839	1.040	1.178
Superior 95% CI	0.013	0.044	0.025	1.531	1.279	1.503	1.681
Rangos de la media	3.000	10.000	9.200	32.290	26.050	33.360	38.150

ANEXO 12: Porcentaje de colocalización en cebreros de ratas controles, infectadas y tratadas.

Marcadores	Grupos			Ctrl			Ctrl 24H			Ctrl 2M			IV 24H			IV 2M			IT 24H			IT 2M		
	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n	Promedio (%)	DE	n
NeuN	15.75	0.80	2	16.59	3.59	2	13.11	1.12	2	8.58	0.53	2	7.12	0.23	2	8.71	0.98	3	7.22	2.51	3			
Iba-1	0.02	0.01	2	0.02	0.01	2	0.02	0.02	2	0.03	0.02	2	0.01	0.00	2	0.02	0.00	3	0.02	0.01	3			
GFAP	0.02	0.00	2	0.02	0.03	2	0.02	0.01	2	0.01	0.00	2	0.01	0.00	2	0.02	0.00	3	0.01	0.00	3			
NF	0.04	0.02	2	0.09	0.12	2	0.12	0.16	2	18.03	0.94	2	14.85	2.26	2	18.11	1.59	3	14.98	1.57	3			
p62	0.07	0.01	2	0.10	0.04	2	0.08	0.03	2	16.34	0.02	2	14.62	3.19	2	17.36	1.00	3	13.03	4.51	3			
		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo		Máximo	Mínimo
NeuN		16.32	15.19		19.13	14.05		13.90	12.32		8.96	8.20		7.28	6.96		9.64	7.69		10.07	5.36			
Iba-1		0.03	0.02		0.03	0.01		0.03	0.01		0.04	0.01		0.02	0.01		0.02	0.02		0.02	0.01			
GFAP		0.02	0.02		0.05	0.00		0.03	0.01		0.01	0.01		0.02	0.01		0.02	0.01		0.01	0.01			
NF		0.05	0.02		0.17	0.00		0.23	0.01		18.69	17.36		16.45	13.25		19.36	16.32		16.32	13.25			
p62		0.08	0.06		0.12	0.07		0.11	0.06		16.35	16.32		16.87	12.36		18.36	16.35		17.36	8.37			

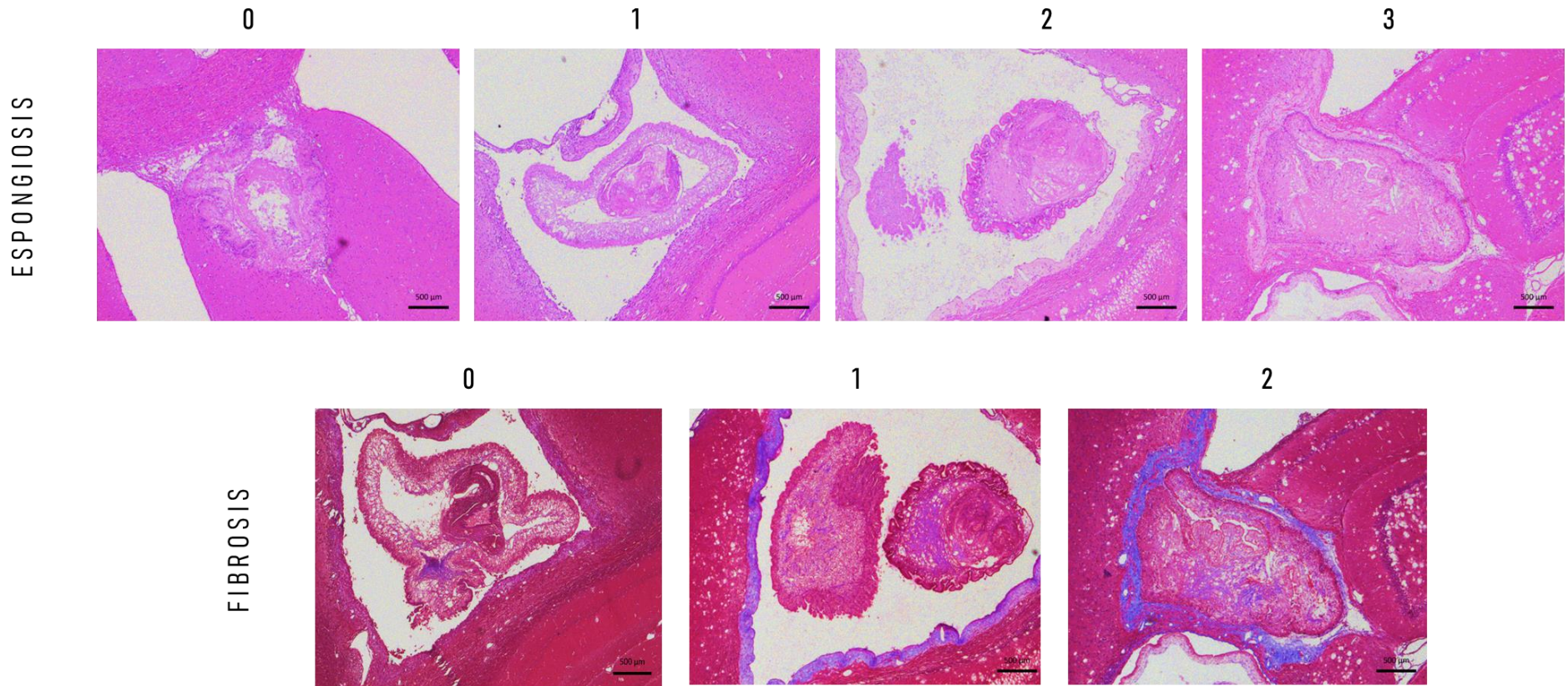
Notas: Se analizaron un total de 16 cerebros de ratas, divididos en siete grupos: 2 ratas del grupo Control (Ctrl), 2 ratas del grupo Controles Tratados 24 horas (Ctrl 24H), 2 ratas del grupo Controles Tratados 2 Meses (Ctrl 2M), 2 ratas del grupo Infectados con vehículo 24 horas (IV 24H), 2 ratas del grupo Infectados con vehículo 2 Meses (IV 2M), 3 ratas del grupo Infectados Tratados 24 H (IT 24H) y 3 ratas del grupo Infectados Tratados 2 Meses (IT 2M). La tabla muestra los promedios de los porcentajes de colocalización, la desviación estándar, el n utilizado por cada grupo y los valores máximos y mínimos de los porcentajes de colocalización evaluados por un doble marcaje entre LC3B y marcadores neuronales (NeuN, NF), gliales (IBA-1, GFAP) y p62.

ANEXO 13: Imágenes de estandarización de LC3B, Beclin-1, p62 y NF en Inmunohistoquímica.



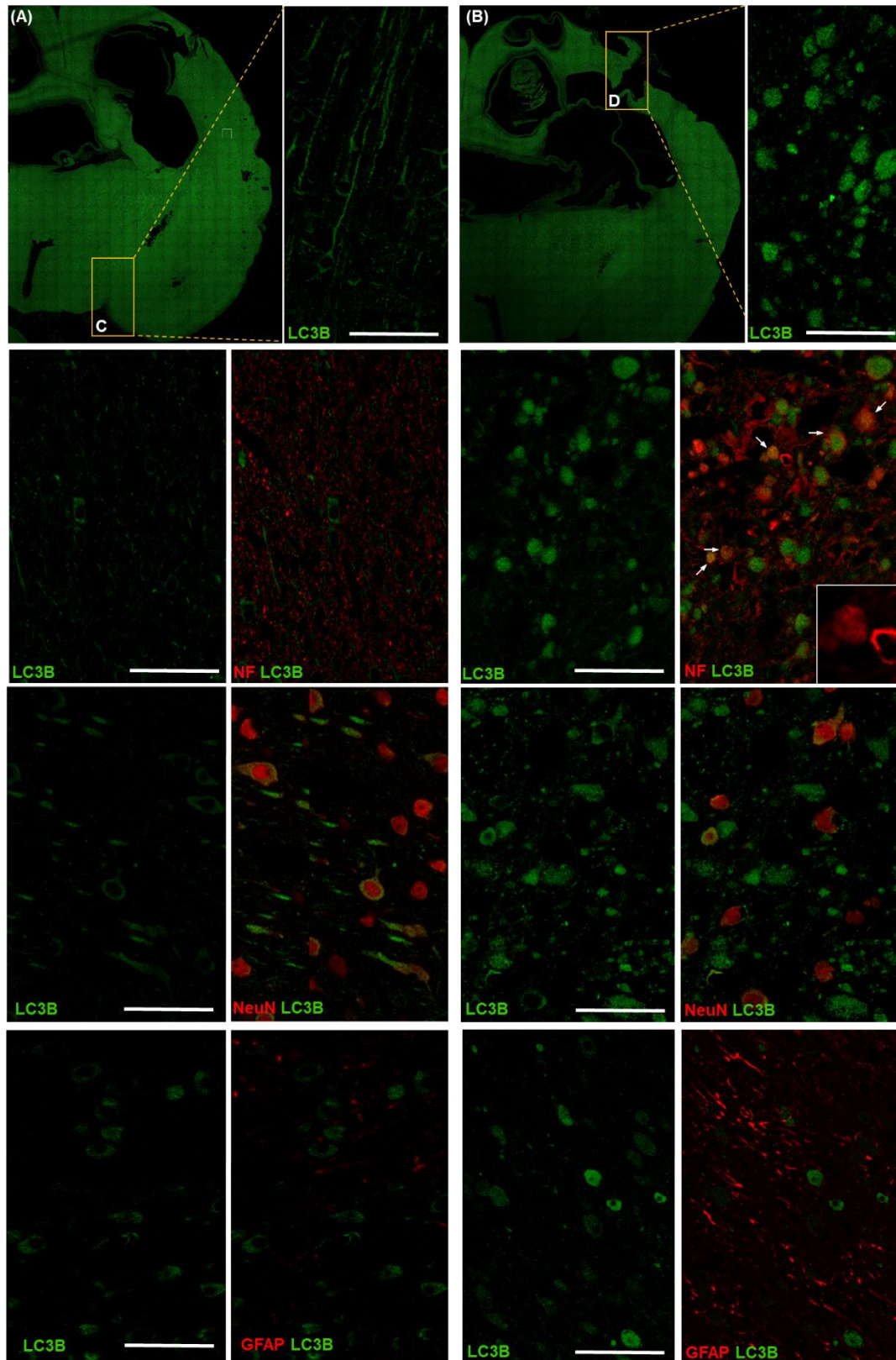
Nota: Inmunohistoquímico en ratas control (A) e infectadas (B). Se evaluó la misma región para ambos cerebros (CD). La intensidad del marcado es notoria entre cerebros sanos e infectados. (D) Cerca del cisticerco (flecha negra) se observaron inflamaciones focales de los axones con citoesqueleto alterado denominadas esferoides, que describen reactividad de mayor intensidad. Se muestra un patrón similar con LC3B, Beclin y p62. Las barras de escala corresponden a 50 μ m.

ANEXO 14: Imágenes de Histopatología en modelo de rata con NCC.



Nota: Histopatología en cerebros de ratas con Neurocisticercosis. Los cambios esponjosos (espongiosis) se caracterizaron como espacios llenos de líquido de tamaño variable en el tejido cerebral que rodea un cisticercos y se clasificó 0 a 3 acorde con la gravedad. El daño de los cisticercos se basó en la pérdida de integridad de la membrana vesicular del cisticercos y se clasificó de la siguiente manera: grado 0 (daño mínimo en el tegumento, pero con el subtegumento conservado), grado 1: daño severo en el tegumento (tegumento fusionado al parénquima cerebral, y con núcleos celulares desordenados), con ligero daño en el subtegumento (vacuolización, células inflamatorias dentro del subtegumento) y grado 2 que representa la pérdida total del tegumento, con alteración severa del subtegumento (pérdida de canalículos excretorios). Las barras de escala corresponden a 50 µm

ANEXO 15: Imágenes de Colocalización LC3B con NeuN, NF y GFAP en una región cercana y lejana al quiste.



Nota: Las flechas blancas muestran colocalización. Barra de escala de 50 μ m.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Del Brutto OH. Neurocysticercosis: a review. Scientific World Journal [Internet].2012 ;2012:159821.Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312322>
2. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. The Neurohospitalist [Internet]. 2014 Oct ;4(4):205–12. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25360206>
3. Garcia HH. Neurocysticercosis. Neurol Clin [Internet]. 2018;36(4):851–64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30366559/>
4. Gripper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease–A review [Internet]. Vol. 166, Acta Tropica. Elsevier B.V.; 2017 . p. 218–24. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27880878/>
5. Fogang YF, Savadogo AA, Camara M, Toffa DH, Basse A, Sow AD, et al. Managing Neurocysticercosis: Challenges and solutions [Internet]. Vol. 8, International Journal of General Medicine. Dove Medical Press Ltd.; 2015. p. 333–44. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/26527895/>
6. Herrador Z, Pérez-Molina JA, Henríquez Camacho CA, Rodríguez-Guardado A, Bosch-Nicolau P, Calabuig E, et al. Imported cysticercosis in Spain: A retrospective case series from the +REDIVI Collaborative Network. Travel Med Infect Dis [Internet]. 2020 Sep 1; 37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32335208/>
7. García HH, Del Brutto OH. Imaging findings in neurocysticercosis. In: Acta Tropical [Internet]. Elsevier; 2003 . p. 71–8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12781380/>
8. White AC, Coyle CM, Rajshekhar V, Singh G, Hauser WA, Mohanty A, et al. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis: 2017 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2018; 98(4):945–66. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928844/>

9. Carpio A, Fleury A, Romo ML, Abraham R. Neurocysticercosis: the good, the bad, and the missing [Internet]. Vol. 18, Expert Review of Neurotherapeutics. Taylor and Francis Ltd; 2018. p. 289–301. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30505305/>
10. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH. Taenia solium cysticercosis. In: Lancet [Internet]. Elsevier Limited; 2003 . p. 547–56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3103219/>
11. Min Z. Parenchymal neurocysticercosis [Internet]. Vol. 10, Internal and Emergency Medicine. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2015. p. 105–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24889913/>
12. Mahale RR, Mehta A, Rangasetty S. Extraparenchymal (Racemose) neurocysticercosis and its multitude manifestations: A comprehensive review [Internet]. Vol. 11, Journal of Clinical Neurology (Korea). Korean Neurological Association; 2015 . p. 203–11. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4507373/>
13. Marcin Sierra M, Arroyo M, Cadena Torres M, Ramírez Cruz N, García Hernández F, Taboada D, et al. Extraparenchymal neurocysticercosis: Demographic, clinicoradiological, and inflammatory features. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2017 Jun 9 ;11(6). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28599004/>
14. Ghonge NP, Mittal D. Evaluation of imaging patterns of extra-cranial cysticercosis in North India. Radiol Infect Dis [Internet]. 2017 Jun 1;4(2):49–57. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352621117300062>
15. 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 [Internet]. 2015 Aug; 185(8):2259–68. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26216286>

16. Sikasunge CS, Johansen M V., 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* [Internet]. 2009 Mar 23; 160(3–4):242–50. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19117683/>
17. Prodjinotho UF, Lema J, Lacordia M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *taenia solium* neurocysticercosis infection and treatment [Internet]. Vol. 14, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Public Library of Science; 2020. p. 1–16. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7162612/>
18. 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. *J Neurosci Res* [Internet]. 2019 Feb 1; 97(2):137–48. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30315659/>
19. Tellez-Zenteno JF, Hernandez-Ronquillo L. Epidemiology of neurocysticercosis and epilepsy, is everything described? [Internet]. Vol. 76, *Epilepsy and Behavior*. 2017. p. 146–50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28526213>
20. Jácome Sánchez EC, Correa Díaz EP, Martínez Burbano B, Ortiz Yépez MA, García Castillo MA. Neurocysticercosis a public health problem. *Clin Case Reports* [Internet]. 2017 Apr; 5(4):543–4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396789>
21. Bruno E, Bartoloni A, Zammarchi L, Strohmeyer M, Bartalesi F, Bustos J, et al. Epilepsy and Neurocysticercosis in Latin America: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2013 Oct 1 ;7(10). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3814340/>
22. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White AC, et al. Neurocysticercosis: Neglected but not forgotten. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 May ; 6(5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3362619/>

23. Dametto E. Neuropsychiatric manifestations and epidemiology of neurocysticercosis TT - Manifestações neuropsiquiátricas e epidemiologia de neurocisticercose. Rev bras neurol [Internet]. 2017; 53(1):5–14. Disponible en: <http://fi-admin.bvsalud.org/document/view/5qc5x>
24. Son HJ, Kim MJ, Jung KH, Choi S, Jung J, Chong YP, et al. Neurocysticercosis: Clinical characteristics and changes from 26 years of experience in an university hospital in Korea. Korean J Parasitol [Internet]. 2019 Jun 1;57(3):265–71. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6616162/>
25. Coral-Almeida M, Gabriël S, Abatih EN, Praet N, Benitez W, Dorny P. Taenia solium human cysticercosis: A systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015; 9(7). Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493064/>
26. Moyano LM, O’Neal SE, Ayvar V, Gonzalez G, Gamboa R, Vilchez P, et al. High Prevalence of Asymptomatic Neurocysticercosis in an Endemic Rural Community in Peru. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2016 Dec 19 ;10(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5167259/>
27. Garvey BT, Moyano LM, Ayvar V, Rodriguez S, Gilman RH, Gonzalez AE, et al. Neurocysticercosis among people living near pigs heavily infected with cysticercosis in rural endemic Peru. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2018; 98(2):558–64. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29210354/>
28. Pesantes MA, Moyano LM, Sommerville C. Neurocysticercosis in Northern Peru: Qualitative insights from men and women about living with seizures. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2020 Oct 1; 14(10):1–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33035212/>
29. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis [Internet]. Vol. 13, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2014. p. 1202–15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6108081/>

30. Varghese V, Chandra SR, Christopher R, Rajeswaran J, Prasad C, Subasree R, et al. Cognitive dysfunction and its determinants in patients with neurocysticercosis. *Indian J Psychol Med* [Internet]. 2016 Mar 1 ; 38(2):142–6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820554/>
31. Gilman RH. Diagnostic criteria for neurocysticercosis — a difficult update. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2016 Oct 1; 12(10):560–1. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/nrneurol.2016.145>
32. Garcia HH, O’Neal SE, Noh J, Handali S, Gilman RH, Gonzalez AE, et al. Laboratory diagnosis of neurocysticercosis (taenia solium). *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Sep 1; 56(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113464/>
33. L’Ollivier C, González LM, Gárate T, Martin L, Martha B, Duong M, et al. Histological and molecular biology diagnosis of neurocysticercosis in a patient without history of travel to endemic areas: case report. *Parasite* [Internet]. 2012 Nov 1; 19(4):441–4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671466/>
34. Zhao BC, Jiang HY, Ma WY, Jin D Di, Li HM, Lu H, et al. Albendazole and Corticosteroids for the Treatment of Solitary Cysticercus Granuloma: A Network Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Feb 5; 10(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4744042/>
35. Mahamat A, Abboud P, Demar M, JeanBourquin D, Djossou F. Combined antiparasitic treatment for neurocysticercosis [Internet]. Vol. 15, *The Lancet Infectious Diseases*. 2015. p. 264–5. Disponible en: www.thelancet.com/infection
36. Del Brutto OH, Roos KL, Coffey CS, García HH. Meta-analysis: Cysticidal drugs for neurocysticercosis: Albendazole and praziquantel [Internet]. Vol. 145, *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians; 2006. p. 43–51. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16818928/>
37. Mahanty S, Orrego MA, Mayta H, Marzal M, Cangalaya C, Paredes A, et al. Post-treatment Vascular Leakage and Inflammatory Responses around Brain Cysts in Porcine Neurocysticercosis. Jones MK, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015

- Mar 16; 9(3):e0003577. Disponible en:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003577>
38. Sikasunge CS, Johansen M V., Willingham AL, Leifsson PS, Phiri IK. Taenia solium porcine cysticercosis: Viability of cysticerci and persistency of antibodies and cysticercal antigens after treatment with oxfendazole. Vet Parasitol [Internet]. 2008 Nov 25; 158(1–2):57–66. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18834668/>
39. Pondja A, Neves L, Mlangwa J, Afonso S, Fafetine J, Willingham AL, et al. Use of Oxfendazole to Control Porcine Cysticercosis in a High-Endemic Area of Mozambique. Flisser A, editor. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2012 May 29; 6(5):e1651. Disponible en:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001651>
40. Gonzalez AE, Falcon N, Gavidia C, Garcia HH, Tsang VCW, Bernal T, et al. Time-response curve of oxfendazole in the treatment of swine cysticercosis. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 1998; 59(5):832–6. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9840607/>
41. Castillo Vilca G. Estudio comparativo de los tratamientos antihelmínticos de neurocisticercosis en ratas albinas holtzman tratados con albendazol- praziquantel y oxfendazol- praziquantel. Repos Tesis - UNMSM [Internet]. 2018; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9499>
42. Gonzalez AE, Codd EE, Horton J, Garcia HH, Gilman RH. Oxfendazole: a promising agent for the treatment and control of helminth infections in humans [Internet]. Vol. 17, Expert Review of Anti-Infective Therapy. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 51–6. Disponible en:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14787210.2018.1555241>
43. White AC, Coyle CM, Rajshekhar V, Singh G, Hauser WA, Mohanty A, et al. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis: 2017 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American society of tropical

- medicine and hygiene (ASTMH). *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(4):945–66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928844/>
44. Kohli L, Roth KA. Autophagy: Cerebral home cooking. *Am J Pathol* [Internet]. 2010;176(3):1065–71. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832126/>
45. Beth Levine, Guido Kroemer. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell.* 2008;132(1):27–42. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696814/>
46. Weidberg H, Shvets E, Elazar Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2011;80:125–56. Disponible en: <https://sci-hub.se/10.1146/annurev-biochem-052709-094552>
47. Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* [Internet]. 2018;14(2):207–15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902171/>
48. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* [Internet]. 2010;221(1):3–12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2990190/>
49. Farré JC, Subramani S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: Lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2016;17(9):537–52. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm.2016.74.pdf>
50. Keller CW, Münz C, Lünemann JD. Autophagy Pathways in CNS Myeloid Cell Immune Functions. *Trends Neurosci* [Internet]. 2020;43(12):1024–33. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.09.003>
51. Hale AN, Ledbetter DJ, Gawriluk TR, Rucker EB. Autophagy: Regulation and role in development. *Autophagy* [Internet]. 2013;9(7):951–72. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722331/pdf/auto-9-951.pdf>

52. Lin PW, Chu ML, Liu HS. Autophagy and metabolism. *Kaohsiung J Med Sci* [Internet]. 2021;37(1):12–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3010857/>
53. Benito-Cuesta I, Diez H, Ordoñez L, Wandosell F. Assessment of Autophagy in Neurons and Brain Tissue. *Cells* [Internet]. 2017;6(3):25. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617971/>
54. Plaza-Zabala A, Sierra-Torre V, Sierra A. Autophagy and microglia: Novel partners in neurodegeneration and aging. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372614/>
55. M. Christopher AMLS. Methods for the Detection of Autophagy in Mammalian Cells. *Physiol Behav* [Internet]. 2016;176(1):100–106. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982470/>
56. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* [Internet]. 2010;140(3):313–26. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852113/>
57. Martinet W, Roth L, De Meyer G. Standard Immunohistochemical Assays to Assess Autophagy in Mammalian Tissue. *Cells* [Internet]. 2017;6(3):17. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617963/>
58. Congcong H, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Bone* [Internet]. 2010;23(1):140–7.[Internet] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2854269/>
59. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* [Internet]. 2011;18(4):571–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
60. Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Macleod KF, Program ST, Sciences I. Measuring Autophagy in Stressed Cells. 2015;129–50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4460991/pdf/nihms685618.pdf>

61. Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois E, Sivridis E, Pouliliou S, et al. Autophagosome Proteins LC3A , LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics in Cancer Cell Lines. 2015;1–13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4574774/>
62. Lippai M, Low P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. Biomed Res Int [Internet]. 2014;2014. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4075091/#B48>
63. Kulkarni A, Chen J, Maday S. Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. Curr Opin Neurobiol [Internet]. 2018;51:29–36. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.008>
64. Stavoe AKH, Holzbaur ELF. Autophagy in neurons. Annu Rev Cell Dev Biol [Internet]. 2019;35(215):477–500. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6996145/>
65. Yamamoto A, Yue Z. Autophagy and its normal and pathogenic states in the brain. Annu Rev Neurosci [Internet]. 2014;37(March):55–78. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014149>
66. Tavernarakis N. Regulation and Roles of Autophagy in the Brain. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2020;1195:33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32468455/>
67. Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. Cold Spring Harb Perspect Biol [Internet]. 2012;4(10):1–23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3475163/>
68. Cuervo AM. Autophagy in neurons: it is not all about food. Trends Mol Med [Internet]. 2006;12(10):461–4. Disponible en: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.08.003>

69. Maday S. Mechanisms of neuronal homeostasis: Autophagy in the axon. *Brain Res* [Internet]. 2016;1649:143–50. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5045311/pdf/nihms782490.pdf>
70. Negrete-Hurtado A, Overhoff M, Bera S, De Bruyckere E, Schätzmüller K, Kye MJ, et al. Autophagy lipidation machinery regulates axonal microtubule dynamics but is dispensable for survival of mammalian neurons. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15287-9>
71. Wong YC, Holzbaaur ELF. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J Neurosci* [Internet]. 2014;34(4):1293–305. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3898289/pdf/zns1293.pdf>
72. Reimer RJ, Schneider K, Leal-Ortiz S, Montenegro-Venegas C, Kim SA, Garner LC, et al. Bassoon Controls Presynaptic Autophagy through Atg5. *Neuron* [Internet]. 2017;93(4):897-913.e7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.026>
73. Fu M. LC3 Binding to the scaffolding protein JIP1 Regulates Dynein-Driven Transport of Autophagosomes. *Dev cell* [Internet]. 2011;4(164):577–90. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109720/pdf/nihms587631.pdf>
74. Su P, Zhang J, Wang D, Zhao F, Cao Z, Aschner M, et al. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia [Internet]. Vol. 319, *Neuroscience*. Pergamon; 2016. p. 155–67. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306452216000634>
75. Wu J, Lipinski MM. Autophagy in Neurotrauma: Good, Bad, or Dysregulated. *Cells* [Internet]. 2019;8(7):693. Disponible en: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.3390/cells8070693>

76. Jin M, Wang F, Qi D, Liu W, Gu C, Mao C-J, et al. A Critical Role of Autophagy in Regulating Microglia Polarization in Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2018;10(November):1–13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6256089/pdf/fnagi-10-00378.pdf>
77. Belgrad J, de Pace R, Douglas Fields R. Autophagy in myelinating glia. [Internet]. 2020;40(2):256–66. Disponible en: <https://www.jneurosci.org/content/jneuro/early/2019/11/19/JNEUROSCI.1066-19.2019.full.pdf>
78. Yin Y, Sun G, Li E, Kiselyov K, Sun D. ER stress and impaired autophagy flux in neuronal degeneration and brain injury. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2017;34:3–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.008>
79. Di Malta C, Fryer JD, Settembre C, Ballabio A. A novel culprit in lysosomal storage disorders. *Autophagy* [Internet]. 2012;8(December):1873–4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3541309/pdf/auto-8-1871.pdf>
80. Zheng HF, Yang YP, Hu LF, Wang MX, Wang F, Cao LD, et al. Autophagic Impairment Contributes to Systemic Inflammation-Induced Dopaminergic Neuron Loss in the Midbrain. Li X-J, editor. *PLoS One* [Internet];8(8):e70472. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070472>
81. Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: Autophagy in infectious diseases [Internet]. Vol. 16, *Cell Death and Differentiation*. NIH Public Access; 2009 [cited 2019 Mar 12]. p. 57–69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18772897>
82. Zheng HF, Yang YP, Hu LF, Wang MX, Wang F, Cao LD, et al. Autophagic Impairment Contributes to Systemic Inflammation-Induced Dopaminergic Neuron Loss in the Midbrain. Li X-J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Aug 6 ;8(8):e70472. Disponible en: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0070472>

83. Bredesen DE, Rao R V, Mehlen P. Cell death in the nervous system [Internet]. Vol. 443, Nature. NIH Public Access; 2006. p. 796–802. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17051206>
84. Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, et al. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer’s disease. J Neurosci [Internet]. 2008 Jul 2 ;28(27):6926–37. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596167>
85. Alirezaei M, Kemball CC, Whitton JL. Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease. Eur J Neurosci [Internet]. 2011 Jan;33(2):197–204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138487>
86. Muller S, Brun S, René F, de Sèze J, Loeffler JP, Jeltsch-David H. Autophagy in neuroinflammatory diseases [Internet]. Vol. 16, Autoimmunity Reviews. Elsevier; 2017 [cited 2019 Jan 29]. p. 856–74. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1568997217301398>
87. Zhang L, Wang H. Autophagy in traumatic brain injury: A new target for therapeutic intervention. Front Mol Neurosci. 2018;11(June):1–15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5996030/>
88. Zeng XJ, Li P, Ning YL, Zhao Y, Peng Y, Yang N, et al. Impaired autophagic flux is associated with the severity of trauma and the role of A2AR in brain cells after traumatic brain injury article. Cell Death Dis [Internet]. 2018;9(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0316-4>
89. Wu J, Lipinski MM. Autophagy in Neurotrauma: Good, Bad, or Dysregulated. Cells [Internet]. 2019;8(7):693. Disponible en: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.3390/cells8070693>
90. Sarkar C, Zhao Z, Aungst S, Sabirzhanov B, Faden AI, Lipinski MM. Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. Autophagy [Internet]. 2014;10(12):2208–22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4502690/>

91. 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* [Internet]. 1998 Aug 14 [cited 2021 Apr 12];89(1–2):64–72. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9726827/>
92. Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN, Simeonidou C. Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res* [Internet]. 2013 ;8(24):2275–83. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146038/>
93. Chung CG, Lee H, Lee SB. Mechanisms of protein toxicity in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018;75(17):3159– 80. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2854-4>
94. Mejia Maza A, Carmen-Orozco RP, Carter ES, Dávila-Villacorta DG, Castillo G, Morales JD, et al. Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathol* [Internet]. 2019 May 1;29(3):425–36. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30368965/>
95. Beirowski B, Nógrádi A, Babetto E, Garcia-Alias G, Coleman M. Mechanisms of Axonal Spheroid Formation in Central Nervous System Wallerian Degeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* [Internet]. 2010; 69(5):455-472. Disponible en: <https://academic.oup.com/jnen/article/69/5/455/2917190>
96. Wang Q, Ding Y, Kohtz S, Mizushima N, Cristea I, Rout M et al. Induction of Autophagy in Axonal Dystrophy and Degeneration. *Journal of Neuroscience* [Internet]. 2006; 26(31):8057-8068. Disponible en: <http://www.jneurosci.org/content/26/31/8057.long#sec-1>
97. Cui D, Sun D, Wang X, Yi L, Kulikowicz E, Reyes M, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to neuronal death in a piglet model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Cell Death Dis* [Internet]. 2017 Jul 13 [cited 2021 Apr 12];8(7):e2919. Disponible en: www.nature.com/cddis

98. Benito-Cuesta I, Diez H, Ordoñez L, Wandosell F. Assessment of Autophagy in Neurons and Brain Tissue. *Cells*. 2017;6(3):25. Published 2017 Aug 23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5617971/>
99. Strohm L, Behrends C. Glia-specific autophagy dysfunction in ALS. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2020;99(January):172–82. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.024>
100. Araque A, Navarrete M. Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2010;365(1551):2375–81. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2894949/>
101. Mo Y, Sun YY, Liu KY. Autophagy and inflammation in ischemic stroke. *Neural Regen Res* [Internet]. 2020;15(8):1388-1396. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7059569/?report=classic>
102. Alam MM, Zhao XF, Liao Y, et al. Deficiency of Microglial Autophagy Increases the Density of Oligodendrocytes and Susceptibility to Severe Forms of Seizures. *eNeuro*. 2021;8(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7890520/>
103. Bonilla DL, Bhattacharya A, Sha Y, Xu Y, Xiang Q, Kan A, Jagannath C, Komatsu M, Eissa NT. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity*. 2013 Sep 19;39(3):537-47. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24035364/>
104. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):722-37. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24064518/>
105. Smethurst P, Risse E, Tyzack GE, Mitchell JS, Taha DM, Chen YR, et al. Distinct responses of neurons and astrocytes to TDP-43 proteinopathy in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* [Internet]. 2020;143(2):430–40. Disponible en: <https://academic.oup.com/brain/article/143/2/430/5732965>

106. Victoria GS, Arkhipenko A, Zhu S, Syan S, Zurzolo C. Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact. *Sci Rep*. 2016 Feb 9;6:20762. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26857744/>
107. Pearce MMP, Spartz EJ, Hong W, Luo L, Kopito RR. Prion-like transmission of neuronal huntingtin aggregates to phagocytic glia in the *Drosophila* brain. *Nat Commun*. 2015 Apr 13;6:6768. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25866135/>
108. Sung K, Jimenez-Sanchez M. Autophagy in Astrocytes and its Implications in Neurodegeneration. *J Mol Biol* [Internet]. 2020;432(8):2605–21. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.04>
109. Tydlacka S, Wang CE, Wang X, Li S, Li XJ. Differential activities of the ubiquitin-proteasome system in neurons versus glia may account for the preferential accumulation of misfolded proteins in neurons. *J Neurosci* [Internet]. 2008;28(49):13285–95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2662777/>
110. Zhao T, Hong Y, Li S, Li XJ. Compartment-Dependent Degradation of Mutant Huntingtin Accounts for Its Preferential Accumulation in Neuronal Processes. *J Neurosci*. 2016;36(32):8317-8328. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4978797/>
111. Gusel'nikova, V V, and D E Korzhevskiy. "NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker." vol. 7,2 (2015): 42-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4463411/>
112. Iwama R, Ohsumi Y. Analysis of autophagy activated during changes in carbon source availability in yeast cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2019 Apr 5 ;294(14):5590–603. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6462502/>
113. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research [Internet]. Vol. 24, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2014 . p. 9–23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879711/>

114. Gonzales I, Rivera JT, Garcia HH. Pathogenesis of Taenia solium taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunol* [Internet]. 2016 Mar 1 ;38(3):136–46. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pim.12307>
115. Gump JM, Thorburn A. Autophagy and apoptosis: what is the connection? [Internet]. 2011 . Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539742/>
116. Tang C, Livingston MJ, Liu Z, Dong Z. Autophagy in kidney homeostasis and disease. *Nat Rev Nephrol* 2020 169 [Internet]. 2020 Jul 23 [cited 2021 Jul 25];16(9):489–508. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41581-020-0309-2>
117. Nobelprize.org. Yoshinori Ohsumi - Biographical [Internet]. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/ohsumi/biographical/>
118. Ohsumi Y. Yoshinori Ohsumi: Autophagy from beginning to end. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Apr 16 ;197(2):164–5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3328387/>
119. Ohsumi Y. Yoshinori Ohsumi: Autophagy from beginning to end. *J Cell Biol* [Internet]. 2012 Apr 16 ;197(2):164–5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416315951>
120. Schläfli AM, Berezowska S, Adams O, Langer R, Tschan MP. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry. *Eur J Histochem* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jul 25];59(2):137–44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26150155/>
121. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy [Internet]. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2017 [cited 2021 Jul 25]. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5618514/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5618514/)

122. Du Toit A, Hofmeyr JHS, Gniadek TJ, Loos B. Measuring autophagosome flux. *Autophagy* [Internet]. 2018 Jun 3 [cited 2021 Jul 25];14(6):1060–71. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6103398/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33875624/)
123. Maday S, Holzbaur ELF. Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway. *Dev Cell* [Internet]. 2014 Jul 14;30(1):71–85. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109719/>
124. Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Jr., Iwata J, et al. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Sep 4 ;104(36):14489. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1964831/>
125. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF-κB signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2011;1(5):629–49. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3617358/>
126. Sabeta C, Ngoepe E. Preparation of fluorescent antibody conjugate in goats. En: Rupperecht C, Nagarajan T, editores. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2*. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier; 2015. p. 69–81. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128019191000075>
127. Ortiz-Rodriguez A, Arevalo M-A. The contribution of astrocyte autophagy to systemic metabolism. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2479. Disponibl en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177973/>
128. Novusbio.com. Autophagy and LC3 (2021) Disponible en: <https://www.novusbio.com/support/faqs-autophagy-and-lc3>
129. M V, SR K, Y J, SH L. Neuronal Autophagy: Characteristic Features and Roles in Neuronal Pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)* [Internet]. 2021 Apr 20 ; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33875624/>

130. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm. Vol. 61, Essays in Biochemistry. Portland Press Ltd; 2017. p. 609–24.