



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PROTEÍNAS DEL ESTADÍO LARVAL
DE *Taenia solium* INDUCEN DAÑO
NEURONAL Y ACTIVAN LA VÍA MAPK

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

JOSE OCTAVIO ZAPATA MORE

LIMA - PERÚ

2026

ASESORA

Dra. Nancy Chile Andrade

CO ASESORA

Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

JURADO DE TESIS

Dr. Jorge Luis Arevalo Zelada

PRESIDENTE

Dra. Rosa Patricia Herrera Velit

VOCAL

Mg. Carla Maria Gallo Lopez Aliaga

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA.

"A OZM de hace 25 años, quien nunca temió imaginar horizontes lejanos. Su capacidad de soñar fue el primer impulso de esta vocación científica.

A mis padres, raíces de mi formación personal y existencia. Gracias por sembrar en mí la certeza de que la constancia cosecha triunfos.

Esta victoria lleva su nombre.

A mis hermanos y a Gustavo, espejo de mi infancia; memoria viva de mi infancia y recordatorio permanente de por qué avanzar. La responsabilidad de ser ejemplo se transformó en una fuente de fortaleza.

A mis mentores, por su rigor, su paciencia y por enseñarme a convertir la curiosidad en método.

A Nayeli, Melany, Karen y Camila, mis estudiantes: en cada café compartido me devolvieron el asombro que a veces la rutina intenta apagar.

A Edison, Marcelo, Ricardo y Joel, por el equilibrio que ofrecen las olas y las canchas cuando el trabajo exige todo.

Esta tesis no es un punto de llegada. Es una marea construida entre muchos. Gracias por remar conmigo cuando el viento cambiaba."

AGRADECIMIENTO.

A mis mentores: La Dra. Manuela Verastegui, Dra. Nancy Chile, Dr.

Guillermo Fernandez y Dra. Monica Pajuelo

A mis maestros: Edith Málaga, Edson Bernal

A mis estudiantes: Nayeli Advíncula, Melany Ballartra, Karen Cielo y

Camila Carlos.

A mis compañeros: Carlos Neyra, Oscar Ramos, Oscar Nizama, Kevin

Gonzales, Solange Custodio, Gino Castillo

Al Dr. Marcos Milla y a la magíster María Angélica Goñi, por su

grandiosa voluntad en promover el talento científico en el Perú a

través de la beca Milla-Goñi.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Esta investigación fue financiada con un aporte de las Becas Milla -

Goñi de la Facultad de Ciencias e Ingeniería y PROCENCIA,

Contrato PE501079006-2022.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	ZAPATA MORE JOSE OCTAVIO

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, autores del trabajo titulado: **PROTEÍNAS DEL ESTADÍO LARVAL DE Taenia solium INDUCEN DAÑO NEURONAL Y ACTIVAN LA VÍA MAPK**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	CHILE ANDRADE NANCY	FACI	ASESOR
2.	VERASTEGUI PIMENTEL MANUELA RENEE	FACI	CO ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **6%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3033132491**; fecha de entrega: **15-09-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 15 de septiembre de 2026**

Firma del asesor
N° DNI: 41910464
ORCID: 0000-0003-1851-8118

Firma del Co-asesor
N° DNI: 08604175
ORCID: 0000-0002-7500-1353

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	8
III.	HIPÓTESIS	9
IV.	MARCO TEÓRICO	9
V.	METODOLOGÍA	23
VI.	RESULTADOS	35
VII.	DISCUSIÓN	49
VIII.	CONCLUSIONES	58
IX.	RECOMENDACIONES	59
X.	LIMITACIONES	60
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
XII.	ANEXOS	74

RESUMEN

Introducción: La neurocisticercosis (NCC) causado por el estadio larval de *Taenia solium*, es una de las principales patologías neurológicas en América Latina y se asocia con daño neuronal evidenciado por la formación de hinchazones axonales que presentan agregación de proteínas como el neurofilamento y APP. En otras enfermedades neurológicas, la vía de señalización MAPK está relacionada con el daño neuronal, en este contexto el **objetivo general** es determinar el papel de la vía de señalización MAPK en el daño neuronal inducido por las proteínas excretoras/secretoras (E/S) del estadio larval de *T. solium* en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata. **Metodología:** Se obtuvieron proteínas E/S a partir de cisticercos de tejido porcino; las proteínas fueron concentradas y separadas en 22 fracciones mediante cromatografía de intercambio iónico. Se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata expuestos a estas fracciones para cuantificar el daño axonal. Algunas fracciones proteicas, neurotóxicas, se caracterizaron por espectrometría de masas. La activación de la vía MAPK (ERK, JNK y p38) se midió por Western blot. **Resultados:** Se identificó 6 fracciones E/S (F2, F8, F16, F17, F20 y F21) que inducen hinchazones axonales, siendo las fracciones F20 y F21 las que producen una acción más severa. El análisis proteómico de las fracciones F8 y F20 reveló 12 proteínas compartidas, destacando la nardisilina, calreticulina y PSA. Las proteínas E/S activan las MAPK en una secuencia temporal definida: ERK (a los 10-20 min), p38 (30 min) y JNK (45 min). Específicamente, la fracción F8 activó la vía JNK, mientras que la F20 activó ERK y JNK. **Conclusión:** *T. solium* secreta proteínas que causan daño neuronal y activación de las vías MAPK. Este hallazgo desplaza el paradigma de que el daño es puramente inmunológico, sugiriendo que el parásito podría activar rutas endógenas de estrés y muerte celular para inducir un programa de neurodegeneración irreversible.

PALABRAS CLAVES: NEUROCISTICERCOSIS, ESTADIO LARVAL, NEURODEGENERACIÓN, MAPK, HINCHAZONES AXONALES.

ABSTRACT

Introduction: Neurocysticercosis (NCC), caused by *Taenia solium* larval stage, is one of the leading neurological diseases in Latin America and is associated with neuronal damage with the formation of axonal swellings characterized by the accumulation of proteins such as neurofilament and APP. In other neurological disorders, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway has been implicated in neuronal damage. In this context, the overall objective of this study was to determine the role of the MAPK signaling pathway in neuronal damage induced by excretory/secretory (E/S) proteins from the larval stage of *T. solium* in primary cultures of rat hippocampal neurons. **Methodology:** E/S proteins were obtained from cysticerci isolated from porcine tissue, concentrated, and separated into 22 fractions by ion exchange chromatography. Primary cultures of rat hippocampal neurons were exposed to these fractions to quantify axonal damage. Some neurotoxic protein fractions were characterized by mass spectrometry, and activation of the MAPK pathways (ERK, JNK, and p38) was assessed by Western blot analysis. **Results:** Fractions F2, F8, F16, F17, F20, and F21 were identified as inducers of axonal swellings, with F20 and F21 producing the most severe effects. Proteomic analysis of fractions F8 and F20 revealed 12 shared proteins, including nardilysin, calreticulin, and PSA. E/S proteins activated MAPK pathways in a defined temporal sequence: ERK (at 10–20 min), p38 (30 min), and JNK (45 min). Specifically, fraction F8 preferentially activated the JNK pathway, whereas fraction F20 activated both ERK and JNK. **Conclusion:** *T. solium* secrete proteins that cause neuronal damage and activation of the MAPK pathways. These findings challenge the paradigm that neuronal damage in NCC is purely immune-mediated and instead suggest that the parasite could activate endogenous stress and cell death pathways, to induce an irreversible neurodegenerative program.

KEYWORDS: NEUROCYSTICERCOSIS, LARVAL STAGE, NEURODEGENERATION, MAPK, AXONAL SWELLING.

I. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad infecciosa tropical desatendida causada por la forma larval (cisticerco) del cestodo *Taenia solium* que afecta el sistema nervioso central, presentando una alta morbilidad neurológica en áreas endémicas alrededor del mundo (1). La NCC se asocia con diversas manifestaciones clínicas, siendo las convulsiones y cefaleas los síntomas más comunes, aunque la presentación clínica puede variar en función de la localización y etapa de las lesiones quísticas en el cerebro (2). La enfermedad puede tener un impacto grande en la salud pública y afectar la calidad de vida de los pacientes, especialmente en regiones donde la teniasis por *T. solium* es endémica, ya que aumenta el riesgo de infección y transmisión de la enfermedad (3).

La NCC es endémica de regiones de países que presentan bajos y medianos ingresos; y en países de altos ingresos ocurre a través de casos importados. La organización mundial de la salud (OMS) sugiere que alrededor de 2.5 a 8.3 millones de personas tienen la enfermedad a nivel mundial (4). En las regiones endémicas, la enfermedad es una de las principales causas de epilepsia adquirida, el 30% de los casos de epilepsia es atribuida a NCC. El Perú, es uno de los países que presenta una alta endemidad, sobre todo en el norte (Tumbes), donde se encontró que la seroprevalencia de la cisticercosis humana fue 24.4% (5).

El diagnóstico de la NCC se basa en técnicas de neuroimágenes, como la tomografía computarizada y la resonancia magnética, que permiten visualizar las lesiones quísticas en el cerebro, así como en pruebas serológicas para confirmar la infección (6). El tratamiento de la NCC implica el uso de fármacos antiparasitarios, siendo el albendazol la opción preferida, junto con medidas sintomáticas y, en algunos casos, intervenciones quirúrgicas para tratar complicaciones como la hidrocefalia o la presencia de cisticercos intraventriculares (7).

La investigación sobre la NCC abarca diversos aspectos, desde la patología y la fisiopatología de la enfermedad hasta estudios epidemiológicos y ensayos clínicos para evaluar la eficacia de diferentes estrategias de control y tratamiento. Recientemente, se han identificado hallazgos patológicos como la formación de esferoides axonales en cerebros de modelos animales de NCC, hallazgos que han sido corroborados en biopsias cerebrales humanas. (8,9). Este proceso es fundamental en la neurodegeneración, ya que la aparición de esferoides marca la transición entre una fase de latencia y una fase denominada “catastrófica” de naturaleza irreversible, donde hay ruptura del esferoide y consecuente fragmentación del citoesqueleto (10). Los esferoides, observados en humanos y en el modelo murino, presentan acumulación patológica de neurofilamentos, así como también de la proteína precursora amiloidea (APP), lo que sugiere que la degeneración axonal y deterioro del transporte axonal juegan un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad en humanos, de manera similar a otras patologías que producen neurodegeneración (9,11). Esta acumulación de proteínas guarda relación y podría ser consecuencia de una autofagia disfuncional, proceso involucrado en el

recambio de proteínas que podría estar alterado en la NCC (12). Asimismo, esta persistencia de esferoides se ve exacerbada en zonas alrededor y adyacentes del cisticerco, donde también se ha visto una alta inflamación que podría contribuir en esta patología axonal (9).

Por otro lado, se ha reportado que el cisticerco de *T. solium* podría interactuar directamente con las neuronas a través de sus proteínas excretoras-secretoras (E/S), los cuales son internalizadas en el soma de la neurona del modelo de rata (13). Un estudio reciente ha demostrado que los productos E/S del parásito tienen un efecto excitatorio agudo sobre las neuronas, lo que gatilla actividad epileptiforme (señalización glutamatérgica) *in vitro* (14). Asimismo, un estudio sugiere que la persistencia de esferoides podría estar relacionada con la liberación de antígenos del parásito, lo que podría inducir un ambiente oxidativo o estrés celular en las neuronas (8). Todos estos estudios sugieren un rol importante de los productos E/S del parásito en las neuronas, y podrían estar también involucradas en la formación de las hinchazones axonales, sin embargo, actualmente no se ha demostrado el rol de las proteínas del parásito en el daño axonal reportado en la NCC. Asimismo, tampoco se ha caracterizado los componentes de los productos E/S que podrían estar involucrados en esta patología.

En enfermedades neurodegenerativas como distrofia neuroaxonal infantil (15), y la enfermedad de Alzheimer (16), así como en patologías neurológicas de origen infeccioso como la malaria cerebral (17), la formación y persistencia de las hinchazones axonales está asociada al aumento de la frecuencia de convulsiones.

Teniendo en cuenta que en la NCC la principal sintomatología son las convulsiones es importante entender cuál es el desencadenante de la formación de los esferoides y su papel con esta respuesta (9).

Los esferoides encontrados en la NCC presentan abundancia de neurofilamentos (9). Los neurofilamentos son más abundantes en los axones (18), al igual que muchas otras proteínas del citoesqueleto (como la tubulina y la actina) u organelas (como mitocondrias y retículo endoplasmático); todos estos componentes son transportados por las proteínas motoras kinesina y dineína. En un estado no patológico, el reciclaje y la estabilidad de los neurofilamentos depende principalmente del estado de fosforilación de los dominios de reconocimiento de las proteínas motoras y de su carga para un correcto transporte (18). Asimismo, en un modelo animal de NCC se han encontrado alterados los niveles de las proteínas motoras kinesina y dineína, que como ya se mencionó cumplen un rol clave en el transporte axonal; estas proteínas se acumularon en forma de hinchazones axonales en el tejido que rodea al cisticerco, sugiriendo daño en el transporte axonal (19). Adicionalmente, la autofagia se manifiesta como un proceso disfuncional en la NCC. Esta alteración patológica ha sido documentada experimentalmente mediante inmunoreactividad elevada de los marcadores de flujo autofágico LC3-II y p62 localizados en los esferoides axonales (12). Este proceso es importante para el recambio de proteínas, su alteración indica una incorrecta remoción de proteínas dañadas debido a la enfermedad (12).

El funcionamiento correcto del transporte axonal depende del balance entre kinasas y fosfatasas, entre las que se encuentran las MAPK (proteínas quinasas activadas

por mitógenos), CDKs, CAMK-II, PKA, PKC, GSK y PP2A (20,21). En enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, la disrupción axonal con agregación de proteínas y la alteración de la fosforilación de las MAPK JNK y p38 guardan relación directa con la alteración de kinesina y dineína, y en consecuencia el transporte axonal (22,23). Por su lado, en atrofia muscular espinal y enfermedad de Parkinson se ha observado que la fosforilación anormal de MAPK ERK está implicada directamente en las alteraciones de la autofagia (24). Sumado a ello, otros estudios refuerzan el papel de MAPK en la formación de hinchazones axonales relacionada con una alteración de procesos ligados al recambio de proteínas, como del transporte axonal (25,26) y autofagia (27). Sin embargo, no se ha evaluado el rol de las vías MAPK en el daño neuronal en NCC en torno a la formación de las hinchazones axonales.

Las MAPK son una familia de proteínas quinasas altamente conservadas, que en estado normal desempeñan un papel crucial en una variedad de procesos celulares, incluida la regulación de la respuesta inmune, proliferación celular, diferenciación y supervivencia (28). No obstante, en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, esta naturaleza pleiotrópica se dirige hacia la mediación neuronal. Su activación se produce a través de una cascada de fosforilación en residuos de treonina y tirosina por quinasas activadoras específicas (26). En el contexto de enfermedades, las MAPK han sido implicadas en numerosas patologías, incluidas enfermedades inflamatorias, neurodegenerativas, cardiovasculares y cáncer (29,30). En enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), las MAPK

están involucradas en alteración de transporte, autofagia, en muerte neuronal y la neuroinflamación, lo que contribuye al progreso de la enfermedad (31).

En patologías parasitarias del sistema nervioso central, como malaria cerebral causada por *Plasmodium falciparum*, se ha demostrado que efectores específicos como la hemozoína activan selectivamente p38 y regulan positivamente genes de la vía MAPK p38 en neuronas. Esta activación en respuesta al estrés celular y al daño del ADN potencia las vías de señalización inflamatorias que son características de la patogénesis de la malaria cerebral y que se comparten con mecanismos de enfermedades neurodegenerativas que impulsan daño (32).

Evidencia reciente indica que *T. solium* posee una vía MAPK funcional cuya actividad varía según su forma clínica. En el cisticerco racemoso, que es una forma extraparenquimatosa caracterizada por un crecimiento proliferativo y expansivo, la vía MAPK se encuentra activada y dirige la replicación celular del parásito. Por el contrario, en la forma vesicular (parenquimal no proliferativa), no se detectó activación (28). Este hallazgo es clave, pues confirma que el parásito dispone de la maquinaria molecular de señalización necesaria, sugiriendo que los cisticercos vesiculares cuentan con los genes y maquinaria molecular necesarios para esta vía de señalización y podrían modular procesos celulares en el hospedero. Esto sugiere que los cisticercos vesiculares, aunque no presenten la activación interna, producen proteínas E/S capaces de modular la vía MAPK en el hospedero (28). El cisticerco también libera de manera sostenida glutamato, sugiriendo activación de las MAPK por entrada de calcio extracelular a través de los receptores de glutamato (33). A su

vez, también se ha estudiado que el cisticerco en sus vesículas extracelulares contiene moléculas que modulan procesos como la autofagia e inflamación (34). A pesar de ello, actualmente los mecanismos patogénicos en la NCC aún no están del todo claros. Es por ello que urge explicar cómo la interacción de las proteínas E/S del parásito guardan relación con la formación de hinchazones axonales y el desarrollo del daño axonal. En modelos neuronales donde se estudia procesos neurodegenerativos y formación de esferoides se ha visto que los procesos de formación de esferoides dependen de la alteración del patrón de fosforilación de las proteínas MAPK (18,26).

En conjunto, la evidencia sugiere que es posible que las proteínas E/S del cisticerco de *T. solium*, podrían estar causando el daño axonal en forma de hinchazones axonales reportado en NCC. Además, se ha sugerido por estudios previos que el mecanismo por el cual se da el daño axonal se debe a alteraciones en el transporte axonal y en el proceso de autofagia; y en base a la evidencia de la participación de la vía MAPK en otras enfermedades neurológicas, se propone que en NCC estos mecanismos podrían estar influenciados por la alteración del patrón de fosforilación de las MAPK ERK, JNK y p38. Es por ello que el objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de las proteínas ES del estadio larval (cisticerco) de *Taenia solium* en el daño neuronal y en la activación de la vía de señalización MAPK en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de las proteínas excretoras/secretoras (E/S) del estadio larval de *Taenia solium* en la inducción de daño neuronal y en la activación de la vía de señalización MAPK en los cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata Holtzman.

Objetivos específicos

- Identificar las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que causan daño axonal en neuronas hipocampales, evidenciado por la formación de hinchazones axonales.
- Caracterizar el perfil proteico de las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que causan daño axonal, mediante espectrometría de masas.
- Evaluar la activación de la vía MAPK en neuronas hipocampales expuestas a las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que indujeron daño axonal, mediante la medición de la fosforilación de las proteínas ERK, JNK y p38 por western blot.

III. HIPÓTESIS

Las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* inducen el daño neuronal y activan la vía de señalización MAPK en cultivos neuronales del hipocampo de rata.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. *Taenia solium*

Taenia solium es un cestodo con un ciclo de vida complejo, tiene 3 estadios de desarrollo: huevo, larva y adulto. Los parásitos adultos ocupan el intestino delgado del humano y miden aproximadamente 1-7 m, el escólex está provisto de cuatro ventosas y rostelo armado con una doble fila de ganchos, seguido del cuello y el estróbilo. Los proglótidos maduran a lo largo del estróbilo y los segmentos grávidos liberan huevos, los cuales salen en las heces.

4.1.1. El ciclo de vida de *Taenia solium*.

El ciclo biológico comprende un hospedero definitivo y un hospedero intermediario (cerdo/humano). El humano es el hospedero definitivo, a nivel intestinal el parásito alcanza la etapa adulta y produce huevos que se excretan en las heces, facilitando su eliminación y dispersión al ambiente (35). Los huevos en el ambiente pueden ser ingeridos por cerdos y en el intestino liberan la oncósfera o embrión hexacanto, que atraviesan la pared intestinal y son transportados por el torrente sanguíneo hasta los tejidos musculares donde se diferencian a cisticerco, causándoles cisticercosis. La

ingesta de carne de cerdo infectada con los cisticercos del parásito es una vía de infección para el humano, el cisticerco de la carne mal cocida se adhiere a la mucosa intestinal y se diferencia a la forma adulta y el humano desarrolla taeniasis. Sin embargo, cuando los humanos ingieren accidentalmente los huevos del parásito presente en alimentos y aguas contaminadas, la oncósfera o embrión hexacanto migra hacia los órganos, ocasionando cisticercosis y cuando se establece a nivel del sistema nervioso central produce la neurocisticercosis (36).

4.1.2. La Neurocisticercosis (NCC):

Es una infección parasitaria a nivel del sistema nervioso central (SNC) causada por el estadio larval (cisticerco) de *Taenia solium*. Esta infección se da en los humanos cuando ingieren huevos del parásito por vía fecal-oral, convirtiéndose en el hospedero intermediario accidental (37). Los huevos eclosionan en el intestino liberando oncósferas que penetran la pared intestinal hacia la circulación hasta infectar el cerebro, donde se convierten en cisticercos o también llamadas larvas quísticas. En el SNC, los cisticercos pueden localizarse en el parénquima cerebral, los ventrículos, los espacios subaracnoideos o la médula espinal (37). El cisticerco en su estado viable puede desencadenar una respuesta inflamatoria significativa, lo que provoca edema perilesional y gliosis (3).

4.1.2.1. Epidemiología:

La NCC constituye un problema de salud pública ya que las condiciones insalubres y poco saneamiento en zonas endémicas contribuyen al desarrollo de la enfermedad. A pesar de ello, sigue siendo una enfermedad desatendida y su investigación es

limitada. La distribución de la NCC está muy ligada a las condiciones socioeconómicas e higiénicas. Su prevalencia es mayoritaria en regiones pobres o en vías de desarrollo, donde hay crianza de cerdos a campo libre y las condiciones básicas de higiene, como agua potable, sistema de alcantarillado no están establecidas. Esto explica la alta prevalencia en las zonas endémicas y resalta la importancia de atender a la NCC ya que es un problema de salud pública (38).

Perú es un país endémico de la NCC, su prevalencia es en zonas rurales y altoandinas donde persisten prácticas tradicionales de crianza de cerdos donde no hay un sistema de alcantarillado (39). En estas zonas, se ha reportado que entre el 30 y 50% de los casos de epilepsia están asociados a NCC (39,40).

4.1.2.2. Formas clínicas de la NCC:

Las formas que se presentan en la NCC incluyen la parenquimal (parenquimatosa) y extraparenquimal (subaracnoidea o intraventricular) (36). La forma parenquimatosa está asociada con convulsiones y déficit neurológicos. Mientras que las formas extraparenquimales conllevan un mayor riesgo de desarrollar hidrocefalia, presión intracraneal elevada y eventos cerebrovasculares (38).

La forma parenquimatosa afecta al parénquima cerebral, observándose mayores lesiones en la materia gris-blanca, ganglios basales, cerebelo, y algunas veces en el tronco encefálico. Esta forma se clasifica de acuerdo a la viabilidad del parásito y la respuesta inmune del hospedero. La evolución se inicia con el cisticerco viable, en esta etapa los cisticercos tienen un líquido transparente (quiste vesicular). Durante esta etapa hay inflamación, caracterizado por un edema perilesional. A medida que el quiste se degenera, transiciona a quiste vesicular coloidal, y luego a un quiste

calcificado que se ha relacionado con una mayor inflamación e incremento de las crisis epilépticas (41).

La forma subaracnoidea corresponde a la presencia de quistes proliferativos en los espacios del LCR, cisuras de Silvio o surcos corticales. En esta localización predomina la forma racemosa, en la cual los parásitos pierden el escólex y adoptan una morfología multilobulada semejante a racimos, pudiendo alcanzar gran tamaño y generar efecto de masa sobre estructuras vecinas. Esta forma se asocia a una intensa respuesta inflamatoria con aracnoiditis extensa, que puede complicarse con vasculitis, infartos cerebrales e hidrocefalia por obstrucción del flujo del LCR, provocando aumento de la presión intracraneal y síntomas como cefalea, náuseas y alteraciones visuales (42).

4.1.2.3. Manifestaciones neurológicas

Guardan una importante relación en las manifestaciones clínicas de los pacientes, por lo que la sintomatología es heterogénea, ya que dependen de la localización, tamaño, número, y evolución del quiste; y del sistema inmune del hospedero. La epilepsia y las convulsiones representan la manifestación más frecuente, afectando aproximadamente al 70–75% de los pacientes sintomáticos y siendo una causa principal de epilepsia adquirida a nivel mundial (1,41). Este fenómeno epileptogénico se mantiene a largo plazo, ya que las calcificaciones residuales, el hallazgo radiológico más común, constituyen focos de activación de crisis (38,41), presumiblemente a través de una inflamación episódica del hospedador en respuesta a remanentes parasitarios, lo que resulta en edema perilesional y un incremento en el riesgo de recidiva convulsiva (41).

Las cefaleas, incluyendo aquellas con características migrañosas, son también altamente prevalentes, y su patogénesis en presencia de calcificaciones puede deberse a la disrupción de la barrera hematoencefálica y la estimulación del reflejo trigémino-vascular inducida por antígenos (38). Por otra parte, la hipertensión intracraneal es una preocupación grave, a menudo secundaria a hidrocefalia obstructiva causada por aracnoiditis cisticercótica o quistes en el sistema ventricular y el espacio subaracnoideo. En cuanto a las secuelas crónicas, los déficits cognitivos se observan frecuentemente en pacientes con NCC, especialmente aquellos con atrofia/esclerosis del hipocampo, una lesión estructural asociada específicamente con la presencia de cisticercos parenquimales calcificados, sugiriendo que la inflamación crónica localizada o remota media el daño neuronal que subyace a la disfunción cognitiva y a la epilepsia del lóbulo temporal mesial (38,41,43).

4.1.3. El estadio larval (Cisticerco) de *Taenia solium* y su interacción con el hospedero

El cisticerco puede localizarse en distintos compartimentos del cerebro, ya sea en el espacio subaracnoideo, ventrículo y el parénquima cerebral del hospedero, por lo que establece una compleja interacción entre las poblaciones celulares como microglias, células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales) y neuronas. Para que el cisticerco pueda sobrevivir a largo plazo en el hospedero ha desarrollado mecanismos para modular el ambiente del sistema inmune local (44,45). En la forma vesicular viable del cisticerco, éste secreta compuestos inmunomoduladores que minimizan la reacción inflamatoria local, permitiendo evadir la respuesta inmune del hospedero (46). A medida que va avanzando la

enfermedad, el cisticerco desencadena una inflamación marcada, el hospedero evidencia una marcada activación de microglías, proliferación astrocítica y la infiltración de célula inflamatorias periféricas, generando un microambiente complejo en el que coexisten respuestas proinflamatorias y mecanismo reguladores (15,47,48). Asimismo, se ha reportado que el cisticerco puede alterar la maduración de células dendríticas para favorecer la generación de células T reguladoras (Tregs). Esto puede ser explicado debido a que el parásito presenta y secreta factores de crecimientos y moléculas ligando a los receptores de TGFb1, responsables de la polarización de Tregs (49). Este microambiente conduce a una respuesta inmunitaria polarizada hacia un fenómeno antiinflamatorio en fases de viabilidad, mientras que la degeneración del parásito incita respuestas Th1/Th2 mezcladas que propician una inflamación local y, en consecuencia, daño neurológico (50). En biopsias de modelo murino de NCC se ha encontrado que hay un exacerbado daño axonal en zonas cercanas al quiste del parásito junto con una alta inflamación, lo que refuerza la idea de que el daño es respuesta del hospedero. Sin embargo, se ha visto que en regiones alejadas de escasa o nula inflamación también hay presencia de daño axonal. Así mismo, se ha visto antígenos del cisticerco en el soma de las neuronas (13). Es por ello, que el impacto del cisticerco en las neuronas es de mucha importancia, ya que constituye un estado anormal que podría alterar la homeostasis neuronal(36). Estudios han demostrado que el lisado y quiste viable del cisticerco, muestra liberación de neurotransmisores excitatorios, principalmente glutamato, que pueden desencadenar excitotoxicidad a través de los receptores de glutamato y contribuir a la aparición de crisis epilépticas (14). La liberación sostenida de glutamato y otros metabolitos por parte del parásito, junto con la incapacidad de los

astrocitos reactivos para eliminarlo de manera eficiente en presencia de inflamación, predispone a una hiperexcitabilidad neuronal que puede culminar en la generación y propagación de descargas sinápticas incontroladas (34,51). La liberación de glutamato por el cisticerco y la consecuente sobreactivación de receptores ionotrópicos (NMDA/AMPA) desencadenan una entrada masiva de calcio que induce excitotoxicidad y, estrés oxidativo dada la consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno debido a la disfunción mitocondrial. Esto no sólo daría lugar a la pérdida directa de neuronas, sino que también alterarían el citoesqueleto neuronal, la conectividad sináptica y la plasticidad cerebral, elementos esenciales para la función cognitiva y motora.

4.1.4. Proteínas del estadio larval de *Taenia solium*

Las proteínas de *T. solium* constituyen un componente clave para entender la interacción parásito-hospedero y los mecanismos patogénicos que subyacen en la NCC. Proteasas o hidrolasas son una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos y representan el 43% de las enzimas de las proteínas ES de *T. solium*. Son de particular importancia en la biología del parásito ya que constituyen su arsenal de proteasas que escinden proteínas que podrían ser cruciales para la invasión del hospedero, la obtención de nutrientes, la evasión de la respuesta inmune y la patogénesis. Se han encontrado catepsinas que podrían causar degradación de proteínas del plasma y tejidos (52–54).

El parásito tiene también una primera línea de defensa contra las respuestas de estrés oxidativo efectuadas por el hospedero. Estudios proteicos y genómicos han identificado oxidoreductasas que reducen peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos al agua o alcoholes correspondientes. Dentro de ellas destacan glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, tioredoxina peroxidasa. Estas proteínas tienen un rol relevante en silenciar la respuesta de macrófagos y neutrófilos neutralizando el estrés oxidativo (52).

La adhesión es uno de los mecanismos por el cual las proteínas E/S del parásito median la comunicación para manipular vías de señalización del hospedero. El parásito tiene anexinas, fibronectina tipo III, tetraspaninas 1 y 2 que median la interacción membrana-membrana con el hospedero. La presencia de estas proteínas en el E/S evidencia una intervención directa en la comunicación parásito-hospedero. Esta comunicación media la internalización de efectores proteicos en el soma celular a través de vesículas o poros para alterar la homeostasis de las células hospederas (34,54,55).

La adhesión es importante para la comunicación, pero más allá de este proceso el parásito consta de un arsenal para secuestrar y reprogramar señales celulares del hospedero. Por ejemplo, la proteína andamio 14-3-3 es una proteína reportada en el parásito, pero no se sabe su función y su relación con el hospedero. Sin embargo, de acuerdo a su homóloga humana se sabe que la proteína andamio 14-3-3 podría unirse a proteínas fosforiladas y alterar de forma aberrante centros de señalización clave en la autofagia como MAPK/ERK, PI3K/Akt y mTOR(56–58). También el cisticerco libera proteínas de unión al citoesqueleto y actina, probablemente el parásito genera cambios morfológicos y estructurales en las células del hospedero,

por lo que el hallazgo de estas proteínas en el E/S podría tener implicancia en la alteración de mecanismos o vías del huésped (53,54,59,60).

4.2. Daño neuronal

Es la alteración estructural o funcional que compromete la supervivencia o la capacidad normal de una neurona individual o población de neuronas (61). Este daño puede ser provocado por diversos factores, destacando la excitotoxicidad, causada por la sobreactivación sostenida de los receptores de glutamato, lo que conduce a la disrupción de la homeostasis del calcio, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (62). Puede ser causado por una injuria traumática axonal o patológica, por toxinas que causan daño a nivel DNA que desencadenan el reclutamiento y activación de factores que orquestan procesos asociados a la neurodegeneración (32,63).

4.2.3. Daño axonal

El daño axonal es un proceso patológico en variedad de patologías neurológicas (64). Este es impulsor en enfermedades neurodegenerativas, en donde el axón pierde su integridad y función (65). El daño del axón se manifiesta morfológicamente a través de la formación de hinchazones o esferoides axonales, hasta culminar en una fase catastrófica irreversible. En los modelos de neurodegeneración, la aparición de las hinchazones axonales marca la transición crítica entre la fase de latencia (quiescente) y la fase catastrófica (de ejecución). Bajo este marco, la fragmentación axonal representa la etapa final e irreversible del

daño, desencadenada a menudo por la ruptura de las hinchazones axonales y la liberación de factores pro-degenerativos que aceleran la desintegración del citoesqueleto (64).

En enfermedades neurodegenerativas como EA, EP y ELA, las hinchazones y esferoides contienen componentes celulares que quedan acumulados debido a fallos en el transporte axonal. Comúnmente contienen organelas como lisosomas y mitocondrias, microtúbulos rotos, proteínas estructurales como filamentos de actina, acumulación masiva de neurofilamentos (NF) desorganizados y fosforilados; asimismo, también puede contener proteínas patológicas como la proteína precursora del amiloide (APP), ubiquitina, α -sinucleína y proteína tau hiperfosforilada. También se ha encontrado abundante cantidad de iones calcio intra axonal y proteínas motoras kinesina y dineína (64,66).

En modelos *in vitro* de injuria axonal y modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas, la formación de esferoides axonales puede ser producto de diferentes estímulos, ya sea lesión física como un corte al axón (axotomía), privación de factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF) o injuria tóxica (10,66,67). También puede ser producto secundario de la inflamación, desórdenes metabólicos, defectos genéticos, alteraciones en la mielina e isquemia (10,68–70).

4.2.5. Daño axonal en NCC

En biopsias de cerebro de humanos con NCC y de modelos de rata y cerdo de la enfermedad se encontró alteraciones axonales mediante la identificación de esferoides, que son hinchazones axonales focales, ricas en proteínas como la APP

y neurofilamentos fosforilados, lo que demuestra un deterioro del transporte axonal rápido inducido por la infección (9), similar a enfermedades neurodegenerativas como EP, EA y ELA. Además, en el modelo de ratas con NCC se ha demostrado la acumulación patológica de proteínas motoras como la kinesina (transporte anterógrado) y la dineína (transporte retrógrado), lo que confirma una interrupción del transporte axonal debido al atasco masivo en la maquinaria de comunicación de la neurona (19). Estos esferoides no se limitan al área de gliosis inmediata, sino que se extienden de manera vasta en regiones lejanas del cisticerco (9). El modelo destaca que la sustancia gris es significativamente más vulnerable que la blanca, mostrando una mayor densidad de esferoides y una correlación topográfica con el cambio espongiiforme (vacuolización del parénquima), sugiriendo que las vacuolas podrían ser procesos axonales dilatados o rotos (8). Mecánicamente, la patología se atribuye tanto al efecto de masa y compresión del quiste como a la difusión de las proteínas E/S del parásito, los cuales podrían ser absorbidos por las neuronas provocando una autofagia disfuncional (evidenciada por los marcadores LC3B y p62) (12,13).

4.3. Rol de las vías MAPK en neuronas:

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) son una larga familia de proteínas serina/treonina kinasas citosólicas y nucleares reguladores críticos de la fisiología y de los procesos patológicos neuronales. Los miembros de las MAPKs incluyen ERK, JNK y p38, que se expresan en neuronas de mamífero, regulando

funciones como supervivencia celular, proliferación, apoptosis, plasticidad sináptica, induciendo expresión de genes, y otras actividades (71). La desregulación de estas vías MAPK, está involucradas en la formación de hinchazones y esferoides axonales observadas en numerosas enfermedades neurodegenerativas.

La activación de la cascada de las MAPK es iniciada por varios estímulos extracelulares, incluyendo factores de crecimiento, entrada de calcio extracelular inducida por glutamato y aspartato, señalizaciones del receptor acoplado a proteína G, estrés y citoquinas (71,72).

ERK está asociado a proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Sin embargo, en contextos de estrés crónico o neuronal, puede participar en daño. Su activación se da a partir de la activación de Ras que recluta y activa Raf, para fosforilar MEK1/2 que finalmente activa ERK1/2. La activación de ERK, conlleva a translocar al núcleo para regular la transcripción de diversos genes.

JNK y p38: Vías claramente asociadas a respuestas al estrés (estrés oxidativo, choque térmico, citocinas inflamatorias), inflamación y apoptosis. JNK activa al factor de transcripción c-Jun, para regular la expresión de genes relacionados con la apoptosis. JNK también fosforila y estabiliza p53, mejorando la actividad pro apoptótica de p53. La activación de JNK o p38 en la EP promueve apoptosis en neuronas, mientras que la activación de vías ERK1/2 y PI3K/AKT favorece la supervivencia celular (73). JNK está involucrado en muerte axonal, promoviendo un déficit local de energía que finaliza en rompimiento del axón (74).

Bajo condiciones de estrés oxidativo, JNK regula la actividad enzimática de SARM1 (Sterile Alpha and TIR Motif Containing 1) sobre el NAD^+ y promueve la

degeneración axonal al actuar de manera upstream, acelerando el recambio de factores de supervivencia axonales como como NMNAT2 y SCG10(63). La alteración de los niveles de NAD^+ mediada por SARM1 provoca el colapso del ATP intraneuronal, lo que desencadena la activación de la proteasa calpaína. Este evento conduce finalmente a la degradación del citoesqueleto y a la ruptura física del axón (75).

4.3.1. Evidencia de la activación de MAPK en otras enfermedades infecciosas del SNC

La vía MAPK constituye un mecanismo de señalización profundamente conservado, crucial para integrar el estrés celular y orquestar la inmunidad innata en el SNC. Durante las infecciones neuronales, los patógenos secuestran y modulan esta vía para favorecer su patogénesis, desencadenando neuroinflamación. En mamíferos, la cascada MAPK, articulada en los módulos ERK, JNK y p38, traduce señales extracelulares, como el reconocimiento de patrones microbianos por los receptores tipo Toll (TLR), en respuestas que van desde la regulación génica hasta la apoptosis (76). Se ha reportado que, en contextos infecciosos, hay activación de las MAPK: en microglías BV-2 expuestas a vesículas extracelulares de *Naegleria fowleri* (NfEVs), la estimulación de TLR-2/4 dependiente de MyD88 induce la fosforilación de JNK, p38 y ERK, impulsando la expresión de citocinas proinflamatorias como $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 y MIP-2. De forma paralela, en modelos de malaria cerebral con neuronas derivadas de iPSC, la hemozoína de *Plasmodium falciparum* regula al alza la vía MAPK, activando p38 en respuesta al daño del ADN

(17,32,77). Esta cascada no opera de forma aislada; evidencia de regulación cruzada muestra, por ejemplo, que la inhibición de JAK-STAT reduce la fosforilación de ERK inducida por NfEVs. Así, la activación desregulada de MAPK por factores patógenos impulsa una producción exacerbada de mediadores inflamatorios, agravando el daño neuronal (32). La dependencia de los patógenos de esta vía subraya el potencial terapéutico de modularla de forma selectiva, como demuestra la inhibición de JNK y ERK para reducir la replicación viral, ofreciendo una estrategia prometedora para mitigar la inmunopatología en infecciones cerebrales (78).

4.4. Justificación de la Hipótesis

¿Por qué proponer que las proteínas del cisticerco activan la vía MAPK?

Recientemente, se ha demostrado que los productos E/S de *T. solium* alteran el balance de calcio a nivel neuronal, a través de los receptores de glutamato. Esta sobrecarga de calcio genera una alteración del potencial de membrana y genera actividad epileptiforme (33). En modelos neuronales se ha visto que esta condición causa la activación de diversas quinasas dentro de ellas las MAPK (72,79). Así mismo, se sabe que el parásito expresa y secreta varios ligandos que actúan sobre vías que podrían activar las MAPK, como activina que actúa a través de los receptores TGF β (28,49). Por otro lado, en macrófagos, los productos ES del parásito son capaces de promover la ubiquitinización y degradación de proteínas de las vías PI3K/AKT y mTOR (34). Estas vías a nivel neuronal son importantes para

el reciclaje de orgánulos y proteínas dañadas a través de la autofagia, y también apoptosis (24,80). La desregulación de las kinasas ERK, p38 y JNK están involucradas en diversos procesos celulares; por ello, su modulación podría influir de manera significativa en la autofagia, apoptosis y transporte mediado por las proteínas motoras (81).

Si bien el parásito podría causar activación de estas vías y podría desencadenar condiciones patológicas en la neurona, hasta el momento no se ha estudiado ni identificado qué componentes de las proteínas E/S actúan como efectores de dichas respuestas patológicas. Por ello, demostrar cómo las proteínas E/S del parásito activan estas vías de señalización resulta de vital importancia para un mejor entendimiento de su implicancia en el daño neuronal.

V. METODOLOGÍA

5.1. Identificación de las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que causan daño axonal en neuronas hipocampales

5.1.1. Obtención de estadios larvales de *T. solium*

Los estadios larvales o cisticercos del parásito fueron recolectados a partir de la carne de cerdo, proporcionada por el proyecto de código SIDISI 208846. Los cisticercos fueron extraídos cuidadosamente de forma íntegra en la cabina de flujo laminar haciendo uso de bisturís estériles, pinzas y pipetas Pasteur, para lo cual se siguió el protocolo reportado por Arora y Bjorn, con algunas modificaciones

(53,82). Los cisticercos fueron colocados en una placa estéril con buffer fosfato salino (PBS) suplementado con antibióticos y antimicóticos (Sigma Aldrich, USA). Luego fueron lavados con PBS y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado con antibióticos y antimicóticos, 5 veces por 15 minutos cada uno.

5.1.2. Cultivo de cisticercos y obtención de proteínas E/S.

Mediante observación en el microscopio invertido se seleccionaron a aquellos cisticercos que tuvieron la membrana intacta y sin restos de carne adherida. Estos fueron cultivados en placas de 6 pocillos (15 cisticercos por pozo) con medio RPMI suplementado con antibióticos y antimicóticos y fueron incubados a 37°C con 5% CO₂ por 12 horas, posteriormente el medio fue reemplazado por medio RPMI fresco, y a partir de ahí la incubación se realizó por 6 días. Durante este tiempo, se recolectó el medio que contiene las proteínas E/S cada 24 horas para luego centrifugar a 2500 RPM (100 g) por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (proteínas E/S) y se almacenó a -80°C hasta usar en los siguientes experimentos.

5.1.3. Concentración y cuantificación de las proteínas E/S

Las proteínas ES recolectadas durante 6 días fueron cuantificadas y resueltas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), y luego se realizó una tinción de plata para seleccionar a aquellas que tuvieron el mismo patrón de bandas. Posterior a eso se realizó un pool de las proteínas E/S que tuvieron el mismo patrón de bandas en el SDS-PAGE, este pool fue concentrado por centrifugación usando filtro Amicon (Sigma) de corte de peso molecular de 3 kDa, hasta obtener un volumen de 1 ml a una concentración no menor a 5 mg/ml,

para lo cual se siguió el protocolo recomendado por el fabricante, en donde el pool se centrifugó a 2700 g a 4°C. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Ácido Bicinconínico (BCA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BCA™, Thermo Scientific). Los volúmenes recuperados fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

5.1.4. Fraccionamiento de las proteínas E/S

El pool de proteínas fue fraccionado por cromatografía de intercambio iónico, utilizando un equipo de cromatografía líquida (Cytiva, USA). Esta estrategia fue reportada en el estudio de las proteínas E/S del parásito *Heligmosomoides polygyrus* (83). El intercambio iónico se realizó con la columna HiTrap Capto™Q a pH 8 con 20 mM de buffer TRIS, y con diluciones en gradientes y escalonados de cloruro de sodio (NaCl) hasta 2M. De manera resumida, se inyectó 1 ml del pool de proteínas E/S (5 mg/ml) de acuerdo a la especificación de la columna. Las proteínas quedaron retenidas en la columna de acuerdo a su carga proporcionada por el buffer a pH 8, y luego fueron eluidas con concentraciones crecientes y escalonados de NaCl, hasta una concentración de 1 M. Se colectaron fracciones de acuerdo a la absorbancia a 280 nm y en volúmenes variables de 1-5 ml. Las fracciones obtenidas fueron desaladas usando la columna de desalinización (Cytiva, USA) para obtener una separación de las proteínas de la sal, por el principio de exclusión molecular. Los volúmenes obtenidos por cada fracción fueron centrifugados a 2700 g a 4°C por 1h concentrados en filtros amicon hasta volúmenes aproximados de 200 ul. Finalmente, se realizó la cuantificación de proteínas de cada fracción E/S obtenida, usando el método de BCA y fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior uso.

5.1.5. SDS-PAGE y Tinción de plata

Para ver el perfil proteico de cada fracción del E/S se realizó una SDS-PAGE. Se cargó 2 ug de cada fracción en un gel discontinuo de 5% para la parte de apilamiento y 12% la resolución. Las proteínas se resolvieron por su peso molecular a voltaje constante. Primero a 80 V por 10 minutos y 200 V 45 minutos. Posterior a la electroforesis, a los geles con la proteína resuelta se le hizo una tinción de plata siguiendo las indicaciones del kit (1610443, Biorad).

5.1.6. Cultivo primario de neuronas primarias hipocampales

Se trabajó con cultivos neuronales del hipocampo de ratas Holtzman de 1 a 3 días de edad. Las ratas postnatales fueron sacrificadas por hipotermia y decapitación, de acuerdo a la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) (84). Se envolvieron las ratas en aluminio para colocarlas en hielo por 15 minutos aproximadamente, hasta la pérdida de movimiento. Luego las ratas se trasladaron a la cabina de flujo laminar estéril y se desinfectaron rociando etanol de 70%. En la cabina se decapitó a la altura de los hombros y se diseccionó la cabeza para obtener el cerebro y luego los hipocampos, con solución de sal balanceada de Hanks (HBSS). El medio HBSS o medio de disección se suplementó con 1 mM de piruvato de sodio, 100 Unidades/ml de penicilina y 100 ug/ml estreptomicina, y 20 mM de HEPES. La disección se realizó con la ayuda de un microscopio digital, siguiendo las instrucciones del video tutorial de Sahu 2019 (85,86), hasta obtener el

hipocampo. El hipocampo se puso en un tubo conteniendo 4.5 ml de medio de disección y fue tratado con 0.5 ml de tripsina con una concentración final 0.25% W/V. Se colocó en la incubadora a 37°C por 20 minutos, cada 5 minutos se homogeneizó invirtiendo suavemente el tubo. Luego, en cabina se completó a 10 ml con medio de siembra (compuesto por 13.37 g/L de DMEM, 10.6 g de medio F12, 1.176g/L, 1 mM de piruvato de sodio, 10% SFB y 100 Unidades/ml de penicilina y 100 ug/ml estreptomicina). Se homogeneizó con una pipeta hasta disgregar completamente las masas de células. El homogeneizado fue pasado por un filtro de 70 um y luego centrifugado a 1200 RPM por 5 minutos. El pellet resultante (células), fue suspendido en medio de siembra. Posteriormente, se realizó el conteo de las células usando un hemocitómetro, luego de haber diluido las células con azul de tripán en proporción 1:1, se contaron en cuatro cuadrantes y el promedio se expresó en células/ml. Se sembraron 0.6×10^6 células por pocillo en placas de 6 (para los ensayos de Western Blot) y 1.5×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos con marco negro (para los ensayos de inmunofluorescencia) y fueron puestas en la incubadora a 5%CO₂ y 37°C. Después de 2 horas de incubación, se cambiaron con medio de crecimiento (constituido por medio neurobasal suplementado a 1X de Glutamax, a 1X de B27, 100 Unidades/ml de penicilina y 100 ug/ml estreptomicina). Después de 24 h, se añadió 3 uM de arabinósido de citosina (AraC) por 48 horas (87–89). Posteriormente, se hicieron cambios de medio sin AraC hasta aproximadamente el día 7. En la sección de anexos se muestran los resultados de viabilidad de este modelo neuronal por el método de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT).

5.1.7. Inmunofluorescencia indirecta

Para confirmar que se obtuvo el cultivo neuronal primario, se realizó la inmunofluorescencia indirecta con el marcador neuronal beta tubulina III, y el marcador de células gliales GFAP, para lo cual, se lavaron con PBS las células y se fijaron por 20 minutos con una solución fijadora constituida por 4% de paraformaldehído y 4% de sucrosa. Se permeabilizó con una solución de PBS conteniendo 0.2% de Triton X-100 por 15 min. Se hizo el bloqueo con una solución compuesta de 1% albúmina sérica bovina (BSA, Millipore), 5% de suero de cabra por 30 minutos. Luego se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario de ratón anti-beta tubulina III, diluido 1/1000 (ab78078, Abcam) y el anticuerpo de conejo anti GFAP, dilución 1/500 (PA3-16727, Invitrogen) en PBS con 0.5% de BSA, 2.5% de suero de cabra, por una hora a temperatura ambiente (TA). Luego, se hicieron incubaciones de 2 h con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos IgG de cabra anti-ratón conjugado con Alexa-Fluor 488, IgG de cabra anti-conejo conjugado con Alexa-Fluor 549 y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1/4000 (Sigma, Ref. D9542) diluidos en PBS con 0.5% BSA y 2.5% de suero de cabra a TA. Finalmente, en un microscopio de fluorescencia Axiovert Zeiss 5 se obtuvieron las imágenes para observar el cultivo neuronal sin o con poca presencia de células gliales.

5.1.8. Formación de esferoides en cultivos neuronales

Las neuronas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos de marco negro (1.5×10^4 neuronas/pozo) hasta los 7 días *in vitro* como se describió en la sección 5.1.6. y posteriormente fueron incubadas por triplicado con 20 ug/ml de cada fracción de

proteínas E/S. Además, se utilizó como control positivo para la inducción de esferoides al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 50 uM por 15 minutos, y solo medio como control negativo (90). Después del tiempo de incubación, las células fueron lavadas y fijadas tal como se describió previamente en la sección 5.1.7, para luego realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta con el marcador beta tubulina III y evidenciar la formación de los esferoides. Se utilizó un anticuerpo específico contra beta tubulina III en dilución 1/1000, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (sección 5.1.7). En el microscopio de fluorescencia Axiovert Zeiss 5, se obtuvieron las imágenes y se cuantificó el número de los esferoides con el software FIJI-ImageJ. Se contó el número de hinchazones axonales y número de neuronas por campo para luego hacer un ratio de hinchazones/neuronas usando la herramienta multi point o point del programa ImageJ. Para cada condición se analizó tres campos al azar con las siguientes dimensiones Ancho: 1125.1200 um (1920 píxeles) y altura de 632.8800 um (1080 píxeles). Los datos fueron expresados como media, desviación estándar del número de hinchazones axonales por neurona para cada condición en el ensayo.

5.2. Caracterización del perfil proteico de las fracciones de proteína E/S del estadio larval de *Taenia solium* que causan daño axonal

De acuerdo a los resultados del ensayo de formación de hinchazones axonales, se seleccionaron las fracciones de proteínas E/S que causaron un mayor daño axonal, evidenciado por la formación de un gran número de hinchazones. Estas fracciones fueron enviadas a la empresa Applied Biomics Inc. (Hayward, CA, USA) para su análisis proteómico cuantitativo sin marcaje (label-free quantitative proteomic

analysis, LFQ). Brevemente la metodología empleada por la empresa fue la siguiente, se realizó la limpieza y extracción de proteínas, seguidas de la medición y el ajuste de la concentración proteica. Las proteínas extraídas se digirieron con tripsina para generar péptidos, los cuales fueron separados mediante cromatografía líquida en nanoescala (nanoLC) y analizados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) utilizando un sistema Thermo Fisher Ultimate 3000 acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris. La identificación de proteínas y la cuantificación sin marcaje se llevaron a cabo utilizando Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias de aminoácidos obtenidos de las proteínas identificadas fueron utilizadas para un posterior análisis bioinformático para determinar sus funciones, interacciones o posibles targets.

5.3. Evaluación de la activación de la vía MAPK en neuronas hipocampales expuestas a las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que inducen daño neuronal

5.3.1. Tratamientos para la evaluación de vía MAPK en el cultivo neuronal primario

Para este objetivo las neuronas fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (0.5×10^6 células/pozo) hasta los 7 días *in vitro* tal como se describió en la sección 5.1.6. Para evaluar el rol de las MAPK en el daño neuronal inducido por las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium*, primero se realizó la evaluación con las proteínas E/S sin fraccionar, para lo cual, los cultivos fueron tratados con 20 ug/ml de proteínas E/S en diferentes tiempos (10, 20, 30 45 y 60 minutos), y se usó 100 uM de glutamato (por 10 minutos) como control positivo de activación de

las MAPK (antes de realizar el ensayo se comprobó que el glutamato activa la vía MAPK, tal como se muestra en el anexo 1) y solo medio como control negativo, este ensayo se realizó por triplicado. Luego, se evaluó la fosforilación de la vía MAPK (ERK, JNK y P38) mediante western blot.

Una vez confirmado que las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* activan la vía MAPK, se procedió a realizar el ensayo con las fracciones de proteínas E/S que causan daño neuronal. Para las células neuronales fueron incubadas por 10 minutos con 20 ug/ml de las proteínas E/S sin fraccionar (como control) y 20 ug/ml de las fracciones de las proteínas E/S que indujeron la formación de un mayor número de hinchazones. Los cultivos primarios de neuronas hipocampales también fueron incubados con 100 uM de glutamato como control de activación de la vía MAPK (por 10 minutos) (91,92) y solo medio como control negativo. Posteriormente se evaluó la activación de la vía MAPK usando los marcadores P38, JNK y ERK1/2, en el estado fosforilado, mediante western blot.

5.3.2. Western blot

Luego de los ensayos, las células fueron tratadas con buffer de lisis RIPA (buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación) conteniendo 5 mM de EDTA y 1X de cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasas (Thermo Scientific, Ref. 1861282), por 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 2700 g a 4°C por 10-15 minutos (93). Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta la cuantificación de proteína total. La cuantificación de proteínas totales se hizo por el método de Lowry, usando

el kit DC™ Protein Assay Kit II (BIORAD, Ref.5000112), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La muestra fue preparada con buffer de carga o Laemmli buffer en condiciones denaturantes con 2-mercaptoetanol y fueron hervidos a 100°C por 5 minutos. Luego, fueron separadas por electroforesis en gel 10% de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) a 80 V por 10 minutos para apilar las proteínas, seguido de 200 V por 45 minutos para resolver las proteínas. Las proteínas fueron transferidas en una membrana de fluoruro de polivinilo (PVDF) a 25 V por 16 horas. La membrana, fue bloqueada con 5% de albúmina de suero bovino (BSA) en TBS al 0.3% de Tween (TBST) por 1h a temperatura ambiente. La identificación del estado de fosforilación de las kinasas se evaluó mediante el uso de anticuerpos específicos para reconocer el estado fosforilado de los tres tipos de kinasas de la familia MAPK [p38, ERK1/2, y JNK]. Los anticuerpos que se usaron fueron: anticuerpo anti-fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) de conejo en dilución 1/300 (Invitrogen, Ref. 44-684G), anticuerpo anti-fosfo p44/42 ERK1/2 MAPK (Thr202/Tyr204) de conejo en dilución 1/500 (Invitrogen, Ref. 44-680G), y anticuerpo anti-fosfo-SAPK/JNK MAPK (Thr183/Tyr185) de conejo en dilución 1/300 (Invitrogen, Ref. 44-682G). Se consideró como control de carga un anticuerpo primario anti Ciclofilina B (Invitrogen, Ref. PA1-027A) en una dilución 1/10000, para realizar normalización y comparaciones confiables. La incubación de los anticuerpos primarios fue durante la noche a 4°C. La membrana fue lavada tres veces con TBST y luego incubado con el anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) 2h a temperatura ambiente, en dilución 1/1000 y 1/10000 para proteínas fosforiladas y el control de carga, respectivamente.

Posteriormente, se lavaron las membranas dos veces con TBST, seguido de 2 lavados con TBS para la hacer el revelado con un kit de quimioluminiscencia Sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (Invitrogen, Ref. 34577). Finalmente se cuantificó la intensidad de la banda usando ImageJ y se expresó en valores cuantitativos relativos, normalizados haciendo uso del control de carga, que nos permitirán comparar entre grupos.

5.4. Análisis de resultados

El análisis de los resultados se realizó de manera secuencial e integrada de acuerdo a los objetivos, con el fin de relacionar las fracciones efectores del daño neuronal, caracterización proteica y la activación de la vía de señalización MAPK.

Las fracciones obtenidas fueron evaluadas funcionalmente en cultivos primarios de neuronas hipocampales, donde el daño neuronal se analizó cualitativa y cuantitativamente observable mediante inmunofluorescencia para β -tubulina III, considerando la presencia de hinchazones axonales y fragmentación como indicadores de neurotoxicidad.

A partir de estos resultados, se seleccionaron fracciones representativas con y sin daño axonal para su caracterización proteómica mediante espectrometría de masas, lo que permitió identificar proteínas compartidas y exclusivas potencialmente

asociadas al daño neuronal.

Para la evaluación de la activación de la vía MAPK, se analizó la fosforilación de ERK, JNK y p38 mediante western blot. La activación de ERK se determinó utilizando un anticuerpo específico para p-ERK que reconoce las isoformas p-ERK1 y p-ERK2, cuya señal fue cuantificada de manera conjunta. De forma similar, la activación de JNK se evaluó empleando un anticuerpo que reconoce las isoformas p-JNK1 y p-JNK2. En el caso de p38, la activación se cuantificó a partir de una única banda correspondiente a p-p38. El valor cuantitativo de cada señal fue expresado en términos de densidad ajustada con respecto al control negativo.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Stata y GraphPad Prism. Para el primer objetivo, se hizo un análisis paramétrico usando la prueba de ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey. Respecto al tercer objetivo, debido a que la distribución de los datos no es normal, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, seguida de la prueba Dunn test como post hoc.

Tabla de resumen de variables

Objetivo	Variable	Indicador	Medición
Objetivo 1	Daño axonal	Inmunofluorescencia	Conteo de número de hinchazones por neurona
Objetivo 2	Proteína	Presencia	Cualitativa
Objetivo 3	Activación MAPK: ERK, JNK, p38	Fosforilación	Intensidad de Banda

5.5. Aspectos éticos

El proyecto fue registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). El proyecto con código SIDISI 215063 fue aprobado antes de su ejecución por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA), encargados de la supervisión ética del uso de animales en la investigación.

VI. RESULTADOS

6.1. Identificación de las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que causan daño axonal en neuronas hipocampales

6.1.1. Fracciones de las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium*

Con el objetivo de identificar qué proteínas del E/S del estadio larval de *Taenia solium* causan daño neuronal, las proteínas fueron fraccionadas por cromatografía de intercambio aniónico con buffer tris pH 8. En total, se obtuvieron 22 fracciones a partir de la elución con concentraciones en gradiente y escalonadas de cloruro de sodio (Fig. 1). La primera fracción colectada (F2) corresponde a las proteínas que no se han unido a la columna de intercambio aniónico dado a que tienen un punto isoeléctrico igual o mayor de 8, con carga neutra o positiva.

Las siguientes fracciones corresponden a las fracciones eluidas, y se observa que a medida que se incrementa la concentración de NaCl en gradiente, la absorbancia incrementa ligeramente desde F4 hasta F13 y luego disminuye hasta F16, estas

fracciones corresponden a las proteínas que están débilmente interaccionando con la fase estacionaria ya que son las que se eluyen primero a comparación de las que tienen una interacción fuerte. Para eluir proteínas que interaccionan con mayor fuerza con la columna, se aplicó una concentración escalonada de cloruro de sodio y se obtuvo 8 fracciones (del F17 al F25). En el cromatograma (Fig. 1) se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de sal hasta su punto máximo, los niveles de absorbancia caen por debajo de 0, indicando que todas las proteínas que interactuaron con la columna ya ha sido eluidas completamente en las fracciones F4 hasta el F21, por lo que las fracciones F22 al F25 es probable que no tengan proteínas.

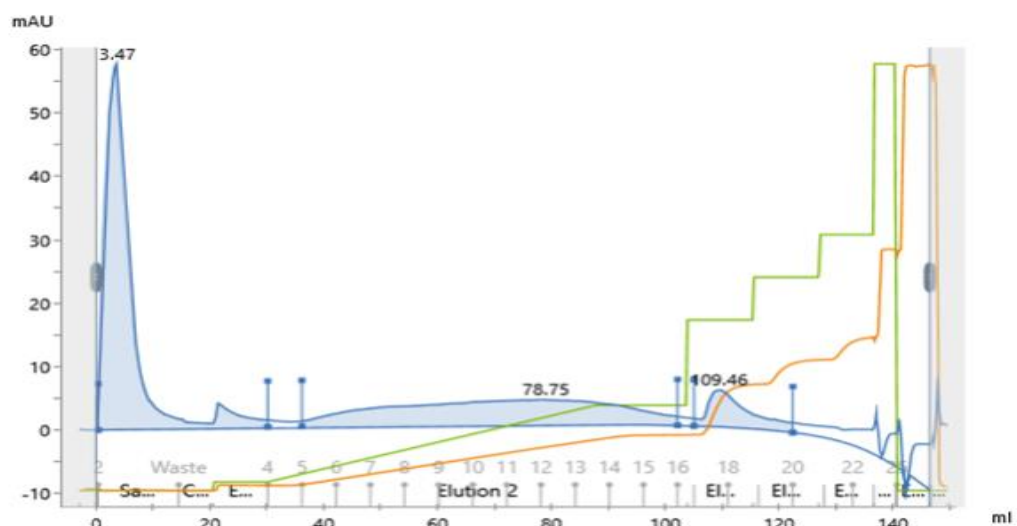


Figura 1. Cromatografía de intercambio aniónico del fraccionamiento de las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium*. Fraccionamiento de las proteínas del E/S de *T. solium* mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH 8, obteniendo 22 fracciones. Se repitió el procedimiento cinco veces y se hizo un pool por cada fracción. La línea de color azul muestra la absorbancia a 280 nm de las proteínas, la línea de color verde representa la gradiente y las concentraciones escalonadas de cloruro de sodio empleados para la elución, y la línea de color naranja muestra la conductividad en mOsm.

En la figura 2, se muestran los resultados del SDS-PAGE y la tinción plata de las fracciones de proteínas E/S obtenidas. A pesar de que se ha realizado una separación

de las proteínas ES, cada fracción sigue constituyendo una mezcla compleja de proteínas como, por ejemplo, las fracciones F8 a F11 que presentan un patrón similar de bandas. También se obtuvieron fracciones que tienen pocas bandas como F16, F19, F20 y F21. Se confirmó que las fracciones F22, F24 y F25 no tienen proteínas (anexo 2).

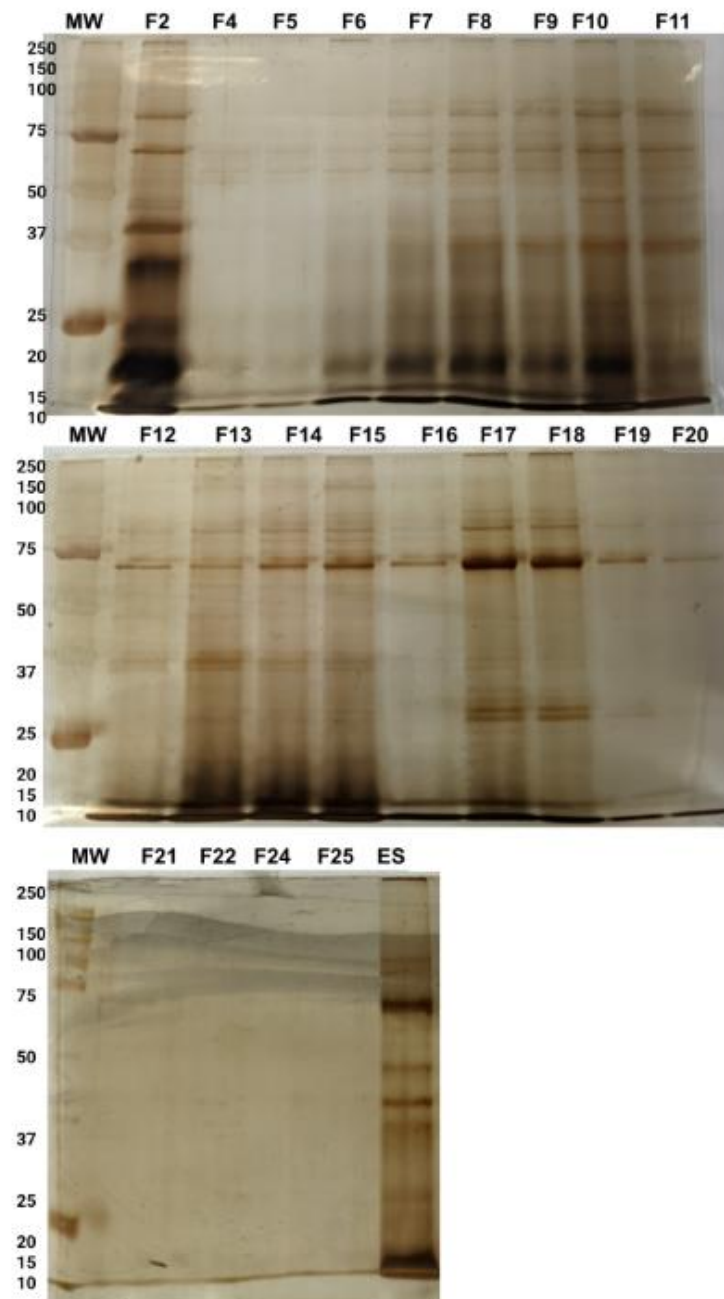


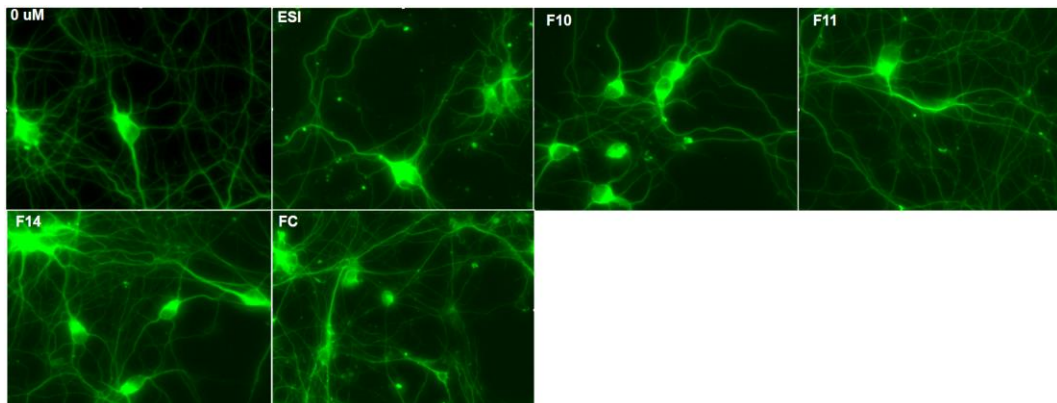
Figura 2. Perfil proteico de las fracciones de las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium*. Por SDS-PAGE en un gel de 12% se resolvió las proteínas correspondientes a cada fracción (F2 hasta la F25). Las proteínas fueron visualizadas por tinción del gel con plata. E/S= corresponde a las proteínas del E/S sin fraccionar, MW=marcador de peso molecular en kDa.

6.1.2. Evaluación del daño neuronal en cultivos neuronales primarios

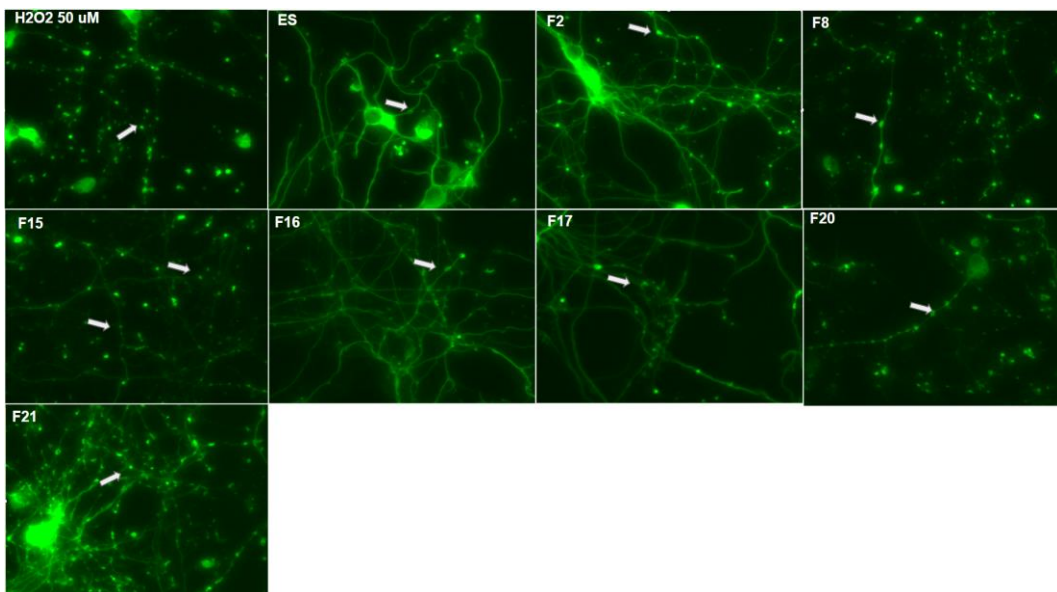
Para evaluar el rol de las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* en el daño neuronal, los cultivos neuronales fueron expuestos a 20 ug/ml de cada fracción (F2 hasta F21) por 10 horas. El daño neuronal fue evaluado por la presencia de hinchazones en los axones observado en la inmunofluorescencia con anti beta-tubulina III que marca una proteína estructural del citoesqueleto de los axones (67). En el ensayo se incluyó solo medio como control negativo y 50 uM de peróxido de hidrógeno como inductor de degeneración axonal evidenciado por formación de hinchazones y/o fragmentación de axones.

En la figura 3 se presenta los resultados de la inmunofluorescencia, en donde se muestra que las neuronas incubadas con medio de cultivo presentan una morfología normal; mientras que, las neuronas incubadas con el control positivo y con las proteínas E/S no fraccionadas, muestran formación de hinchazones axonales. Con respecto a las fracciones de las proteínas E/S, se observa que pocas fracciones no causaron daño neuronal (F10, F11 y F14); en contraste, la mayoría de las fracciones obtenidas causaron daño axonal, algunas en forma de hinchazones, y otras causaron fragmentación de los axones, por ejemplo las fracciones F2, F8, F16, F17, F20 y F21 causaron solo hinchazones en los axones; mientras que las fracciones F5, F6, F13 y F19 causaron solo fragmentación, así mismo se observó que algunas fracciones (F7, F9, F12 F15 y F18) causan tanto hinchazones como fragmentación en los axones (tabla 1).

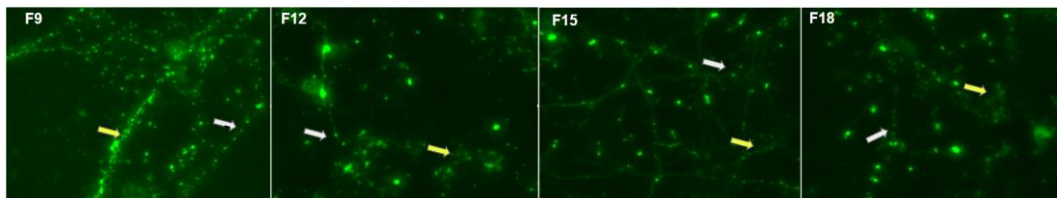
A. Controles y ausencia de daño axonal.



B. Fenotipo de hinchazones axonales (esferoides)



C. Fenotipo mixto (hinchazones + fragmentación axonal).



D. Fenotipo de fragmentación.

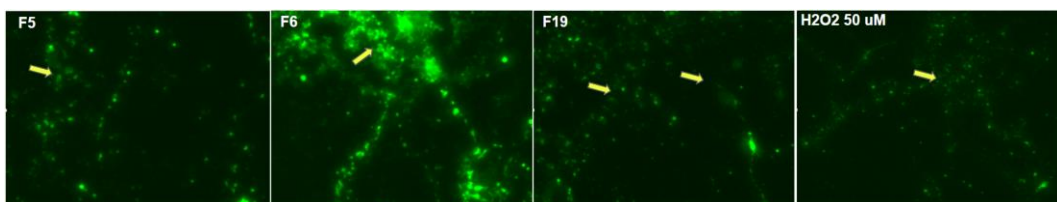


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta para observar la formación de hinchazones axonales en el cultivo primario neuronal incubado con las fracciones de las proteínas E/S del estadio larval de *T. solium*. Se probó las fracciones (F2 al F21) a concentraciones de 20 ug/ml en las neuronas hipocampales de rata. A. Controles y ausencia de daño axonal. B. Fenotipo de hinchazones axonales (esferoides). C. Fenotipo mixto (Hinchazones y fragmentación axonal). D. Fenotipo de fragmentación. Las flechas de color blanco señalan las hinchazones axonales y las flechas de color amarillo señalan axones fragmentados. Siendo ESI40, el componente inferior a 3 KDa las proteínas ES y FC son el buffer de fraccionamiento utilizado en la cromatografía.

Tabla 1. Evaluación cualitativa del daño axonal en el cultivo primario neuronal incubadas con 20 ug/ml de las fracciones de las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium*. Sí, indica presencia, y NO: ausencia.

Fracción	Hinchazones Axonales	Fragmentación de axones
F2	Sí	No
F5	No	Sí
F6	No	Sí
F7	Sí	Sí
F8	Sí	No
F9	Sí	Sí
F10	No	No
F11	No	No
F12	Sí	Sí
F13	No	Sí
F14	No	No
F15	Sí	Sí
F16	Sí	No
F17	Sí	No
F18	Sí	Sí
F19	No	Sí

F20	Sí	No
F21	Sí	No

En la figura 4 se muestra la cuantificación de las hinchazones axonales. 8 fracciones causaron un incremento significativo del número de hinchazones axonales comparado con el control negativo en el cultivo primario neuronal, de las cuales 5 fracciones inducen solo hinchazones axonales, siendo mayor el número de estas hinchazones axonales por las fracciones F20 y F21, mientras que las otras fracciones como F7, F9 y F12 inducen hinchazones y fragmentación axonal.

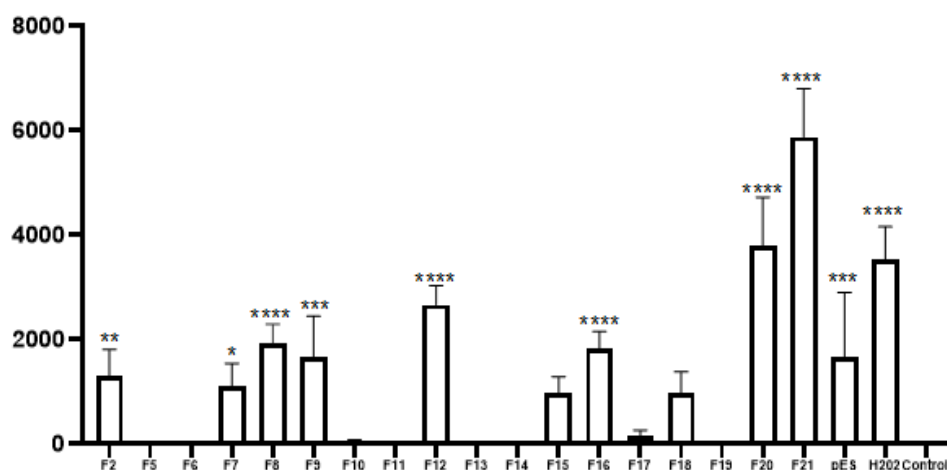


Figura 4. Evaluación del daño neuronal en el cultivo primario de neuronas hipocampales incubadas con 20 ug/ml de las fracciones de las proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium*. Número de hinchazones axonales. En las gráficas las barras representan el promedio del número de hinchazones axonales o fragmentos $\pm$ desviación estándar. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.00001$ en comparación del control negativo, neuronas no tratadas.

La inducción de hinchazones y/o fragmentos axonales por las fracciones E/S sugiere que las proteínas presentes en estas fracciones tienen actividad neurotóxica en los cultivos neuronales. Esto resalta la importancia de estudiar la composición proteica de cada fracción y explorar su rol y los mecanismos por el cual las proteínas causan daño neuronal.

6.2. Caracterización del perfil proteico de las fracciones de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* que causan daño axonal

Se eligieron fracciones que causan daño neuronal con formación de hinchazones axonales (F8 y F20) y una fracción que no generó daño axonal (F10). La figura 5 muestra el número de proteínas E/S del estadio larval de *Taenia solium* identificadas mediante espectrometría de masas de las fracciones de las proteínas E/S seleccionadas. El número de proteínas identificadas en las fracciones F8, F10 y F20 fue de 248, 252 y 223 respectivamente. Las fracciones que causan hinchazones axonales F8 y F20 comparten 12 proteínas que podrían tener un rol en el daño de los cultivos neuronales, mientras que la fracción F8 tiene 6 proteínas únicas de esa fracción que podrían cumplir un rol en el daño neuronal, así mismo la Fracción F20 tiene 37 proteínas únicas de esta fracción que podrían estar involucradas en el daño neuronal.

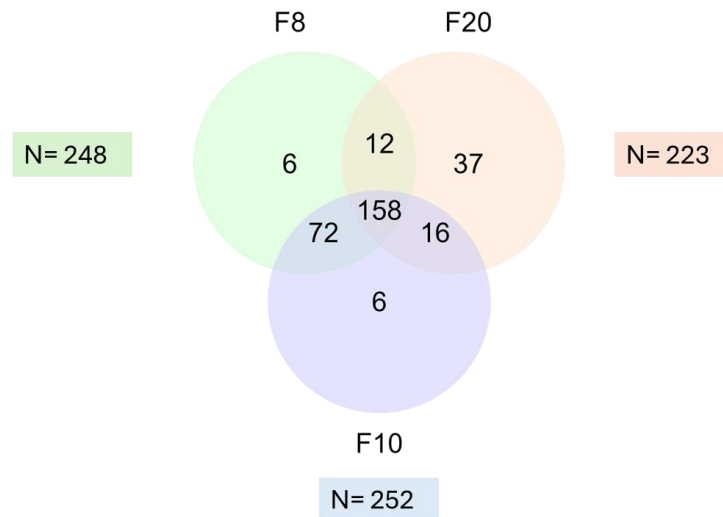


Figura 5. Diagrama de Venn que muestra el número de proteínas del E/S del estadio larval de *Taenia solium* identificadas mediante espectrometría de masas en las fracciones F8, F20 y F10. Las fracciones F8 y F20 inducen la formación de hinchazones axonales en neuronas primarias del hipocampo de ratas, la fracción F10 no causa daño neuronal.

En la tabla 2 se muestra el nombre y función de las 12 proteínas identificadas tanto en la fracción F8 como en la fracción F20. De estas proteínas, la mayoría corresponde a enzimas, las cuales participan en procesos biológicos de proteólisis (Puromycin-sensitive aminopeptidase, Nadilysin e hypothetical protein TSMEX_010657), catabolismo de péptidos (Poly U specific endoribonuclease), metabolismo de carbohidratos (Glucose 1-dehydrogenase), síntesis de GTP (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2) y estrés oxidativo (Peroxidasin). Asimismo, se identificó una proteína de unión a calcio (calreticulin) y una proteína con función desconocida (Oncosphere antigen B)

Tabla 2. GO procesos biológico y GO función molecular de las proteínas del E/S del estadio larval de *Taenia solium* identificadas en las fracciones F8 y F20.

Número de Acceso	Nombre de la proteína	GO Proceso Biológico	GO Función molecular
2954423615 2954420174 2954423614	Puromycin-sensitive aminopeptidase	Proteólisis	Actividad metalo aminopeptidasa
2954413957	Poly U specific endoribonuclease	Proceso catabólico de péptidos	Actividad metalopeptidasa, unión de péptidos, unión a ión zinc
2954413364 2954413365	Nardilysin	Proteólisis	Unión a ión metálico, actividad metaloendopeptidasa
2954421430	Peroxidasin	Estrés oxidativo	Proteína de unión a grupo hemo, actividad de lactoperoxidasa, de unión a metal iónico
2954420640	Oncosphere antigen B	Sin información	Sin información
2954420676	Calreticulin	Degradación de proteínas asociadas al retículo endoplasmático	Proteína de unión a calcio, de unión a carbohidrato, de unión a calcio.
2954413779	Glucose 1-dehydrogenase	Metabolismo de carbohidrato	Actividad oxidoreductasa
2954419131	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2	Proceso de síntesis de GTP	Actividad de IMP deshidrogenasa, unión a ión metálico, unión a nucleótido
2954413369	hypothetical protein TSMEX_010657	Proteólisis	Actividad de unión a ión metálico

6.3. Evaluación de la activación de la vía MAPK en neuronas hipocampales expuestas a las proteínas del E/S del estadio larval de *T. solium*.

Para la evaluación se hicieron dos ensayos, en el primero se evaluó si las proteínas E/S sin fraccionar activan la vía MAPK, y una vez confirmado se procedió a evaluar si las fracciones 8 y 20 que causan daño neuronal son capaces de activar la vía MAPK. La activación de la vía MAPK se evaluó mediante la detección de ERK1/2, JNK y p38 fosforilados.

En el primer ensayo se evidenció que las proteínas E/S (20 ug/ml) activan la vía MAPK (Fig. 6). La activación de ERK en el cultivo primario neuronal se evidenció por la presencia de 2 bandas proteicas de 42 kDa y 44 kDa que corresponden a la isoforma p-ERK1 y 2 respectivamente; la intensidad de las bandas fue mayor a los 10 y 20 minutos de incubación con las proteínas E/S con respecto al control, siendo más alto a los 10 minutos, lo que indica una activación temprana de la vía ERK, esta activación fue transitoria, ya que disminuyó y volvió a los niveles basales a partir de los 30 minutos hasta los 60 minutos de evaluación.

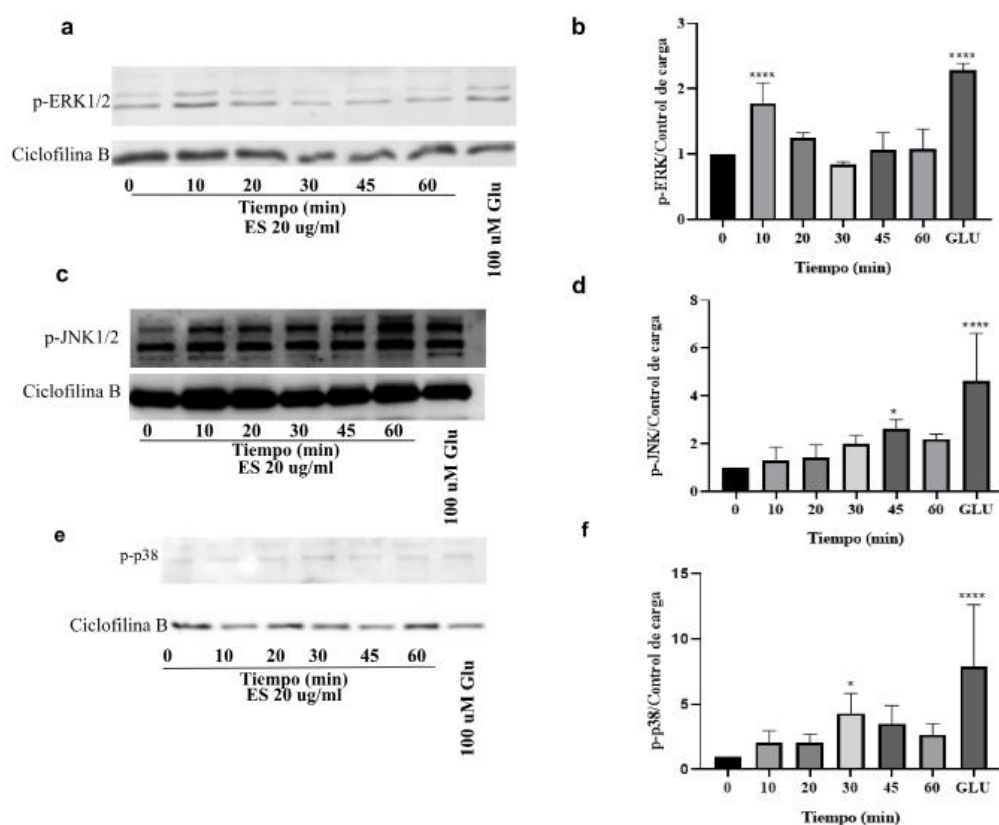


Figura 6. El antígeno E/S de *T. solium* induce una activación temporal de MAPK ERK (a y b), JNK (c y d) y p38 (e y f) en neuronas hipocámpales de rata. Las neuronas hipocámpales de rata fueron expuestas a 20 ug/ml de las proteínas E/S del parásito en diferentes tiempos, con 100 uM de glutamato por 10 minutos. En las gráficas de barras representan el promedio del número de promedio de la densidad ajustada $\pm$ desviación estándar. * $P < 0.05$ y **** $P < 0.00001$ en comparación del control negativo (0 min), neuronas no tratadas.

Con respecto a la activación de la vía JNK, se evidenció en el western blot la presencia de 2 bandas, una de 42 kDa y la otra de 44 kDa que corresponden a fosforilación de las isoformas JNK 1 y 2 respectivamente (Fig. 6c). A diferencia de ERK, la intensidad de las bandas proteicas de JNK incrementó a partir de los 30 minutos, siendo mayor a los 45 minutos de incubación con las proteínas E/S.

En cuanto a la activación de p38 se evidenció una banda de 38 kDa correspondiente a la proteína p38 fosforilada. La intensidad de la banda fue mayor a los 30 minutos de incubación con las proteínas E/S, sugiriendo una activación transitoria, ya que la activación disminuyó en menor medida a los 45 minutos y cayendo a su valor basal a los 60 minutos de evaluación.

Una vez confirmado que las proteínas E/S activan la vía MAPK, y determinado los tiempos de activación, se procedió a evaluar las fracciones F8 y F20 en la activación de las vías ERK y JNK (Fig. 7). La fracción F8 activa la vía JNK, mientras que la fracción F20 activa la vía ERK y JNK, sugiriendo una posible relación de la activación de estas vías con la formación de hinchazones axonales, tal como se ha visto en modelos de degeneración axonal (94–96). La activación de p38 no se determinó porque el volumen de la muestra era limitado. Siendo los resultados presentados para ERK y JNK de una repetición biológica.

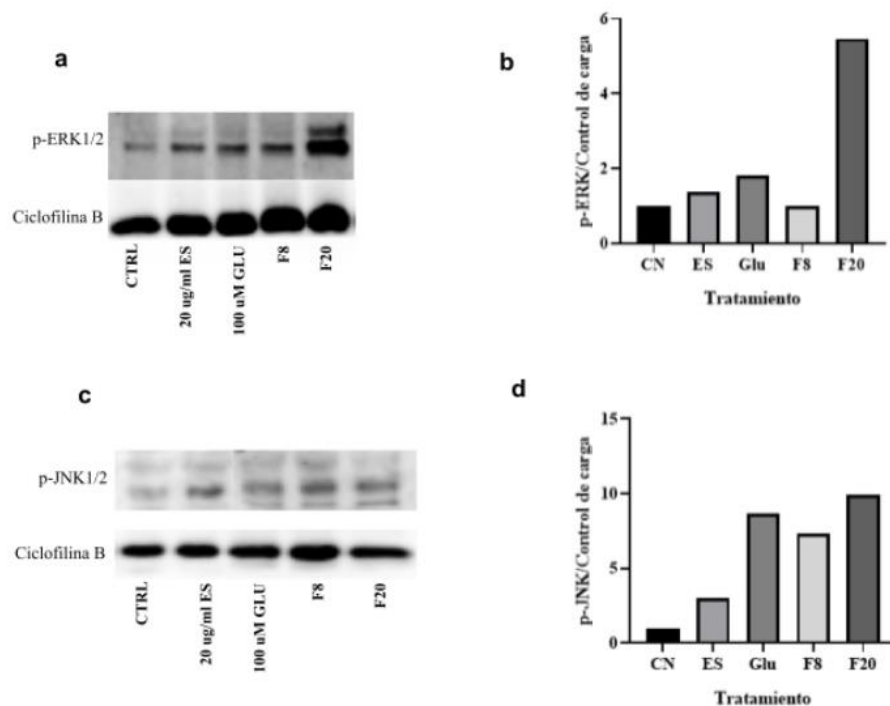


Figura 7. Las fracciones de las proteínas del E/S de *T. solium* induce una activación temporal de MAPK ERK y JNK en neuronas hipocampales de rata. Las neuronas hipocampales de rata fueron expuestas a 20 ug/ml de las fracciones de las proteínas ES del parásito por 10 minutos, las fracciones F8 y F20 del ES, a 100 uM de glutamato (GLU) por 10 min en medio de crecimiento y solo medio de cultivo como control negativo. En cada condición experimental, la inmunoreactividad obtenida se calculó como porcentaje de la señal total obtenida para las dos isoformas para p-ERK y p-JNK, respectivamente. El panel a) muestra un experimento representativo para p-ERK, y en b) los valores cuantitativos de la densidad ajustada. En c) se muestra la inmunoreactividad de p-JNK, y en el panel d) su representación cuantitativa en términos de densidad ajustada. Los resultados presentados en la gráfica corresponden a una repetición biológica.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio, por primera vez se demuestra que las proteínas E/S del estadio larval de *T. solium* inducen daño neuronal, evidenciado por la formación de hinchazones axonales *in vitro*. Mediante el fraccionamiento de las proteínas E/S, se identificaron seis fracciones capaces de inducir hinchazones axonales, de las cuales en dos se determinó el perfil proteico, identificando doce proteínas comunes entre ambas fracciones que podrían estar asociadas al daño neuronal. Así mismo, estas dos fracciones activaron la vía de señalización MAPK, lo que sugiere un rol importante de esta vía en el daño neuronal inducido por el parásito. A continuación, se discuten con detalle estos hallazgos.

En cuanto al fraccionamiento, en este trabajo, por primera vez se ha fraccionado por cromatografía de intercambio iónico las proteínas E/S del estadio larval de *T. solium*. El fraccionamiento proteico, reveló una complejidad sustancial, con al menos 22 fracciones distintas que contienen mezclas de proteínas. Las fracciones F2, F8, F16, F17, F20 y F21 indujeron la formación de hinchazones axonales en los cultivos neuronales primarios. La relevancia de este hallazgo radica en que dichas fracciones reproducen el sello distintivo de neurodegeneración axonal temprana que se ha observado en estudios *in vitro* de traumas (10), inducción de daño por neurotoxinas (67), y en modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (15). En biopsias humanas también se han observado esferoides axonales similares a los encontrados en el modelo murino. Estos hallazgos demuestran que el daño no se limita a modelos experimentales, sino que es una patología de la NCC humana (8,9).

Otro resultado interesante es que ciertas fracciones (F5, F6, F13, F19) provocaron fragmentación axonal, conocida como "degeneración catastrófica". Este es un estado final e irreversible de daño axonal (10,66). Este hallazgo da pie a que lo reportado en el modelo de rata con NCC, disminuye la densidad de neuronas en zonas hipocampales, se deba a la presencia del parásito y sus proteínas ES (13).

También se observó la presencia de fracciones que inducen tanto hinchazón axonal como fragmentación (F7, F9, F12, F15 y F18), esto sugiere que ciertas fracciones pueden contener una combinación de proteínas neurotóxicas o una única proteína capaz de desencadenar una cascada de daño progresivo. Por lo que la evaluación funcional de estas fracciones en cultivos neuronales primarios demuestra que la neurotoxicidad no es una propiedad de los productos ES, sino que reside en subpoblaciones proteicas específicas.

Este espectro fenotípico, que progresa desde la formación de hinchazones axonales focales hasta la fragmentación completa, sugiere que las proteínas del parásito activan múltiples vías con distintos mecanismos de acción en las neuronas. La observación de hinchazones axonales y fragmentación del axón, en algunas fracciones, sugiere una coexistencia de axones en fase de latencia y en fase catastrófica dentro de la población neuronal. Bajo este escenario, la presencia de esferoides axonales representaría la transición crítica hacia la desintegración irreversible del citoesqueleto (65,66).

Con respecto al análisis por espectrometría de masas, se identificaron 12 proteínas compartidas entre las fracciones neurotóxicas F8 y F20. Tres de estas proteínas participan en procesos biológicos de proteólisis: Puromycin-sensitive

aminopeptidase (aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA)), Nadilysin e hypothetical protein TSMEX_010657. La PSA de *T. solium*, aún no ha sido caracterizada, sin embargo, esta proteína también ha sido reportada en humanos. En humanos la función de esta proteína es remover péptidos neurotóxicos y promover la autofagia (97,98). Por lo tanto, el parásito podría internalizar su PSA en la neurona y competir con la PSA endógena de las neuronas, en consecuencia podría estar alterando el aclaramiento de péptidos tóxicos. Se sabe que es una proteína que regula la acumulación de Tau. En condiciones normales Tau estabiliza los microtúbulos. Es posible que la PSA del parásito cause acumulación de Tau en estado hiperfosforilado, que en consecuencia, causaría la despolarización de los microtúbulos, lo que interrumpiría el transporte axonal mediado por las proteínas motoras. Las vesículas y orgánulos se estarían agregando en puntos específicos del axón generando los hinchazones axonales y posterior degeneración total de la neurona (99,100).

El estadio larval de *Taenia solium* secreta nardisilina, una metalopeptidasa identificada específicamente en las fracciones neurotóxicas F8 y F20 de sus productos de excreción-secreción. En el organismo humano, esta proteína tiene la capacidad de actuar sobre receptores de superficie y factores de crecimiento, mediando la hiperfosforilación de la vía mTORC1, la cual ejerce un control maestro sobre la autofagia (101). Dado que la autofagia es el mecanismo esencial para la eliminación de orgánulos y proteínas dañadas, la presencia de nardisilina parasitaria podría ser responsable de la desregulación de la autofagia funcional observada en la NCC. Esta alteración patológica ya ha sido documentada en la NCC a través del hallazgo de niveles elevados en los marcadores de flujo autofágico LC3-II y p62

(12). Además de afectar el recambio proteico, esta proteína podría comprometer la función mitocondrial y los niveles de ATP, induciendo un edema citotóxico previo a la desintegración final de la neurona (101,102).

La calreticulina, identificada específicamente en las fracciones neurotóxicas F8 y F20 de las proteínas E/S ya ha sido reportada en *Taenia solium* y en otros parásitos, esta proteína está vinculada en procesos claves en la interacción hospedero parásito (103–105). No se ha reportado hasta la actualidad la relación directa en procesos neuronales, sin embargo, podría actuar como una proteína de unión al calcio que podría comprometer la homeostasis de calcio de la neurona. Su presencia en las proteínas E/S podría permitirle secuestrar el calcio o interferir con los canales de este ion en la membrana neuronal, provocando una alteración en el gradiente electroquímico (106). De promover el incremento resultante del calcio citosólico podría activar la calpaína, una proteasa que escinde la espectrina y proteínas estructurales críticas como los neurofilamentos (107). Este proceso de degradación proteolítica del citoesqueleto se manifiesta morfológicamente mediante la formación de múltiples hinchazones axonales (esferoides), lo que conduce finalmente al colapso físico e irreversible de la neurona (66,108).

Se identificó la presencia de la proteína peroxidasin, la cual no se ha caracterizado en *T. solium*. En otros parásitos, la proteína actúa como un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo provocado por el hospedero (109). También, en presencia de peróxido de hidrógeno puede formar ácido hipocloroso, molécula muy neurotóxica (110).

Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (IMPDH2) de *T. solium* no se sabe su función o cómo interactúa con el hospedero. Sin embargo, en humanos, esta proteína es importante para mantener los niveles de GTP. El GTP regula la dinámica de la actina y estabilidad del citoesqueleto. Su desregulación en estados patológicos impulsa la reorganización del citoesqueleto axonal, contribuyendo a la formación de hinchazones que promueven acumulación de vesículas y el agrandamiento del esferoide (10). Además, se sabe que exceso de GTP provocado por la IMPDH 2 mantiene a mTOR activado de forma crónica, lo cual inhibe la biogénesis lisosómica y el inicio de la autofagia a través de la quinasa ULK1. Esto resulta en la acumulación masiva de vesículas y el crecimiento de esferoides (111). Ello sugiere, un rol similar de la IMPDH2 del parásito en el humano para mediar la degeneración axonal.

Asimismo, se identificó la presencia de glucose 1-dehydrogenase, y la proteína oncosphere antigen B. Estas moléculas representan proteínas metabólicas y antigénicas cuya función precisa en el hospedero es aún desconocida. Su relevancia radica en que, al ser antígenos específicos del parásito, poseen una alta probabilidad de ser internalizados por las neuronas (13).

La literatura sugiere que la liberación de estos antígenos parasitarios puede inducir un ambiente de estrés oxidativo y activar diversas vías de señalización de daño celular (13,34,112). El enfoque futuro debe dirigirse a estas 12 candidatas, que incluyen enzimas proteolíticas, inhibidores de la fosfatasa o moléculas que podrían

mimetizar señales endógenas de muerte celular, similares a las toxinas secretadas por otros patógenos del SNC (54).

El hallazgo más significativo de este estudio es la demostración de que las proteínas E/S inducen una activación temporal y distintiva de los tres principales brazos de la vía MAPK: ERK, JNK y p38. Este patrón de activación no es aleatorio, sino que reflejaría un programa de señalización bien orquestado que precede a la disfunción y muerte neuronal, como un evento disparador como se discute a continuación. La vía ERK, tiene una activación rápida y transitoria de ERK1/2 (pico a los 10 minutos) es intrigante. Tradicionalmente, la vía ERK se asocia con supervivencia, proliferación y plasticidad neuronal (79,113). Sin embargo, existe evidencia creciente de su papel dual en la neurodegeneración. La hiperactivación de ERK en atrofia muscular espinal promueve una autofagia disfuncional, por lo tanto una deficiente remoción de proteínas agregadas que contribuye a la formación de los hinchazones axonales (24). También participa en respuesta al estrés oxidativo y la excitotoxicidad (84,114,115). La activación temprana de ERK por las proteínas E/S podría estar relacionada con la disrupción inicial del citoesqueleto, alterando el transporte axonal y predisponiendo a la formación de hinchazones axonales (116,117). Es plausible que esta señalización temprana desencadena cambios postraduccionales en proteínas del citoesqueleto como la tau o neurofilamentos, haciéndolos más susceptibles a la agregación o proteólisis (118,119).

La cinética de activación de JNK, con un pico más tardío (45 minutos), se alinea perfectamente con su papel establecido como un mediador central de la

degeneración axonal inducida por estrés [8]. JNK fosforila una multitud de sustratos, incluyendo proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción proapoptóticos. La activación de JNK es un evento crítico en la degeneración walleriana, ya que promueve la proteólisis mediada por calpaínas para ejecutar la fragmentación axonal (74,75). Nuestros datos sugieren que las proteínas E/S activan este "programa de autodestrucción" axonal, siendo JNK un nodo de señalización indispensable (74,75).

La activación de p38 mostró una cinética intermedia (pico a los 30 minutos). Esta vía es un potente inductor de apoptosis y daño neuronal en respuesta a factores de estrés celular (120). Su activación sugiere que las proteínas ES actúan como un estímulo proapoptótico directo debido a la presencia del parásito con una posible muerte neuronal que se evidencia en un tiempo tardío al tratamiento.

También se ha visto que esta activación obedece a diferentes mecanismos como excitotoxicidad (121). Esta excitotoxicidad puede ser inducida a través de receptores ionotrópicos de glutamato, específicamente NMDA, AMPA y kainato. Su sobreestimulación puede ser por neurotransmisores excitatorios como aspartato, glutamato y exotoxinas. La sobreestimulación desencadena entrada excesiva de calcio en la neurona, que activa señales downstream involucradas en disfunción, muerte neuronal, incluyendo fallo de la mitocondrial que desencadena producción de radicales libres. La utilización de glutamato como control positivo refuerza la relevancia de nuestros hallazgos, ya que sitúa el mecanismo de acción del parásito en una categoría de neurotoxicidad similar a la excitotoxicidad, un proceso

patológico bien caracterizado en enfermedades neurológicas isquémicas y degenerativas (62).

La secuencia temporal ERK, p38 y JNK sugiere una cascada de eventos, una señal de estrés inicial (ERK) seguida de activación de señales de muerte somática (p38) y culminando con la ejecución de la degeneración axonal (JNK). Esta hipótesis es respaldada por estudios que muestran la interdependencia de estas vías en otros contextos neurodegenerativos (122).

La relevancia de este programa de señalización se hace evidente al analizar el efecto de las fracciones proteicas individuales. Mientras que el antígeno total muestra una respuesta integrada, los resultados demuestran una especificidad funcional por fracción. La fracción F8 activa selectivamente la vía JNK, mientras que la fracción F20 posee un efecto dual, activando tanto ERK como JNK. Esta distinción es crucial, ya que la fracción F20 fue la que indujo el mayor incremento significativo de esferoides axonales en el cultivo. Este hallazgo sugiere un vínculo causal directo entre los componentes proteicos de la F20 como la nardisilina y la calreticulina identificadas mediante espectrometría y la capacidad de disparar simultáneamente la señal de estrés temprano (ERK) y la ejecución de la degeneración axonal (JNK). Por tanto, la activación diferencial por fracciones confirma que la neurotoxicidad no es un evento accidental, sino que el parásito utiliza subpoblaciones proteicas específicas para secuestrar rutas endógenas de estrés, llevando a la neurona a un punto de no retorno.

Los hallazgos presentados en este estudio proporcionan evidencia mecanicista fundamental que conecta las proteínas E/S del cisticerco de *Taenia solium* con la

patogénesis neuronal, un vínculo largamente sospechado pero muy poco entendido en la NCC. Nuestros resultados no solo identifican fracciones proteicas específicas con potente actividad neurotóxica asociado con las hinchazones axonales (F8 y F20, Fig. 3 y 4), sino que también delinean, por primera vez, la participación de las vías de señalización MAPK en la mediación del daño axonal inducido por el E/S del parásito. También identifica proteínas con actividad proteolítica, proteínas relacionadas a estrés oxidativo y de unión a calcio, en la génesis de alteración de señales coordinadas y la degeneración de la neurona. Estos resultados sitúan a las proteínas E/S del cisticerco como un eje central en la etiología del daño neuronal en la NCC, yendo más allá de su papel tradicional como simple blanco diagnóstico o inmunológico. Además, este hallazgo redefine nuestra comprensión de la neuropatogénesis en la cisticercosis y abre nuevas perspectivas para el desarrollo de terapias neuroprotectoras dirigidas a estas vías de señalización, más allá de las estrategias antiparasitarias y antiinflamatorias convencionales.

VIII. CONCLUSIONES

- Las fracciones de proteínas E/S: F2, F8, F16, F17, F20 y F21 del estadio larval de *T. solium*, inducen exclusivamente la formación de hinchazones axonales en neuronas hipocampales, un sello distintivo de patología axonal temprana. Entre estas, las fracciones F20 y F21 causaron un mayor incremento significativo en el número de hinchazones axonales.
- El análisis proteómico de las fracciones F8 y F20 reveló un arsenal de 12 proteínas compartidas que podrían contribuir de forma sinérgica en la formación de hinchazones axonales. Este perfil destaca por la presencia de efectores claves como la nardisilina, la calreticulina, la PSA y la peroxidasa, las cuales podrían desregular procesos vitales como la autofagia funcional, la homeostasis del calcio, y la estabilidad estructural del axón.
- Las proteínas E/S del cisticerco de *T. solium* activan las vías MAPK ERK, JNK y p38 en neuronas hipocampales. La fracción F8 activa la vía JNK, mientras que la fracción F20 activa tanto ERK como JNK, estableciendo una posible relación causal entre estas quinasas y la formación de las hinchazones axonales.

IX. RECOMENDACIONES

Las futuras investigaciones deben centrarse en varios frentes:

- Identificar los efectores moleculares: La purificación y caracterización funcional de las 12 proteínas candidatas compartidas por las fracciones F8 y F20 es primordial.
- Realizar ensayos con inhibidores específicos de la vía MAPK (SB203580, SP600125, Ravoxertinib) en combinación con las fracciones neurotóxicas, lo cual reforzaría la causalidad del daño axonal por la vía MAPK.
- Validar *In Vivo*: Es crucial trasladar estos hallazgos a modelos animales de NCC para corroborar la activación de MAPK en el contexto de la infección y la respuesta inmune intacta.

X. LIMITACIONES

- La cantidad de proteínas por fracción en el fraccionamiento de E/S fue muy poca. Lo cual no permitió hacer 3 réplicas biológicas en el ensayo de WB.
- No se pudo realizar la espectrometría de masa a todas las fracciones neurotóxicas, pero aún así se encontró proteínas que podrían estar relacionadas con el daño neuronal.
- Complejidad de las fracciones proteicas: Aunque se logró separar las proteínas ES del parásito en 22 fracciones mediante cromatografía, cada una de estas fracciones sigue siendo una mezcla compleja de proteínas y no una molécula aislada. Por lo tanto, no se ha identificado aún un único efector molecular, sino subpoblaciones proteicas que podrían actuar de forma sinérgica.
- Falta de un sistema inmune completo: Al ser un modelo *in vitro* de cultivos primarios de rata, el estudio no puede replicar la respuesta inflamatoria masiva (como la infiltración de linfocitos y mastocitos) que ocurre en un cerebro real infectado.
- No contar con los niveles de la proteína total específica de cada MAPK ERK, JNK y p38 limita la capacidad de discernir si el aumento de la señal observado se debe exclusivamente a un evento de activación (fosforilación) o si existe una fluctuación en la expresión basal de estas proteínas durante los intervalos de exposición a los productos E/S.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Devi KR, Borbora D, Upadhyay N, Goswami D, Rajguru SK, Narain K. Neurocysticercosis in patients with active epilepsy in the tea garden community of Assam, Northeast India. *Sci Rep.* 1 de abril de 2021;11(1):1. doi:10.1038/s41598-021-86823-w
2. Satyaprakash K, Khan WA, Zade NN, Chaudhari SP, Shinde SV, Kurkure NV, et al. Serological and molecular detection of neurocysticercosis among epileptic patients in Nagpur, Maharashtra state (India). *Helminthologia.* 60(3):208-20. doi:10.2478/helm-2023-0023 PubMed PMID: 38152476; PubMed Central PMCID: PMC10750244.
3. García H, Gonzalez A. *Taenia solium* Cysticercosis and Its Impact in Neurological Disease | Clinical Microbiology Reviews [Internet]. 2020 [citado 26 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00085-19>
4. Butala C, Brook TM, Majekodunmi AO, Welburn SC. Neurocysticercosis: Current Perspectives on Diagnosis and Management. *Front Vet Sci.* 10 de mayo de 2021;8. doi:10.3389/fvets.2021.615703
5. Allen SE, Moyano LM, Wardle MT, Guzman C, Sanchez-Boluarte SS, Bonnet G, et al. Clinical Characteristics of Neurocysticercosis in a Peruvian Population-Based Epilepsy Cohort: A Descriptive Cross-Sectional Study of Baseline Clinical Intake. *Pathogens.* noviembre de 2023;12(11):1313. doi:10.3390/pathogens12111313
6. Bustos JA, Arroyo G, Del Brutto OH, Gonzales I, Saavedra H, Guzman C, et al. Calcified Neurocysticercosis: Demographic, Clinical, and Radiological Characteristics of a Large Hospital-Based Patient Cohort. *Pathogens.* 27 de diciembre de 2023;13(1):26. doi:10.3390/pathogens13010026 PubMed PMID: 38251334; PubMed Central PMCID: PMC10820744.
7. Norcia LF, Zanini MA, Hamamoto Filho PT. Letter to the Editor Regarding: «Is Antihelminthics Necessary in Postoperative Treatment of Intraventricular Neurocysticercosis? A Systematic Review». *World Neurosurg.* febrero de 2024;182:229. doi:10.1016/j.wneu.2023.11.074 PubMed PMID: 38390886.
8. Castillo G, Fustamante L, Delgado-Kamiché AD, Camen-Orozco RP, Clark T, Bernal E, et al. Understanding the pathogenic mechanisms and therapeutic effects in neurocysticercosis. *Brain Pathol Zurich Switz.* 11 de enero de 2024;e13237. doi:10.1111/bpa.13237 PubMed PMID: 38212958.
9. Mejía Maza A, Carmen-Orozco RP, Carter EC, Dávila-Villacorta DG, Castillo G, Morales JD, et al. Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathol.* 11 de diciembre

de 2018;29(3):425-36. doi:10.1111/bpa.12669 PubMed PMID: 30368965; PubMed Central PMCID: PMC6482075.

10. Yong Y, Gamage K, Cushman C, Spano A, Deppmann C. Regulation of degenerative spheroids after injury. *Sci Rep*. 22 de septiembre de 2020;10(1):15472. doi:10.1038/s41598-020-71906-x

11. Umehara F, Abe M, Koreeda Y, Izumo S, Osame M. Axonal damage revealed by accumulation of beta-amyloid precursor protein in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol Sci*. 15 de junio de 2000;176(2):95-101. doi:10.1016/s0022-510x(00)00324-5 PubMed PMID: 10930590.

12. Patilla Chihuan DL, Ramírez Cubas DMA. Detección de autofagia en neuronas y células gliales en ratas con neurocisticercosis [Internet]. 2021 [citado 24 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/9987>

13. Bernal E. Neuronal damage in neurocysticercosis using rat NCC model. En: *ASTMH 202 Annual Meeting*. United States: ASTMH; 2021.

14. Lange A de, Tomes H, Selfe J, Prodjinotho UF, Verhoog MB, Mahanty S, et al. Cestode larvae excite host neuronal circuits via glutamatergic signaling. *eLife*. 28 de julio de 2023;12. doi:10.7554/eLife.88174.1

15. Yong Y, Hunter-Chang S, Stepanova E, Deppmann C. Axonal spheroids in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. diciembre de 2021;117:103679. doi:10.1016/j.mcn.2021.103679

16. Born HA. Seizures in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 12 de febrero de 2015;286:251-63. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.11.051 PubMed PMID: 25484360.

17. Idro R, Marsh K, John CC, Newton CR. Cerebral Malaria; Mechanisms Of Brain Injury And Strategies For Improved Neuro-Cognitive Outcome. *Pediatr Res*. octubre de 2010;68(4):267-74. doi:10.1203/PDR.0b013e3181eee738 PubMed PMID: 20606600; PubMed Central PMCID: PMC3056312.

18. Dale JM, Garcia ML. Neurofilament Phosphorylation during Development and Disease: Which Came First, the Phosphorylation or the Accumulation? *J Amino Acids*. 2012;2012:382107. doi:10.1155/2012/382107 PubMed PMID: 22570767; PubMed Central PMCID: PMC3337605.

19. Huaman Navarro AY. Evaluación de daño en el transporte axonal en un modelo animal de neurocisticercosis [Internet]. 2025 [citado 23 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/17923>

20. Ding C, Wu Y, Dabas H, Hammarlund M. Activation of the CaMKII-Sarm1-ASK1-p38 MAP kinase pathway protects against axon degeneration caused by loss of mitochondria. Shen K, Sengupta P, Shen K, Freeman M, editores. *eLife*. 14 de marzo de 2022;11:e73557. doi:10.7554/eLife.73557
21. Lee S, Pant HC, Shea TB. Divergent and convergent roles for kinases and phosphatases in neurofilament dynamics. *J Cell Sci*. 15 de septiembre de 2014;127(18):4064-77. doi:10.1242/jcs.153346 PubMed PMID: 25015294; PubMed Central PMCID: PMC6519427.
22. Yang X, Ma Z, Lian P, Wu Y, Liu K, Zhang Z, et al. Disruption of axonal transport in Parkinson's disease: the role of pathological α -Syn and AMPK/p38 MAPK signaling. *NPJ Park Dis*. 6 de mayo de 2025;11:114. doi:10.1038/s41531-025-00926-z PubMed PMID: 40328804; PubMed Central PMCID: PMC12055991.
23. Yang X, Ma Z, Lian P, Xu Y, Cao X. Common mechanisms underlying axonal transport deficits in neurodegenerative diseases: a mini review. *Front Mol Neurosci*. 24 de abril de 2023;16. doi:10.3389/fnmol.2023.1172197
24. Sansa A, Miralles MP, Beltran M, Celma-Nos F, Calderó J, Garcera A, et al. ERK MAPK signaling pathway inhibition as a potential target to prevent autophagy alterations in Spinal Muscular Atrophy motoneurons. *Cell Death Discov*. 5 de abril de 2023;9(1):1-11. doi:10.1038/s41420-023-01409-x
25. Yang X, Ma Z, Lian P, Wu Y, Liu K, Zhang Z, et al. Disruption of axonal transport in Parkinson's disease: the role of pathological α -Syn and AMPK/p38 MAPK signaling. *Npj Park Dis*. 6 de mayo de 2025;11(1):114. doi:10.1038/s41531-025-00926-z
26. Li S, Roy ER, Wang Y, Watkins T, Cao W. DLK-MAPK Signaling Coupled with DNA Damage Promotes Intrinsic Neurotoxicity Associated with Non-Mutated Tau. *Mol Neurobiol*. 13 de noviembre de 2023. doi:10.1007/s12035-023-03720-1
27. Chun YS, Kim MY, Lee SY, Kim MJ, Hong TJ, Jeon JK, et al. MEK1/2 inhibition rescues neurodegeneration by TFEB-mediated activation of autophagic lysosomal function in a model of Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*. noviembre de 2022;27(11):4770-80. doi:10.1038/s41380-022-01713-5
28. Orrego MA, Verastegui MR, Vasquez CM, Garcia HH, Nash TE, Cysticercosis Working Group in Peru. Proliferative cells in racemose neurocysticercosis have an active MAPK signalling pathway and respond to metformin treatment. *Int J Parasitol*. mayo de 2022;52(6):377-83.

doi:10.1016/j.ijpara.2022.01.001 PubMed PMID: 35182540; PubMed Central PMCID: PMC9038666.

29. Yang J, Wu Z, Renier N, Simon DJ, Uryu K, Park DS, et al. Pathological axonal death through a MAPK cascade that triggers a local energy deficit. *Cell*. 15 de enero de 2015;160(0):161-76. doi:10.1016/j.cell.2014.11.053 PubMed PMID: 25594179; PubMed Central PMCID: PMC4306654.

30. Gibbs KL, Kalmar B, Rhymes ER, Fellows AD, Ahmed M, Whiting P, et al. Inhibiting p38 MAPK alpha rescues axonal retrograde transport defects in a mouse model of ALS. *Cell Death Dis*. 22 de mayo de 2018;9(6):1-16. doi:10.1038/s41419-018-0624-8

31. Li S, Roy ER, Wang Y, Watkins T, Cao W. DLK-MAPK Signaling Coupled with DNA Damage Promotes Intrinsic Neurotoxicity Associated with Non-Mutated Tau. *Mol Neurobiol*. 1 de mayo de 2024;61(5):2978-95. doi:10.1007/s12035-023-03720-1

32. Pranty AI, Szepanowski LP, Wruck W, Karikari AA, Adjaye J. Hemozoin induces malaria via activation of DNA damage, p38 MAPK and neurodegenerative pathways in a human iPSC-derived neuronal model of cerebral malaria. *Sci Rep*. 23 de octubre de 2024;14(1):24959. doi:10.1038/s41598-024-76259-3

33. Lange A de, Tomes H, Selfe JS, Prodjinotho UF, Verhoog MB, Mahanty S, et al. Cestode larvae excite host neuronal circuits via glutamatergic signaling. *eLife*. 28 de octubre de 2024;12. doi:10.7554/eLife.88174.2

34. Rawat SS, Keshri AK, Arora N, Kaur R, Mishra A, Kumar R, et al. *Taenia solium* cysticerci's extracellular vesicles Attenuate the AKT/mTORC1 pathway for Alleviating DSS-induced colitis in a murine model. *J Extracell Vesicles*. mayo de 2024;13(5):e12448. doi:10.1002/jev2.12448 PubMed PMID: 38779712; PubMed Central PMCID: PMC11112404.

35. Galán-Puchades MT. Taeniasis and Cysticercosis. En: Rezaei N, editor. *Encyclopedia of Infection and Immunity* [Internet]. Oxford: Elsevier; 2022 [citado 3 de julio de 2026]. p. 689-709. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187319000355> doi:10.1016/B978-0-12-818731-9.00035-5

36. Del Brutto OH. Neurocysticercosis: A Review. *Sci World J*. 2012;2012(1):159821. doi:10.1100/2012/159821

37. Del Brutto OH. Chapter 97 - Neurocysticercosis. En: Biller J, Ferro JM, editores. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2014 [citado 11 de agosto de 2023]. p. 1445-59. (Neurologic Aspects of Systemic Disease Part III). Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702040887000973>
doi:10.1016/B978-0-7020-4088-7.00097-3

38. Brutto D, H O. Human Neurocysticercosis: An Overview. *Pathogens*. octubre de 2022;11(10):10. doi:10.3390/pathogens11101212
39. Pesantes MA, Moyano LM, Sommerville C, Project on behalf of CWG in P and C. Neurocysticercosis in Northern Peru: Qualitative Insights from men and women about living with seizures. *PLoS Negl Trop Dis*. 9 de octubre de 2020;14(10):e0008715. doi:10.1371/journal.pntd.0008715
40. Allen SE, Moyano LM, Wardle MT, Guzman C, Sanchez-Boluarte SS, Bonnet G, et al. Clinical Characteristics of Neurocysticercosis in a Peruvian Population-Based Epilepsy Cohort: A Descriptive Cross-Sectional Study of Baseline Clinical Intake. *Pathogens*. noviembre de 2023;12(11):1313. doi:10.3390/pathogens12111313
41. Coyle CM, Bustos JA, Brutto OHD, Garcia HH, Nash TE, Rajshekhar V. Calcified Neurocysticercosis: Understanding Dead (Not Necessarily Inactive) Parasites. *Am J Trop Med Hyg*. 4 de junio de 2025;112(6):1187-92. doi:10.4269/ajtmh.24-0446
42. Bazan R, Filho PTH, Luvizutto GJ, Nunes HR de C, Odashima NS, Santos AC dos, et al. Clinical Symptoms, Imaging Features and Cyst Distribution in the Cerebrospinal Fluid Compartments in Patients with Extraparenchymal Neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 9 de noviembre de 2016;10(11):e0005115. doi:10.1371/journal.pntd.0005115
43. Ayala ER, Medina SA, Morales JA. Cisticercosis humana y su asociación con factores epidemiológicos y clínicos en los Andes centro y sur de Perú, 2000-2001. Vol. 18. 2014;18(1).
44. Dutta K, Ghosh S, Basu A. Infections and Inflammation in the Brain and Spinal Cord: A Dangerous Liaison. En: Jana N, Basu A, Tandon PN, editores. *Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies* [Internet]. Singapore: Springer; 2016 [citado 27 de octubre de 2025]. p. 71-138. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-10-1711-7_4 doi:10.1007/978-981-10-1711-7_4
45. Alloo J, Leleu I, Granette C, Pied S. Parasite infections, neuroinflammation, and potential contributions of gut microbiota. *Front Immunol*. 8 de diciembre de 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.1024998
46. Adalid-Peralta L, Sáenz B, Fragoso G, Cárdenas G. Understanding host-parasite relationship: the immune central nervous system microenvironment and its effect on brain infections. *Parasitology*. julio de 2018;145(8):988-99. doi:10.1017/S0031182017002189

47. Fleury A, Trejo A, Cisneros H, García-Navarrete R, Villalobos N, Hernández M, et al. *Taenia solium*: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 7 de agosto de 2015;9(8):e0003980. doi:10.1371/journal.pntd.0003980
48. Alloo J, Leleu I, Granette C, Pied S. Parasite infections, neuroinflammation, and potential contributions of gut microbiota. *Front Immunol*. 8 de diciembre de 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.1024998
49. Adalid-Peralta L, Rosas G, Arce-Sillas A, Bobes RJ, Cárdenas G, Hernández M, et al. Effect of Transforming Growth Factor- β upon *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* Cysticerci. *Sci Rep*. 27 de septiembre de 2017;7(1):1. doi:10.1038/s41598-017-12202-z
50. Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunol*. 2016;38(3):147-57. doi:10.1111/pim.12299
51. Lange A de, Tomes H, Selfe J, Prodjinotho UF, Verhoog MB, Mahanty S, et al. Cestode larvae excite host neuronal circuits via glutamatergic signaling. *eLife*. 28 de julio de 2023;12. doi:10.7554/eLife.88174.1
52. Gomez S, Adalid-Peralta L, Palafox-Fonseca H, Cantu-Robles VA, Soberón X, Sciutto E, et al. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). *Sci Rep*. 19 de mayo de 2015;5(1):9683. doi:10.1038/srep09683
53. Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, et al. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion–secretion proteins. *PROTEOMICS*. 2012;12(11):1860-9. doi:10.1002/pmic.201100496
54. Li L, He W, Fan X, Liu M, Luo B, Yang F, et al. Proteomic analysis of *Taenia solium* cysticercus and adult stages. *Front Vet Sci*. 9 de enero de 2023;9. doi:10.3389/fvets.2022.934197
55. Yan H li, Xue G, Mei Q, Ding F xiang, Wang Y zhao, Sun S han. Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: A novel strategy to prevent host immune response. *Int J Biochem Cell Biol*. 1 de enero de 2008;40(10):2151-63. doi:10.1016/j.biocel.2008.02.018
56. Pozuelo-Rubio M. 14-3-3 proteins are regulators of autophagy [Internet]. 15 de octubre de 2012. doi:10.3390/cells1040754
57. Xu Y, Ren J, He X, Chen H, Wei T, Feng W. YWHA/14-3-3 proteins recognize phosphorylated TFEB by a noncanonical mode for controlling TFEB cytoplasmic localization. *Autophagy*. 27 de enero de

2019;15(6):1017-30. doi:10.1080/15548627.2019.1569928 PubMed PMID: 30653408; PubMed Central PMCID: PMC6526839.

58. Liu T, Zheng Y, Zhou S, Wang Y, Lei X, Xie L, et al. 14-3-3 proteins inhibit autophagy by regulating SINAT-mediated proteolysis of ATG6 in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 29 de noviembre de 2024;24(1):1148. doi:10.1186/s12870-024-05854-3

59. Zhang Y, Yan M, Yu Y, Wang J, Jiao Y, Zheng M, et al. 14-3-3ε: a protein with complex physiology function but promising therapeutic potential in cancer. *Cell Commun Signal.* 26 de enero de 2024;22(1):72. doi:10.1186/s12964-023-01420-w

60. Stone WJ, Pair FS, Ekkatine R, Gannon M, Scholz K, Pattanayak R, et al. 14-3-3 Proteins Negatively Regulate Microglial Activation via Inhibition of the NF-κB Pathway. *J Neurochem.* 2025;169(9):e70228. doi:10.1111/jnc.70228

61. Moujalled D, Strasser A, Liddell JR. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death Differ.* julio de 2021;28(7):2029-44. doi:10.1038/s41418-021-00814-y

62. Dong X xia, Wang Y, Qin Z hong. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* abril de 2009;30(4):379-87. doi:10.1038/aps.2009.24

63. Summers D, Milbrandt J. Palmitoylation enables MAPK-dependent proteostasis of axon survival factors [Internet]. [citado 5 de noviembre de 2025]. Disponible en: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1806933115> doi:10.1073/pnas.1806933115

64. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, et al. Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Science.* 25 de febrero de 2005;307(5713):1282-8. doi:10.1126/science.1105681

65. Hunter-Chang S, Kim-Aun C, Karim H, Jones M, Vegiraju T, Stepanova E, et al. Axonal spheroids are regulated by Schwann cells after peripheral nerve injury [Internet]. *bioRxiv*; 2024 [citado 20 de agosto de 2025]. p. 2024.11.08.622649. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.11.08.622649v1> doi:10.1101/2024.11.08.622649

66. Yong Y, Gamage K, Cheng I, Barford K, Spano A, Winckler B, et al. p75NTR and DR6 Regulate Distinct Phases of Axon Degeneration Demarcated by Spheroid Rupture. *J Neurosci.* 27 de noviembre de 2019;39(48):9503-20. doi:10.1523/JNEUROSCI.1867-19.2019

67. King AE, Southam KA, Dittmann J, Vickers JC. Excitotoxin-induced caspase-3 activation and microtubule disintegration in axons is inhibited by taxol. *Acta Neuropathol Commun.* 9 de septiembre de 2013;1(1):59. doi:10.1186/2051-5960-1-59
68. Lingor P, Koch JC, Tönges L, Bähr M. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell Tissue Res.* 1 de julio de 2012;349(1):289-311. doi:10.1007/s00441-012-1362-3
69. Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. Axonal Degeneration during Aging and Its Functional Role in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci.* 4 de septiembre de 2017;11. doi:10.3389/fnins.2017.00451
70. Wang JT, Medress ZA, Barres BA. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol.* 9 de enero de 2012;196(1):7-18. doi:10.1083/jcb.201108111
71. Wu X, Yang Z, Zou J, Gao H, Shao Z, Li C, et al. Protein kinases in neurodegenerative diseases: current understandings and implications for drug discovery. *Signal Transduct Target Ther.* 7 de mayo de 2025;10(1):146. doi:10.1038/s41392-025-02179-x
72. Yang L, Mao L, Chen H, Catavsan M, Kozinn J, Arora A, et al. A Signaling Mechanism from Gαq-Protein-Coupled Metabotropic Glutamate Receptors to Gene Expression: Role of the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway. *J Neurosci.* 18 de enero de 2006;26(3):971-80. doi:10.1523/JNEUROSCI.4423-05.2006 PubMed PMID: 16421317.
73. Wu X, Yang Z, Zou J, Gao H, Shao Z, Li C, et al. Protein kinases in neurodegenerative diseases: current understandings and implications for drug discovery. *Signal Transduct Target Ther.* 7 de mayo de 2025;10(1):146. doi:10.1038/s41392-025-02179-x
74. Yang J, Wu Z, Renier N, Simon DJ, Uryu K, Park DS, et al. Pathological Axonal Death through a MAPK Cascade that Triggers a Local Energy Deficit. *Cell.* enero de 2015;160(1-2):161-76. doi:10.1016/j.cell.2014.11.053
75. Geden MJ, Deshmukh M. Axon degeneration: context defines distinct pathways. *Curr Opin Neurobiol.* agosto de 2016;39:108-15. doi:10.1016/j.conb.2016.05.002
76. Lê HG, Kang JM, Võ TC, Yoo WG, Na BK. Naegleria fowleri Extracellular Vesicles Induce Proinflammatory Immune Responses in BV-2 Microglial Cells. *Int J Mol Sci.* 3 de septiembre de 2023;24(17):13623. doi:10.3390/ijms241713623 PubMed PMID: 37686429; PubMed Central PMCID: PMC10487526.

77. Franco A, Flores-Garcia Y, Zavala F, Sullivan DJ. Plasmodium berghei Purified Hemozoin Associated with DNA Strongly Inhibits P. berghei Liver-Stage Development in BALB/c Mice after Intravenous Inoculation. Infect Immun. 24 de enero de 2023;91(1):e0030422. doi:10.1128/iai.00304-22 PubMed PMID: 36622216; PubMed Central PMCID: PMC9872621.
78. Jones LP, Martin DE, Tripp RA. The MAPK Response to Virus Infection Is Modified by Probenecid. Curr Issues Mol Biol. abril de 2025;47(4):246. doi:10.3390/cimb47040246
79. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Grãos MM, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. Cell Death Differ. octubre de 2005;12(10):1329-43. doi:10.1038/sj.cdd.4401662
80. Ferreira-Marques M, Carvalho A, Cavadas C, Avelaira CA. PI3K/AKT/MTOR and ERK1/2-MAPK signaling pathways are involved in autophagy stimulation induced by caloric restriction or caloric restriction mimetics in cortical neurons. Aging. 14 de marzo de 2021;13(6):7872-82. doi:10.18632/aging.202805 PubMed PMID: 33714946.
81. Gibbs KL, Greensmith L, Schiavo G. Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases. Trends Biochem Sci. 1 de octubre de 2015;40(10):597-610. doi:10.1016/j.tibs.2015.08.003 PubMed PMID: 26410600.
82. Arora N, Keshri AK, Kaur R, Rawat SS, Kumar R, Mishra A, et al. Taenia solium excretory secretory proteins (ESPs) suppresses TLR4/AKT mediated ROS formation in human macrophages via hsa-miR-125. PLoS Negl Trop Dis. 29 de diciembre de 2023;17(12):e0011858. doi:10.1371/journal.pntd.0011858 PubMed PMID: 38157380; PubMed Central PMCID: PMC10783723.
83. Johnston CJC, Smyth DJ, Kodali RB, White MPJ, Harcus Y, Filbey KJ, et al. A structurally distinct TGF- β mimic from an intestinal helminth parasite potently induces regulatory T cells. Nat Commun. 23 de noviembre de 2017;8(1):1741. doi:10.1038/s41467-017-01886-6
84. Leary S, Pharmaceuticals F, Underwood W, Anthony R, Cartner S, Johnson CL, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. 2020.
85. Sahu MP, Nikkilä O, Lågas S, Kolehmainen S, Castrén E. Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex [Internet]. bioRxiv; 2018 [citado 3 de julio de 2026]. p. 491118. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/491118v1> doi:10.1101/491118
86. Salazar IL, Mele M, Caldeira MV, Costa RO, Correia B, Frisari S, et al. Preparation of Primary Cultures of Embryonic Rat Hippocampal and

Cerebrocortical Neurons. *Bio-Protoc.* 20 de septiembre de 2017;7(18):e2551. doi:10.21769/BioProtoc.2551 PubMed PMID: 34541197; PubMed Central PMCID: PMC8413547.

87. Lesslich HM, Klapal L, Wilke J, Haak A, Dietzel ID. Adjusting the neuron to astrocyte ratio with cytostatics in hippocampal cell cultures from postnatal rats: A comparison of cytarabine furanoside (AraC) and 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR). *PLOS ONE.* 9 de marzo de 2022;17(3):e0265084. doi:10.1371/journal.pone.0265084

88. Sahu MP, Nikkilä O, Lågas S, Kolehmainen S, Castrén E. Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex [Internet]. *bioRxiv*; 2019 [citado 27 de junio de 2024]. p. 491118. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/491118v2> doi:10.1101/491118

89. Valian N, Heravi M, Ahmadiani A, Dargahi L. Comparison of Rat Primary Midbrain Neurons Cultured in DMEM/F12 and Neurobasal Mediums. *Basic Clin Neurosci.* 2021;12(2):205-12. doi:10.32598/bcn.12.2.1568.1 PubMed PMID: 34925717; PubMed Central PMCID: PMC8672668.

90. Strong CE, Zhang J, Carrasco M, Kundu S, Boutin M, Vishwasrao HD, et al. Functional brain region-specific neural spheroids for modeling neurological diseases and therapeutics screening. *Commun Biol.* 28 de noviembre de 2023;6(1):1-18. doi:10.1038/s42003-023-05582-8

91. Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TVP, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Long-Term Potentiation in Intact Adult Hippocampus: Requirement for ERK Activation Coupled to CREB and Upregulation of Arc Synthesis. *J Neurosci.* 1 de marzo de 2002;22(5):1532-40. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-05-01532.2002 PubMed PMID: 11880483.

92. Zadrán S, Jourdi H, Rostamiani K, Qin Q, Bi X, Baudry M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Epidermal Growth Factor Activate Neuronal m-Calpain via Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation. *J Neurosci.* 20 de enero de 2010;30(3):1086-95. doi:10.1523/JNEUROSCI.5120-09.2010 PubMed PMID: 20089917.

93. Cao K, Liao X, Lu J, Yao S, Wu F, Zhu X, et al. IL-33/ST2 plays a critical role in endothelial cell activation and microglia-mediated neuroinflammation modulation. *J Neuroinflammation.* 4 de mayo de 2018;15(1):136. doi:10.1186/s12974-018-1169-6

94. Walker LJ, Summers DW, Sasaki Y, Brace E, Milbrandt J, DiAntonio A. MAPK signaling promotes axonal degeneration by speeding the turnover of the axonal maintenance factor NMNAT2. *eLife.* 6:e22540. doi:10.7554/eLife.22540 PubMed PMID: 28095293; PubMed Central PMCID: PMC5241118.

95. Dasgupta S, Pandya MA, Zanin JP, Liu T, Sun Q, Li H, et al. ProNGF elicits retrograde axonal degeneration of basal forebrain neurons through p75NTR and induction of amyloid precursor protein. *Sci Signal*. 24 de septiembre de 2024;17(855):eadn2616. doi:10.1126/scisignal.adn2616
96. Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, et al. Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons: roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *J Neurochem*. 2003;84(3):566-75. doi:10.1046/j.1471-4159.2003.01548.x
97. Menzies FM, Hourez R, Imarisio S, Raspe M, Sadiq O, Chandraratna D, et al. Puromycin-sensitive aminopeptidase protects against aggregation-prone proteins via autophagy. *Hum Mol Genet*. 1 de diciembre de 2010;19(23):4573-86. doi:10.1093/hmg/ddq385 PubMed PMID: 20829225; PubMed Central PMCID: PMC2972693.
98. Kudo LC, Parfenova L, Ren G, Vi N, Hui M, Ma Z, et al. Puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA/NPEPPS) impedes development of neuropathology in hPSA/TAUP301L double-transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 1 de mayo de 2011;20(9):1820-33. doi:10.1093/hmg/ddr065
99. Bhutani N, Venkatraman P, Goldberg AL. Puromycin-sensitive aminopeptidase is the major peptidase responsible for digesting polyglutamine sequences released by proteasomes during protein degradation. *EMBO J*. 7 de marzo de 2007;26(5):1385-96. doi:10.1038/sj.emboj.7601592 PubMed PMID: 17318184; PubMed Central PMCID: PMC1817637.
100. Chow KM, Guan H, Hersh LB. Aminopeptidases do not directly degrade tau protein. *Mol Neurodegener*. 5 de noviembre de 2010;5(1):48. doi:10.1186/1750-1326-5-48
101. Yoon WH, Sandoval H, Nagarkar-Jaiswal S, Jaiswal M, Yamamoto S, Haelterman NA, et al. Loss of Nardilysin, a Mitochondrial Co-chaperone for α -Ketoglutarate Dehydrogenase, Promotes mTORC1 Activation and Neurodegeneration. *Neuron*. 4 de enero de 2017;93(1):115-31. doi:10.1016/j.neuron.2016.11.038
102. Mailloux RJ. Targeted Redox Regulation α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex for the Treatment of Human Diseases. *Cells*. 29 de abril de 2025;14(9):653. doi:10.3390/cells14090653 PubMed PMID: 40358176; PubMed Central PMCID: PMC12071522.
103. Chile N, Bernal-Teran EG, Condori BJ, Clark T, Garcia HH, Gilman RH, et al. Characterization of antigenic proteins of the *Taenia solium* postoncospherical form. *Mol Biochem Parasitol*. 1 de septiembre de 2024;259:111621. doi:10.1016/j.molbiopara.2024.111621

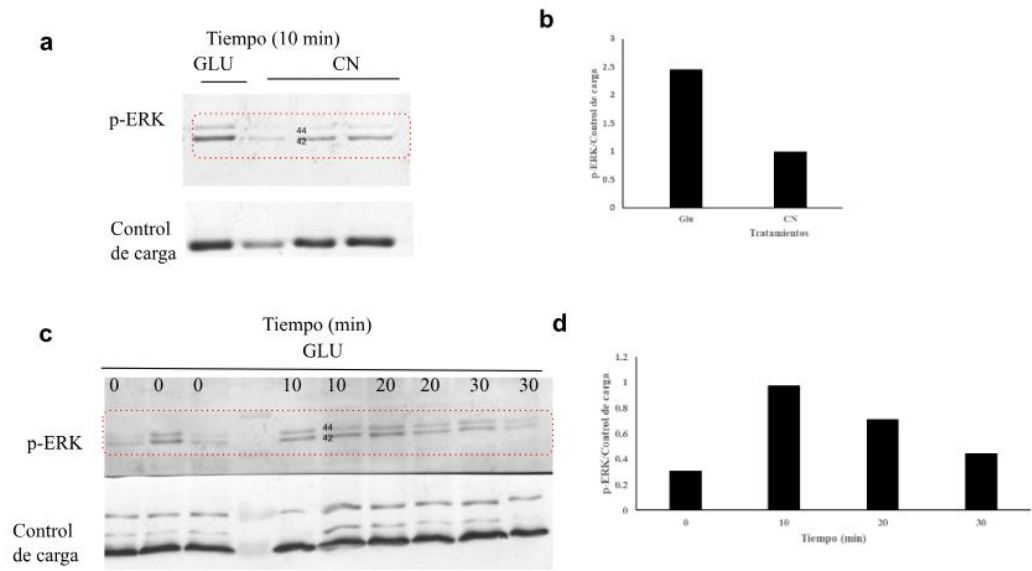
104. Sosoniuk Roche ER. Calreticulina de trypanosoma cruzi : un factor de virulencia que unido exógenamente a epimastigotes, promueve su penetración a células hospederas [Internet]. 2013 [citado 22 de enero de 2026]. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/115053>
105. Mendlovic Pasol F. Estudio de la interacción de la calreticulina de taenia solium con el sistema inmunológico del hámster durante la teniosis experimental. México; 2015.
106. Barsukova AG, Forte M, Bourdette D. Focal Increases of Axoplasmic Ca²⁺, Aggregation of Sodium–Calcium Exchanger, N-type Ca²⁺ Channel, and Actin Define the Sites of Spheroids in Axons Undergoing Oxidative Stress. *J Neurosci*. 29 de agosto de 2012;32(35):12028-37. doi:10.1523/JNEUROSCI.0408-12.2012 PubMed PMID: 22933787.
107. Khan H, Garg N, Singh TG, Kaur A, Thapa K. Calpain Inhibitors as Potential Therapeutic Modulators in Neurodegenerative Diseases. *Neurochem Res*. 1 de mayo de 2022;47(5):1125-49. doi:10.1007/s11064-021-03521-9
108. Zhang JN, Michel U, Lenz C, Friedel CC, Köster S, d'Hedouville Z, et al. Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration. *Sci Rep*. 15 de noviembre de 2016;6(1):37050. doi:10.1038/srep37050
109. Bieñ J, Salamatin R, Sulima A, Savijoki K, Conn DB, Näreaho A, et al. Mass spectrometry analysis of the excretory-secretory (E-S) products of the model cestode *Hymenolepis diminuta* reveals their immunogenic properties and the presence of new E-S proteins in cestodes. *Acta Parasitol*. 1 de abril de 2016;61(2):429-42. doi:10.1515/ap-2016-0058
110. Cheng G, Shi R. Mammalian Peroxidasin (PXDN): From Physiology to Pathology. *Free Radic Biol Med*. marzo de 2022;182:100-7. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.02.026 PubMed PMID: 35219848; PubMed Central PMCID: PMC8957557.
111. Cai Y, Kanyo J, Wilson R, Bathla S, Cardozo PL, Tong L, et al. Subcellular proteomics and iPSC modeling uncover reversible mechanisms of axonal pathology in Alzheimer's disease. *Nat Aging*. marzo de 2025;5(3):504-27. doi:10.1038/s43587-025-00823-3
112. Teran EGB. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO NEURONAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS CON NEUROCISTICERCOSIS QUE PRESENTAN EPILEPSIA.
113. Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. marzo de 2004;5(3):173-83. doi:10.1038/nrn1346

114. A Death-Promoting Role for Extracellular Signal-Regulated Kinase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 de diciembre de 2006;319(3):991-7. doi:10.1124/jpet.106.107367
115. Li Q, Chen M, Liu H, Yang L, Yang T, Yang G, et al. The dual role of ERK signaling in the apoptosis of neurons. *Front Biosci-Landmark*. 1 de junio de 2014;19(8):1411-7. doi:10.2741/4291
116. Devarakonda SS, Basha S, Pithakumar A, L b T, Mukunda DC, Rodrigues J, et al. Molecular mechanisms of neurofilament alterations and its application in assessing neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev*. 1 de diciembre de 2024;102:102566. doi:10.1016/j.arr.2024.102566
117. Ackerley S, Grierson AJ, Brownlees J, Thornhill P, Anderton BH, Leigh PN, et al. Glutamate Slows Axonal Transport of Neurofilaments in Transfected Neurons. *J Cell Biol*. 10 de julio de 2000;150(1):165-76. doi:10.1083/jcb.150.1.165
118. Qi H, Prabakaran S, Cantrelle FX, Chambraud B, Gunawardena J, Lippens G, et al. Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase *. *J Biol Chem*. 1 de abril de 2016;291(14):7742-53. doi:10.1074/jbc.M115.700914 PubMed PMID: 26858248.
119. Sasaki T, Gotow T, Shiozaki M, Sakaue F, Saito T, Julien JP, et al. Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants. *Hum Mol Genet*. 15 de marzo de 2006;15(6):943-52. doi:10.1093/hmg/ddl011
120. Cao J, Semenova MM, Solovyan VT, Han J, Coffey ET, Courtney MJ. Distinct Requirements for p38 α and c-Jun N-terminal Kinase Stress-activated Protein Kinases in Different Forms of Apoptotic Neuronal Death. *J Biol Chem*. agosto de 2004;279(34):35903-13. doi:10.1074/jbc.M402353200
121. Shah SA, Lee HY, Bressan RA, Yun DJ, Kim MO. Novel osmotin attenuates glutamate-induced synaptic dysfunction and neurodegeneration via the JNK/PI3K/Akt pathway in postnatal rat brain. *Cell Death Dis*. enero de 2014;5(1):e1026-e1026. doi:10.1038/cddis.2013.538
122. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 3 de marzo de 2011;75(1):50-83. doi:10.1128/mmbr.00031-10
123. Advíncula N, Ballartra Gonzales M. Efecto de los productos excretorios-secretores (PES) del estadio de cisticerco de *Taenia solium* sobre la sinapsis en cultivos neuronales primarios del hipocampo de rata. [LIMA PERU]: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

XII. ANEXOS

Anexo 1

Determinación del control positivo en el experimento de activación de las MAPK



El glutamato induce la activación de ERK en neuronas hipocampales y células SHSY 5Y. 100 uM de glutamato (GLU) activa la vía ERK en neuronas hipocampales de rata en un tiempo de 10 minutos (**a** y **b**). El glutamato induce la activación transitoria de ERK en células SHSY 5Y a los 10 minutos (**c** y **d**).

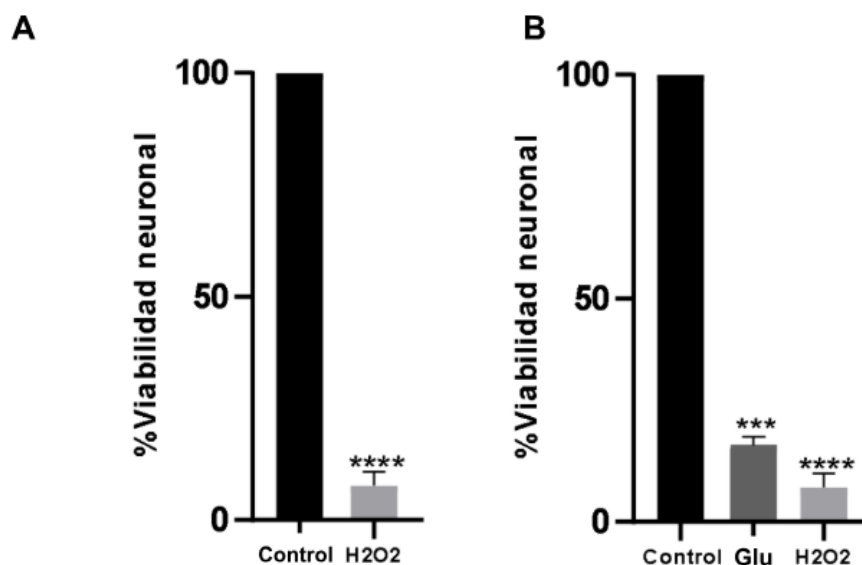
Anexo 2

Cuantificación de la cantidad de proteína de las fracciones E/S de *T. solium* por el método de BCA.

Fracción	ug/mL	Fracción	ug/mL
F2	812.6	F14	166.6
F4	22.6	F15	96.6
F5	44.6	F16	30.6
F6	88.6	F17	200.6
F7	114.6	F18	128.6
F8	102.6	F19	66.6
F9	184.6	F20	14.6
F10	194.6	F21	6.6
F11	178.6	F22	0
F12	206.6	F24	0
F13	182.6	F25	0

Anexo 3

Viabilidad de los cultivos neuronales primarios de hipocampo de rata.



Viabilidad neuronal. Viabilidad del modelo de neuronas primarias hipocampales, A. mantenidos hasta 7 (DIV7) y B. 21 días *in vitro* (DIV 21). Se realizó mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio (MTT). Se expuso a las neuronas a 100 uM de glutamato por 24 h, 50 uM de peróxido de hidrógeno por 15 minutos (se mantuvieron en medio por 23 h y 45 minutos, y tratadas en los últimos 15 minutos). Las neuronas control (solo expuestas a medio por 24 h) muestran una viabilidad al 100% a comparación cuando son expuestas a glutamato y peróxido de hidrógeno. B. Resultados obtenidos por Advíncula y Ballarta 2026 para su tesis de pregrado, no publicada (123).