



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

MUERTE CELULAR POR PIROPTOSIS EN
TEJIDO DE CEREBRO DE RATA CON
NEUROCISTICERCOSIS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

MARIA MILAGROS DUEÑAS MENDOZA

LIMA – PERÚ

2026

ASESOR

PhD. MANUELA RENEE VERASTEGUI PIMENTEL

DEDICATORIA.

A mis padres Edwin y María por sus palabras de aliento, su apoyo y amor incondicional

A mis hermanos Raphael y Carlos por todo su soporte.

A mi sobrinita Flavia quién es la alegría de la familia.

A mi abuelito Juan por todo el apoyo en esta aventura de la tesis.

A la familia Gómez Arteta por estar siempre atentos a mis pasos.

A mis amigos y compañeros que siempre me brindaron una palabra de aliento.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme estar en este camino y poder alcanzar mis metas.

Un especial agradecimiento a la Dra. Manuela Verástegui por ser soporte y guía en el desarrollo de la tesis y por permitirme ser parte del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la UPCH.

A mis compañeros del laboratorio por todo su compañerismo.

A mis colegas que siempre me brindaron ánimo para culminar la tesis.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO.

La conclusión de este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC) a través de su Programa Nacional de Investigación Científica y de Estudios Avanzados (PROCIENCIA) apoyando la realización de este trabajo - Número de contrato: PE501090892-2024.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	DUEÑAS MENDOZA MARIA MILAGROS

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **MUERTE CELULAR POR PIROPTOSIS EN TEJIDO DE CEREBRO DE RATA CON NEUROCISTICERCOSIS**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA** 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.	VERASTEGUI PIMENTEL MANUELA RENEE	FACI	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 **15%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3019548814**; fecha de entrega: **28-08-2026**).
- 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, 28 de agosto de 2026**

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

Firma del Co-asesor
N° DNI:
ORCID:

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Planteamiento del problema.....	3
1.2	Justificación del estudio	5
II.	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo general	6
2.2	Objetivos específicos	6
III.	HIPÓTESIS.....	7
IV.	MARCO TEÓRICO.....	7
4.1	Neurocisticercosis	7
4.2	Piroptosis.....	9
4.2.1	<i>Inflamasoma NLRP3</i>	10
4.2.2	<i>Caspasa-1</i>	11
4.2.3	<i>Gasdermina D</i> y su relevancia en el daño cerebral.....	12
4.2.4	<i>Interleucina-1β (IL-1β)</i>	13
V.	METODOLOGÍA	13
5.1	Consideraciones éticas	13
5.2	Lugar de estudio.....	14
5.3	Diseño experimental.....	14
5.4	Obtención de muestras	15
5.5	Selección de muestras	16
5.6	Muestras utilizadas para el análisis del presente estudio	17
5.7	Técnicas y procedimientos.....	18
5.7.1	Inmunohistoquímica.....	18
5.7.2	Inmunofluorescencia	20
5.8	Obtención de datos	21
5.9	Análisis estadístico.....	22
VI.	RESULTADOS.....	22

6.1	Evaluación exploratoria de la inmunorreactividad de biomarcadores de piroptosis en quistes viables de ratas con neurocisticercosis tratadas y no tratadas.	23
6.2	Inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis en tejidos cerebrales infectados y no infectados	27
6.2.1	Inmunorreactividad del inflammasoma NLRP3	27
6.2.2	Inmunorreactividad del inflammasoma caspasa-1 (Casp-1)	29
6.2.3	Inmunorreactividad de gasdermina D clivada (GSDMD-C1)	32
6.2.4	Inmunorreactividad de Interleucina 1 β (IL-1 β)	36
6.3	Población celular inmunorreactiva al marcador gasdermina D clivada (GSDMD-C1).....	40
6.4	Correlación entre el porcentaje de inmunorreactividad de los biomarcadores NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β en tejidos de cerebro de rata con neurocisticercosis.	42
VII.	DISCUSIÓN	45
VIII.	CONCLUSIONES	54
IX.	LIMITACIONES	55
X.	RECOMENDACIONES	56
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
XII.	ANEXOS	67

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. NÚMERO DE ANIMALES POR GRUPO EXPERIMENTAL	15
TABLA 2. NÚMERO DE ANIMALES POR CADA GRUPO EXPERIMENTAL Y TIEMPO DE SACRIFICIO POSTRATAMIENTO.....	17
TABLA 3. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO CEREBRAL INFECTADAS Y NO INFECTADAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE PIROPTOSIS.....	18
TABLA 4. COMPARACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE NLRP3 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATA CON QUISTES VIABLES DE LOS GRUPOS TRATADOS Y NO TRATADOS A DIFERENTES TIEMPOS POSTRATAMIENTO	23
TABLA 5. COMPARACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE CASPASA1 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATA CON QUISTES VIABLES DE LOS GRUPOS TRATADOS Y NO TRATADOS A DIFERENTES TIEMPOS POSTRATAMIENTO	24
TABLA 6. COMPARACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE GSDMD-C1 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATA CON QUISTES VIABLES DE LOS GRUPOS TRATADOS Y NO TRATADOS A DIFERENTES TIEMPOS POSTRATAMIENTO.	25
TABLA 7. COMPARACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE IL-1B EN TEJIDO CEREBRAL DE RATA CON QUISTES VIABLES DE LOS GRUPOS TRATADOS Y NO TRATADOS A DIFERENTES TIEMPOS POSTRATAMIENTO	26
TABLA 8. COMPARACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE NLRP3 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS CON GRUPO NO INFECTADO A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN.....	28
TABLA 9. COMPARACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE CASPASA-1 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS CON GRUPO NO INFECTADO A DIFERENTES TIEMPOS POST TRATAMIENTO	30
TABLA 10. INMUNORREACTIVIDAD DE LA GASDERMINA D CLIVADA (GSDMD-C1) EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN.....	33
TABLA 11. COMPARACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD DE IL-1B EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN	37
TABLA 12. CORRELACIÓN ENTRE LA INMUNORREACTIVIDAD DE LOS BIOMARCADORES NLRP3, CASPASA-1, GSDMD-C1 E IL-1B	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DEL INFLAMASOMA NLRP3	28
FIGURA 2 INMUNORREACTIVIDAD DE INFLAMASOMA NLRP3 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN. ...	29
FIGURA 3 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE CASPASA-1	31
FIGURA 4 INMUNORREACTIVIDAD DE CASPASA-1 EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN.	32
FIGURA 5 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE GSDMD-C1.....	34
FIGURA 6 INMUNORREACTIVIDAD DE GSDMD-C1EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN.	35
FIGURA 7 INMUNORREACTIVIDAD DE GSDMD-C1EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN.	36
FIGURA 8 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD DE IL-1B.....	38
FIGURA 9 INMUNORREACTIVIDAD DE IL-1B EN TEJIDO CEREBRAL DE RATAS INFECTADAS Y NO INFECTADAS A DIFERENTES TIEMPOS POSINFECCIÓN	39
FIGURA 10 INMUNOFLUORESCENCIA DE GSDMD-C1.	41
FIGURA 11. INMUNORREACTIVIDAD DE MARCADORES DE PIROPTOSIS EN TEJIDO CEREBRAL CON NCC.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC	Proteína adaptadora asociada al inflamasoma
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina
Casp-1	Caspasa-1
CIEA	Comité Institucional de Ética en el uso de Animales
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
GSDMD	Gasdermina D
GSDMD-C1	Forma clivada N-terminal de gasdermina D
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IBA1	Ionized calcium binding adapter molecule 1
IF	Inmunofluorescencia
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-18	Interleucina-18
IHC	Inmunohistoquímica
LDH	Lactato deshidrogenasa
NCC	Neurocisticercosis
NeuN	Antígeno nuclear neuronal
NLRP3	Receptor tipo NOD con dominio pirina 3
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
ROI	Región de interés
SNC	Sistema nervioso central

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria del sistema nervioso central asociada a una respuesta inflamatoria que contribuye al daño cerebral y a manifestaciones neurológicas como epilepsia y deterioro cognitivo. La piroptosis es un tipo de muerte celular inflamatoria regulada que ha sido implicada en diversas enfermedades neuroinflamatorias; sin embargo, su participación en la neurocisticercosis no ha sido ampliamente estudiada. El objetivo del presente estudio fue evaluar la inmunorreactividad de biomarcadores asociados a la piroptosis, inflammasoma NLRP3, caspasa-1, interleucina-1 β (IL-1 β) y la forma clivada de gasdermina D (GSDMD-C1), en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis, en comparación con ratas no infectadas. Se utilizaron cortes histológicos de cerebro fijados en parafina, previamente obtenidos de un estudio experimental, los cuales fueron analizados mediante inmunohistoquímica. Asimismo, se realizó inmunofluorescencia de doble marcaje para identificar la población celular inmunorreactivas a GSDMD-C1. La cuantificación se realizó mediante un análisis semi-cuantitativo de área inmunorreactiva y se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas.

Los resultados mostraron una mayor inmunorreactividad de NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β en los tejidos cerebrales de ratas infectadas, con variaciones dependientes del tiempo posinfección. GSDMD-C1 fue el biomarcador que presentó un aumento más consistente en los diferentes tiempos evaluados. El análisis de correlación evidenció asociaciones moderadas entre NLRP3 y GSDMD-C1, así como

entre caspasa-1 e IL-1 β . La inmunofluorescencia mostró expresión de GSDMD-C1 en neuronas y astrocitos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la neurocisticercosis induce la activación de componentes clave de la vía piroptótica en el tejido cerebral, contribuyendo a la respuesta inflamatoria asociada a esta enfermedad.

Palabras clave: Neurocisticercosis, piroptosis, gasdermina D clivada, inflammasoma NLRP3, Caspasa-1 e interleucina 1 β .

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a parasitic disease of the central nervous system associated with an inflammatory response that contributes to brain damage and neurological manifestations such as epilepsy and cognitive impairment. Pyroptosis is a type of regulated inflammatory cell death that has been implicated in various neuroinflammatory diseases; however, its role in neurocysticercosis has not been extensively studied. The objective of this study was to evaluate the immunoreactivity of biomarkers associated with pyroptosis, inflammasome NLRP3, caspase-1, interleukin 1 β (IL-1 β), and the cleaved form of gasdermin D (GSDMD C1), in brain tissue from rats with neurocysticercosis, compared to healthy rats. Paraffin-embedded brain histological sections, previously obtained from an experimental study, were analyzed using immunohistochemistry. Additionally, double-labeling immunofluorescence was performed to identify cell populations immunoreactive to GSDMD C1. Quantification was performed using a semi-quantitative analysis of immunoreactive area, and nonparametric statistical tests were applied.

The results showed increased immunoreactivity of NLRP3, caspase-1, GSDMD-C1, and IL-1 β in the brain tissues of infected rats, with variations depending on the time post-infection. GSDMD-C1 was the biomarker that showed the most consistent increase across the different time points evaluated. Correlation analysis revealed moderate associations between NLRP3 and GSDMD-C1, as well as between caspase-1 and IL-1 β . Immunofluorescence showed expression of GSDMD-C1 in neurons and astrocytes.

Taken together, these findings suggest that neurocysticercosis induces the activation of key components of the pyroptotic pathway in brain tissue, contributing to the inflammatory response associated with this disease.

Keywords: Neurocysticercosis, pyroptosis, inflammasome NLRP3, cleaved gasdermin D, caspase-1, interleukin 1 β

I. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad causada por la forma larval del parásito *Taenia solium*, cuando esta infecta al sistema nervioso central (SNC) (Ndimubanzi et al., 2010). *T. solium* es la causa del 30% de los casos de epilepsia tardía en lugares donde se crían a los cerdos libres en el campo sin el uso de corrales y están cerca de las viviendas de las personas (Garcia, 2018). En determinadas comunidades endémicas hay una relación entre la neurocisticercosis y la epilepsia que puede llegar hasta el 70% (Garcia, 2018; Ndimubanzi et al., 2010), constituyendo un problema de salud pública reconocido a nivel mundial (Guekht et al., 2021). La NCC causa una alta morbilidad en estas zonas endémicas afectando la economía familiar y local (Fukuda et al., 2013; Srinivas et al., 1980). Esta enfermedad ocurre cuando los seres humanos ingieren alimentos o agua contaminada con materia fecal que contienen a los huevos de *T. solium*, estos eclosionan a nivel intestinal y las oncósferas atraviesan la mucosa intestinal y migran a través del torrente sanguíneo localizándose en diferentes partes del cuerpo y cuando se localiza a nivel del sistema nervioso central causa la neurocisticercosis; una vez localizado en el SNC puede permanecer meses o años sin que el individuo presente ningún síntoma clínico. Las convulsiones son las manifestaciones clínicas predominante y el tratamiento puede exacerbar la respuesta inflamatoria, pueden presentar hipertensión intracraneal que puede ser potencialmente mortal (Garcia HH, Nash TE, 2014; Madrazo I, et al., 2005). En algunos casos se han reportado déficits cognitivos en un porcentaje significativo de pacientes con NCC (Wallin et al., 2012).

El tratamiento de la NCC con drogas antihelmínticas exacerba el cuadro clínico, el cual se asocia al daño del parásito e incremento de la respuesta inflamatoria (Garcia HH, Nash TE, 2014). Sin embargo, no se conoce si, posterior al tratamiento antiparasitario, la exacerbación de la respuesta inflamatoria podría favorecer el daño en células neuronales y gliales que rodean al parásito.

La neurocisticercosis induce una respuesta inflamatoria leve a moderada alrededor del cisticerco, caracterizada por infiltrado de células inmunes y liberación de mediadores inflamatorios (Carmen-Orozco et al., 2019; Hamamoto Filho et al., 2021; Mejia et al., 2020; Verastegui et al., 2015). Considerando que la inflamación del SNC se encuentra estrechamente relacionada con mecanismos de muerte celular programada, resulta relevante investigar si procesos inflamatorios específicos, como la piroptosis participan en la patogénesis de la NCC (Jia et al., 2019; Pezuk, 2019; H. H. Shen et al., 2018).

Muchas enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central están estrechamente relacionadas con muerte celular por piroptosis que es una forma inflamatoria de muerte celular programada y desempeña un papel protector en la defensa del hospedero durante la infección (Jia et al., 2019; Pezuk, 2019; H. H. Shen et al., 2018; Song et al., 2017). Este tipo de muerte celular se caracteriza por la inflamación celular, lisis y liberación de contenido citoplasmático. Sin embargo, el incremento de la piroptosis puede ser perjudicial para los tejidos y células normales. Para evitar daños excesivos en el organismo huésped, especialmente sensibles como el SNC, la piroptosis se encuentra estrictamente regulada mediante la activación controlada de caspasas inflamatorias asociadas a los inflamasomas. Esta regulación ocurre a través de dos vías principales: la vía canónica, dependiente de caspasa-1, y la

vía no canónica, mediada por caspasas inflamatorias. Ambas vías culminan con la activación de gasdermina D, la liberación de citocinas proinflamatorias y la ejecución de la muerte celular inflamatoria (Broz & Dixit, 2016) (Kayagaki et al., 2013). Por tal motivo, en este estudio se evaluó la inmunoreactividad de proteínas relacionadas a la piroptosis como NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), caspasa-1, la forma clivada de gasdermina D (GSDMD-C1) e interleucina1 β (IL-1 β) en tejidos de cerebro de ratas con cisticercosis, en comparación con tejidos de cerebro de ratas sanas. Además, se evaluó mediante inmunofluorescencia qué células son inmunorreactivas a estos biomarcadores.

1.1 Planteamiento del problema

La neurocisticercosis, a pesar de constituir un importante problema de salud pública en países endémicos, presenta aspectos de su patogénesis que aún no han sido completamente esclarecidos, particularmente aquellos relacionados con el déficit cognitivo y a los cuadros de epilepsia. Se trata de una enfermedad crónica, cuya evolución clínica puede requerir meses o incluso años antes de la manifestación de los primeros síntomas neurológicos evidentes. El empleo de un modelo animal con NCC, como la rata, ha permitido estudiar de manera controlada los cambios inflamatorios y neuropatológicos asociados a la enfermedad (Verastegui et al., 2015). En estudios utilizando este modelo animal se ha encontrado daño neuronal caracterizado por hinchazón axonal y formación de esferoides, lo que puede conducir a una muerte neuronal (Mejia et al., 2020). Sin embargo, los mecanismos de específicos de muerte celular que contribuyen a este daño cerebral aún no están completamente definidos.

Entre los distintos tipos de muerte celular programada, la piroptosis ha emergido como un mecanismo clave en la amplificación de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central mediado por la activación del inflamasoma NLRP3, caspasa-1 y GSDMD, los cuales promueven la liberación de citocinas pro inflamatorias como IL-1 β e IL-18 (Frank & Vince, 2019).

Por esta razón, resulta relevante investigar si la neurocisticercosis induce muerte celular por piroptosis en el tejido cerebral. Hasta el momento, no existen estudios que evalúen de manera específica la participación de este mecanismo en la patogénesis de la NCC, a pesar de que la piroptosis ha sido ampliamente implicada en diversas enfermedades del sistema nervioso central como la encefalopatía relacionada a sepsis (Fu et al., 2019), en la encefalopatía hipóxico-isquémica neonatal (Lv et al., 2019) la enfermedad de Parkinson (Wang et al., 2019), la esclerosis múltiple (McKenzie et al., 2018), la enfermedad del Alzheimer (Tan et al., 2014), y las lesiones cerebrales causadas por aneurisma (Yuan et al., 2020). Esta evidencia sugiere que la piroptosis podría desempeñar un papel relevante también en la NCC, contribuyendo al daño neuronal y a la respuesta inflamatoria observada en esta enfermedad.

Pregunta de investigación

¿Existe muerte celular programada por piroptosis en tejidos de cerebro de ratas con NCC evidenciado por una alta inmunorreactividad de los biomarcadores NLRP3, caspasa-1, GSDMD e IL-1 β ?

1.2 Justificación del estudio

Las manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis pueden variar desde una infección completamente asintomática hasta una enfermedad grave e incluso mortal. La severidad del cuadro clínico depende de múltiples factores, como el número, tamaño, viabilidad y localización de los cisticercos, así como de la intensidad de la respuesta inmunitaria del huésped (Garcia HH, Nash TE, 2014). En las zonas endémicas, la neurocisticercosis puede imitar diversos trastornos neurológicos, lo que dificulta su diagnóstico clínico y manejo oportuno (Garcia & Brutto, 2005). Aunque las convulsiones asociadas a la neurocisticercosis parenquimatosa suelen responder favorablemente al tratamiento con fármacos antiepilépticos, los cisticercos viables pueden persistir durante años o incluso décadas, generando síntomas neurológicos intermitentes y daño cerebral progresivo. Además, se ha descrito que el tratamiento antihelmíntico, si bien es fundamental para eliminar al parásito, puede inducir una respuesta inflamatoria exacerbada, particularmente en las fases iniciales, contribuyendo al agravamiento transitorio de los síntomas neurológicos (Garcia HH, Nash TE, 2014).

En ese contexto, resulta necesario profundizar en los mecanismos patogénicos responsables del daño cerebral y la respuesta inflamatoria en la NCC, con el fin de comprender de manera más integral la evolución clínica de la enfermedad e identificar posibles blancos terapéuticos. Un conocimiento más profundo de estos mecanismos permitiría no solo ampliar las opciones terapéuticas disponibles, sino también favorecer

el desarrollo de estrategias orientadas a modular la inflamación y prevenir el daño neuronal.

Por ello, el presente trabajo se justifica en la evaluación si la neurocisticercosis induce muerte celular por piroptosis en el tejido cerebral, evidenciada a través de la inmunorreactividad de biomarcadores específicos. Las vías piroptóticas representan importantes blancos farmacológicos y han demostrado desempeñar un papel fundamental en diversas enfermedades neuroinflamatorias como la encefalopatía relacionada a sepsis (Wu et al., 2020), la enfermedad de Alzheimer (Flores et al., 2018) y la enfermedad de Parkinson (Wang et al., 2019).

Considerando la intensa respuesta inflamatoria que caracteriza a la NCC, el estudio de la piroptosis como posible mecanismo contribuyente al daño cerebral resulta relevante desde el punto de vista científico y clínico.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis NLRP3, Caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β en tejidos de cerebro de rata con NCC, en comparación con los tejidos de cerebros de ratas sanas.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar, mediante inmunohistoquímica, la inmunorreactividad de los biomarcadores asociados a la activación de la piroptosis, NLRP3 y caspasa-1, en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis.

2. Evaluar, mediante inmunohistoquímica, la inmunorreactividad de los biomarcadores asociados a la fase efectora de la piroptosis, GSDMD-C1 e IL-1 β , en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis.
3. Identificar, mediante inmunofluorescencia la población celular inmunorreactiva a GSDMD-C1 en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis.
4. Determinar la correlación entre los porcentajes de inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis.

III. HIPÓTESIS

La infección por NCC induce muerte celular por piroptosis evidenciado por el incremento de la inmunorreactividad de los biomarcadores NLRP3, Caspasa-1, GSDMD e IL- 1 β .

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Neurocisticercosis

Taenia solium es el agente causal de la neurocisticercosis y posee un ciclo de vida que involucra a dos huéspedes: un huésped definitivo que alberga al parásito adulto y un huésped intermediario, que alberga al estadio larval o cisticerco. El ser humano es el único huésped definitivo y adquiere la teniasis al ingerir carne de cerdo mal cocida que contienen cisticercos viables. El cerdo actúa como huésped intermediario natural y se infecta al ingerir huevos del parásito presentes en el ambiente, eliminados en las heces del huésped definitivo (Mahanty et al., 2010). En el ser humano, la ingestión accidental

de huevos de *T. solium*, generalmente asociada a deficiencias higiénicas o al consumo de alimentos contaminados, da lugar al desarrollo de cisticercos en distintos tejidos, principalmente en el sistema nervioso central, originando la neurocisticercosis (Garcia HH, Nash TE, 2014)

En una etapa inicial la infección por NCC suele ser asintomática ya que el parásito logra evadir la respuesta inmunitaria del huésped y mantener un equilibrio entre mecanismos proinflamatorios y antiinflamatorio. Sin embargo, dependiendo de la localización, el número y la viabilidad de los cisticercos, pueden manifestarse signos clínicos como dolor de cabeza, hipertensión intracraneal, déficit cognitivo y epilepsia. Este equilibrio se rompe como consecuencia de la degeneración del parásito o por el efecto del tratamiento antihelmíntico, lo que exacerba la respuesta inflamatoria y los síntomas clínicos (Del Brutto & García, 2012; Garcia HH, Nash TE, 2014).

Entre las características histopatológicas más relevantes de la NCC se encuentra la formación de tejido fibrótico alrededor del quiste, el cambio espongiótico del parénquima cerebral, la gliosis y la angiogénesis, asociados a una alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Los cisticercos en degeneración inducen una respuesta inflamatoria caracterizada por infiltrado de macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T gama delta, eosinófilos y aumento del grosor de la capa fibrótica. (Mejia et al., 2020; Verastegui et al., 2015).

Estos procesos inflamatorios, altamente dependientes del estado evolutivo del cisticerco y de la respuesta inmunitaria del huésped, sustentan la variabilidad clínica de la enfermedad.

Asimismo, la inflamación perilesional observada en la NCC respalda la necesidad de estudiar mecanismos de muerte celular regulada, como la piroptosis, que podrían contribuir al daño cerebral asociado a esta patología.

4.2 Piroptosis

La piroptosis es una forma de muerte celular inflamatoria caracterizada por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y la liberación de mediadores proinflamatorios. Este proceso es inducido por la activación de complejos inflamatorios como los inflamasomas, especialmente aquellos que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs). La activación del inflamasoma y la posterior maduración de caspasas inflamatorias, que culmina en la escisión de gasdermina, constituyen pasos esenciales de esta vía, tal como lo describen revisiones recientes que han actualizado la comprensión molecular del proceso y su relevancia en enfermedades inflamatorias del SNC (Y. Liu et al., 2024).

La función principal de la piroptosis es eliminar células infectadas o dañadas, así como alertar al sistema inmunitario para contener infecciones o situaciones de estrés celular. Aunque este mecanismo cumple un rol protector, su activación exacerbada puede generar inflamación patológica, particularmente en tejidos altamente sensibles como el sistema nervioso central. (Bertheloot et al., 2021).

La piroptosis es un tipo de muerte celular regulada y lítica que, si bien cumple funciones fisiológicas, puede contribuir al daño tisular cuando se activa de manera descontrolada en el sistema nervioso central (Coutinho-Budd & Broihier, 2020). Aunque comparte ciertas características con la apoptosis, como daño al ADN y

condensación de cromatina (Fadeel & Orrenius, 2005; Kurokawa & Kornbluth, 2009), ambos procesos se diferencian claramente en la ruptura final de membrana plasmática y el marcado carácter inflamatorio de la piroptosis.

Dos rutas principales participan en la activación de esta forma de muerte celular. La vía canónica dependiente de caspasa-1 e inducida por el inflamasoma NLRP3, lo que conduce a la escisión de la gasdermina D (GSDMD) y al procesamiento de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. Por otro lado, la vía no canónica es dependiente de las caspasas inflamatorias 4, 5 y 11. La comprensión de estas vías se ha enriquecido con estudios recientes que describen niveles adicionales de regulación, particularmente mediante modificaciones postraduccionales como la palmitoilación de NLRP3 y GSDMD, las cuales modulan su activación y localización, ampliando la complejidad de la piroptosis en contextos inflamatorios del sistema nervioso central (N. Zhang et al., 2025).

Durante la piroptosis las células desarrollan un hinchamiento progresivo, formación de burbujas en la membrana plasmática y liberación de su contenido citoplasmático antes de la ruptura de la membrana (Chen et al., 2016). Este proceso se diferencia de la necrosis clásica, ya que los poros formados por GSDMD permiten la lisis celular de manera controlada (Chen et al., 2016). Evidencias recientes muestran que, además de GSDMD, otras gasderminas pueden participar en respuestas inflamatorias dependiendo del tipo celular y el microambiente fisiopatológico (Li & Guo, 2025)

4.2.1 Inflamasoma NLRP3

El inflamasoma NLRP3 es uno de los principales complejos más estudiados y relevantes en el contexto de la piroptosis. Está conformado por un dominio sensor encargado del reconocimiento de señales de peligro, una proteína adaptadora ASC y una pro-caspasa-1 asociada al dominio ejecutor. Ante la presencia de señales de estrés o daño celular principalmente patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), estas estructuras se oligomerizan para formar el complejo inflamasmático, lo que conduce a la activación de caspasa-1 y, subsecuentemente a la maduración de las citocinas proinflamatorias de IL-1 β , IL-18, así como a la activación de GSDMD (Coutinho-Budd & Broihier, 2020).

La activación excesiva del inflamasoma NLRP3 se ha vinculado a múltiples enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo la enfermedad del Alzheimer, la enfermedad del Parkinson, la esclerosis múltiple y los accidentes cerebrovasculares. Su participación en la neuroinflamación ha llevado a considerarlo una diana terapéutica prometedora en diversas patologías neurodegenerativas, debido a su papel central en la amplificación de la respuesta inflamatoria (Chiarini et al., 2024; Holbrook et al., 2021).

4.2.2 *Caspasa-1*

La caspasa-1 es una caspasa inflamatoria clave en la vía canónica de la piroptosis, estrechamente asociada a la activación del inflamasoma NLRP3. Una vez activada, la caspasa-1 cumple una doble función: por un lado, escinde las formas precursoras de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 para generar sus formas maduras y biológicamente activas; por otro, cliva la gasdermina D, dando lugar a su fragmento N-terminal encargado de la formación de poros en la membrana plasmática y de la

ejecución de la muerte celular piroptótica (Broz & Dixit, 2016; Jorgensen et al., 2016). En el sistema nervioso central, la activación de caspasa-1 ha sido asociada a procesos de neuroinflamación y daño tisular en diversas patologías, consolidando su papel como un mediador central entre inflamación y muerte celular programada (Broz & Dixit, 2016; Frank & Vince, 2019).

4.2.3 Gasdermina D y su relevancia en el daño cerebral

La gasdermina D (GSDMD) es una proteína efectora central de la piroptosis. Durante este proceso la GSDMD es escindida por caspasas inflamatorias, particularmente la caspasa-1, dando lugar a su fragmento N-terminal clivado conocido como gasdermina D clivada (GSDMD-C1). Este fragmento activo se inserta en la membrana plasmática formando poros que permiten la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18, la lisis celular y la posterior liberación de contenido citoplasmático. Estas características han sido descritas como esenciales para la ejecución de la muerte celular piroptótica, y la detección de GSDMD-C1 es considerada un marcador clave de la activación de esta vía (Chen et al., 2016; Kayagaki et al., 2015).

En el sistema nervioso central, la activación de GSDMD y particularmente la generación de su forma clivada se ha observado en diversos tipos celulares, incluyendo microglía, oligodendrocitos, células endoteliales. La activación sostenida de GSDMD-C1 contribuye al daño tisular, la amplificación de la respuesta inflamatoria y la progresión de enfermedades cerebrovasculares y neurodegenerativas, lo que ha impulsado la propuesta de la inhibición de GSDMD como estrategia terapéutica para reducir la inflamación y proteger el tejido cerebral (Frank & Vince, 2019).

Dado que la activación de GSDMD constituye el paso final de la vía piroptótica, su escisión depende directamente de la activación previa de complejos inflamatorios como el inflamasoma NLRP3 y de la acción de caspasas inflamatorias. En este sentido, comprender los mecanismos de activación del inflamasoma resulta fundamental para interpretar la ejecución de la piroptosis en el sistema nervioso central (Broz & Dixit, 2016; Kayagaki et al., 2015).

4.2.4 *Interleucina-1 β (IL-1 β)*

La interleucina-1 β (IL-1 β) es una de las citocinas proinflamatorias más relevantes en los procesos de neuroinflamación. Su síntesis ocurre inicialmente como una proteína precursora inactiva (pro-IL-1 β), la cual es procesada por la caspasa-1 tras la activación del inflamasoma, generando la forma madura y secretada. La liberación de IL-1 β es facilitada por los poros formados por la gasdermina D durante la piroptosis, lo que vincula estrechamente a esta citocina con la ejecución del proceso piroptótico (Broz & Dixit, 2016). En el sistema nervioso central, IL-1 β participa en la activación glial, el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la amplificación de la respuesta inflamatoria, procesos que han sido implicados en epilepsia, daño neuronal y deterioro cognitivo (Heneka et al., 2014, 2015; Vezzani et al., 2013). Estos mecanismos resultan particularmente relevantes en el contexto de enfermedades parasitarias del SNC, como la neurocisticercosis (Garcia HH, Nash TE, 2014).

V. METODOLOGÍA

5.1 Consideraciones éticas

En la presente investigación se utilizaron tejidos cerebrales provenientes de animales empleados en un estudio previamente aprobado por el Comité Institucional de Ética en

el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, titulado “Evaluación de la respuesta inflamatoria y cambios neuropatológicos en cerebros de ratas con neurocisticercosis a diferentes tiempos postratamiento” con código de aprobación ética SIDISI: 206876.

Asimismo, el presente trabajo cuenta con la aprobación de Comité Institucional de Ética, bajo el código SIDISI: 212224, y no implicó la realización de procedimientos experimentales adicionales sobre los animales, limitándose exclusivamente al análisis de muestras previamente obtenidas y procesadas.

5.2 Lugar de estudio

El proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia ubicado en la ciudad de Lima, Perú.

5.3 Diseño experimental

En estudios previos del grupo de investigación, se estableció a la rata como modelo animal viable para el estudio de la neurocisticercosis (Verastegui et al., 2015). En el presente trabajo se utilizaron tejidos cerebrales previamente obtenidos de ratas con neurocisticercosis tratadas y no tratadas con fármacos antihelmínticos, así como de ratas sanas utilizadas como grupo control.

El estudio tuvo como objetivo evaluar la inmunorreactividad de biomarcadores asociados a la piroptosis, incluyendo NLRP3, caspasa-1, gasdermina D e IL-1 β , en secciones histológicas de cerebro. Para ello, las muestras fueron procesadas mediante técnicas de inmunohistoquímica, con el fin de observar y cuantificar la inmunoreactividad de dichos marcadores alrededor del cisticerco y mediante

inmunofluorescencia, para identificar la población celular inmunorreactiva a gasdermina D, incluyendo neuronas, microglías y astrocitos.

5.4 Obtención de muestras

Se utilizaron cortes histológicos de tejido cerebral de ratas con NCC y de ratas sanas, previamente fijados en incluidos en parafina, provenientes del estudio titulado “Evaluación de la respuesta inflamatoria y cambios neuropatológicos en cerebros de ratas con neurocisticercosis a diferentes tiempos postratamiento”.

En dicho estudio, ratas Holtzman, de 12 a 15 días de nacidas fueron infectadas experimentalmente mediante inoculación intracraneal con 120 oncósferas activadas de *T. solium* suspendidas en PBS, de acuerdo con la metodología descrita por Verástegui et al. (2015). El tamaño del grupo experimental se calculó considerando un 80% de eficacia en el desarrollo de la infección experimental, utilizándose ratas sanas no infectadas como grupo control que fueron inoculadas intracranealmente con PBS.

Se muestra en la Tabla 1 la distribución del número de animales utilizados por grupo experimental.

Tabla 1. Número de animales por grupo experimental

Grupos experimentales	Número de Animales
Grupo control	34
Ratas con NCC no tratadas	66
Ratas con NCC tratadas con Praziquantel + Oxfendazole	118
TOTAL	218

Las ratas experimentalmente infectadas fueron tratadas con drogas antiparasitarias a los 6 meses de edad. Del total de 184 ratas infectadas, 118 recibieron tratamiento

antiparasitario con oxfendazole (75 mg/kg/día) y praziquantel (100 mg/kg/día) por vía oral, durante 5 días consecutivos distribuidos en dos dosis diarias. El grupo de ratas infectadas no tratadas recibió únicamente el vehículo (0.5% de carboximetilcelulosa con Tween-80 al 10%), también por vía oral.

Los animales fueron sacrificadas a diferentes tiempos postratamiento: 48 horas pos-administración de la primera dosis, al quinto día de iniciado el tratamiento y luego de 2, 4, 8, y 12 meses postratamiento. Los cerebros obtenidos fueron extraídos, fijados, deshidratados e incluidos en parafina. A partir de este material se obtuvieron cortes histológicos de 4µm de espesor, que fueron utilizados para los análisis posteriores.

5.5 Selección de muestras

Para el presente estudio se utilizaron tejidos de cerebro de rata fijados en parafina, agrupados en tres grupos experimentales:

- Ratas con NCC no tratadas.
- Ratas con NCC tratadas con drogas antiparasitarias (oxfendazole 75 mg/kg + 100 mg/kg de praziquantel).
- Ratas sanas.

Inicialmente, los tejidos fueron teñidos con hematoxilina y eosina para la selección de las muestras que serían incluidas en el análisis. Los criterios de inclusión fueron: i) presencia de quiste parenquimales, y ii) que los cerebros contengan un máximo de 4 quistes. De acuerdo con estos criterios, se seleccionaron un total de 55 muestras de tejido cerebral distribuidas en 5 tiempos postratamiento: 48 horas (n=14), 2 meses

(n=11), 4 meses (n=9), 8 meses (n=11) y 12 meses (n=10), según se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Número de animales por cada grupo experimental y tiempo de sacrificio postratamiento

Tiempo post tratamiento	Cerebro de ratas infectadas no tratadas	Cerebro de ratas infectadas tratadas	Cerebro de ratas no infectadas (control)
48 horas	5	5	4
2 meses	3	5	3
4 meses	4	2	3
8 meses	5	2	4
12 meses	3	3	4
Total	20	17	18

5.6 Muestras utilizadas para el análisis del presente estudio

Del total de muestras seleccionadas, para el análisis central del presente estudio se utilizaron únicamente aquellas correspondientes a tejidos con quistes viables.

Las muestras fueron organizadas según tiempo postratamiento y la condición de infección. Inicialmente, se realizó una comparación exploratoria de la inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis (NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β) entre tejidos provenientes de ratas tratadas y no tratadas con drogas antiparasitarias. Esta comparación se limitó a los biomarcadores evaluados en el presente estudio y no evidenció diferencias entre ambos grupos.

En función a estos resultados y considerando que el objetivo principal del estudio fue evaluar la activación de la piroptosis asociada a la infección cerebral, los análisis centrales se realizaron agrupando todos los tejidos con quistes viables en un único

grupo de tejidos infectados independientemente de la condición del tratamiento. Para este análisis, el tiempo postratamiento fue transformado a tiempo posinfección (Tabla 3). Este grupo fue comparado con tejidos cerebrales de ratas no infectadas utilizadas como grupo control. Se analizó un solo quiste parenquimal por cerebro de animal infectado (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de las muestras de tejido cerebral infectadas y no infectadas utilizadas para el análisis de piroptosis

Tiempo posinfección	Tiempo postratamiento	Tejido cerebral infectado con quistes viables (n)	Tejido cerebral no infectado (control)
6 meses	48 horas	6	4
8 meses	2 meses	6	3
10 meses	4 meses	2	3
14 meses	8 meses	7	4
18 meses	12 meses	6	4
Total		27	18

Distribución de las muestras: las muestras infectadas corresponden exclusivamente a tejidos cerebrales con quistes viables que cumplieron los criterios de inclusión. Este grupo incluye tejidos provenientes de ratas tratadas y no tratadas con drogas antiparasitarias, las cuales fueron agrupadas para el análisis central del estudio.

5.7 Técnicas y procedimientos

5.7.1 Inmunohistoquímica

Las secciones de tejidos cerebral fijadas en parafina se desparafinaron y rehidrataron mediante incubación en estufa a 60°C, seguida de pases consecutivos en xilol y una batería de alcoholes en orden decreciente de concentración.

La recuperación antigénica se realizó empleando condiciones específicas según el biomarcador evaluado. Para NLRP3, las secciones se sometieron a recuperación

antigénica mediante ebullición en microondas en solución de citrato a 10mM durante 10 minutos. El bloqueo de peroxidasas endógenas se realizó mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol.

En el caso de caspasa-1, la recuperación antigénica se efectuó colocando las secciones en un rack dentro de un beaker con solución de citrato 10mM llevándolas a ebullición durante 30 minutos, y el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena se realizó igualmente con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol.

Para la detección de gasdermina D se utilizó un anticuerpo específico dirigido contra su fragmento clivado N-terminal (GSDMD-C1), el cual es generado tras la activación de caspasas inflamatorias y constituye un marcador de la activación de la vía piroptótica, donde la recuperación antigénica se realizó utilizando solución de citrato sin Tween-20, a diferencia de los demás biomarcadores, en los cuales se utilizó Tween 20 al 0.05% en los buffers correspondientes. En este caso las secciones se incubaron en coplin con citrato 10mM, los cuales se pusieron en una olla con agua para su ebullición durante 30 min. El bloqueo de peroxidasas endógenas se realizó con peróxido de hidrógeno al 3% preparado en PBS 1X.

En el caso de IL-1 β , el desenmascaramiento antigénico se llevó a cabo utilizando citrato 10 mM, sometiendo las secciones a ebullición durante 10 minutos en el microondas, seguido de la inhibición de la peroxidasa endógena mediante incubación con peróxido de hidrógeno al 3% preparado en PBS 1X.

Posteriormente se realizaron lavados con PBS 1X y el bloqueo de uniones inespecíficas se llevó a cabo utilizando albúmina sérica bovina (BSA), suero de caballo y suero de rata. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos

primarios dirigidos contra NLRP3 (1:800), caspasa-1 (1:100), GSDMDC1 (1:400) e IL-1 β (1:300) (Las concentraciones de los anticuerpos se muestran en el Anexo 1).

Tras los lavados correspondientes, las láminas se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa. Finalmente, los núcleos celulares se contrastaron con hematoxilina, las secciones se deshidrataron y se montaron utilizando solución de Entellan para su posterior análisis. (Los protocolos se detallan en los Anexos 2 al 5).

5.7.2 Inmunofluorescencia

Para identificar la principal población celular responsable inmunorreactiva a GSDMD-C1, en tejidos de cerebros de ratas con NCC se realizó inmunofluorescencia de doble marcaje mediante la colocación de este biomarcador con los marcadores de neuronas (NeuN), astrocitos (GFAP) y microglías (Iba1) siguiendo un protocolo donde las secciones se desparafinaron y rehidrataron como para la inmunohistoquímica. La recuperación de antígenos se llevó a cabo hirviendo las secciones en citrato de sodio 10mM durante 10 minutos en coplins. Posteriormente, se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de PBS suplementada con 10% de suero de burro y un 10% de suero de caballo diluido en PBS para bloquear las reacciones inespecíficas. Las secciones se incubaron durante la noche con anticuerpos primarios anti-GSDMD (1:300) y los respectivos marcadores celulares. Tras los lavados, se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluoróforos. Por último, las secciones se montaron con ProLong Gold Antifade Mountant con DAPI (Life Technologies, EE.UU.).

Las imágenes digitales se obtuvieron utilizando un microscopio confocal LSM880 (Zeiss, Alemania) mediante el procesamiento en modo rápido de escaneo Airy (Zen black, Zeiss). Posteriormente las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ, donde los canales de fluorescencia fueron separados y se asignaron colores distintos a cada uno con fines de visualización y análisis de colocalización; por ello, los colores mostrados no corresponden necesariamente a la emisión original de los fluoróforos. (Mas detalle en el Anexo 7)

5.8 Obtención de datos

La obtención de imágenes se realizó en el microscopio Zeiss AxioLab con el objetivo 20X y con la cámara Basler Ac2040 incorporado a un ordenador con el Software Manual WSI.

El análisis de imágenes se realizó con el software ImageJ con las siguientes consideraciones:

- ✓ Se definió una región de interés (ROI) equivalente a un área continua de hasta 400 μm alrededor del quiste y un área paralela en los cerebros control, los cuales se procedieron a deconvolucionar con la herramienta “color deconvolution” y el criterio HE-DAB, que permite la separación de los canales azul, verde y marrón. A partir de este punto, se trabajó únicamente con la imagen de color marrón al cual se le ajustó el valor límite “threshold” que se usó de manera uniforme para todas las imágenes y marcadores. Finalmente, las imágenes fueron convertidas a formato binario, del cual se obtuvo el porcentaje de área que ocupan los pixeles negros (área reactiva) para los 4 biomarcadores.

- ✓ El análisis se realizó en ciego respecto al tiempo posinfección (meses), de modo que se desconocía la asignación temporal de las muestras. Sin embargo, el cegamiento completo no fue posible debido a las diferencias morfológicas evidentes entre tejidos con presencia de cisticercos y tejidos control. Para minimizar posibles sesgos, todo el análisis se llevó a cabo bajo parámetros estandarizados y utilizando un umbral uniforme en todas las imágenes.

5.9 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se usó el software STATA19 y se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. para comparar y determinar si existe diferencias estadísticamente significativo en el área inmunorreactiva para los marcadores de piroptosis de NLRP3, caspasa-1, GSDMD e IL-1 β en el tejido cerebral de ratas de los diferentes grupos: ratas infectadas y ratas no infectadas. Los resultados se expresaron como mediana (Mdn) $\pm$ rangos intercuartílicos (RIC), y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$

Para determinar si existe asociación entre la inmunorreactividad de estos biomarcadores de piroptosis se usó la prueba de correlación de Spearman.

VI. RESULTADOS

6.1 Evaluación exploratoria de la inmunorreactividad de biomarcadores de piroptosis en quistes viables de ratas con neurocisticercosis tratadas y no tratadas.

En una fase inicial del análisis, se evaluó de manera exploratoria la inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis NLRP3, caspasa-1, gasdermina D clivada (GSDMD-C1) e interleucina-1 β (IL-1 β) en tejidos cerebrales con quistes provenientes de ratas tratadas y no tratadas con drogas antiparasitarias. Este análisis preliminar tuvo como finalidad evaluar posibles diferencias asociadas al tratamiento; sin embargo, se evidenciaron que el tratamiento no produjo cambios consistentes entre ambos grupos, con la persistencia de quistes viables tanto en ratas tratadas como no tratadas y un tamaño muestral limitado por grupo y tiempo postratamiento. A continuación, se presentan los resultados correspondientes a esta comparación.

Para NLRP3, se observa que el grupo tratado presenta variaciones a lo largo del tiempo, con un incremento a los 8 meses, mientras que el grupo no tratado mantiene valores relativamente estables con ligeras fluctuaciones. No se evidencian diferencias marcadas entre ambos grupos en todos los tiempos evaluados. (Tabla 4)

Tabla 4. Comparación de la inmunorreactividad de NLRP3 en tejido cerebral de rata con quistes viables de los grupos tratados y no tratados a diferentes tiempos postratamiento

Tiempo de sacrificio postratamiento	Infectado no tratado		Infectado tratado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
48 horas	2.67(4)	1.51-3.18	4.69(2)	4.26-5.10	0.1333
2 meses	4.27(3)	4.10-5.26	1.30(3)	0.25-1.62	0.1000
8 meses	2.27(5)	1.44-3.31	3.62(2)	3.55-5.69	0.3810
12 meses	4.11(3)	1.02-6.11	2.79(3)	0.95-3.16	0.4000

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva de NLRP3 por mm² en tejido cerebral de ratas tratadas y no tratadas, evaluados a diferentes tiempos postratamiento. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, *p < 0.05; **p < 0.01.

Para caspasa-1, ambos grupos presentan niveles bajos en general. El grupo tratado muestra un ligero incremento a los 8 meses, mientras que el grupo no tratado mantiene valores cercanos a cero a lo largo de todos los tiempos evaluados. (Tabla 5)

Tabla 5. Comparación de la inmunorreactividad de Caspasa1 en tejido cerebral de rata con quistes viables de los grupos tratados y no tratados a diferentes tiempos postratamiento

Tiempo de sacrificio postratamiento	Infectado no tratado		Infectado tratado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
48 horas	2.27(4)	0.43-4.15	0.49(2)	0.47-0.52	0.8000
2 meses	0.16(3)	0.11-2.39	0.37(3)	0.15-0.41	1.0000
8 meses	0.64(5)	0.26-0.95	3.05(2)	2.72-3.39	0.0952
12 meses	0.49(3)	0.23-0.61	0.28(3)	0.09-4.76	1.0000

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva de caspasa-1(casp1) por mm² en tejido cerebral de ratas tratadas y no tratadas, evaluados a diferentes tiempos postratamiento. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. *p < 0.05; **p < 0.01.

En el caso de GSDMD, el grupo tratado muestra una mayor inmunorreactividad en el tiempo temprano de 48 horas postratamiento, seguida de una disminución a los 2 meses

y fluctuaciones posteriores. Por su parte, el grupo no tratado presenta valores más variables, con un incremento a los 2 meses y una tendencia irregular en los demás periodos. (Tabla 6)

Tabla 6. Comparación de la inmunorreactividad de GSDMD-C1 en tejido cerebral de rata con quistes viables de los grupos tratados y no tratados a diferentes tiempos postratamiento.

Tiempo de sacrificio postratamiento	Infectado no tratado		Infectado tratado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
48 horas	4.81(4)	3.84-5.89	8.83(2)	5.05-12.60	0.5333
2 meses	4.00(3)	2.11-6.23	0.83(3)	0.43-1.92	0.1000
8 meses	1.42(5)	1.36-1.53	3.65(2)	3.54-3.75	0.0952
12 meses	4.09(3)	3.78-8.18	1.09(3)	1.05-1.94	0.1000

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva de GSDMD-C1 por mm² en tejido cerebral de ratas tratadas y no tratadas, evaluados a diferentes tiempos postratamiento. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, *p < 0.05; **p < 0.01.

En cuanto a IL-1 β , el grupo tratado presenta una disminución progresiva desde 48 horas hasta 12 meses. En contraste, el grupo no tratado evidencia un patrón más variable, con un incremento a los 12 meses. (Tabla 7)

Tabla 7. Comparación de la inmunorreactividad de IL-1 β en tejido cerebral de rata con quistes viables de los grupos tratados y no tratados a diferentes tiempos postratamiento

Tiempo de sacrificio postratamiento	Infectado no tratado		Infectado tratado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
48 horas	2.18(4)	2.15-2.35	3.38(2)	2.82-3.94	0.1333
2 meses	1.82(3)	0.24-1.89	1.91(3)	0.82-2.12	0.4000
8 meses	0.76(5)	0.31-2.54	3.54(2)	2.17-4.90	0.5714
12 meses	0.13(3)	0.03-4.17	3.30(3)	0.18-3.51	0.7000

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva de IL-1 β por mm² en tejido cerebral de ratas tratadas y no tratadas, evaluados a diferentes tiempos postratamiento. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, *p < 0.05; **p < 0.01.

En conjunto, las tablas 4 al 7 muestran que los biomarcadores de piroptosis NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β presentan inmunorreactividad en tejidos cerebrales con quistes viables tanto de ratas tratadas como no tratadas. La comparación estadística entre ambos grupos no evidenció diferencias significativas para ninguno de los biomarcadores evaluados en los tiempos analizados. Estos resultados indican que el tratamiento no se asoció con cambios en la inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis evaluados en el presente estudio.

Por esta razón, considerando que el objetivo principal del estudio fue evaluar la activación de la piroptosis asociada a la presencia de la infección cerebral y que no se observaron diferencias significativas en los biomarcadores de piroptosis entre los tejidos con quistes viables provenientes de ratas tratadas y no tratadas, se agruparon únicamente las muestras con quistes viables en un único grupo de tejidos infectados, independientemente de la condición del tratamiento.

6.2 Inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis en tejidos cerebrales infectados y no infectados

Para el análisis central del estudio, los tejidos con quistes provenientes de ratas tratadas y no tratadas fueron agrupados en un único grupo de tejidos infectados, los cuales se compararon con tejidos cerebrales de ratas no infectadas (grupo control). Esta agrupación permitió evaluar de manera más consistente el impacto de la neurocisticercosis sobre la inmunorreactividad de los biomarcadores de piroptosis, disminuyendo la variabilidad asociada a subclasificaciones con bajo tamaño muestral y fortaleciendo la interpretación biológica de los resultados.

6.2.1 Inmunorreactividad del inflammasoma NLRP3

Se evaluó la inmunorreactividad del inflammasoma NLRP3 a una distancia de 400 μm alrededor del quiste mediante la técnica de inmunohistoquímica, tanto en tejidos cerebrales infectados como en tejidos no infectados. En ambos grupos se observó inmunorreactividad para este marcador a lo largo de los tiempos analizados con variaciones dependientes del periodo evaluado. La comparación estadística entre tejidos infectados y no infectados, realizada mediante la prueba de Mann-Whitney U, no evidenció diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos posinfección evaluados. No obstante, de manera descriptiva en algunos periodos los tejidos infectados presentaron valores más elevados de inmunorreactividad en comparación con los no infectados (Tabla 8 y Figura 1). En los tejidos infectados se observa inmunorreactividad perilesional alrededor del cisticerco, mientras que en los tejidos no infectados la inmunorreactividad es menor y de distribución más difusa, en

concordancia con los resultados cuantitativos, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Figura 2).

Tabla 8. Comparación de la inmunorreactividad de NLRP3 en tejido cerebral de ratas infectadas con grupo no infectado a diferentes tiempos posinfección

Tiempo de sacrificio posinfección	Infectado		No infectado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
6 meses	3.18(6)	2.21-4.26	1.31(4)	0.40-2.97	0.1714
8 meses	2.86(6)	1.30-4.27	1.74(3)	1.31-2.35	0.9048
10 meses	0.75(2)	0.54-0.96	1.23(3)	0.26-1.89	0.8000
14 meses	3.31(7)	1.44-5.69	1.48(4)	1.37-1.82	0.1636
18 meses	2.97(6)	1.02-4.11	1.31(4)	1.02-1.57	0.2571

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva de NLRP3 por mm² en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas, evaluados a diferentes tiempos posinfección. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. *p < 0.05; **p < 0.01.

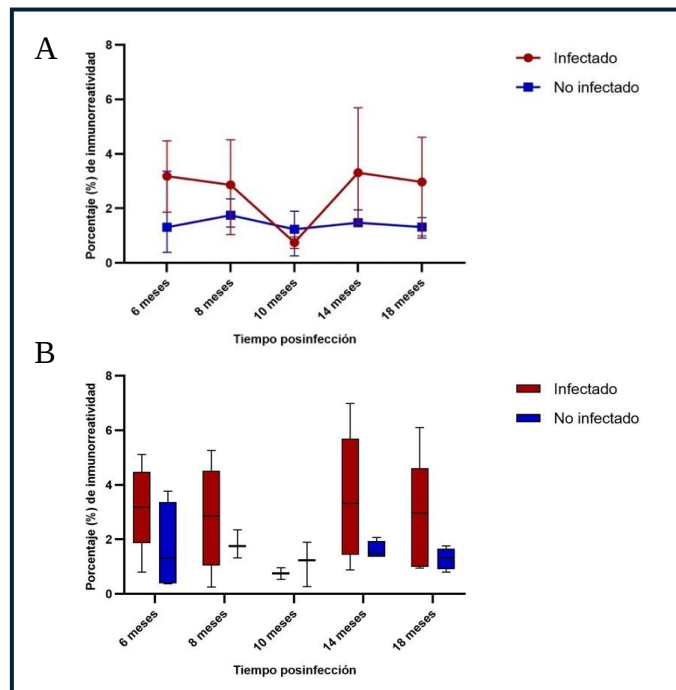


Figura 1 Cuantificación de la inmunorreactividad del inflammasoma NLRP3 por mm² en tejido cerebral alrededor del cisticerco en ratas infectadas y no infectadas. A. Evolución temporal de la inmunorreactividad de NLRP3. B. Distribución de la inmunorreactividad mostrada como gráficos de cajas y bigotes a diferentes tiempos posinfección. (**) p value < 0.01, (*) p value < 0.05. Mediana±RIC.

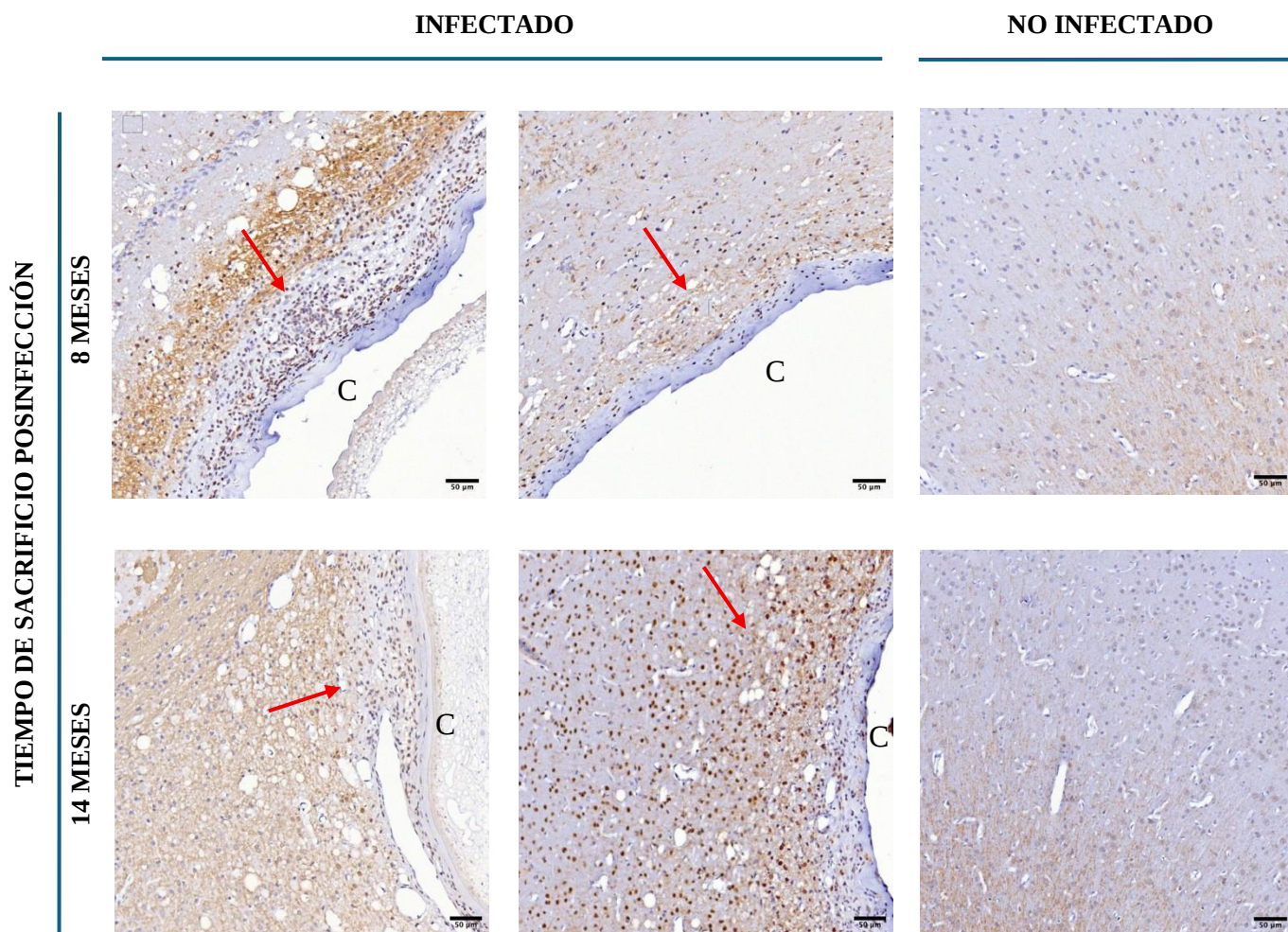


Figura 2 Inmunorreactividad de inflammasoma NLRP3 en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección.

C: cisticerco. Flechas rojas: zona inmunorreactiva alrededor del cisticerco. Barra de escala 50 μ m.

6.2.2 Inmunorreactividad del inflammasoma caspasa-1 (Casp-1)

Se evaluó la inmunorreactividad de caspasa-1 en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis, comparando tejido cerebrales infectados y no infectados a diferentes tiempos posinfección. En conjunto, los resultados evidencian que los tejidos infectados presentan una mayor inmunorreactividad de casp-1 en comparación con los no infectados, lo cual sugiere una mayor activación de esta caspasa en el contexto de infección.

El análisis estadístico, realizado mediante la prueba de Mann-Whitney U, evidenció una diferencia estadísticamente significativa únicamente a los 6 meses posinfección ($p = 0.0095$). En los demás tiempos evaluados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, aunque los valores de inmunorreactividad tendieron a ser mayores en los tejidos infectados (Tabla 9 y Figura 3). Adicionalmente la inmunorreactividad de caspasa-1 presenta una localización perilesional alrededor del cisticerco y mayor intensidad de inmunorreactividad en los tejidos infectados (Figura 4).

Tabla 9. Comparación de la inmunorreactividad de caspasa-1 en tejido cerebral de ratas infectadas con grupo no infectado a diferentes tiempos post tratamiento

Tiempo de sacrificio posinfección	Infectado		No infectado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
6 meses	0.49(6)	0.47-4.06	0.09(4)	0.08-0.16	0.0095**
8 meses	0.26(6)	0.15-0.41	0.11(3)	0.03-1.22	0.5476
10 meses	0.31(2)	0.06-0.55	1.02(3)	0.14-1.86	0.4000
14 meses	0.95(7)	0.26-2.72	0.33(4)	0.28-0.38	0.2303
18 meses	0.39(6)	0.23-0.61	0.09(4)	0.07-0.28	0.1524

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva caspasa-1 por mm² en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas, evaluados a diferentes tiempos posinfección. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

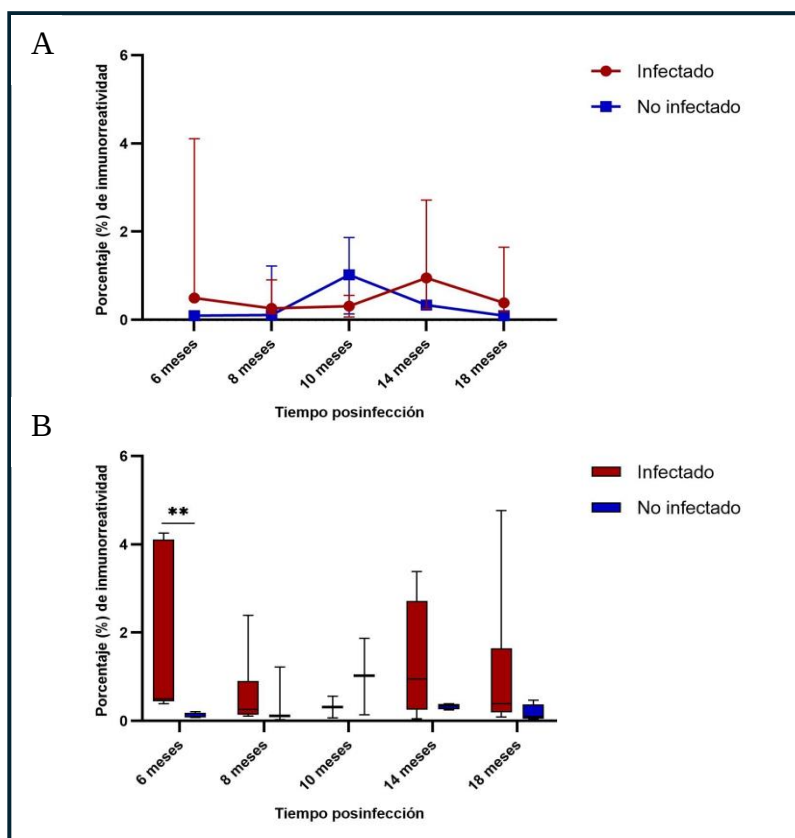


Figura 3 Cuantificación de la inmunorreactividad de Caspasa-1 por mm² en tejido cerebral alrededor del cisticerco en ratas infectadas y no infectadas.

A. Evolución temporal de la inmunorreactividad de Caspasa-1. B. Distribución de la inmunorreactividad mostrada como gráficos de cajas y bigotes a diferentes tiempos posinfección. (**) p value < 0.01, (*) p value < 0.05. Mediana ± RIC.

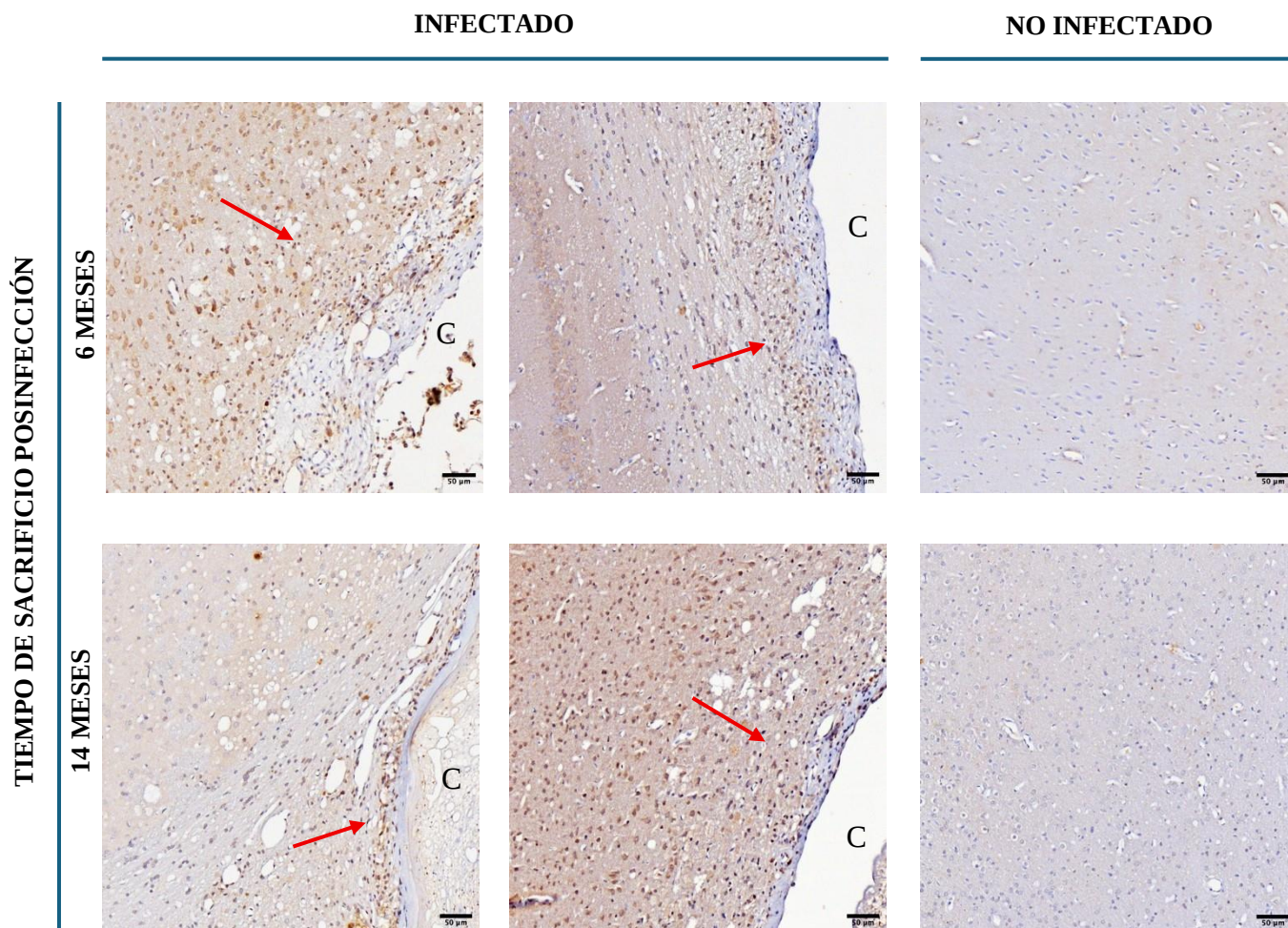


Figura 4 Inmunorreactividad de Caspasa-1 en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección.

C: cisticerco. Flechas rojas: zona inmunorreactiva alrededor del cisticerco. Barra de escala 50 µm.

6.2.3 Inmunorreactividad de gasdermina D clivada (GSDMD-C1)

La inmunorreactividad de GSDMD-C1 fue significativamente mayor en tejidos cerebrales infectados que en los no infectados en la mayoría de los tiempos evaluados. Este incremento fue evidente desde los 6 meses posinfección y se mantuvo en etapas posteriores, aunque no se observaron diferencias significativas a los 10 meses. Estos resultados sugieren una activación sostenida de GSDMD-C1 durante el curso de la neurocisticercosis (Tabla 10 y Figura 5).

El análisis microscópico muestra la localización específica de GSDMD en el tejido cerebral, evidenciando zonas de inmunorreactividad alrededor del cisticerco. En algunas áreas, esta inmunorreactividad presentó un patrón de distribución puntiforme y/o anular, observable tanto en inmunohistoquímica como por inmunofluorescencia, particularmente en regiones perilesionales. Estas imágenes permiten observar el patrón focal de expresión de dicho marcador, coherente con el proceso inflamatorio que caracteriza a la neurocisticercosis y en concordancia con los patrones cuantitativos evidenciados (Figuras 6 y 7)

Estos resultados evidencian que la neurocisticercosis induce una respuesta inflamatoria sostenida que involucra fuertemente la vía piroptótica.

Tabla 10. Inmunorreactividad de la gasdermina D clivada (GSDMD-C1) en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección

Tiempo de sacrificio posinfección	Infectado		No infectado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
6 meses	5.33(6)	4.00-6.18	0.44(4)	0.22-0.61	0.0095**
8 meses	2.01(6)	0.83-4.01	0.15(3)	0.11-1.33	0.0238*
10 meses	2.24(2)	0.29-4.18	0.05(3)	0.02-0.06	0.2000
14 meses	1.53(7)	1.36-3.54	0.01(4)	0.01-0.24	0.0121*
18 meses	2.86(6)	1.09-4.09	0.75(4)	0.49-0.96	0.0381*

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva GSDMD-C1 por mm² en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas, evaluados a diferentes tiempos posinfección. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. *p < 0.05; **p < 0.01.

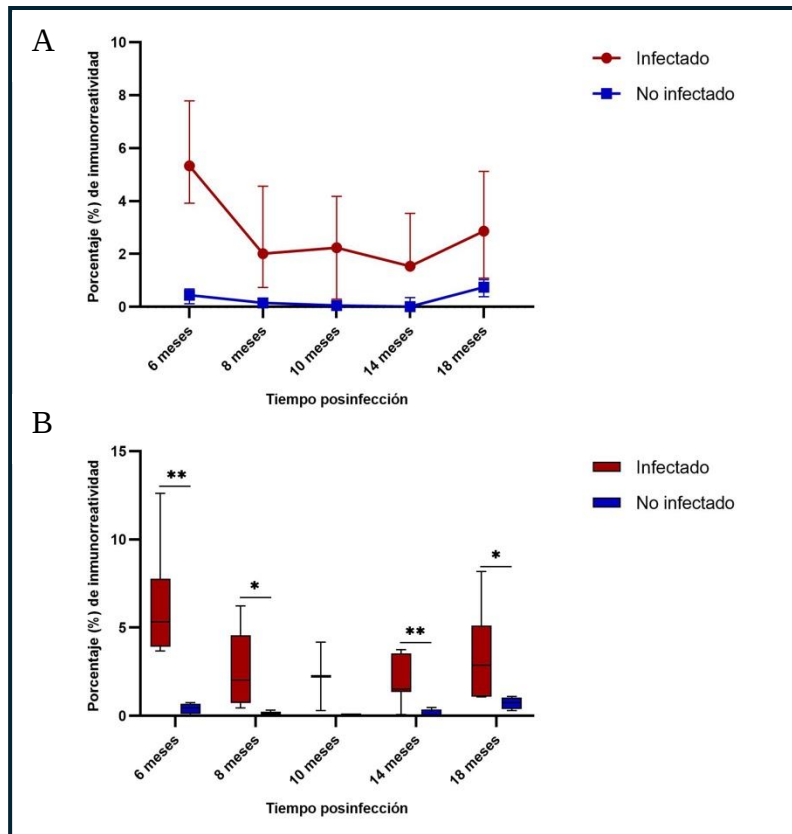


Figura 5 Cuantificación de la inmunorreactividad de GSDMD-C1 por mm² en tejido cerebral alrededor del cisticerco.

A. Evolución temporal de la inmunorreactividad de GSDMD-C1. B. Distribución de la inmunorreactividad mostrada como gráficos de cajas y bigotes a diferentes tiempos posinfección. (**) p value < 0.01, (*) p value < 0.05. Mediana ± RIC.

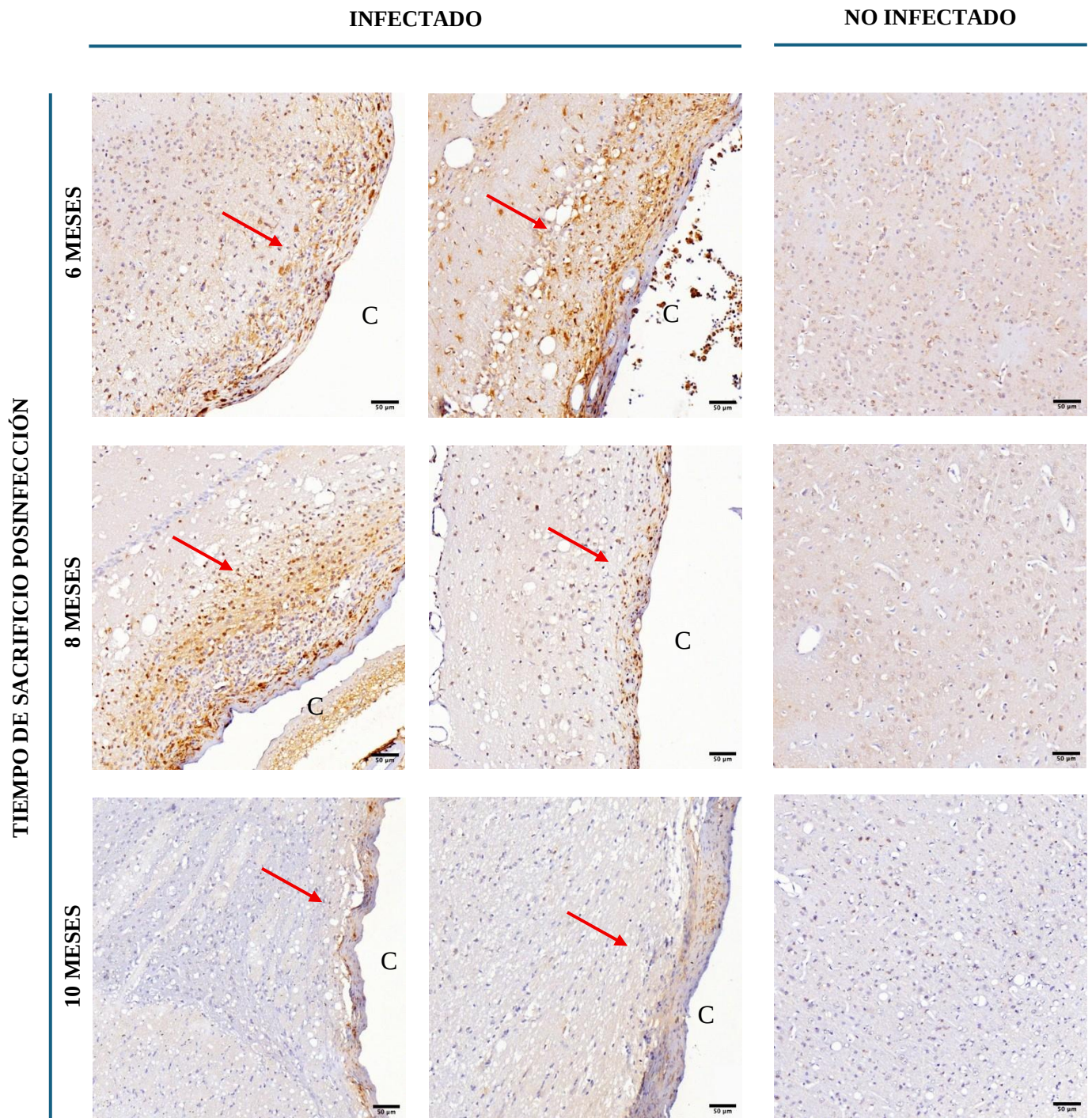


Figura 6 Inmunorreactividad de GSDMD-C1en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección. C: cisticerco. Flechas rojas: zona inmunorreactiva alrededor del cisticerco. Barra de escala 50 μ m.

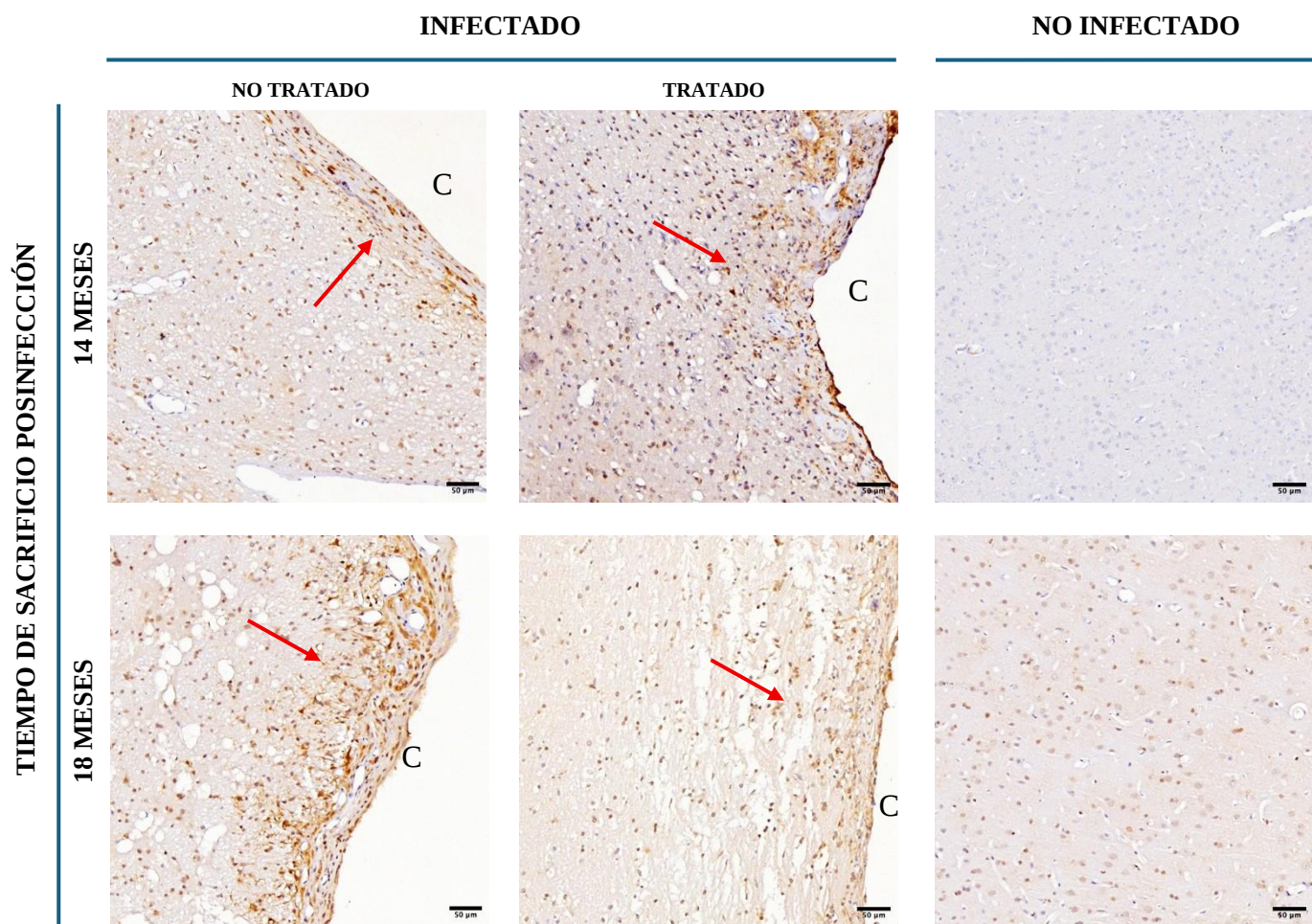


Figura 7 Inmunorreactividad de GSDMD-C1 en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección. C: cisticerco. Flechas rojas: zona inmunorreactiva alrededor del cisticerco. Barra de escala 50 μ m.

6.2.4 Inmunorreactividad de Interleucina 1 β (IL-1 β)

La inmunorreactividad de IL-1 β fue significativamente mayor en los tejidos cerebrales infectados que en los no infectados a los 6, 8 y 14 meses posinfección, mientras que a los 10 y 18 meses no se observaron diferencias entre los grupos. En conjunto estos resultados evidencian un aumento temporal de IL-1 β asociado a la infección, compatible con una respuesta inflamatoria dinámica durante el curso de la neurocisticercosis (Tabla 11 y Figura 8).

La inmunorreactividad de IL-1 β se observa predominantemente en la región perilesional alrededor del cisticerco, con un patrón de distribución focal y mayor intensidad en el tejido alrededor del parásito (Figura 9).

Tabla 11. Comparación de la inmunoreactividad de IL-1 β en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección

Tiempo de sacrificio posinfección	Infectado		No infectado		p_value
	Mdn(n)	RIC	Mdn(n)	RIC	
6 meses	2.35(6)	2.16-2.82	0.02(4)	0.01-0.03	0.0095**
8 meses	1.85(6)	0.82-1.91	0.03(3)	0.03-0.07	0.0238*
10 meses	0.66(2)	0.01-1.32	0.03(3)	0.01-0.06	1.0000
14 meses	2.17(7)	0.31-4.90	0.04(4)	0.02-0.23	0.0242*
18 meses	1.74(6)	0.13-3.51	0.07(4)	0.03-0.16	0.1714

Valores que corresponden al porcentaje de área inmunorreactiva IL-1 β por mm² en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas, evaluados a diferentes tiempos posinfección. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico (RIC). La comparación entre ambos grupos se realizó mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U. *p < 0.05; **p < 0.01.

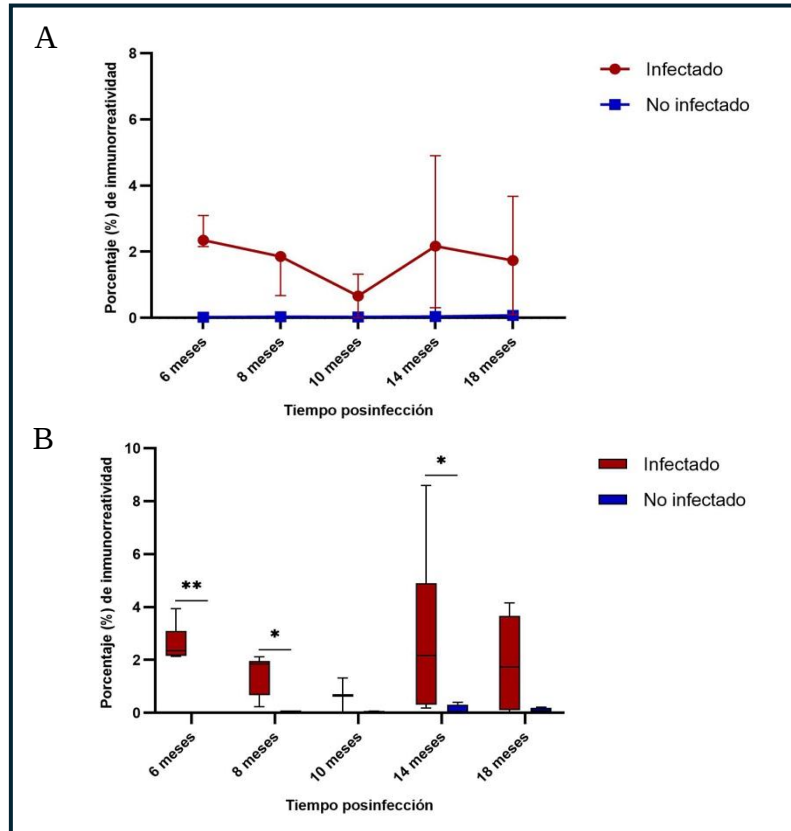


Figura 8 Cuantificación de la inmunorreactividad de IL-1 β por mm² en tejido cerebral alrededor del cisticerco en ratas infectadas y no infectadas.

A. Evolución temporal de la inmunorreactividad de IL-1 β . B. Distribución de la inmunorreactividad mostrada como gráficos de cajas y bigotes a diferentes tiempos posinfección. (**) p value < 0.01, (*) p value < 0.05. Mediana $\pm$.RIC.

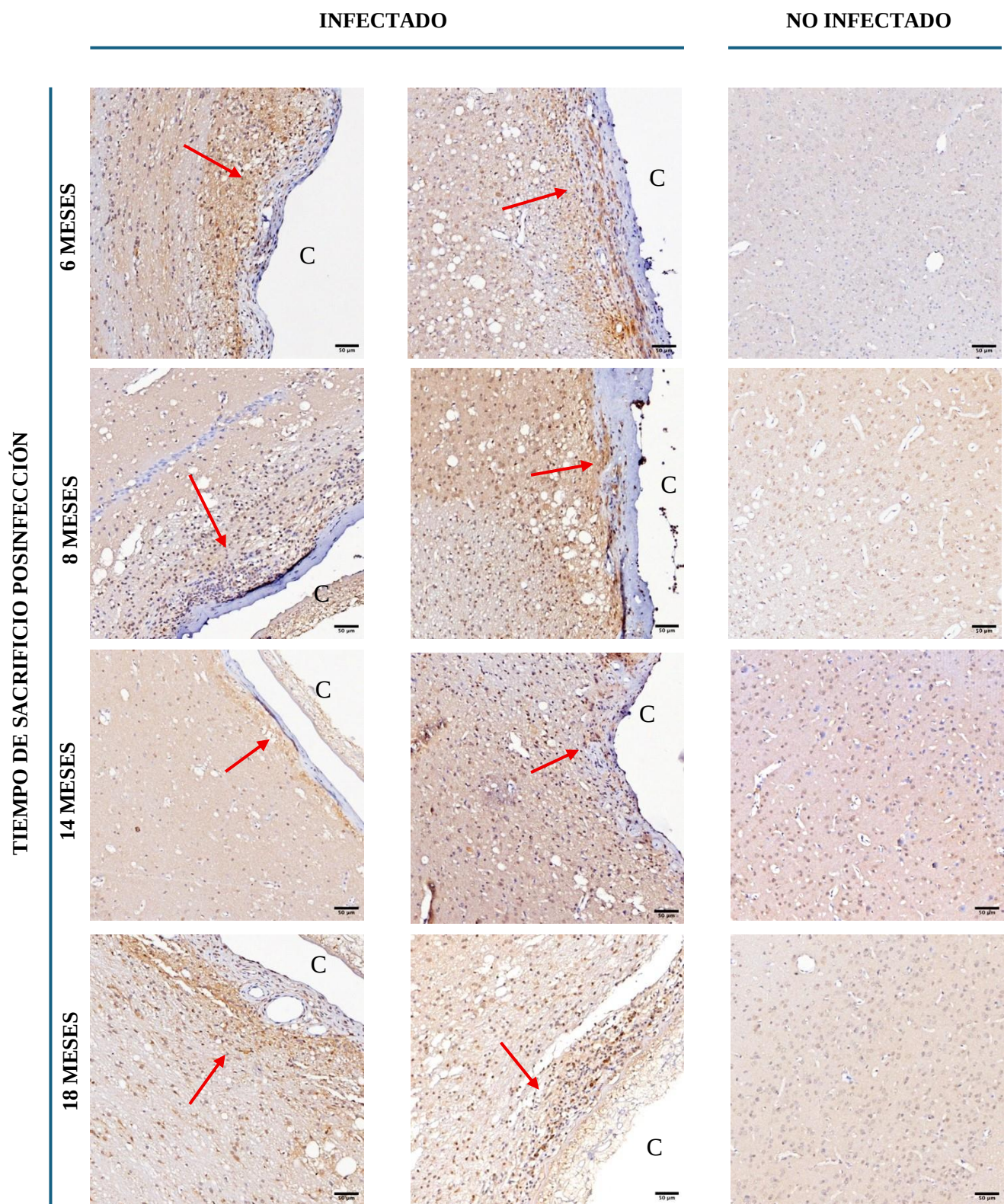


Figura 9 Inmunorreactividad de IL-1 β en tejido cerebral de ratas infectadas y no infectadas a diferentes tiempos posinfección. C: cisticerco. Flechas rojas: zona inmunorreactiva alrededor del cisticerco. Barra de escala 50 μ m.

El análisis de los biomarcadores NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β evidenció un aumento en la inmunorreactividad en el tejido cerebral de ratas infectadas, con variaciones dependientes del tiempo posinfección. En conjunto, se observó un patrón dinámico de expresión, con incrementos temprano, persistencia o picos tardíos en algunos marcadores, así como diferencias entre ratas infectadas y sanas en momentos específicos. Estos hallazgos indican una activación sostenida de la respuesta asociada a piroptosis durante el curso de la neurocisticercosis en este modelo animal.

6.3 Población celular inmunorreactiva al marcador gasdermina D clivada (GSDMD-C1)

Se evaluó la población celular inmunorreactiva a GSDMD-C1 en tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis, con el objetivo de identificar qué tipo celulares participan en la expresión de este marcador asociado a piroptosis. Para ello se empleó inmunofluorescencia de doble marcaje, combinando GSDMD-C1 con marcadores específicos de astrocitos (GFAP), neuronas (NeuN) y microglías (Iba1). La Figura 10 muestra las microfotografías obtenidas mediante microscopía confocal, donde GSDMD-C1 se visualiza en verde y los marcadores celulares en rojo. La superposición de las señales (MERGE) permite identificar las células inmunorreactivas al marcador mediante coincidencia de ambas fluorescencias.

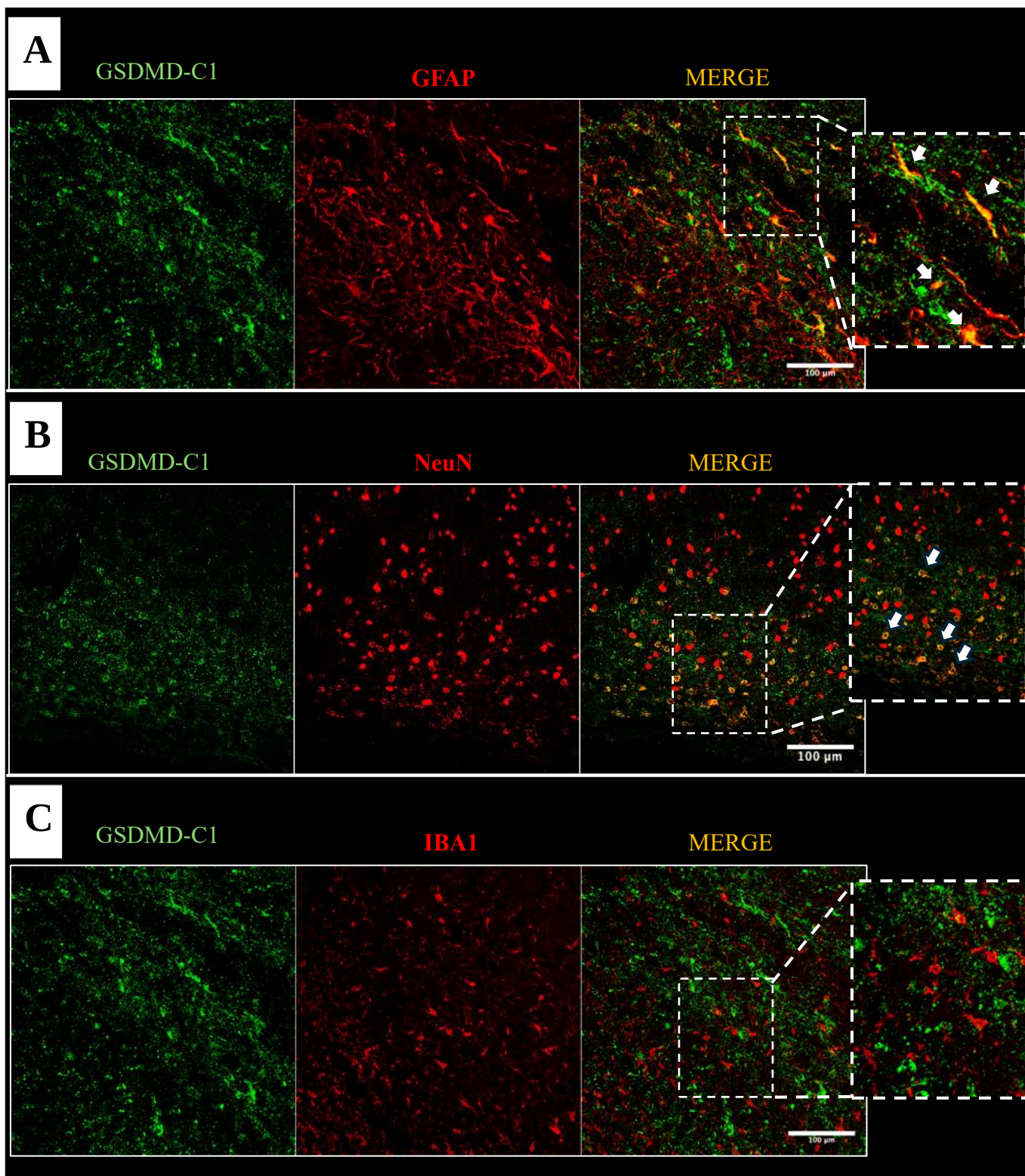


Figura 10 Inmunofluorescencia de GSDMD-C1.

A) Inmunofluorescencia doble de GSDMD-C1 con astrocitos (GFAP). B) Inmunofluorescencia doble de GSDMD-C1 con neuronas (NeuN). C) Inmunofluorescencia doble de GSDMD y microglías (IBA1). GSDMD: verde. GFAP, NeuN e IBA: rojo. Las imágenes MERGE muestran señal amarilla (flechas), indicativa de colocalización. Barra de escala: 100 µm.

6.4 Correlación entre el porcentaje de inmunorreactividad de los biomarcadores NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β en tejidos de cerebro de rata con neurocisticercosis.

Para evaluar si los biomarcadores involucrados en la piroptosis presentan una relación entre sí en el contexto de la neurocisticercosis, se realizó análisis de correlación de Spearman entre los porcentajes de inmunoreactividad obtenidos para NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β . Este método es adecuado para datos no paramétricos que permite identificar asociaciones entre estas variables biológicas.

La Tabla 12 representa los coeficientes rho (ρ) obtenidos y sus respectivos valores de significancia. La interpretación se realizó de acuerdo con la escala propuesta por Daniel (1999), donde correlaciones de 0.00-0.19 se consideran muy débiles, 0.20-0.39 débiles, 0.40-0.59 moderadas, 0.60-0.79 fuertes y >0.80 muy fuertes.

Los resultados muestran que NLRP3 y GSDMD-C1 presentan una correlación moderada y significativa, indicando que la activación del inflamasoma NLRP3 podría estar asociada a la activación del mecanismo ejecutor de la piroptosis mediado por gasdermina D. Caspasa-1 e IL-1 β también muestran una correlación moderada y significativa, consistente con el papel de la caspasa-1 en la maduración de citocinas inflamatorias como lo es IL-1 β durante la piroptosis. Las demás combinaciones no mostraron correlaciones significativas, lo cual sugiere que la activación de estos biomarcadores no es necesariamente simultánea ni proporcional, sino dependiente del microambiente inflamatorio y la presencia del quiste. La Figura 11 complementa los resultados del análisis de correlación al mostrar visualmente la distribución de los 4 biomarcadores en el tejido cerebral infectado. Esta inmunorreacción se concentra en la

región perilesional, lo cual coincide con las áreas donde se realizaron las mediciones cuantitativas

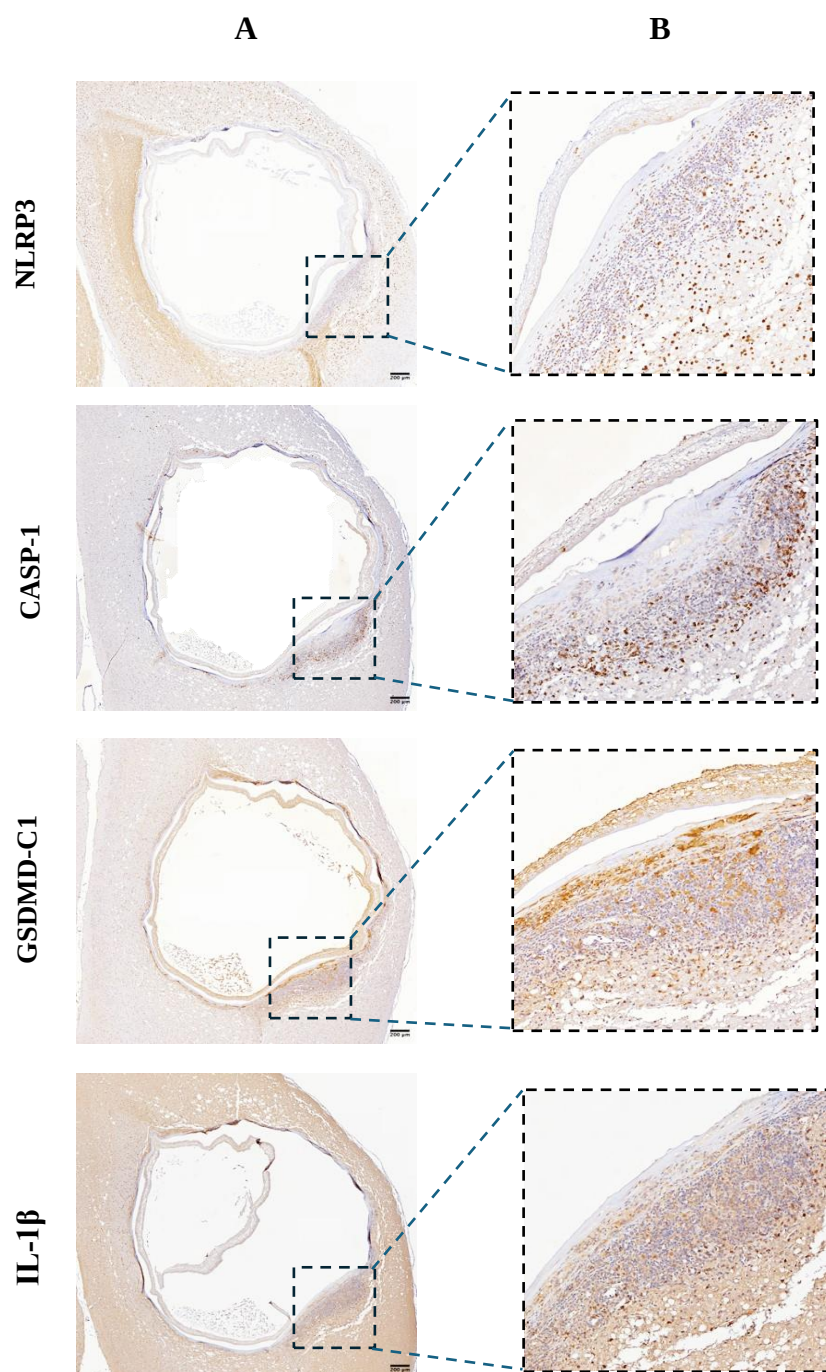


Figura 11. Inmunorreactividad de marcadores de piroptosis en tejido cerebral con NCC. A. Vista general del tejido que muestra la inmunorreacción alrededor del cisticerco (C). B. Ampliación de una región que resalta una zona inmunorreactiva. Barra de escala: 200 μ m.

Tabla 12. Correlación entre la inmunorreactividad de los biomarcadores NLRP3, caspasa-1, GSDMD-C1 e IL-1 β

Comparación	Rho (ρ)	p value
NLRP3 – Caspasa-1	0.1140	0.4998
NLRP3 – GSDMD	0.4030	0.0139*
NLRP3 – IL-1 β	0.2076	0.2166
Caspasa-1 - GSDMD	0.1705	0.3116
Caspasa-1 – IL-1 β	0.4950	0.0021*
GSDMD – IL-1 β	0.2204	0.1891

ρ : coeficiente de correlación de Spearman.

Interpretación: 0.00-0.19 muy débil; 0.20-0.39 débil; 0.40-0.59 moderada; 0.60-0.79 fuerte; 0.80-1.00 muy fuerte (Daniel & Cross, 2018). (**) p value<0.01, (*) p value < 0.05.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó si la neurocisticercosis (NCC) induce muerte celular por piroptosis mediante la inmunorreactividad de NLRP3, caspasa-1, gasdermina D (GSDMD-C1) e IL-1 β en tejido cerebral de ratas infectadas. En conjunto, los cuatro biomarcadores evaluados mostraron una mayor inmunorreactividad en animales con NCC, con variaciones dependientes del tiempo posinfección. Estos resultados sugieren que la NCC se asocia a una respuesta inflamatoria temporalmente variable en el tejido cerebral, influenciada por la presencia del cisticerco.

Inicialmente, se exploró la posible influencia del tratamiento antiparasitario comparando ratas tratadas y no tratadas; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los biomarcadores evaluados, indicando que el tratamiento no produjo un efecto consistente sobre la activación de la piroptosis. Este resultado puede explicarse por la persistencia de quistes viables tanto en animales tratados como no tratados. En este sentido, Huaman Navarro (2025), utilizando las mismas muestras experimentales, reportó la presencia de quistes viables en una proporción importante en animales tratados, lo que evidencia que el tratamiento antiparasitario no fue efectivo en este modelo animal.

Estos hallazgos justifican la decisión de agrupar las muestras las muestras según el tiempo posinfección, ya que el tratamiento no evidenció diferencias relevantes en los biomarcadores.

Bajo este enfoque de análisis, la inmunorreactividad de NLRP3 confirma que la NCC induce activación inflamatoria alrededor del cisticerco. Este comportamiento coincide

con la función del inflamasoma NLRP3 como sensor de PAMPs y DAMPs y mediador central de la activación de caspasa-1 y la maduración de citocinas inflamatorias como IL-1 β e IL-18. Estudios recientes destacan su papel en enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas. En este estudio, el incremento más notorio ocurrió a los 14 meses posinfección donde se observan valores descriptivamente mayores de inmunorreactividad en ratas infectadas, sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística. Este comportamiento podría relacionarse con la persistencia del parásito o con la liberación progresiva de señales de daño asociados a su presencia en el tejido cerebral (Del Brutto & García, 2012; Garcia HH, Nash TE, 2014). Además, la acumulación de DAMPs y la activación glial en entornos inflamatorios crónicos ha sido descrita como un potenciador de la vía NLRP3 (L. Zhang et al., 2024). En otros tiempos (6, 8, 10 y 18 meses posinfección) tampoco se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos; no obstante, se observaron valores descriptivamente mayores en los tejidos infectados, lo cual es consistente con la heterogeneidad del proceso inflamatorio asociada a la presencia del cisticerco, previamente descrita en la neurocisticercosis (Carmen-Orozco et al., 2019; Hamamoto Filho et al., 2021). La inmunorreactividad de NLRP3 en tejido cerebrales infectados mostró variaciones temporales a lo largo del periodo de estudio, incluyendo valores descriptivamente mayores en comparación con los tejidos no infectados; sin evidenciar una activación uniforme en todos los tiempos evaluados no siendo estadísticamente significativo. Este comportamiento podría relacionarse con la participación prolongada de la vía NLRP3–IL-1 β en procesos inflamatorios crónicos del sistema nervioso central descritos previamente (Zheng et al., 2023). En conjunto, estos hallazgos respaldan que

la NCC activa de manera sostenida el inflamasoma NLRP3, con picos modulados por la presencia del parásito.

La inmunorreactividad de caspasa-1 mostró que la NCC activa la vía canónica de piroptosis. Caspasa-1, proteína responsable de la maduración de IL-1 β e IL-18 y de la escisión de GSDMD, presentó valores mayores en tejidos infectados en comparación con los tejidos no infectados, en concordancia con estudios previos que describen su participación en procesos inflamatorios del sistema nervioso central (Broz & Dixit, 2016; Frank & Vince, 2019). El incremento observado a los 6 meses posinfección, corresponde al único tiempo en el que se encontraron diferencias estadísticamente significativas lo que sugiere una respuesta inflamatoria temprana asociada a la presencia inicial del parásito en el tejido cerebral, fenómeno descrito previamente en modelos experimentales de NCC (Chen et al., 2016; Garcia HH, Nash TE, 2014). Entre los tiempos posteriores (8, 10, 14 y 18 meses posinfección) no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre tejidos infectados y no infectados. No obstante se mantuvo una tendencia a valores descriptivamente mayores de inmunorreactividad de caspasa-1 en los tejidos infectados, lo cual se debería a la respuesta inflamatoria asociada a la presencia del cisticerco descrita en la NCC crónica (Carmen-Orozco et al., 2019; Hamamoto Filho et al., 2021). Finalmente, la correlación moderada entre caspasa-1 e IL-1 β observada en este estudio respalda su participación conjunta dentro de la vía canónica de la piroptosis, tal como se ha descrito previamente en contextos inflamatorios (Jorgensen et al., 2016; Jorgensen & Miao, 2017).

En el caso de GSDMD-C1, los resultados muestran que la NCC se asocia a los cambios en la vía efectora de la piroptosis, dado que esta proteína es responsable de la formación

de poros en la membrana plasmática tras su escisión por caspasas inflamatorias. La inmunorreactividad de GSDMD-C1 fue significativamente mayor en los tejidos cerebrales infectados en cuatro de los cinco tiempos evaluados, en comparación con los tejidos no infectados, lo que indica una activación persistente de este componente efector durante el curso de la infección. Los incrementos observados a los 6 meses y nuevamente a los tiempos tardíos de 14 y 18 meses posinfección sugieren la presencia de picos temprano y tardío de activación piroptótica. El incremento temprano podría estar relacionado con procesos inflamatorios agudos inducidos por la presencia inicial del parásito, mientras que los incrementos tardíos podrían reflejar procesos inflamatorios crónicos e inflamación crónica sostenida por la presencia del parasitario o estrés celular (Chen et al., 2016; Frank & Vince, 2019). Entre los 8 y 10 meses se observó una disminución, aunque manteniendo niveles mayores en animales infectados comparados con los no infectados, lo que refleja inflamación persistente pero atenuada, acorde con la reorganización tisular y la variabilidad según la presencia del cisticerco (Carmen-Orozco et al., 2019; Hamamoto Filho et al., 2021). El aumento tardío en ratas infectadas sugiere que la presencia del parásito puede inducir inflamación prolongada debido a la liberación de DAMPs y restos estructurales (Wang et al., 2019; Zheng et al., 2023). En conjunto, la persistencia de GSDMD indica que la piroptosis podría contribuir tanto al daño neuronal temprano como a la inflamación crónica observada en la NCC (Li & Guo, 2025; L. Zhang et al., 2024).

La expresión de IL-1 β , citocina clave en inflamación neuroinmune, presentó un patrón trifásico: aumento temprano (6 meses), disminución intermedia (10 meses) y un segundo incremento tardío (14 meses). Los niveles elevados en animales infectados

concuerdan con su papel en procesos de respuesta inflamatoria del SNC (Broz & Dixit, 2016; Frank & Vince, 2019). El aumento temprano podría explicarse por la activación inicial de la inmunidad innata inducida por la presencia de quiste viables y sus productos excretorios-secretorios, capaces de estimular la microglía y desencadenar la liberación de citocinas proinflamatorias (Garcia HH, Nash TE, 2014; Mejia et al., 2020). La reducción intermedia de IL-1 β sugiere una fase de modulación inflamatoria asociada a mecanismos regulatorios del hospedero que limitan el daño tisular durante la persistencia del parásito viable (Carmen-Orozco et al., 2019; Hamamoto Filho et al., 2021). El incremento tardío es característico de inflamación crónica persistente, posiblemente con cambios dinámicos en la viabilidad parasitaria, estrés tisular prolongado o activación glial persistente (Li & Guo, 2025; L. Zhang et al., 2024). Su correlación con caspasa-1 y GSDMD refuerza su rol en la vía piroptótica (Jorgensen & Miao, 2017).

La inmunofluorescencia realizada en este estudio demostró la expresión de GSDMD-C1 en neuronas y astrocitos, lo que indica que la piroptosis inducida por la neurocisticercosis afecta de manera directa a múltiples poblaciones celulares del sistema nervioso central. La colocalización con los marcadores NeuN y GFAP respalda la activación de vías de muerte celular inflamatoria en células estructurales y funcionales clave del tejido nervioso, particularmente en el entorno perilesional del cisticerco, en concordancia con lo previamente descrito en modelos experimentales de NCC (Mejia et al., 2020). Estos hallazgos coinciden con estudios que han documentado la activación de GSDMD en neuronas, astrocitos y células endoteliales en diversas patologías neuroinflamatorias, donde esta proteína ejecutora contribuye a la disrupción

de la homeostasis tisular y a la propagación del daño inflamatorio (Chen et al., 2016; Frank & Vince, 2019).

De manera relevante, en nuestro estudio no se observó colocalización de GSDMD-C1 con el marcador microglial Iba1, lo que sugiere que, en el contexto de la NCC, la microglía no participa predominantemente como célula ejecutora de piroptosis mediada por GSDMD. Esta observación es consistente con evidencia que indica que la activación del inflamasoma en microglía no siempre culmina en la escisión de GSDMD ni en la muerte celular lítica. En particular, se ha demostrado que la microglía puede procesar y liberar IL-1 β e IL-18 mediante mecanismos no líticos, conservando su viabilidad y capacidad funcional, fenómeno conocido como inflamación sin piroptosis (Evavold et al., 2018; Gaidt et al., 2016). Este tipo de respuesta permitiría a la microglía mantener una activación inflamatoria sostenida sin comprometer su rol como regulador inmunológico del SNC.

Asimismo, se ha descrito que la expresión y activación de GSDMD es altamente dependiente del tipo celular. Estudios comparativos en el SNC muestran que, frente a estímulos inflamatorios o infecciosos, neuronas y astrocitos presentan una mayor susceptibilidad a activar vías de piroptosis mediadas por GSDMD, mientras que la microglía tiende a privilegiar respuestas inflamatorias regulatorias y secretoras (Frank & Vince, 2019; McKenzie et al., 2020). En el contexto de la NCC, la microglía cumple funciones esenciales de reconocimiento antigénico, fagocitosis de detritos y amplificación de la respuesta inflamatoria perilesional, lo que podría favorecer su supervivencia en lugar de su eliminación por muerte celular inflamatoria (Carmen-Orozco et al., 2019; Garcia HH, Nash TE, 2014; Hamamoto Filho et al., 2021).

Por otro lado, la expresión de GSDMD en neuronas adquiere una relevancia clínica significativa, ya que la activación de mecanismos de muerte celular inflamatoria en estas células podría contribuir directamente a las manifestaciones neurológicas de la NCC, como convulsiones y deterioro cognitivo, ampliamente reportadas en pacientes afectados. Un patrón similar de daño neuronal mediado por inflamasoma y GSDMD ha sido descrito en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, donde la activación inflamatoria crónica se asocia con pérdida neuronal progresiva y disfunción sináptica (Heneka et al., 2018).

En conjunto, la expresión selectiva de GSDMD-C1 en neuronas y astrocitos, junto con su ausencia en microglía, sugiere que la piroptosis constituye un mecanismo celular específico dentro de la respuesta inflamatoria de la NCC. Mientras la microglía actuaría principalmente como modulador y amplificador de la neuroinflamación mediante vías no líticas, las neuronas y astrocitos serían más vulnerables a la ejecución directa de piroptosis, contribuyendo de forma sustancial al daño estructural y funcional del SNC. Estos hallazgos refuerzan el papel de GSDMD como un mediador central de la patogénesis neuroinflamatoria y consolidan su relevancia como potencial diana terapéutica en la NCC.

Es relevante señalar que la inmunorreactividad de GSDMD mostró, en algunas células, un patrón de distribución anular o puntiforme, observable tanto en inmunohistoquímica como en inmunofluorescencia, particularmente en regiones perilesionales del tejido cerebral. Si bien las técnicas empleadas en el presente estudio no permiten la visualización directa de poros funcionales, este patrón de inmunorreacción resulta compatible con la organización en estructuras tipo anillo del fragmento

N-terminal de GSDMD, descrita previamente como un paso clave en la ejecución de la piroptosis. Dichas estructuras porogénicas han sido asociadas con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y con la liberación de citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , contribuyendo a la amplificación de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central.

Estudios estructurales y funcionales han demostrado que, tras su escisión por caspasas inflamatorias, el dominio N-terminal de GSDMD se inserta en la membrana plasmática y se organiza en complejos circulares formadores de poros, responsables de la pérdida de la integridad de la membrana celular y de la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β (Ding et al., 2016; X. Liu et al., 2016; Xia et al., 2021). En este contexto, la presencia de dicho patrón anular o puntiforme en células localizadas en zonas perilesionales sugiere la activación local de la vía piroptótica, contribuyendo potencialmente a la amplificación de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central.

Adicionalmente, el análisis de correlación permitió observar asociaciones entre NLRP3–GSDMD y caspasa-1–IL-1 β , lo que respalda una activación funcional coordinada de la vía canónica de piroptosis (Jorgensen et al., 2016). En conjunto, la NCC induce una activación multifásica del inflamasoma y de la piroptosis en tejido cerebral, lo cual genera un microambiente neuroinflamatorio complejo que podría contribuir a sus manifestaciones neurológicas.

Finalmente, mecanismos terapéuticos dirigidos a la vía piroptótica han demostrado resultados prometedores en modelos experimentales. En un modelo de isquemia cerebral, Shen et al. (2026) demostraron que la inhibición farmacológica de la

activación microglial del eje NLRP3–caspasa-1-GSDMD, mediada por quercetina, reduce la neuroinflamación y protege el tejido cerebral. Esta evidencia sugiere que el bloqueo de la vía piroptótica podría representar una estrategia potencial para modular el daño inflamatorio en la neurocisticercosis.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los biomarcadores asociados a la activación de la piroptosis, NLRP3, caspasa-1 presentaron mayor inmunorreactividad en tejidos cerebrales con neurocisticercosis en comparación con los no infectados, con variaciones dependientes del tiempo posinfección.
2. Los biomarcadores asociados a la fase efectora de la piroptosis GSDMD e IL-1 β presentaron mayor inmunorreactividad en tejido cerebral infectado, con variaciones dependientes del tiempo posinfección.
3. GSDMD mostró el patrón de aumento más consistente entre los tiempos evaluados, respaldando su papel como efector clave en la ejecución de la piroptosis durante la infección.
4. La expresión de gasdermina D en neuronas y astrocitos indica la participación de múltiples tipos celulares del sistema nervioso central en la respuesta inflamatoria asociada a la neurocisticercosis.
5. Se observaron asociaciones moderadas y significativas entre NLRP3 y GSDMD-C1, así como entre caspasa-1 e IL-1 β , compatibles con la activación de la vía canónica de la piroptosis, aunque sin una activación uniforme de todos los biomarcadores en todos los tiempos evaluados.

IX. LIMITACIONES

1. El estudio se realizó en un modelo experimental en ratas, lo que permitió un análisis controlado de la neurocisticercosis, pero limita la extrapolación directa de los resultados a humanos.
2. La evaluación de la piroptosis se basó en la inmunodetección de biomarcadores, incluyendo la forma clivada de gasdermina D (GSDMD-C1); sin embargo, no se realizaron ensayos funcionales directos de muerte celular, lo que impide confirmar de manera definitiva la ejecución completa del proceso piroptótico.
3. La cuantificación se efectuó mediante un análisis semi-cuantitativo de área inmunorreactiva, técnica adecuada para estudios histológicos, pero que no permite determinar niveles absolutos de expresión proteica.
4. El tamaño muestral por grupo y tiempo posinfección, aunque adecuado para un estudio exploratorio, podría limitar la detección de algunas diferencias estadísticas, especialmente en fases con alta variabilidad inflamatoria.
5. La persistencia de quistes viables en muestras provenientes de animales tratados limitó el análisis comparativo del efecto del tratamiento antiparasitario sobre los biomarcadores de la vía de piroptosis.
6. No se evaluaron biomarcadores específicos asociados a la viabilidad del cisticerco o a la respuesta al tratamiento antiparasitario, por lo que las comparaciones entre animales tratados y no tratados deben interpretarse exclusivamente en el contexto de los biomarcadores de piroptosis analizados.

X. RECOMENDACIONES

1. Incluir en estudios futuros ensayos funcionales directos que confirmen la muerte celular piroptótica asociada a la activación de GSDMD-C1.
2. Evaluar otros mecanismos de muerte celular regulada que puedan coexistir con la piroptosis en la neurocisticercosis.
3. Ampliar el tamaño muestral y realizar análisis cuantitativos de colocalización celular en estudios futuros.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertheloot, D., Latz, E., & Franklin, B. S. (2021). Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: An intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(5), 1106-1121. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00630-3>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 407-420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Carmen-Orozco, R. P., Dávila-Villacorta, D. G., Cauna, Y., Bernal-Teran, E. G., Bitterfeld, L., Sutherland, G. L., Chile, N., Céliz, R. H., Ferrufino-Schmidt, M. C., Gavidia, C. M., Sterling, C. R., García, H. H., Gilman, R. H., & Verástegui, M. R. (2019). Blood–brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis. *Journal of Neuroscience Research*, 97(2), 137-148. <https://doi.org/10.1002/jnr.24335>
- Chen, X., He, W. T., Hu, L., Li, J., Fang, Y., Wang, X., Xu, X., Wang, Z., Huang, K., & Han, J. (2016). Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Research*, 26(9), 1007-1020. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.100>
- Chiarini, A., Armato, U., Gui, L., & Dal Prà, I. (2024). “Other Than NLRP3” Inflammasomes: Multiple Roles in Brain Disease. *The Neuroscientist*, 30(1), 23-48. <https://doi.org/10.1177/10738584221106114>

- Coutinho-Budd, J. C., & Broihier, H. T. (2020). Pyroptosis Takes Aim at Neurodevelopment. *Developmental Cell*, 53(5), 498-499. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.013>
- Daniel, W. W., & Cross, C. L. (2018). *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*. John Wiley & Sons.
- Del Brutto, O. H., & García, H. H. (2012). Neurocysticercosis in nonendemic countries: Time for a reappraisal. *Neuroepidemiology*, 39(2), 145-146. <https://doi.org/10.1159/000341693>
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C., & Shao, F. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535(7610), 111-116. <https://doi.org/10.1038/nature18590>
- Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., & Kagan, J. C. (2018). The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*, 48(1), 35-44.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013>
- Fadeel, B., & Orrenius, S. (2005). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, 258(6), 479-517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>
- Flores, J., Noël, A., Foveau, B., Lynham, J., Lecrux, C., & LeBlanc, A. C. (2018). Caspase-1 inhibition alleviates cognitive impairment and neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06449-x>

- Frank, D., & Vince, J. E. (2019). Pyroptosis versus necroptosis: Similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death and Differentiation*, 26(1), 99-114. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0212-6>
- Fu, Q., Wu, J., Zhou, X. Y., Ji, M. H., Mao, Q. H., Li, Q., Zong, M. M., Zhou, Z. Q., & Yang, J. J. (2019). NLRP3/Caspase-1 Pathway-Induced Pyroptosis Mediated Cognitive Deficits in a Mouse Model of Sepsis-Associated Encephalopathy. *Inflammation*, 42(1), 306-318. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0894-4>
- Fukuda, A. M., Adami, A., Pop, V., Bellone, J. A., Coats, J. S., Hartman, R. E., Ashwal, S., Obenaus, A., & Badaut, J. (2013). Posttraumatic reduction of edema with aquaporin-4 RNA interference improves acute and chronic functional recovery. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(10), 1621-1632. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.118>
- Gaidt, M. M., Ebert, T. S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Rapino, F., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Graf, T., & Hornung, V. (2016). Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*, 44(4), 833-846. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.012>
- Garcia, H. H. (2018). Neurocysticercosis. *Neurologic Clinics*, 36(4), 851-864. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.07.003>
- Garcia, H. H., & Del Brutto, O. H. D. (2005). Neurocysticercosis: Updated concepts about an old disease. *The Lancet Neurology*, 4(10), 653-661. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70194-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70194-0)

- Garcia HH, Nash TE, D. B. OH. (2014). Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Physiology & behavior*, 176(5), 139-148. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8).Clinical
- Guekht, A., Brodie, M., Secco, M., Li, S., Volkens, N., & Wiebe, S. (2021). The road to a World Health Organization global action plan on epilepsy and other neurological disorders. *Epilepsia*, 62(5), 1057-1063. <https://doi.org/10.1111/epi.16856>
- Hamamoto Filho, P. T., Fragoso, G., Sciutto, E., & Fleury, A. (2021). Inflammation in neurocysticercosis: Clinical relevance and impact on treatment decisions. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 19(12), 1503-1518. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1912592>
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388-405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 463-477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Heneka, M. T., McManus, R. M., & Latz, E. (2018). Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 610-621. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>

- Holbrook, J. A., Jarosz-Griffiths, H. H., Caseley, E., Lara-Reyna, S., Poulter, J. A., Williams-Gray, C. H., Peckham, D., & McDermott, M. F. (2021). Neurodegenerative Disease and the NLRP3 Inflammasome. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643254>
- Huaman Navarro, A. Y. (2025). *Evaluación de daño en el transporte axonal en un modelo animal de neurocisticercosis* (Tesis para optar el grado de Maestro en Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia). Repositorio Institucional UPCH. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/17923>
- Ignacio Madrazo N, Olhagaray B, Becerra M, Sandoval MA, R. S. L. (2005). *Acute cysticercosis encephalitis: Description of a histologically confirmed case. Neurosurgery.*
- Jia, C., Chen, H., Zhang, J., Zhou, K., Zhuge, Y., Niu, C., Qiu, J., Rong, X., Shi, Z., Xiao, J., Shi, Y., & Chu, M. (2019). Role of pyroptosis in cardiovascular diseases. *International Immunopharmacology*, 67(November 2018), 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.028>
- Jorgensen, I., & Miao, E. A. (2017). Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Physiology & behavior*, 176(3), 139-148. <https://doi.org/10.1111/imr.12287>.Pyroptotic
- Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B. A., & Miao, E. A. (2016). Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, 213(10), 2113-2128. <https://doi.org/10.1084/jem.20151613>

- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., ... Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666-671. <https://doi.org/10.1038/nature15541>
- Kayagaki, N., Wong, M. T., Stowe, I. B., Ramani, S. R., Gonzalez, L. C., Akashitakamura, S., Miyake, K., Zhang, J., Lee, W. P., Forsberg, L. S., Carlson, R. W., & Dixit, V. M. (2013). Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*, 130(6151), 1246-1249. <https://doi.org/10.1126/science.1240248>
- Kurokawa, M., & Kornbluth, S. (2009). Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138(5), 838-854. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.021>
- Li, Y., & Guo, B. (2025). GSDMD-mediated pyroptosis: Molecular mechanisms, diseases and therapeutic targets. *Molecular Biomedicine*, 6(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s43556-025-00249-8>
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535(7610), 153-158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>
- Liu, Y., Pan, R., Ouyang, Y., Gu, W., Xiao, T., Yang, H., Tang, L., Wang, H., Xiang, B., & Chen, P. (2024). Pyroptosis in health and disease: Mechanisms, regulation and clinical perspective. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 245. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01958-2>

- Lv, Y., Sun, B., Lu, X. xing, Liu, Y. lin, Li, M., Xu, L. X., Feng, C. X., Ding, X., & Feng, X. (2019). The role of microglia mediated pyroptosis in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.003>
- Mahanty, S., Garcia, H. H., & Cysticercosis Working Group in Perú. (2010). Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 91(2), 172-184. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.008>
- McKenzie, B. A., Dixit, V. M., & Power, C. (2020). Fiery Cell Death: Pyroptosis in the Central Nervous System. *Trends in Neurosciences*, 43(1), 55-73. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.11.005>
- McKenzie, B. A., Mamik, M. K., Saito, L. B., Boghozian, R., Monaco, M. C., Major, E. O., Lu, J. Q., Branton, W. G., & Power, C. (2018). Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26), E6065-E6074. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722041115>
- Mejia, A., Carmen, R., Carter, E., Davila, D., Castillo, G., Morales, J., Mamani, J., Gavidia, C., Alroy, J., Garcia, H., Manuel, V., & Gilman, R. (2020). Axonal swellings and spheroids: A new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathology*, 29(3), 425–436. <https://doi.org/10.1111/bpa.12669>
- Ndimubanzi, P. C., Carabin, H., Budke, C. M., Nguyen, H., Qian, Y. J., Rainwater, E., Dickey, M., Reynolds, S., & Stoner, J. A. (2010). A systematic review of the

- frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000870>
- Pezuk, J. A. (2019). Pyroptosis in combinatorial treatment to improve cancer patients' outcome, is that what we want? *EBioMedicine*, 41, 17-18.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.007>
- Shen, D., Kong, W., Qiu, H., Yuan, H., Wu, W., Huang, L., Yin, Z., Chu, L., & Ge, L. (2026). Quercetin Alleviates Cerebral Ischemia-Induced Neuroinflammation by Inhibiting Microglia-Mediated NLRP3/Caspase-1/GSDMD Pathway. *Cells*, 15(6), 552. <https://doi.org/10.3390/cells15060552>
- Shen, H. H., Yang, Y. X., Meng, X., Luo, X. Y., Li, X. M., Shuai, Z. W., Ye, D. Q., & Pan, H. F. (2018). NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 17(7), 694-702.
<https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.01.020>
- Song, L., Pei, L., Yao, S., Wu, Y., & Shang, Y. (2017). NLRP3 inflammasome in neurological diseases, from functions to therapies. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(March), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00063>
- Srinivas, H., Vasudev, T., & Deshpande, D. (1980). *CEREBRAL CYSTICERCOSIS : CLINICAL AND PATHOLOGICAL OBSERVATIONS WITH EMPHASIS ON THE ENCEPHALITIC TYPE* H. K Srinivas ', T. Vasudev RatP * and D. H. Deshpande ** *Cerebral cysticercosis is prevalent throughout the world. The disease is particularly con.* 82.

- Tan, M. S., Tan, L., Jiang, T., Zhu, X. C., Wang, H. F., Jia, C. D., & Yu, J. T. (2014). Amyloid- β induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease. *Cell Death and Disease*, 5(8), 1-12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.348>
- Verastegui, M. R., Mejia, A., Clark, T., Gavidia, C. M., Mamani, J., Ccopa, F., Angulo, N., Chile, N., Carmen, R., Medina, R., García, H. H., Rodriguez, S., Ortega, Y., & Gilman, R. H. (2015). Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. *American Journal of Pathology*, 185(8), 2259-2268. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.015>
- Vezzani, A., Friedman, A., & Dingledine, R. J. (2013). The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology*, 69, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.004>
- Wallin, M. T., Pretell, E. J., Bustos, J. A., Caballero, M., Alfaro, M., Kane, R., Wilken, J., Sullivan, C., Fratto, T., & Garcia, H. H. (2012). Cognitive Changes and Quality of Life in Neurocysticercosis: A Longitudinal Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), e1493. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001493>
- Wang, S., Yuan, Y. H., Chen, N. H., & Wang, H. B. (2019). The mechanisms of NLRP3 inflammasome/pyroptosis activation and their role in Parkinson's disease. *International Immunopharmacology*, 67(November 2018), 458-464. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.019>
- Wu, C., Lu, W., Zhang, Y., Zhang, G., Shi, X., Hisada, Y., Smyth, S. S., Kirchhofer, D., Shiroishi, T., & Shao, F. (2020). *Inflammasome activation triggers blood*

clotting and host death through pyroptosis. Immunity, 50(6), 1401–1411.e4.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.003>

Xia, S., Zhang, Z., Magupalli, V. G., Pablo, J. L., Dong, Y., Vora, S. M., Wang, L., Fu, T.-M., Jacobson, M. P., Greka, A., Lieberman, J., Ruan, J., & Wu, H. (2021).

Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-

1. *Nature, 593(7860), 607-611.* <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03478-3>

Yuan, B., Zhou, X. ming, You, Z. qi, Xu, W. dong, Fan, J. mei, Chen, S. juan, Han, Y.

ling, Wu, Q., & Zhang, X. (2020). Inhibition of AIM2 inflammasome activation

alleviates GSDMD-induced pyroptosis in early brain injury after subarachnoid

haemorrhage. *Cell Death and Disease, 11(1).* [https://doi.org/10.1038/s41419-](https://doi.org/10.1038/s41419-020-2248-z)

[020-2248-z](https://doi.org/10.1038/s41419-020-2248-z)

Zhang, L., Tang, Y., Huang, P., Luo, S., She, Z., Peng, H., Chen, Y., Luo, J., Duan, W.,

Xiong, J., Liu, L., & Liu, L. (2024). Role of NLRP3 inflammasome in central

nervous system diseases. *Cell and Bioscience, 14(1).*

<https://doi.org/10.1186/s13578-024-01256-y>

Zhang, N., Yang, Y., & Xu, D. (2025). Emerging roles of palmitoylation in pyroptosis.

Trends in Cell Biology, 35(6), 500-514.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2024.10.005>

Zheng, X., Wan, J., & Tan, G. (2023). The mechanisms of NLRP3

inflammasome/pyroptosis activation and their role in diabetic retinopathy.

Frontiers in Immunology, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1151185>

XII. ANEXOS

ANEXO 1: ANTICUERPOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

Anticuerpo	Marca	Código	Concentración	Tipo	Técnica
IgG de conejo anti - NALP3	ProSci	5447	1mg/mL	Policlonal	IHQ
IgG de conejo anti – Caspasa-1	Thermo Fisher	MA5-16215	1mg/mL	Monoclonal	IHQ
IgG de conejo anti – GSDMDC1	Novus Biologicals	NBP2-80427	1mg/mL	Policlonal	IHQ/IFI
IgG de conejo anti – IL-1 β	Abcam	Ab9722	100ug/mL	Policlonal	IHQ
IgG de cabra anti-IgG de ccconejo (H+L)	Thermo Fisher	5220-0336	1mg/mL	Policlonal	IHQ
IgG de raton anti - NeuN	Abcam	Ab104224	1mg/mL	Monoclonal	IFI
IgG de cabra anti – Iba1	Abcam	Ab5076	0.5 mg/mL	Policlonal	IFI
IgG de raton anti - GFAP	Merck	IF03L	100 ug/mL	Monoclonal	IFI
Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat IgG (H+L)	Thermo Fisher	A11055	2mg/mL	Policlonal	IFI
Alexa Fluor 594 Donkey anti-mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher	A21203	2mg/mL	Policlonal	IFI
Alexa Fluor 647 Donkey anti-rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher	A32795TR	2mg/mL	Policlonal	IFI

ANEXO 2: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA NLRP3

Empresa: ProSci

N° Catálogo: 5447

1. DESPARAFINIZACIÓN

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (60°C) por 40 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 VEZ)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 VECES)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 VECES)
- Dejar secar entre cada Xilol durante 3' en la estufa.
- Se debe dejar secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes.
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO (20min)

Preparar 800 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM (pH 6) en un beacker. Agregar Tween-20 al 0.05%. Colocar las láminas con canastilla en el beacker durante 15 minutos en el citrato hirviendo en microondas.

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

3. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA: (15 min)

Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en metanol 1X. Dejar incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

4. BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES (60 min)

Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 2.5 % BSA

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

5. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO overnight a 4 °C

.Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 2.5 % Suero de cabra
- 2.5 % suero de caballo
- 2.5% BSA

Agregar el anticuerpo Rabbit anti-NLRP3(1/800) durante 16 horas a 4°C .

Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH, 7.2.

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO (60 min)

La solución se preparó en PBS 1X conteniendo

- 5% Suero de cabra
- 2.5% Suero de caballo
- 2.5% Suero de rata

Agregar el anticuerpo Goat anti-rabbit HRP (1/300).

Incubar las láminas con aprox. 400 uL de la solución por 1 hora a temperatura ambiente,

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

7. REVELADO

Preparar la solución de revelado: 1 gota de DAB + 3mL de solución tamponada, dejar incubando hasta observar reacción, luego lavar con agua destilada. Realizar la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 segundo y lavar con abundante agua.

8. DESHIDRATACIÓN

Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70°, 90°, 96° y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasar las láminas por Xilol I y Xilol II por 2 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

ANEXO 3: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA CASPASA-1
Empresa: Abcam
Nº Catálogo: ab1872

1. DESPARAFINIZACIÓN

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (60°C) por 40 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 VEZ)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 VECES)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 VECES)
- Dejar secar entre cada Xilol durante 3' en la estufa.
- Se debe dejar secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes.
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO (30min)

Colocar en una olla con agua fría en la cocina hasta que alcance el punto de ebullición, luego colocar las láminas en coplins conteniendo la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) con Tween 20 al 0.05% y empezar a contar los 30 minutos.

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

3. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA: (15 min)

Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en metanol. Dejar incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

4. BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES (60 min)

Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 2 % BSA

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

5. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO (overnight a 4 °C)

.Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 2 % Suero de cabra
- 1% suero de caballo
- 1% BSA

Agregar el anticuerpo Rabbit anti-Caspasa-1 (1/100) durante 16 horas a 4°C .

Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH, 7.2.

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO (60 min)

La solución se preparó en PBS 1X conteniendo

- 5% Suero de cabra
- 5% Suero de caballo

Agregar el anticuerpo Goat anti-rabbit HRP (1/300).

Incubar las láminas con aprox. 400 uL de la solución por 1 hora a temperatura ambiente,

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

7. REVELADO

Preparar la solución de revelado: 1 gota de DAB + 3mL de solución tamponada, dejar incubando hasta observar reacción, luego lavar con agua destilada. Realizar la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 segundo y lavar con abundante agua.

8. DESHIDRATACIÓN

Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70°, 90°, 96° y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasar las láminas por Xilol I y Xilol II por 2 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

ANEXO 4: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA GSDMDC1

Empresa: Novus Biologicals

N° Catálogo: NBP2-80427

1. DESPARAFINIZACIÓN

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (60°C) por 40 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 VEZ)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 VECES)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 VECES)
- Dejar secar entre cada Xilol durante 3' en la estufa.
- Se debe dejar secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes.
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO (20min)

Colocar en una olla agua fría en la cocina hasta que alcance el punto de ebullición, luego colocar las láminas en coplins conteniendo la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) y empezar a contar los 30 minutos.

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

3. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA: (15 min)

Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS1X. Dejar incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

4. BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES (60 min)

Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 5 % BSA

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

5. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO overnight a 4 °C

.Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5% suero de cabra
- 5% suero de caballo
- 5% BSA

Agregar el anticuerpo Rabbit anti-GSDMD (1/400) durante 16 horas a 4°C .

Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH, 7.2.

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO (60 min)

La solución se preparó en PBS 1X conteniendo

- 5% Suero de cabra
- 2.5% Suero de caballo
- 2 % Suero de rata

Agregar el anticuerpo Goat anti-rabbit HRP (1/300).

Incubar las láminas con aprox. 400 uL de la solución por 1 hora a temperatura ambiente,

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

7. REVELADO

Preparar la solución de revelado: 1 gota de DAB + 3mL de solución tamponada, dejar incubando hasta observar reacción, luego lavar con agua destilada. Realizar la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 segundo y lavar con abundante agua.

8. DESHIDRATACIÓN

Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70º, 90º, 96º y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasar las láminas por Xilol I y Xilol II por 2 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

ANEXO 5: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA IL-1 β

Empresa: Abcam

N° Catálogo: Ab9722

1. DESPARAFINIZACIÓN

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (60°C) por 40 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 VEZ)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 VECES)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 VECES)
- Dejar secar entre cada Xilol durante 3' en la estufa.
- Se debe dejar secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes.
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO (15min)

Preparar 800 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM (pH 6) en un beacker. Agregar Tween-20 al 0.05%. Colocar las láminas con canastilla en el beacker durante 15 minutos en el citrato hirviendo en microondas.

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

3. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA: (25 min)

Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS 1X. Dejar incubar por 25 minutos a temperatura ambiente. Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

4. BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES (60 min)

Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 2.5 % BSA

Incubar las láminas con aprox. 400 μ L cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

5. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO (overnight a 4 °C)

.Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 2.5% suero de caballo

Agregar el anticuerpo Rabbit anti-IL-1 β (1/300) durante 16 horas a 4°C .

Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH, 7.2.

Incubar las láminas con aprox. 400 μ L cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO (60 min)

La solución se preparó en PBS 1X conteniendo

- 5% Suero de cabra
- 2.5% Suero de caballo

Agregar el anticuerpo Goat anti-rabbit HRP (1/300).

Incubar las láminas con aprox. 400 μ L de la solución por 1 hora a temperatura ambiente,

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

7. REVELADO

Preparar la solución de revelado: 1 gota de DAB + 3mL de solución tamponada, dejar incubando hasta observar reacción, luego lavar con agua destilada. Realizar la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 segundo y lavar con abundante agua.

8. DESHIDRATACIÓN

Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70°, 90°, 96° y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasar las láminas por Xilol I y Xilol II por 2 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

ANEXO 5: PROTOCOLO DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA – DOBLE MARCAJE PARA GSDMD Y NEUN, GFAP E IBA1

1. DESPARAFINIZACIÓN

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (60°C) por 40 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 VEZ)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 VECES)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 VECES)
- Dejar secar entre cada Xilol durante 3' en la estufa.
- Se debe dejar secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes.
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO (15min)

Colocar en una olla agua fría en la cocina hasta que alcance el punto de ebullición, luego colocar las láminas en coplins conteniendo la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) y empezar a contar los 30 minutos.

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

3. BLOQUEO DE PROTEÍNAS GENERALES (60 min)

Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 5 % suero de burro

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

4. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO (overnight a 4 °C)

.Preparar la solución en PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo:

- 5 % Suero de cabra
- 5 % suero de caballo
- 2.5% suero de burro

Agregar el anticuerpo

- a. Rabbit anti-GSDMD (1:300) + IgG de raton anti – NeuN (1:1000)
- b. Rabbit anti-GSDMD (1:300) + IgG de cabra anti – Iba1 (1:300)
- c. Rabbit anti-GSDMD (1:300) + IgG de raton anti – GFAP (1:500)

Incubar durante 16 horas a 4°C .

Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH, 7.2.

Incubar las láminas con aprox. 400 µL cada una (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente).

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

5. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO (60 min)

La solución se preparó en PBS 1X conteniendo

- 5% suero de burro.
- 5% suero de caballo.
- 2.5% Suero de caballo.

Agregar el anticuerpo secuandario:

- a. Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat IgG (H+L) (1:300)
- b. Alexa Fluor 594 Donkey anti-mouse IgG (H+L) (1:300)
- c. Alexa Fluor 647 Donkey anti-rabbit IgG (H+L) (1:300)

Incubar las láminas con aprox. 400 uL de la solución por 1 hora a temperatura ambiente, sin exposición a luz.

(*) Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min

6. MONTAJE

Agregar DAPI aprox. 10-40 uL por lámina cubriendo completamente el tejido, colocar el cubreobjeto y sellar con esmalte.

Conservar en 4° a 20°C hasta la lectura.