



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

EVALUACIÓN DE DAÑO EN EL  
TRANSPORTE AXONAL EN UN  
MODELO ANIMAL DE  
NEUROCISTICERCOSIS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

AYME YADINE HUAMAN NAVARRO

LIMA- PERÚ

2025



**ASESOR**

**PhD. MANUELA RENEE VERASTEGUI PIMENTEL**

**JURADO DE TESIS**

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA  
PRESIDENTE

DRA. MONICA PAJUELO TRAVEZAÑO  
VOCAL

DR. JAVIER ARTURO BUSTOS PALOMINO  
SECRETARIO (A)

## **DEDICATORIA.**

A mi familia por su apoyo incondicional y amigos con quienes compartimos la pasión por la ciencia e investigación

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a Dios por todas las bendiciones recibidas. A los doctores Marco Milla y Maria Goñi por financiar mis estudios de posgrado a través de la Beca Milla-Goñi en la UPCH. Un profundo agradecimiento a la Dra. Manuela Verástegui por orientarme en el desarrollo de la tesis y permitirme ser parte de su grupo de investigación. Así como a mis compañeros del laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas por su apoyo en todo este proceso.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

La presente tesis se desarrolló con el financiamiento de la Beca de posgrado  
Milla- Goñi



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

### Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	HUAMAN NAVARRO Ayme YADINE

*(Agregar filas adicionales si hay más autores)*

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **EVALUACIÓN DE DAÑO EN EL TRANSPORTE AXONAL EN UN MODELO ANIMAL DE NEUROCYSTICERCOSIS**, 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	MAESTRÍA

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 **11%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **2802161006**; fecha de entrega: **03-11-2025**).
- 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, 03 de noviembre de 2025**

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 Degeneración o daño axonal.....	12
	4.3 Transporte axonal .....	14
V.	METODOLOGÍA.....	17
	5.1 Diseño del estudio.....	17
	5.2 Lugar de estudio .....	18
	5.3 Metodología para la obtención de muestras .....	18
	5.4 Procedimiento y técnicas .....	20
	5.4.1 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E) .....	21
	5.4.2 Evaluación del daño del cisticerco .....	22
	5.4.3 Inmunohistoquímica (IHC) .....	22
	5.4.4 Análisis de imágenes.....	27
	5.5 Análisis estadístico .....	27
VI.	RESULTADOS.....	28
	6.1 Descripción de muestras .....	28
	6.2 Daño del cisticerco .....	29
	6.3 Inmunorreactividad de Kinesina en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios a diferente tiempo postratamiento.....	31
	6.3.1 Patrón de inmunorreactividad de la cadena pesada de Kinesina (KIF5A) .....	31
	6.3.2 Patrón de inmunorreactividad de la cadena ligera de kinesina (KLC2) .....	36

6.4 Patrón de inmunorreactividad de Dineína en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios a diferente tiempo postratamiento.....	41
6.5 Evaluación de daño axonal mediante el número de hinchazones axonales reactivos a NFP en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios a diferente tiempo postratamiento .....	46
6.6 Determinación de la correlación que existe entre la inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína con el marcador de daño axonal en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios.....	51
VII. DISCUSIÓN: .....	55
VIII. LIMITACIONES .....	64
IX. CONCLUSIONES .....	65
X. RECOMENDACIONES.....	66
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
XII. ANEXOS	

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de daño en el cisticerco.....	30
Figura 2. Patrón de inmunorreactividad de KIF5A en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento.....	32
Figura 3. Promedio de hinchazones axonales reactivos a KIF5A.....	35
Figura 4. Patrón de inmunorreactividad de KLC2 en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento. ....	37
Figura 5. Promedio de varicosidades reactivos a KLC2.....	40
Figura 6. Patrón de inmunorreactividad de DIC en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento. ....	42
Figura 7. Promedio de hinchazones axonales reactivos a DIC. A .....	45
Figura 8. Inmunorreactividad de NFP en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento. ....	47
Figura 9. Promedio de hinchazones axonales reactivos a NFP.....	50
Figura 10. Análisis de correlación de Spearman en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitario.. ....	53

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Grupos experimentales del estudio previo .....	19
Tabla 2. Número de animales sacrificados en cada tiempo postratamiento por grupo experimental .....	20
Tabla 3. Lista de anticuerpos utilizados para IHC .....	26
Tabla 4. Número de muestras analizadas por cada tiempo postratamiento .....	28
Tabla 5. Análisis estadístico del promedio de esferoides y varicosidades reactivos a KIF5A en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control..	36
Tabla 6. Análisis estadístico del promedio de varicosidades reactivas a KLC2 en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control.....	40
Tabla 7. Análisis estadístico del promedio de esferoides y varicosidades reactivas a DIC en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control.....	46
Tabla 8. Análisis estadístico del promedio de esferoides y varicosidades reactivas a NFP en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control. ....	51

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

NCC	Neurocisticercosis
SNC	Sistema nervioso central
NFP	Neurofilamento
KIF5A	Cadena pesada de la proteína motora Kinesina
KLC2	Cadena ligera de la proteína motora Kinesina
DIC	Cadena intermedia de Dineína
IHC	inmunohistoquímica
MG	Materia gris / Grey Matter
MW	Materia blanca / White Matter
ON	Óxido nítrico

## RESUMEN

La neurocisticercosis es una enfermedad parasitaria del SNC que causa epilepsia adquirida y es generada por la forma larvaria del cestodo *Taenia solium*. Es de curso crónico y en pacientes sintomáticos se caracteriza por convulsiones y epilepsia. Estudios en ratas de laboratorio con NCC, reportan daño axonal caracterizado por el acúmulo de proteínas (neurofilamento, APP) en forma de hinchazones axonales, que podría estar relacionado con deterioro en el transporte axonal. **Objetivo:** Evaluar el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína como marcadores de daño en el transporte axonal en tejido cerebral de ratas Holtzman con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios; y su asociación con el daño axonal. **Metodología:** Se utilizó tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios y ratas sanas sacrificadas a diferentes tiempos postratamiento (48 horas, 5 días, 2, 8 y 12 meses). Las muestras se procesaron por inmunohistoquímica, para evaluar el patrón de inmunorreactividad de las proteínas. **Resultados:** En ratas con NCC el patrón de inmunorreactividad de kinesina y dineína se caracterizó por la acumulación patológica de estas proteínas en forma de esferoides y varicosidades axonales en el tejido alrededor del cisticerco con ausencia de esta alteración en ratas sanas (valor  $p < 0.05$ ). Al comparar los valores de los grupos de ratas con NCC tratadas y no tratadas, no se encontraron diferencias estadísticas, aunque en el grupo no tratado hubo tendencia a incrementarse en el tiempo. Las hinchazones axonales prevalecieron en materia gris. Se encontró correlación positiva entre el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras y daño axonal (neurofilamento). **Conclusiones:** En ratas con NCC existe acumulación patológica las proteínas kinesina y dineína en forma de hinchazones

axonales en el tejido que rodea al cisticerco indicando presencia de daño en el transporte axonal y se asociado con daño axonal.

### **PALABRAS CLAVE**

Neurocisticercosis, transporte axonal, kinesina, dineína, neurofilamento.

## ABSTRACT

Neurocysticercosis is a parasitic disease of the CNS that causes acquired epilepsy and is caused by the larval form of the cestode *Taenia solium*. It has a chronic course and symptomatic patients are characterized by seizures and epilepsy. Studies in laboratory rats with NCC report axonal damage characterized by the accumulation of proteins (neurofilament, APP) in the form of axonal swellings, which could be related to impaired axonal transport. **Objective:** To evaluate the immunoreactivity pattern of the motor proteins kinesin and dynein as markers of damage to axonal transport in brain tissue of Holtzman rats with NCC treated and untreated with antiparasitics; and its association with axonal damage. **Methodology:** Brain tissue from NCC rats treated and untreated with antiparasitics and healthy rats sacrificed at different post-treatment times (48 hours, 5 days, 2, 8 and 12 months) was used. The samples were processed by immunohistochemistry, to evaluate the immunoreactivity pattern of the proteins. **Results:** In rats with NCC, the immunoreactivity pattern of kinesin and dynein was characterized by the pathological accumulation of these proteins in the form of spheroids and axonal varicosities in the tissue around the cysticercus, with an absence of this alteration in healthy rats (p-value <0.05). When comparing the values of the groups of rats with treated and untreated NCC, no statistical differences were found, although in the untreated group there was a tendency for them to increase over time. Axonal swellings prevailed in gray matter. A positive correlation was found between the immunoreactivity pattern of motor proteins and axonal damage (neurofilament). **Conclusions:** In rats with NCC there is pathological accumulation of kinesin and dynein proteins in the form of axonal swellings in the tissue surrounding the

cysticercus indicating the presence of damage in axonal transport and is associated with axonal damage.

### **KEYWORDS**

Neurocysticercosis, axonal transport, kinesin, dynein, neurofilament

## I. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria del sistema nervioso central (SNC) (1,2) y es una causa importante de epilepsia adquirida en personas de países endémicos de América Latina, África y Asia (3). Esta enfermedad es causada por la forma larvaria del cestodo *Taenia solium* (1). La NCC humana ocurre cuando el hombre se infecta al consumir accidentalmente los huevos de *T. solium*, que al llegar al sistema digestivo eclosionan y liberan las oncosferas. Estas últimas atraviesan la mucosa intestinal y migran a diversos tejidos desarrollando como cisticerco y cuando se localizan en SNC, la infección (o enfermedad) se denomina NCC (1,4). Los cisticercos pueden mantenerse viables por meses o años, observándose una inflamación leve en el tejido que rodea al parásito (40), hasta que comienzan a degenerarse perdiendo su viabilidad y en algunos casos llegan a calcificarse (1,4). Cuando el cisticerco empieza a degenerar ya sea de forma natural o por el tratamiento antiparasitario se exagera la respuesta inflamatoria y la sintomatología neurológica en el paciente que incluye cuadros de convulsiones (4,5).

La NCC es una enfermedad de curso crónico, y el estudio en modelos animales de laboratorio ha permitido describir algunos aspectos fisiopatológicos importantes en esta enfermedad, como la existencia de daño axonal en las neuronas que están alrededor del cisticerco (6). Uno de los modelos animales que presenta una patología similar al del hombre, es el modelo de NCC en ratas Hotzman descrito por Verastegui y colaboradores (2). En este modelo animal la infección se realiza por vía intracraneal con oncosferas activadas de *T. solium*, los cuales

posteriormente desarrollan a cisticercos en el tejido cerebral; siendo un modelo fácil de replicar para el estudio de la NCC (2). Empleando este modelo animal en rata se ha reportado incremento de la autofagia en células neuronales en el tejido que rodea al parásito, siendo una autofagia desregulada (7). Así mismo se ha reportado daño axonal con presencia de hinchazón axonal conocidos como esferoides en donde existe acúmulo de proteínas del citoesqueleto axonal como neurofilamentos (NFP), proteína precursora amiloidea (APP) (6) y acúmulo de autofagosomas (7). En conjunto, estos hallazgos estarían asociados a un probable deterioro a nivel del transporte axonal que precederían a la degeneración y muerte de las células neuronales (6,7).

El transporte axonal es un proceso esencial para la viabilidad y funcionalidad de la neurona, una falla o alteración a este nivel llevaría a la degeneración y muerte neuronal (8). El transporte axonal es responsable del movimiento de distintos componentes celulares (mitocondrias, autofagosomas, vesículas sinápticas y proteínas) desde el cuerpo de la neurona hasta la punta del axón y viceversa (8,9). El movimiento de los componentes celulares a través del axón es impulsado por las proteínas motoras (kinesina y dineína) y los microtúbulos (8,9). En enfermedades neurodegenerativas tanto en pacientes como en modelos animales las proteínas motoras se encuentran reducidas en su expresión y acumuladas en las áreas de hinchazón axonal junto a otros componentes que transportan como NFP y APP (18,19, 21). La exposición de las neuronas a agentes infecciosos virales y compuestos tóxicos presenta características similares, es decir disminución en la expresión y acúmulo de estas proteínas en los axones (13,14,15,20). Demostrando que la alteración en el transporte axonal puede desencadenarse por diversos factores

adversos y asociarse con el acúmulo de los componentes que transportan a través del axón afectando la funcionalidad de la neurona (8,9).

De acuerdo a los estudios previos, resulta necesario evaluar el daño en el transporte axonal como un posible mecanismo de daño neuronal en la NCC. Por lo cual, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína como marcadores de daño en el transporte axonal y su asociación con el daño axonal en tejido cerebral de ratas con NCC. Para ello se evaluó el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína por inmunohistoquímica en tejido cerebral de 3 grupos experimentales (ratas con NCC que recibieron tratamiento antiparasitario, ratas con NCC sin tratamiento antiparasitario y control sano) sacrificadas a diferente tiempo postratamiento. Los resultados obtenidos nos permitirán comprender mejor la patogenia de la NCC y su asociación con el daño en el transporte axonal. Así mismo, esto permitirá orientar futuros estudios a comprender o evaluar las vías involucradas para que se desencadene este proceso patológico en la NCC y diseñar alternativas terapéuticas dirigidas a regular esta alteración y evitar la progresión de la degeneración neuronal.

### **1.1 Planteamiento del problema**

La NCC es un problema de salud pública, donde los pacientes sintomáticos presentan cuadros de convulsiones y epilepsia, que los imposibilita a desarrollar sus actividades diarias afectando su calidad de vida y afectando su productividad económica (1). El parásito puede mantenerse viable por largo tiempo con una inflamación leve en el tejido que lo rodea que al ser constante en el tiempo irá

causando daño neuronal observándose hinchazones axonales en el tejido que rodea al parásito. Así mismo, cuando el cisticerco empieza a degenerar se incrementa la inflamación y la sintomatología neurológica; siendo necesario el tratamiento con drogas antiparasitarias asociado a corticoides, para reducir la inflamación (1,24).

Por otro lado, en los últimos años dado que la NCC es una enfermedad crónica de meses a años, el uso de modelos animales ha permitido describir aspectos fisiopatológicos importantes que se dan durante el curso del desarrollo de la enfermedad de NCC (2). El daño o hinchazón axonal es un hallazgo reciente descrito en la NCC del cual se desconocen los mecanismos y vías implicadas que llevan a esta patología; caracterizado por el acúmulo anormal de proteínas (NFP, APP) (6,7). Así mismo, se ha reportado que en enfermedades neurodegenerativas el acúmulo anormal de proteínas y otros componentes a lo largo del axón está asociado a un daño en las proteínas que conforman la maquinaria de transporte axonal (8,11,12). De igual manera, la exposición a agentes patógenos como virus neurotrópicos y compuestos tóxicos, conducen a un daño en el transporte axonal, caracterizado principalmente por una reducción en la expresión de las proteínas motoras dineína y kinesina (13,14,15). Estas proteínas se acumulan a nivel de las áreas de hinchazón axonal (18,19, 21, 35). Sin embargo, en la NCC no se ha evaluado la existencia de daño en el transporte axonal y su asociación con el acúmulo anormal de proteínas como NFP, APP, autofagosomas en estas zonas de hinchazón axonal. Así mismo, se desconoce que tanto influiría el tratamiento antiparasitario en exacerbar el daño en el transporte axonal y si es reversible en el tiempo. Por lo cual, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Existirá un cambio en el patrón de inmunorreactividad de las proteínas de transporte axonal kinesina y dineína en tejido cerebral de ratas Hotlzman con Neurocisticercosis y el tratamiento antiparasitario incrementará esta alteración?

## **1.2 Justificación del estudio**

Estudiar el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína en tejido cerebral de ratas con NCC es importante ya que sería un indicador de presencia de daño en el transporte axonal. Este estudio permitirá comprender mejor la patología neuronal en la enfermedad de NCC, en donde se reporta la presencia de hinchazón axonal con acúmulo anormal de proteínas (NFP y APP) y autofagosomas. Así mismo, las proteínas motoras que se plantean evaluar son componentes importantes del transporte axonal (kinesina y dineína). En diferentes enfermedades se reportan que cualquier alteración o daño a nivel de las proteínas motoras llevaría al acúmulo anormal de otros componentes citoplasmáticos en las áreas de hinchazón axonal y posterior contribución a la muerte neuronal. Por otro lado, el estudio sobre la patogénesis de la NCC en humanos resulta difícil de realizar por ser una enfermedad crónica que puede tomar meses a años hasta la aparición de los primeros síntomas. Por lo tanto, los modelos animales son útiles para describir los cambios fisiopatológicos que se dan a nivel del tejido cerebral por la presencia del parásito. Por consiguiente, en este estudio se evaluará el cambio en el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína como indicadores de daño en el transporte axonal en tejido cerebral de ratas con NCC, ya que es un modelo fácil y preciso para reproducir la enfermedad de NCC. Por otro lado, evaluar el patrón de inmunorreactividad en ratas con NCC que recibieron tratamiento antiparasitario, permitirá determinar si el tratamiento incrementa el

daño en las proteínas motoras, por una respuesta inflamatoria exacerbada y si este daño es reversible en el tiempo. Identificar la existencia de alteración en las proteínas del transporte axonal permitiría en futuros estudios determinar las causas o factores que están mediando este daño y buscar alternativas terapéuticas dirigidas a regular este cambio y progresión de la degeneración neuronal.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína como marcadores de daño en el transporte axonal en tejido cerebral de ratas Holtzman con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios; y su asociación con el daño axonal.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Evaluar el patrón de inmunorreactividad de kinesina mediante la técnica de inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios comparado con un grupo control sano a diferente tiempo postratamiento.
- Evaluar el patrón de inmunorreactividad de dineína mediante la técnica de inmunohistoquímica en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios comparado con un grupo control sano a diferente tiempo postratamiento.
- Evaluar el daño axonal mediante el número de hinchazones axonales reactivos a neurofilamento (NFP) en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios comparado con un

grupo control sano a diferente tiempo postratamiento, a través de la técnica de inmunohistoquímica.

- Determinar la correlación que existe entre la inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína con el marcador de daño axonal en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios.

### **III. HIPÓTESIS**

En la neurocisticercosis existe un cambio en el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína que se caracteriza por la formación de hinchazones axonales con acumulación de estas proteínas, el que se refleja como un daño en el transporte axonal. Este cambio se incrementa con el tratamiento antiparasitario.

### **IV. MARCO TEÓRICO**

#### **4.1 Neurocisticercosis**

La NCC es la enfermedad parasitaria más común del SNC en el ser humano, generada por la forma larvaria del cestodo *Taenia solium*. Esta enfermedad es una causa importante de epilepsia adquirida y convulsiones en pacientes sintomáticos (1). La NCC es endémica en países de África, América Latina y Asia donde condiciones como mala higiene, déficit sanitario y pobreza favorecen la transmisión de la enfermedad (3). En el Perú, se reporta una seroprevalencia del 36,9% en una comunidad endémica de la zona norte, con una alta proporción de personas asintomáticas; siendo una de las más altas

reportadas en América Latina (22). El hospedero definitivo de *T. solium* es el ser humano, que alberga la forma adulta del parásito, el cerdo constituye el hospedero intermediario natural que alberga el estadio de cisticerco. Sin embargo, el humano también puede actuar como un hospedero intermediario accidental al ingerir los huevos de *T. solium* (4). Una vez que los huevos son ingeridos, al llegar al intestino eclosionan y liberan las oncosferas que atraviesan la pared intestinal y se diseminan a múltiples tejidos (ojos, piel, músculo y con alta afinidad por SNC) (1). En los tejidos, las oncosferas se diferencian hasta establecerse como cisticercos (23).

En el SNC, los cisticercos en un inicio se encuentran en una etapa vesicular en la que está presente una membrana alrededor del parásito que contiene un líquido transparente que rodea al escólex y puede mantenerse viable por meses a años (4). Al entrar en proceso de degeneración, los cisticercos se encuentran en etapa coloidal, en donde el líquido vesicular se vuelve turbio y el escólex se deteriora (4). En la etapa granular, el cisticerco ya no es visible, porque la pared del quiste se espesa y el escólex se convierte en gránulos. Finalmente, en la última etapa calcificada, aparece un nódulo calcificado no viable (4,5).

### **Síntomas clínicos:**

Los síntomas clínicos de la enfermedad pueden variar desde una infección completamente asintomática a una enfermedad severa y muerte (1). Las manifestaciones clínicas dependen del número, tamaño, ubicación de los quistes e intensidad de respuesta inflamatoria del huésped (1). Generalmente en la NCC parenquimatosa, se presentan convulsiones, los cisticercos viables pueden

sobrevivir por años con síntomas neurológicos intermitentes (24). Entre las manifestaciones clínicas más recurrentes en pacientes sintomáticos están las convulsiones (80%), déficit neurológico focal (16%), aumento de la presión intracraneal (12%) y deterioro cognitivo (5%) (25). Las convulsiones se incrementan cuando el parásito empieza a degenerar, lo cual se debe a un incremento de la inflamación local (26). En NCC extraparenquimatosa, los quistes están ubicados en los ventrículos cerebrales, pudiendo causar hidrocefalia; también pueden ubicarse en el espacio subaracnoideo en cuyo caso la enfermedad se conoce como NCC racemosa, pudiendo localizarse a nivel de la fisura de Silvio y crecer a nivel de los espacios interhemisféricos o cisternas basales (24). Este tipo de NCC, presenta una alta tasa de mortalidad de hasta el 20% y en la mayoría de los casos requieren de cirugía ya que el efecto de las drogas es bajo (24).

### **Tratamiento:**

Los fármacos antiparasitarios de elección para tratar la NCC incluyen praziquantel (PZQ) y albendazol, ya que los quistes o cisticercos no se resuelven espontáneamente a corto plazo (1). El uso de antiparasitarios en pacientes con NCC puede exacerbar los síntomas neurológicos, debido a una respuesta inflamatoria incrementada por la muerte del parásito, recomendándose el uso combinado de antiparasitarios y esteroides; sin embargo, la respuesta inflamatoria puede ser grave en pacientes con muchos quistes y lesiones extensas (1). Durante el tratamiento, se genera una respuesta de tipo Th1, con una respuesta inflamatoria prominente dirigido contra el parásito, que puede dañar gravemente al tejido cerebral y la combinación con corticoides, genera

una respuesta mixta tipo Th1 y Th2, que podrían amortiguar la inflamación y promover la resolución de la lesión (27,28).

### **Respuesta inflamatoria**

La respuesta inmune celular durante la NCC es diversa y distinta variando de acuerdo a la localización, número y viabilidad del cisticerco (27). Una vez que la oncosfera se establece en el parénquima cerebral hasta desarrollar el cisticerco, es seguido de un periodo de varios meses a años en el que el paciente es completamente asintomático, lo cual se debe al mecanismo de evasión sistema inmune del hospedero (4). A medida que el cisticerco comienza a degenerar de forma natural o debido al tratamiento antiparasitario, se intensifica una respuesta inmune inflamatoria, con aumento en la producción de citoquinas, proliferación de astrocitos y gliosis, activación de las células endoteliales afectando la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) que facilitan la infiltración y migración de leucocitos (27).

En los análisis histopatológicos de tejido cerebral de humano, los quistes degenerados están rodeados por un granuloma maduro, compuesto por células gigantes multinucleadas, rodeado por una capa fibrosa gruesa, seguido de un área rico en leucocitos, como macrófagos, linfocitos T, células plasmáticas, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y microglía cerebral (33). De igual forma, en el tejido cerebral de cerdos naturalmente infectados, se observó que el número de células inmunes y capa de colágeno aumenta con el grado de inflamación; y que el tratamiento antiparasitario después de 2 a 5 días resulta en un mayor grado de inflamación con formación de granuloma (34). En ratas

con NCC, los cisticercos viables se encuentran rodeados por tejido fibrótico, con presencia de numerosos macrófagos, linfocitos, heterófilos (neutrófilos y eosinófilos), células plasmáticas, infiltrado perivascular dentro del área de gliosis hasta 300  $\mu\text{m}$  del borde del cisticerco, siendo las células plasmáticas las más abundantes (6).

### **Hallazgos en modelos animales para el estudio de la NCC**

La NCC es una enfermedad parasitaria de progresión lenta, que afecta al SNC y causa epilepsia adquirida en personas de zonas endémicas a nivel mundial. Al ser una enfermedad de curso crónico, estudios en modelos animales de cerdos y ratas con NCC, han permitido describir distintos cambios patológicos que se dan en el tejido cerebral durante la enfermedad (2,16). En el modelo con ratas, la infección intracraneal con oncosferas activadas de *T. solium*, favorece el desarrollo de cisticercos que exhiben características idénticas a las observadas en humanos y cerdos (2). Los cisticercos se ubican a nivel del tejido cerebral parenquimatoso y extraparenquimatoso, exhibiendo cambios histopatológicos importantes como fibrosis, infiltrado inflamatorio y angiogénesis (2). Así mismo, en la NCC existe disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), con sobreexpresión de marcadores angiogénicos, como es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF2) en el tejido que rodea a los cisticercos viables ubicados a nivel parenquimatoso y corticomeníngeo (17). *In vitro*, los antígenos excretorios y secretorios del cisticerco inducen angiogénesis, alterando la permeabilidad de la BHE (17). Por lo cual, el modelo en ratas constituye un modelo animal preciso, barato y fácil de replicar para estudiar la NCC (2).

A nivel de la patología axonal de tejido cerebral de ratas, cerdos y humanos con NCC, existe la presencia de hinchazón axonal en forma de esferoides (6). Los esferoides presentan mayor inmunorreactividad a la proteína precursora amiloide (APP) y al neurofilamento (NFP) en humanos y ratas con NCC; las cuales se observan como acúmulos dentro de estas estructuras; indicando un probable deterioro en el transporte axonal (6). En ratas con NCC, la presencia de los esferoides se extiende hasta una distancia promedio de 1500 um alrededor del cisticerco en tejido cerebral (6). Además, en otras enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral isquémica y traumática, la hinchazón axonal es un hallazgo importante de degeneración axonal que podrían preceder a la muerte de las células neuronales (6). Así mismo, en un reciente estudio, se evidenció la existencia de autofagia desregulada en las neuronas que rodean al cisticerco, con acúmulo de autofagosomas que no llegan a fusionarse con los lisosomas en las regiones de hinchazón axonal, que podría estar asociado a un fallo o daño en el transporte axonal (7).

#### **4.2 Degeneración o daño axonal**

La degeneración axonal y dendrítica es una patología temprana común de muchos trastornos neurodegenerativos y que ante ciertos estímulos los axones y dendritas pueden exhibir características de degeneración como: degradación terminal, retracción neurítica, patología sináptica e hinchazón focal conocida con el término de “neurita distrófica” que podría contribuir al progreso de la enfermedad y síntomas clínicos (29). El proceso de degeneración axonal es un proceso que consiste en la destrucción de axones, que contribuye a la disfunción

neuronal y muerte de las células neuronales (30). Además, es un proceso que puede ser activado por diferentes estímulos que incluyen daño mecánico, defectos en el transporte axonal o exposición a algunos fármacos (30).

Una forma de observar la presencia de daño axonal en el tejido cerebral es a través de la presencia de esferoides y pequeñas varicosidades axonales (31). Estas estructuras, son áreas de hinchazón axonal en forma de burbujas que se forman en la mayoría de los axones en degeneración (31). Siendo los esferoides, hinchazones axonales de 10 a 50  $\mu\text{m}$  de diámetro y varicosidades axonales hinchazones de diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$  (38). Su formación se asocia a la respuesta a lesiones, estrés oxidativo, factores inflamatorios y moléculas neurotóxicas y generalmente contienen elementos del citoesqueleto, orgánulos y proteínas; estos esferoides eventualmente pueden romperse liberando su contenido al espacio extracelular (31).

### **Neurofilamento como marcador de daño axonal**

Los neurofilamentos (NFP) son proteínas de filamento intermedio que se encuentran en las neuronas, compuesta por subunidades de neurofilamento alto (NF-H), medio (NF-M) y bajo (NF-L) (32). El neurofilamento es responsable de mantener el calibre axonal mejorando la velocidad de conducción eléctrica y se mueven a lo largo del axón usando las proteínas motoras kinesina y dineína (32). Su actividad se encuentra regulada por modificaciones postraduccionales (PTM) como fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, oxidación y nitración, siendo la fosforilación la más estudiada (39). Tanto la desfosforilación como la hiperfosforilación del NF se han relacionado con diversas enfermedades

neurodegenerativas como esclerosis múltiple, Alzheimer, Parkinson; en estas enfermedades el análisis histopatológico muestra grandes agregados de la proteína tanto en el cuerpo y axón de la neurona (12). La hiperfosforilación de los NFPs, podría alterar su interacción iónica con los motores moleculares e interrumpir el transporte axonal llevando a su agregación, lo cual dificultaría su función para la distribución de vesículas y otros orgánulos como las mitocondrias progresando a una posterior neurodegeneración (12,39).

### **4.3 Transporte axonal**

El transporte axonal es esencial para las neuronas, ya que permite una comunicación eficiente entre el cuerpo celular y la punta del axón (8). Es un proceso, por el cual las proteínas motoras viajan activamente por los microtúbulos para entregar diversas cargas, como orgánulos, proteínas entre otros componentes esenciales para el desarrollo, funcionamiento y supervivencia de los nervios (9). Esta maquinaria está compuesta principalmente por microtúbulos y proteínas motoras (kinesina y dineína) (8,9). Cualquier alteración a nivel de estas proteínas motoras contribuirán a cambios degenerativos en las células neuronales o progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Huntington (10).

#### **Proteínas motoras:**

- **Kinesina:** Es el principal motor molecular que transporta los componentes en dirección anterógrada (desde el soma hasta la punta del axón). Transporta vesículas sinápticas, neurofilamentos, proteínas citoplasmáticas, enzimas, Tau, APP, tubulina y actina (11). Adicional a ello, existen orgánulos unidos

a la membrana (mitocondrias, endosomas y lisosomas) y mRNAs que presentan movimiento bidireccional, siendo transportados por ambas proteínas motoras dineína y kinesina (8). Las kinesinas están codificadas por 45 genes, 38 de los cuales se expresan en el sistema nervioso (9). Estructuralmente está compuesto por dos cadenas pesadas codificadas por KIF5A, KIF5B y KIF5C y dos cadenas ligeras codificadas por KLC1, KLC2, KLC3 y KLC4 (9). La cadena pesada presenta dominios de unión ATPasa a los microtúbulos y la subunidad de cadenas ligeras es importante para la unión a la carga y actividad motora (36). Además, su actividad se encuentra regulada por quinasas, en donde su unión a microtúbulos es promovida por la acetilación de la tubulina y la unión a las cargas es promovida por proteínas adaptadoras del soma (JNK, JIP1) (8,36). Usan la energía química del ATP para impulsar el movimiento a través de los microtúbulos (9) y algunas kinesinas pueden traducirse localmente en los axones después de una lesión, siendo necesario para el crecimiento axonal (37).

- **Dineína citoplasmática:** Es una proteína motora que impulsa el transporte de diversos componentes en dirección retrógrada (desde la punta del axón hacia el soma) como señales de endosomas, autofagosomas y señales de lesiones (11). Su estructura consiste en dos cadenas pesadas (DHC), dos cadenas intermedias (DIC), dos cadenas intermedias ligeras (DLIC) y 3 cadenas ligeras (DLC), el complejo se une a los microtúbulos e hidroliza ATP (8). La región carboxilo terminal de la cadena pesada presenta un anillo de unión ATPasa; el extremo amino de DHC media la dimerización y unión

a DIC, DLIC y DLC para formar el dominio de unión a la carga y DIC tiene dominios de unión a la dinactina (48). La proteína dinactina es la que modula la unión de dineína a sus cargos (8). Esta proteína está compuesta por 8 subunidades (p150, dinamitina/p50, Arp1, Arp11, p62, p24, p25 y p2); la subunidad p150 forma un puente entre DIC y los microtúbulos y la sobreexpresión de dinamitina/p50 inhibe el transporte axonal al provocar la sobreexpresión de p150 y p24, alterando al complejo dineína- dinactina y BICD2 permite estabilizar al complejo permitiendo su movimiento (48).

### **Proteínas motoras kinesina y dineína como marcadores de transporte axonal**

En las neuronas, el transporte axonal esta mediado principalmente por 2 proteínas motoras (dineína, kinesina) y los microtúbulos, siendo un proceso esencial para la comunicación, supervivencia y desarrollo de las neuronas (8). Defectos en cualquier punto del sistema de transporte axonal, pone en riesgo a las neuronas de sufrir de degeneración y progresión de algunas enfermedades como Alzheimer y Huntington (10,12).

Estudios en pacientes con Alzheimer o esclerosis múltiple, reportan una reducción significativa en los niveles de expresión de las proteínas motoras, indicando un déficit en el transporte axonal (18,19). Así mismo, en modelos animales como ratones con gangliosidosis, a nivel inmunohistoquímico las neuronas exhibieron un transporte axonal alterado, con esferoides positivos a proteínas como APP, NFP, kinesina y dineína que contribuirían considerablemente a la presentación clínica de la enfermedad (21). De igual

forma, en ovinos con distrofia neuroaxonal las áreas de hinchazón axonal presentaron acumulación de kinesina y dineína con evidente interrupción en el transporte de NFP (35).

La infección con el virus de la encefalomiелitis murina en ratones conlleva a un incremento en el acúmulo axonal de neurofilamento no fosforilado (np-NFP), reducción de neurofilamento fosforilado (p-NFP), y no se encontraron esferoides positivos para dineína, pero sí para kinesina, esto a mayor tiempo postinfección (13). A nivel transcripcional, los genes relacionados a kinesina, dineína y APP presentaron una regulación negativa (13). En un estudio, en lesiones subagudas comparado con las crónicas causadas por el virus de la rabia, se observó que los genes de kinesina y dineína estuvieron regulados a la baja, sin embargo se encontró un incremento en la inmunorreactividad del p-NF (14). Así mismo, la exposición de las neuronas a agentes externos como óxido nítrico, toxina 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP) llevan a una acumulación anormal de proteínas y vacuolas autofágicas en los axones con reducción en el nivel de expresión de las proteínas motoras, generando un déficit en el transporte de autofagosomas necesarios para el aclaramiento de las proteínas (15, 20). En conjunto, estos hallazgos indican que la exposición de las neuronas a agentes externos como patógenos y sustancias tóxicas influyen en generar una desregulación de la maquinaria de transporte axonal (13,14,15,20).

## **V. METODOLOGÍA**

### **5.1 Diseño del estudio**

En el presente estudio se utilizaron muestras procedentes de un estudio experimental controlado. Se evaluaron tejidos de cerebro de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios y grupo control sano. Se analizó el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína a diferentes tiempos postratamiento.

## **5.2 Lugar de estudio**

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas del LID de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

## **5.3 Metodología para la obtención de muestras**

Se utilizaron muestras procedentes de un estudio experimental que tiene como objetivo general: “Evaluar la respuesta inflamatoria y cambios neuropatológicos en cerebro de ratas con Neurocisticercosis sacrificadas a diferentes tiempos postratamiento”, el cual cuenta con la constancia de aprobación por el comité de ética de la UPCH para el uso de animales (SIDISI:206876).

Para este estudio se analizó el patrón de inmunorreactividad las proteínas motoras kinesina y dineína como marcadores de daño o alteración en el transporte axonal y neurofilamento como marcador de daño axonal en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios y grupo control sano a diferente tiempo postratamiento. Las muestras de tejido cerebral de los grupos experimentales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas del LID – UPCH. A continuación,

se describe la metodología resumida que se realizó en el estudio experimental para la obtención de las muestras.

- **Animales:** Se infectó por vía intracraneal a ratas consanguíneas Holtzman de 12 a 15 días de edad con 120 oncosferas activadas de *T. solium* de acuerdo con lo descrito por Verastegui *et al.*, (2015). Los animales provinieron del Bioterio de la UPCH. La tabla 1 muestra la distribución del número de animales por grupo experimental. El grupo de ratas infectadas se calculó considerando un 80 % de éxito de infección experimental para el desarrollo de la NCC.

**Tabla 1.** Grupos experimentales del estudio previo

Grupos Experimentales	Número de animales
Grupo 1: Grupo control	29
Grupo 2: Ratas con NCC no tratados	55
Grupo 3: Ratas con NCC tratados con Praziquantel (PZQ) y Oxfendazol	98
<b>Total</b>	<b>182</b>

- **Tratamiento antiparasitario:** Las ratas fueron tratadas a los 6 meses postinfección. Del total de 153 ratas infectadas, 98 recibieron praziquantel (100 mg/kg/día) + oxfendazol (75 mg/kg/día) por vía oral y el grupo restante recibió un vehículo (0.5% de carboximetilcelulosa con Tween-80 al 10%). Las dosis fueron administradas durante un periodo de 5 días, dividida en 2 tomas diarias. Finalmente, las ratas fueron sacrificadas a distintos tiempos postratamiento: a las 48 horas post administración de la primera dosis, a los 5 días de iniciado el

tratamiento, y a los 2, 8 y 12 meses de finalizado el tratamiento de 5 días.

- **Procesamiento de los tejidos:** Para el sacrificio, los animales fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/ kg) vía intraperitoneal. Las ratas se perfundieron mediante punción cardiaca directa con 300 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con 200 mL de paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros obtenidos fueron fijados en PFA / PBS durante 24 horas y deshidratados en una batería de alcoholes de forma ascendente hasta alcohol absoluto, xilol y embebidos en parafina de acuerdo a lo descrito anteriormente (2).

**Tabla 2.** Número de animales sacrificados en cada tiempo postratamiento por grupo experimental

Tiempos de sacrificio postratamiento	Grupos experimentales		
	Control	Grupo 1: Ratas con NCC no tratados	Grupo 2: Ratas con NCC tratados con Praziquantel y Oxfendazol
48 horas	6	11	20
5 días	6	11	20
2 meses	5	11	20
8 meses	6	11	19
12 meses	6	11	19
Total	<b>29</b>	<b>55</b>	<b>98</b>

#### 5.4 Procedimiento y técnicas

De acuerdo con el estudio previo, las muestras se conservaron en tacos con parafina. A partir de estos tacos se realizaron cortes de 5 mm empleando un micrótopo. Los cortes fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) para

su selección de acuerdo con dos criterios de inclusión (ubicación anatómica y número de quistes por cerebro). Posteriormente, los tejidos cerebrales seleccionados, fueron procesados a través de la técnica de inmunohistoquímica.

#### **5.4.1 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)**

Se realizó la tinción H&E para seleccionar las muestras que iban a ser procesadas por la técnica de inmunohistoquímica. En primer lugar, se realizaron cortes histopatológicos de 5 mm de grosor al total de muestras incluidas en parafina con el uso de un micrótomo. Luego, los tejidos fueron fijados en portálaminas con poli-L- lisina. Las láminas fueron desparafinadas en una estufa a 60°C por 45 min y luego colocados en los siguientes solventes xilol I, I, alcohol absoluto hasta alcohol de 95° y se hidrató con agua de caño a chorro. El rack de láminas fue sumergido en el colorante Hematoxilina de Harris por 2 min, seguido de lavado con agua. Luego se sumergió en agua ácida 1% (introducir y retirar), se lavó con agua amoniacal por 1 min, seguido de agua destilada. La contratinción se realizó con Eosina alcohólica al 5% por 30 segundos. Para la deshidratación y montaje, las láminas se colocaron en una batería creciente de alcoholes de 90°, 96° y alcohol absoluto, se secaron en la estufa por 5 min. Luego se pasó por xilol I y II y finalmente se hizo el montaje de las láminas con solución Entellan (Detalle del protocolo en el anexo 1).

Se seleccionaron únicamente, muestras que cumplían con los criterios de inclusión de ubicación anatómica (solo se seleccionaron tejidos con quistes parenquimatosos y corticomeníngeos) y número de quistes (no mayor de 3

quistes por cerebro), hasta completar el tamaño mínimo de muestra requerido para cada grupo. Tomando en cuenta la variable número de esferoides por cisticerco, se estimó un mínimo de 3 muestras por cada tiempo de sacrificio postratamiento para cada grupo experimental.

#### **5.4.2 Evaluación del daño del cisticerco**

La evaluación del daño de cisticerco se hizo a través de la observación de las láminas con tinción HE en el microscopio óptico para determinar el grado de daño de la membrana del cisticerco. La gravedad del daño del cisticerco se categorizó en cisticerco viable o sano: caracterizado por un tegumento bien definido, canal espiral preservado y escólex intacto. Cisticerco dañado: alteración del tegumento, ligero daño del subtegumento con vacuolización e infiltrado de células inflamatorias, dilatación del canal espiral (daño moderado), pérdida completa del tegumento, alteración severa del subtegumento (pérdida de canalículos excretorios) quiste con fibrosis o calcificación (daño severo).

#### **5.4.3 Inmunohistoquímica (IHC)**

Se realizó la técnica de IHC para evaluar la inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína (como marcadores de daño axonal) y neurofilamento (marcador de daño axonal) (Tabla 3).

Para evaluar la inmunorreactividad de los biomarcadores de kinesina: cadena pesada de kinesina (KIF5A) y cadena ligera de kinesina (KLC2), las láminas se desparafinaron colocando en una estufa a 64°C por 45 min, luego se colocó en xilol I, II y II por 3 minutos en cada solución y una batería decreciente de

alcoholes para hidratar la muestra. Para el desenmascaramiento o exposición de los antígenos, las láminas se sumergieron en coplins con citrato 10 mM (pH 6) + Tween 20 al 0.05% y estos coplins en una olla con agua hirviendo durante 30 minutos. Las láminas fueron lavadas con PBS y para el bloqueo de la peroxidasa endógena se añadió la solución peróxido de hidrógeno al 3% en metanol y se incubó por 15 minutos. Luego, se procedió a bloquear la unión de anticuerpos inespecíficos con PBS-Triton X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de cabra, 5% suero de caballo, 2.5% de BSA, las muestras se incubaron durante 1 hora a T° ambiente. Posteriormente se lavaron y para la incubación con el anticuerpo primario, las láminas se incubaron durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo primario Rabbit anti- KIF5A a una dilución 1/300 (concentración inicial de 0.1 mg/ml) y Rabbit anti-KLC2 a una dilución 1/300 (concentración inicial 0.6 mg/ml) diluido en la solución PBS1X Tritón X-100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra, de manera independiente para cada marcador. Al finalizar las láminas se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución PBS 1X que contenía 5% suero de caballo, 5% suero de cabra y el anticuerpo secundario Goat anti- rabbit HRP a la dilución 1/500 (concentración inicial 1 mg/ml). Posteriormente, se lavaron las láminas y la reacción antígeno- anticuerpo se detectó cubriendo la lámina con el sustrato cromogénico preparado agregando una gota (30 ul) del sustrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en 3 mL de solución tamponada (Kit de sustrato DAB ab64238- DAKO) y dejando incubar durante 1 minuto 30 segundos seguido de lavado con agua destilada, formándose un

precipitado marrón indicativo de reacción positiva. Seguidamente, se realizó una contratinción con Hematoxilina de Harris por 3 segundos y las láminas se deshidrataron en una batería creciente de alcoholes y se secaron para su posterior montaje con Entellan 1:1 (Detalle del protocolo en el anexo 2 y 3).

Para evaluar la inmunorreactividad del biomarcador de Dineína, se marcó la cadena intermedia de dineína (DIC), las láminas se desparafinaron con el mismo procedimiento indicado para kinesina. Para el desenmascaramiento o exposición de los antígenos, las láminas se sumergieron en un beaker con la solución citrato 10 mM (pH 6) + Tween 20 al 0.05% en ebullición dentro del microondas durante 15 minutos a una potencia de 6. Las láminas fueron lavadas con PBS y para el bloqueo de la peroxidasa endógena se añadió la solución peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 1X y se incubó por 30 minutos. Luego, se procedió a bloquear la unión de anticuerpos inespecíficos con PBS-Triton X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de cabra, 5% suero de caballo, 2.5% de BSA, las láminas se incubaron durante 1 hora a T° ambiente. Posteriormente se lavaron y para la incubación con el anticuerpo primario, las láminas se incubaron durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo primario Mouse anti- Dynein IC 1/2 a una dilución 1/25 (concentración inicial 200 ug/ml) diluido en la solución PBS1X Tritón X-100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra. Al finalizar las láminas se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución PBS 1X que contenía 5% suero de caballo, 5% suero de cabra y el anticuerpo secundario Goat anti- mouse HRP a la dilución 1/100 (concentración inicial 1 mg/ml). Posteriormente, se lavaron las láminas y la

reacción antígeno- anticuerpo se detectó cubriendo la lámina con el sustrato cromogénico preparado agregando una gota (30 ul) del sustrato 3,3´ diaminobenzidina (DAB) en 3 mL de solución tamponada (Kit de sustrato DAB ab64238- DAKO) dejando incubar durante 3 minutos, seguido de lavado con agua destilada, formándose un precipitado marrón indicativo de reacción positiva. Seguidamente, se realizó una contratinción con Hematoxilina de Harris por 3 segundos y las láminas se deshidrataron en una batería creciente de alcoholes y se secaron para su posterior montaje con Entellan 1:1 (Detalle del protocolo en el anexo 4).

Para evaluar la inmunorreactividad del biomarcador de Neurofilamento (NFP) las láminas se desparafinaron con el mismo procedimiento indicado para kinesina. Para el desenmascaramiento o exposición de los antígenos, las láminas se sumergieron en coplins con la solución citrato 10 mM (pH 6) + Tween 20 al 0.05%, los cuales fueron colocados en una olla con agua en ebullición durante 30 minutos. Las láminas fueron lavadas con PBS y para el bloqueo de la peroxidasa endógena se añadió la solución peróxido de hidrógeno al 3% en PBS 1X y se incubó por 30 minutos. Luego, se procedió a bloquear la unión de anticuerpos inespecíficos con PBS 1X-Triton X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de cabra, 5% suero de caballo, 2.5% de BSA y 2.5% de leche, las láminas se incubaron durante 1 hora a T° ambiente. Posteriormente se lavaron y para la incubación con el anticuerpo primario, las láminas se incubaron durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo primario Mouse anti- NFP a una dilución 1/400 (concentración inicial del anticuerpo de 0.1 mg/ml) diluido en la solución PBS1X Tritón X-

100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra. Al finalizar las láminas se lavaron con PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con la solución PBS 1X que contenía 5% suero de caballo, 5% suero de cabra y el anticuerpo secundario Goat anti- mouse HRP a la dilución 1/500 (concentración inicial 1mg/ ml). Posteriormente, se lavaron las láminas y la reacción antígeno–anticuerpo se detectó cubriendo la lámina con el sustrato cromogénico preparado agregando una gota (30 ul) del sustrato 3,3´diaminobenzidina (DAB) en 3 mL de solución tamponada (Kit de sustrato DAB ab64238- DAKO) se dejó incubar durante 2 minutos y 30 segundos, seguido de lavado con agua destilada, formándose un precipitado marrón indicativo de reacción positiva. Seguidamente, se realizó una contratinción con Hematoxilina de Harris por 3 segundos y las láminas se deshidrataron en una batería creciente de alcoholes y se secaron para su posterior montaje con Entellan 1:1 (Detalle del protocolo en el anexo 5).

**Tabla 3.** Lista de anticuerpos utilizados para IHC

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Dilución</b>	<b>Fuente</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>
Rabbit Ab Anti-rat KLC2	Cadena ligera de la proteína motora Kinesina	1:300	Abcam/ ab254848	Goat anti- IgG rabbit HRP Código52200336
Rabbit Ab anti-rat KIF5A	Cadena pesada de la proteína motora Kinesina	1:300	Sigma-Aldrich/ HPA004469	Goat anti- IgG rabbit HRP Código52200336
Mouse Ab Anti-Dynein IC 1/2	Cadena intermedia de la proteína motora dineína	1:25	Santa Cruz/ sc-13524	Goat anti- IgG mouse HRP Código52200341
Mouse Ab Anti-Neurofilament 200 kDa	Cadena pesada de neurofilamento	1:400	Fitzgerald/ 10R-N119a	Goat anti- IgG mouse HRP – Código52200341

#### **5.4.4 Análisis de imágenes**

Finalizado el procesamiento de las muestras por IHC, las láminas se escanearon haciendo uso del microscopio óptico a un objetivo de 20x que tiene acoplada la cámara Basler Ac2040 vinculado al Software ManualWSI. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ v1.21. Para el análisis, se tomó un área de 1500 micras alrededor del quiste y un área con similar ubicación en el tejido sano. Así mismo, esta área se separó en materia gris y blanca, haciendo uso de un atlas virtual de cerebro de rata (<https://scalablebrainatlas.incf.org/rat/PLCJB14>). Seguidamente con el programa ImageJ v1.21 se procedió a separar el tejido con DAB del fondo teñido con hematoxilina a través de la herramienta “color deconvolution” y criterio “HE-DAB” que permitió separar la imagen en 3 colores, seleccionando solo la imagen con fondo marrón para la cuantificación. Posteriormente, se cuantificó el número de esferoides y varicosidades axonales reactivos a cada marcador por separado.

#### **5.5 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se colocaron en una base de datos en el programa Microsoft Excel y fueron analizados con el software Stata 18. Los resultados fueron representados gráficamente con el software Prism Graphpad versión 8 mostrándola media y error estándar de la media (SEM). Para el análisis se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para poder evaluar si había diferencia estadística entre los tres grupos experimentales evaluados. También se usó la prueba de U de Mann-Whitney para evaluar

si había diferencia entre ubicación (materia gris y materia blanca) e hinchazones axonales (esferoides y varicosidades axonales) dentro de un mismo grupo experimental. Finalmente, para evaluar la asociación entre la inmunorreactividad de las proteínas motoras y daño axonal, se evaluó a través de la correlación de Spearman. Para todos los casos se consideró que un valor de  $p < 0,05$  indica una diferencia estadísticamente significativa.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Descripción de muestras

Para este estudio se trabajó con muestras de tejido cerebral incluido en parafina de un estudio previo, de los cuales se realizó un submuestreo (seleccionándose únicamente tejidos cerebrales con quistes parenquimatosos y corticomeníngeos con no más de 3 quistes por cerebro Fig.1). Del total de 182 cerebros evaluadas, se seleccionó y analizó 52 (28.6%) que cumplieron con los criterios de inclusión de ubicación anatómica (solo se seleccionaron tejidos con quistes parenquimatosos y corticomeníngeos) y número de quistes (no mayor de 3 quistes por cerebro) (tabla 4).

**Tabla 4.** Número de muestras analizadas por cada tiempo postratamiento

Tiempos de sacrificio postratamiento	Controles	Grupo de ratas con NCC no tratadas	Grupo de ratas con NCC tratadas (paziquantel + oxfendazol)
	#Cerebros sanos	# Cerebros infectados (# quistes)	# Cerebros infectados (# quistes)
48 horas	4	3 (3)	3 (4)
5 días	4	1 (3)	3(4)
2 meses	3	3 (3)	5 (5)
8 meses	3	4(6)	3 (3)

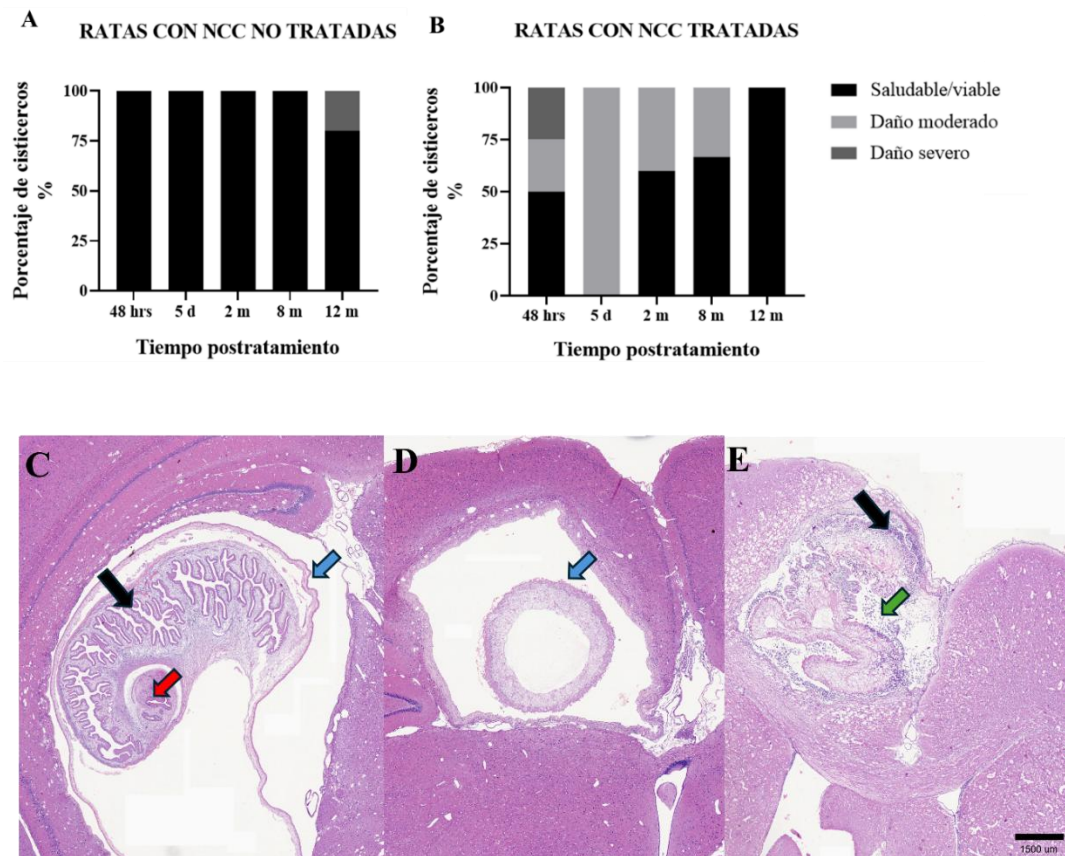
12 meses	4	4 (5)	3 (5)
Total	20	15 (20)	17(21)

## 6.2 Daño del cisticerco

Se evaluó el daño del cisticerco a través de los cambios histológicos en el tegumento y morfología del escólex (Figura 1). En el grupo no tratado el 100% de los cisticercos mostraron un tegumento y escólex sano a las 48 horas, 5 días, 2 meses y 8 meses. Únicamente a los 12 meses, se identificó un cisticerco con daño severo (pérdida del tegumento y calcificación) y el resto se encontraron viables representando el 80% (4/5) del total de quistes analizados para este tiempo (Figura 1A).

Respecto al grupo que recibió tratamiento antiparasitario, el daño en el cisticerco a lo largo del tiempo fue variado (Figura 1B). En las muestras analizadas a las 48 horas, el 50% (2/4) de cisticercos se encontraron saludables, mientras que el 25 % (1/4) presentó un daño moderado caracterizado por alteración moderada del tegumento y el otro 25% (1/4) presentó daño severo con pérdida del tegumento, alteración de los canales espirales y pérdida del escólex del cisticerco. A los 5 días postratamiento el 100% (4/4) de los cisticercos analizados presentaron un daño moderado, con alteración del tegumento, canales espirales dilatados, en las láminas no se pudo visualizar el escólex del parásito. De las muestras analizadas a los 2 meses postratamiento, el 60 % (3/5) de cisticercos se encontraron saludables y el 40 % (2/5) presentaron un daño moderado del tegumento. De las muestras analizadas a los 8 meses el 66.6% (2/3) de cisticercos se encontraron viables y el 33% (1/3) con daño moderado del tegumento. Finalmente, a los 12 meses postratamiento el 100% (5/5) de los cisticercos analizados se encontraron viables/

saludables (Figura 1B). Al analizar el total de cisticercos de este grupo de ratas con NCC tratadas, se encontró que 43% (9/21) presentó daño en el tegumento, indicando que el tratamiento antiparasitario con praziquantel y oxfendazol a las dosis usadas en este estudio no fue efectivo para causar la muerte o degeneración del cisticerco en el tiempo.

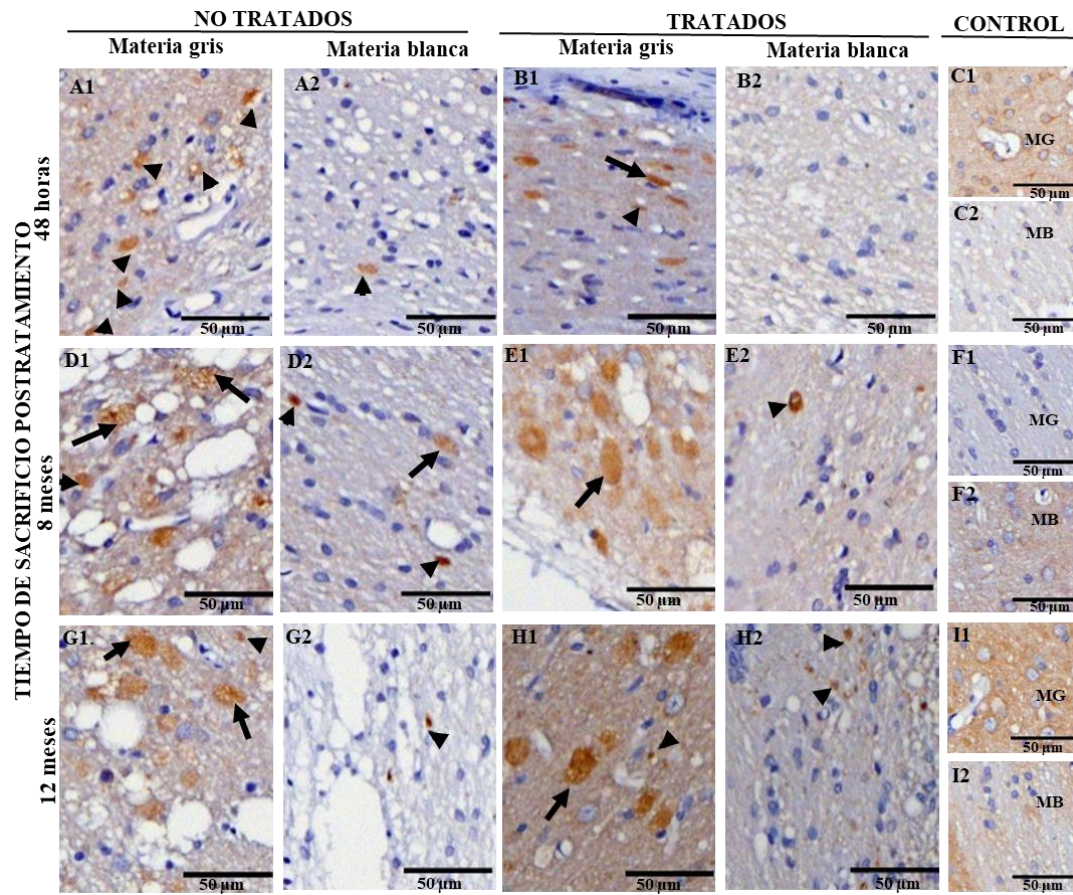


**Figura 1. Evaluación de daño en el cisticerco.** A. Porcentaje de cisticercos viables y dañados en ratas con NCC no tratadas. B. Porcentaje de cisticercos viables y dañados en ratas con NCC tratadas. C-D. Tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) en tejido cerebral de ratas con NCC con quistes ubicados en la corteza cerebral (parénquima). C. Cisticerco viable (tegumento quístico íntegro y escólex conservado). D. Cisticerco con daño moderado (alteración moderada del tegumento). E. Cisticerco con daño severo (infiltrado celular inflamatorio, pérdida del tegumento con vacuolización interior, canales espirales alterados). *Flecha azul: Tegumento del quiste. Flecha roja: señala ventosas y escólex. Flecha negra: canales espirales. Flecha verde: infiltrado de células inflamatorias. Fotomicrografía tomada a 20 x. Barra de escala 1500  $\mu$ m.*

### **6.3 Inmunorreactividad de Kinesina en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios a diferente tiempo postratamiento**

#### **6.3.1 Patrón de inmunorreactividad de la cadena pesada de Kinesina (KIF5A)**

El patrón de inmunorreactividad de KIF5A en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) se caracterizó por presentar la forma de esferoides como cuerpos ovalados con bordes regular de 10 a 50  $\mu\text{m}$  y varicosidades axonales como cuerpos ovalados de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (hinchazones axonales) con acúmulo de la proteína kinesina, presente hasta los 12 meses postratamiento. A diferencia del grupo control sano, en donde el patrón de inmunorreactividad se caracterizó por ausencia de hinchazones axonales reactivas a KIF5A y con un marcaje tenue alrededor del soma y axón de las neuronas (Figura 2).



**Figura 2. Patrón de inmunorreactividad de KIF5A en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento. (A, D, G) Tejido cerebral de ratas con NCC no tratadas. (B, E, H) Tejido cerebral de ratas con NCC tratadas. (C, F, I) Tejido cerebral de ratas sanas. Materia gris (MG): En ambos grupos (tratados y no tratados), se muestran abundantes esferoides como cuerpos ovalados con borde regular de 10 a 50  $\mu\text{m}$  (flecha) y varicosidades axonales como cuerpos ovalados con bordes regulares de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (cabeza de flecha). Materia blanca (MB): En ambos grupos (tratados y no tratados), escasa presencia de esferoides y varicosidades axonales. Control sano, ausencia de esferoides y varicosidades axonales reactivas a KIF5A en materia gris y blanca.**

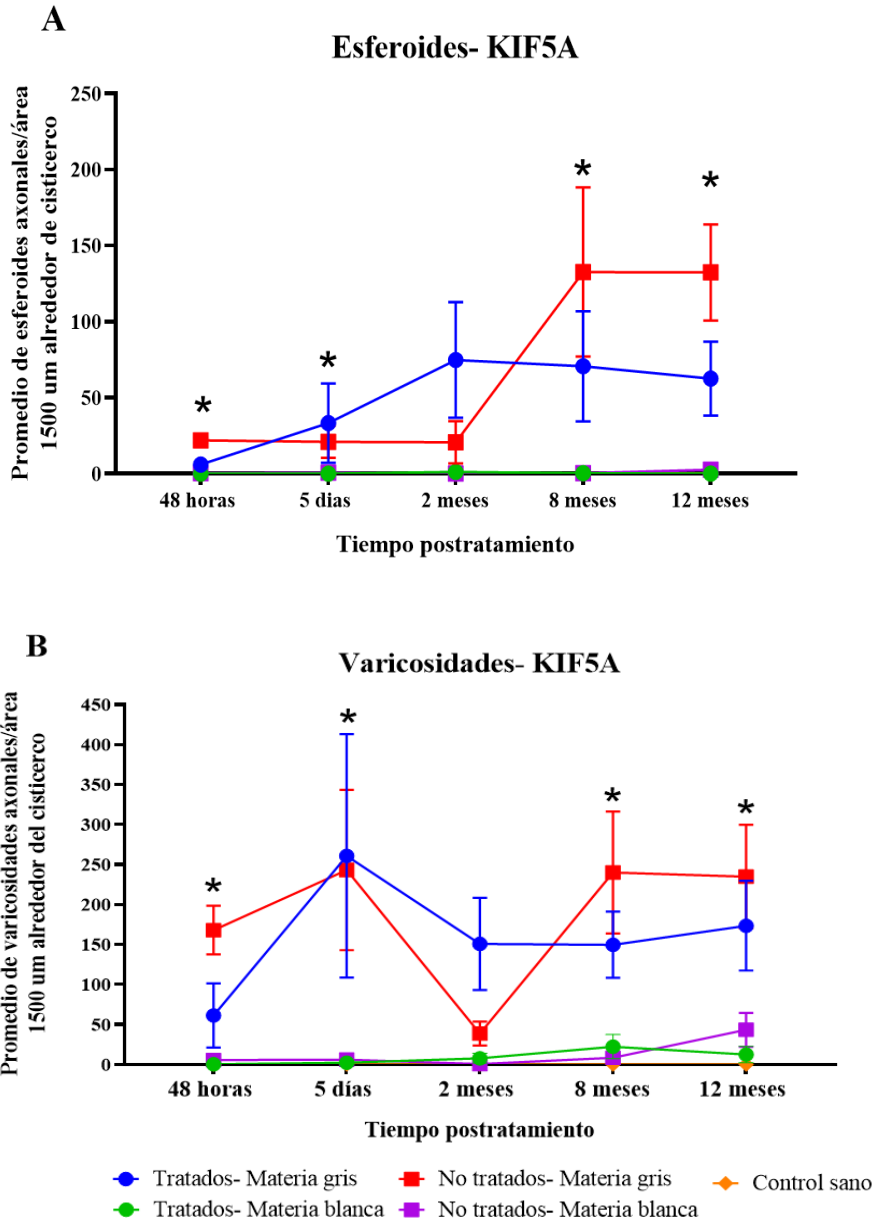
Para conocer si el patrón de inmunorreactividad de este biomarcador es útil como indicador de daño en el transporte axonal, se cuantificó las hinchazones axonales (esferoides y varicosidades axonales) reactivas a KIF5A en tejido cerebral de los 2 grupos infectados (tratados y no tratados) en un área de 1500  $\mu\text{m}$  alrededor del cisticercos y un área similar en el grupo control sano. Al comparar entre materia gris

y materia blanca el promedio de esferoides y varicosidades axonales en los grupos infectados no tratados, se encontró diferencias estadísticamente significativas en casi todos los tiempos a excepción de los 2 meses, siendo la materia gris la zona más afectada (se obtuvo valores  $p$  de 0.04 a las 48 horas y 5 días,  $p= 0.2$  a los 2 meses,  $p = 0.003$  a los 8 meses y  $p=0.01$  a los 12 meses). En el grupo tratado, se encontró diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos evaluados (valores  $p$  de 0.04 a las 48 horas y 5 días,  $p= 0.05$  a los 2 meses,  $p= 0.04$  a los 8 meses y  $p=0,02$  a los 12 meses). La materia gris presentó un mayor número de esferoides axonales (20-132; 6-62 por área) y varicosidades axonales (38-243; 61-260 por área) con acúmulo de la cadena pesada de la proteína kinesina para los grupos no tratados y tratados respectivamente. Por otro lado, en materia blanca los esferoides o varicosidades fueron escasos u ausentes (Fig 3, tabla 5), no se encontró diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de hinchazones axonales entre los grupos infectados con el grupo control sano en todos los tiempos. En la figura 3 se puede apreciar una elevada cantidad de esferoides y varicosidades axonales en materia gris para los grupos tratados y no tratados comparado con materia blanca.

Al comparar el promedio de esferoides y varicosidades entre los grupos infectados (no tratados y tratados) vs control sano, por cada tiempo, si se encontró diferencias estadísticamente significativas con el control sano (Tabla 5, anexo 6) excepto en el tiempo de 2 meses (obteniéndose valores  $p = 0.02$  a las 48 horas,  $p = 0.04$  a los 5 días,  $p = 0.055$  a los 2 meses y  $p = 0.01$  a los 8 y 12 meses). No se observó diferencia estadísticamente significativa en el promedio de esferoides y varicosidades axonales entre los grupos infectados tratados y no tratados ( $p =0.51$  a las 48 horas,

$p = 0.9$  los 5 días, 2 meses y 8 meses,  $p = 0.2$  a los 12 meses) (Anexo 6). Como se muestra en la figura 3, en el grupo no tratado el número de varicosidades tienen una tendencia a incrementarse en los últimos meses postratamiento (8 y 12 meses), aunque este incremento no fue estadísticamente diferente de los otros tiempos con valor  $p=0.14$  (Tabla 5). Por otro lado, en el grupo tratado el promedio de esferoides y varicosidades axonales se mantienen constante en todos los tiempos, con un ligero incremento de varicosidades axonales a los 5 días, aunque este incremento no fue estadísticamente significativo con valor  $p = 0.48$  (Tabla 5).

Así mismo, hubo una tendencia a mayor número de varicosidades axonales con acúmulo de KIF5A comparado con los esferoides en ambos grupos de ratas con NCC, aunque no fue estadísticamente significativo ( con valores de  $p = 0.1$  a las 48 horas, 5 días, 8 meses y  $p = 0.5$  a los 12 meses en el grupo no tratado;  $p=0.57$  a las 48 horas,  $p= 0.1$  a los 5 días,  $p=0.4$  a los 2 meses,  $p=0.2$  a los 8 meses y  $0.1$  a los 12 meses en el grupo tratado) en todos los tiempos evaluados (Anexo 7). Por lo cual, los resultados obtenidos del patrón de inmunorreactividad caracterizado por el acúmulo de la cadena pesada la proteína motora kinesina (KIF5A) en esferoides y varicosidades axonales con predominancia en materia gris en los grupos infectados tratados y no tratados, sería un buen indicador que muestra la existencia de daño en el transporte axonal en ratas con NCC, ya que esta alteración estuvo ausente en el grupo control sano.



# cisticercos evaluados	48 horas	5 días	2 meses	8 meses	12 meses
No tratados	3	3	3	6	5
Tratarados	4	4	5	3	5

**Figura 3. Promedio de hinchazones axonales reactivos a KIF5A.** A. Promedio de esferoides axonales B. Promedio de varicosidades axonales: Presentes en mayor cantidad en MG que en MB en todos los tiempos ( $p < 0.05$ ), con un incremento en los últimos meses postratamiento en el grupo no tratado. El grupo control, ausencia de esferoides y varicosidades axonales ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 5.** Análisis estadístico del promedio de esferoides y varicosidades reactivos a KIF5A en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control.

Promedio de esferoides								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	<i>p</i> -value <sup>(b)</sup>
48 horas	0	22 $\pm$ 1.73	0.33 $\pm$ 0.33	0.0463	6 $\pm$ 3.45	0	0.0472	0.022
5 días	0	21 $\pm$ 10.58	0.67 $\pm$ 0.33	0.1046	33.25 $\pm$ 26.07	0	0.0472	0.0697
2 meses	0	20 $\pm$ 17.1	0	0.1213	74.8 $\pm$ 37.99	1.2 $\pm$ 0.73	0.0517	0.0918
8 meses	0	132.67 $\pm$ 55.66	0.33 $\pm$ 0.21	0.0033	70.67 $\pm$ 36.26	0.33 $\pm$ 0.33	0.0463	0.0098
12 meses	0	132 $\pm$ 31.61	2.6 $\pm$ 2.35	0.0082	62.6 $\pm$ 24.27	0	0.0186	0.0172
<i>p</i> -value <sup>(c)</sup>	0	0.0371	0.7524		0.2099	0.7232		

Promedio de varicosidades								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	<i>p</i> -value <sup>(b)</sup>
48 horas	0	168 $\pm$ 30.41	5.67 $\pm$ 2.96	0.0495	61.25 $\pm$ 40.18	0.25 $\pm$ 0.25	0.018	0.0198
5 días	0	243 $\pm$ 100.2	6 $\pm$ 2.08	0.0495	260 $\pm$ 152.2	2.25 $\pm$ 2.25	0.018	0.0302
2 meses	0	38.67 $\pm$ 14.9	0.66 $\pm$ 0.66	0.2463	150.8 $\pm$ 57.63	7.8 $\pm$ 6.11	0.0088	0.0239
8 meses	0	240 $\pm$ 76.14	8.3 $\pm$ 4.14	0.0037	149.67 $\pm$ 41.38	22.3 $\pm$ 15.1	0.0495	0.0105
12 meses	0	234 $\pm$ 64.88	43.4 $\pm$ 21.1	0.0163	173.4 $\pm$ 56.01	12.4 $\pm$ 10.1	0.0264	0.0159
<i>p</i> -value <sup>(c)</sup>	0	0.1457	0.3481		0.4882	0.6105		

<sup>(a)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre materia gris y materia blanca por la prueba de U de Mann-Whitney

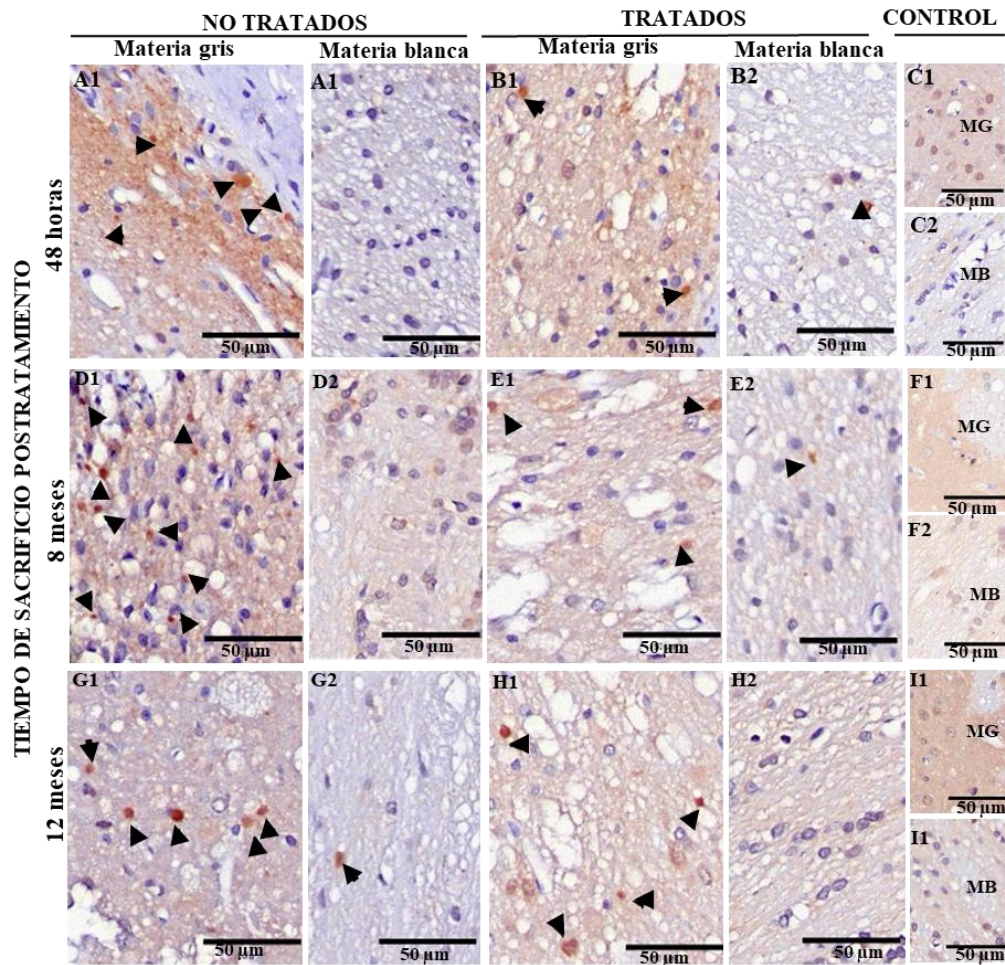
<sup>(b)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación de materia gris entre los 3 grupos experimentales por la prueba de Kruskal-Wallis

<sup>(c)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre los 5 tiempos por cada grupo experimental por la prueba de Kruskal-Wallis

### 6.3.2 Patrón de inmunorreactividad de la cadena ligera de kinesina (KLC2)

El patrón de inmunorreactividad a KLC2 en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) se caracterizó por hinchazones axonales en forma de varicosidades axonales con acúmulo de la cadena ligera de la proteína motora kinesina, presente hasta los 12 meses postratamiento. A diferencia del grupo control

sano, en donde el patrón de inmunorreactividad se caracterizó por ausencia de hinchazones axonales reactivas a KLC2 y con un marcaje tenue alrededor del soma y a lo largo del axón de la neurona (Figura 4). No se encontró esferoides axonales reactivos a KLC2.

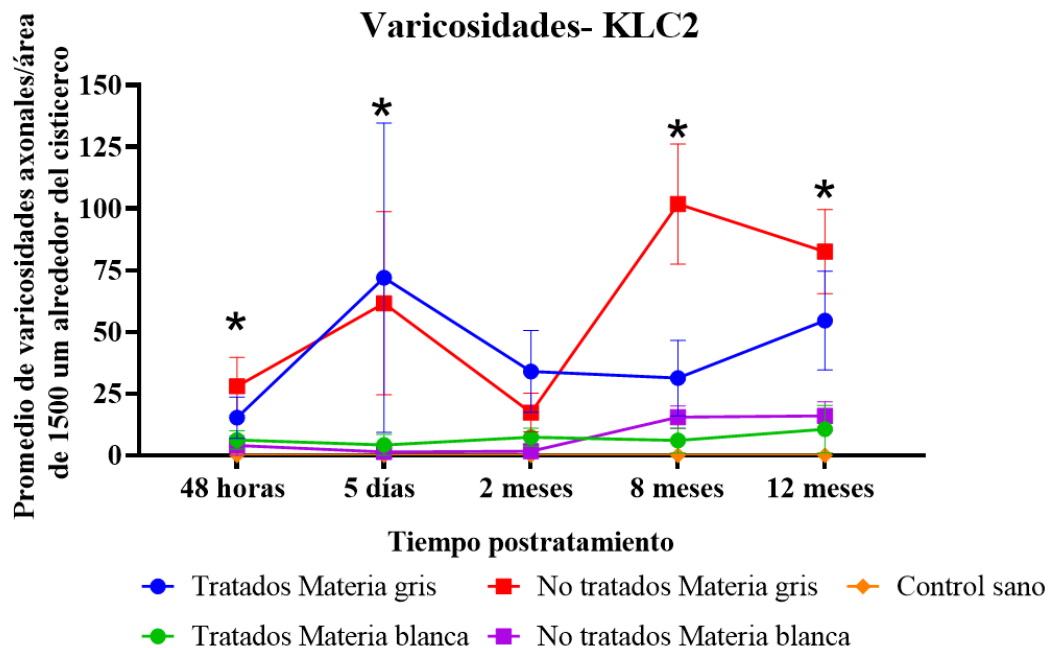


**Figura 4. Patrón de inmunorreactividad de KLC2 en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento. (A, D, G) Tejido cerebral de ratas con NCC no tratadas. (B, E, H) Tejido cerebral de ratas con NCC tratadas. (C, F, I) Tejido cerebral de ratas sanas. Materia gris (MG): En ambos grupos (tratados y no tratados), se muestran abundantes varicosidades axonales como cuerpos ovalados con bordes regulares de 4 a 10 μm de diámetro (cabeza de flecha). Materia blanca (MB): En ambos grupos (tratados y no tratados), escasa presencia de varicosidades axonales. Control sano, tejido cerebral con ausencia de varicosidades axonales reactivas a KLC2 en materia gris y blanca.**

Para evaluar si el patrón de inmunorreactividad de KLC2 es un buen indicador de daño en el transporte axonal, se cuantificó las varicosidades axonales reactivas a KLC2 en tejido cerebral de los grupos experimentales en un área de 1500  $\mu\text{m}$  alrededor del cisticerco. En el grupo no tratado, al comparar el promedio de varicosidades axonales entre materia gris y materia blanca, se encontró diferencia estadísticamente significativa en todos los tiempos (valor  $p=0.04$  a las 48 horas y 5 días,  $p = 0.003$  a los 8 meses,  $p= 0.01$  a los 12 meses) a excepción de los 2 meses ( $p=0.07$ ), siendo la materia gris la zona más afectada (Tabla 6). Por otro lado, en el grupo tratado al comparar entre materia gris y blanca, no se encontró diferencia estadística significativa en todos los tiempos (valor  $p=0.30$  a las 48 horas,  $p=0.14$  a los 5 días,  $p=0.29$  a los 2 meses,  $p=0.27$  a los 8 meses) excepto a los 12 meses ( $p=0.04$ ), sin embargo, hubo una tendencia a mayor daño en materia gris (Tabla 6, Fig. 5). El promedio de varicosidades axonales en materia gris estuvo presente en un rango de (17- 101/área) para el grupo no tratado y (15-72/área) para el grupo tratado comparado con materia blanca donde fue escaso (1- 16/área) para grupo no tratado y (4 a 10/área) en el grupo tratado (Fig. 5, tabla 6). Esto se evidencia en la figura 5, que muestra la predominancia de varicosidades axonales en materia gris para los grupos tratados y no tratados comparado con materia blanca.

Al comparar el promedio de varicosidades axonales entre los grupos infectados (no tratados y tratados) vs control sano por cada tiempo, se encontró diferencias estadísticamente significativas en 4 tiempos (valor  $p=0.02$  a las 48 horas, 5 días,  $p=0.007$  a los 8 meses y  $p= 0.013$  a 12 meses) a excepción del tiempo 2 meses con valor  $p=0.1$  (Tabla 6). Las ratas con NCC sacrificadas a los 2 meses postratamiento presentaron una reducción en el promedio de varicosidades axonales seguido de un

incremento exponencial a los 8 y 12 meses, aunque esta reducción no fue diferente comparado con los otros tiempos evaluados (valor  $p=0.07$ ) (Fig. 5. Tabla 6). Por otro lado, en el grupo tratado el promedio de varicosidades en los últimos 8 y 12 meses fue similar a los primeros tiempos (48 horas, 5 días y 2 meses) sin diferencia estadísticamente significativa entre tiempos (valor  $p=0.7$ ) (Tabla 6, Fig. 5). Al comparar el número de varicosidades axonales entre los grupos tratados y no tratados, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para todos los tiempos evaluados (valor  $p=0.71$  a las 48 horas,  $p=1$  a los 5 días, 2 meses,  $p=0.5$  a los 8 meses y  $p=0.6$  a los 12 meses; Anexo 8), indicando que el número de varicosidades axonales en ambos grupos de ratas con NCC es similar. Estos resultados obtenidos de acúmulo de la cadena ligera de la proteína motora kinesina (KLC2) en las varicosidades axonales en ratas con NCC tratadas y no tratadas, serían un buen indicador que muestra la existencia de daño en el transporte axonal en ratas con NCC y que el tratamiento antiparasitario no revierte este daño.



# cisticercos evaluados	48 horas	5 días	2 meses	8 meses	12 meses
No tratados	3	3	3	6	5
Tratados	4	4	5	3	5

**Figura 5. Promedio de varicosidades reactivas a KLC2:** Mayor cantidad de varicosidades en GM que en MB en todos los tiempos ( $p < 0.05$ ) con incremento a lo largo del tiempo en el grupo no tratado y constante en el grupo tratado. El grupo control presentó ausencia de varicosidades axonales ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 6. Análisis estadístico del promedio de varicosidades reactivas a KLC2 en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control.**

Promedio de varicosidades axonales								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p-value</i> <sup>(a)</sup>	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p-value</i> <sup>(a)</sup>	<i>p-value</i> <sup>(b)</sup>
48 horas	0	28 $\pm$ 11.7	4 $\pm$ 4	0.0463	15.25 $\pm$ 8.35	6.25 $\pm$ 3.66	0.3065	0.0238
5 días	0	61.67 $\pm$ 37.1	1.33 $\pm$ 0.88	0.0495	72 $\pm$ 62.69	4.25 $\pm$ 4.25	0.1391	0.0284
2 meses	0	17.33 $\pm$ 7.88	1.67 $\pm$ 1.67	0.0722	34 $\pm$ 16.61	7.4 $\pm$ 3.64	0.2933	0.1001
8 meses	0	101.8 $\pm$ 24.4	15.5 $\pm$ 4.62	0.0039	31.33 $\pm$ 15.3	6 $\pm$ 5.03	0.2752	0.0072
12 meses	0	82.6 $\pm$ 17.1	16 $\pm$ 5.68	0.0163	54.6 $\pm$ 20	10.6 $\pm$ 9.63	0.0445	0.013
<i>p-value</i> <sup>(c)</sup>	0	0.079	0.1395		0.7083	0.881		

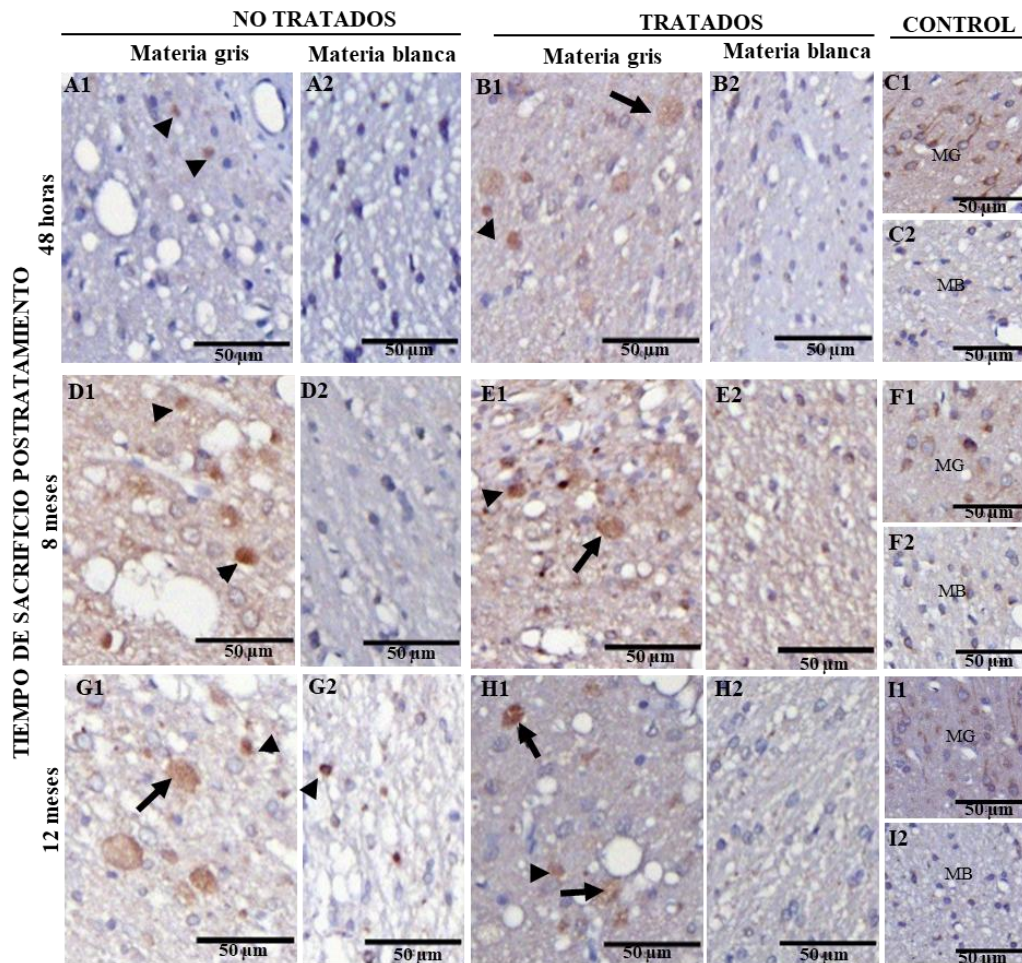
<sup>(a)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre materia gris y materia blanca por la prueba de U de Mann-Whitney

<sup>(b)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación de materia gris entre los 3 grupos experimentales por la prueba de Kruskal-Wallis

<sup>(c)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre los 5 tiempos por cada grupo experimental por la prueba de Kruskal-Wallis

#### **6.4 Patrón de inmunorreactividad de Dineína en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios a diferente tiempo postratamiento.**

El patrón de inmunorreactividad de dineína en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) se caracterizó por presencia de hinchazones axonales en forma de esferoides y varicosidades axonales con acúmulo de la cadena intermedia de dineína (DIC), presente hasta los 12 meses postratamiento. A diferencia del grupo control sano, en donde el patrón de inmunorreactividad se caracterizó por ausencia de hinchazones axonales reactivos a DIC y con un marcaje tenue alrededor del soma y a lo largo del axón de la neurona (Figura 6).



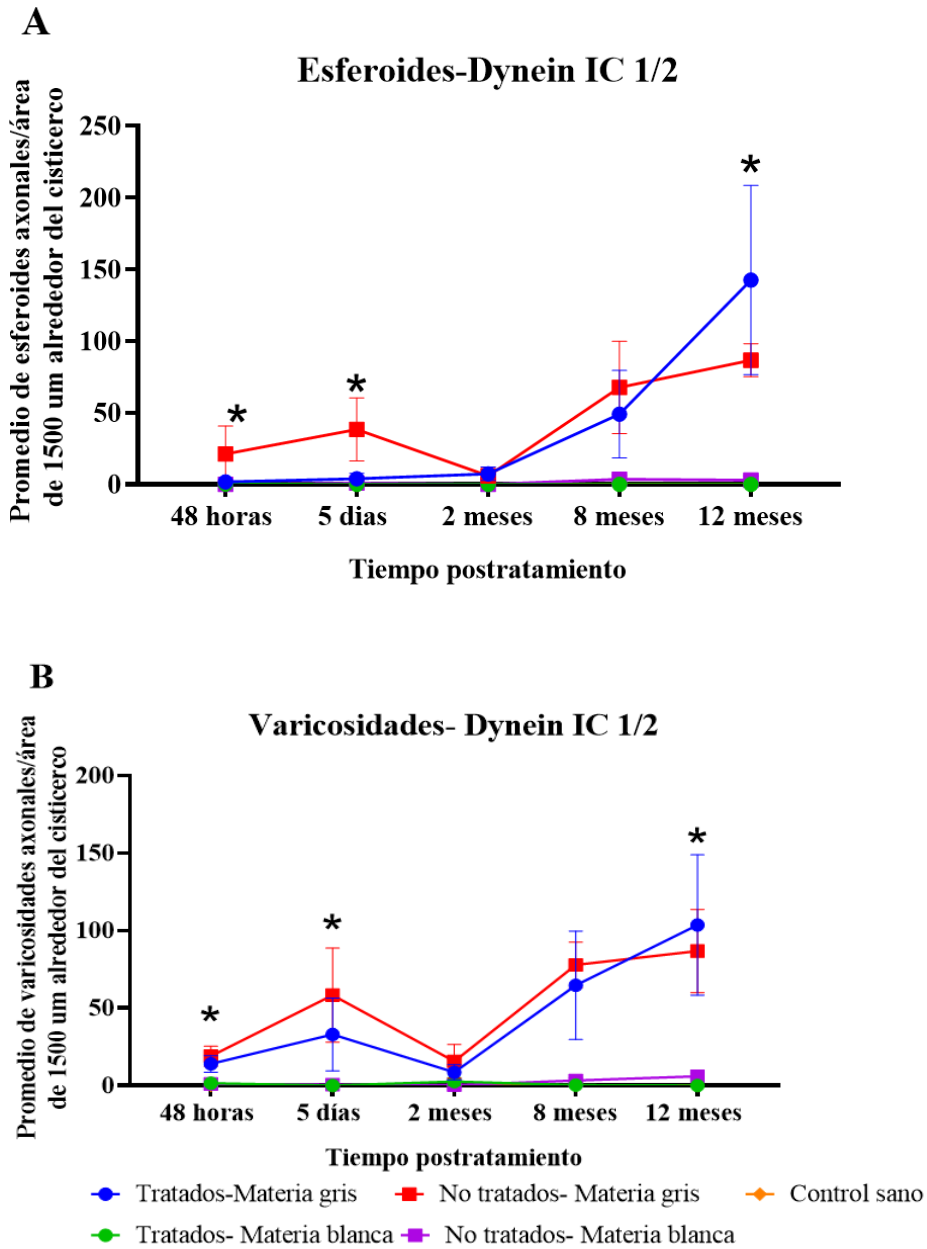
**Figura 6. Patrón de inmunorreactividad de DIC en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento. (A, D, G) Tejido cerebral de ratas con NCC no tratadas. (B, E, H) Tejido cerebral de ratas con NCC tratadas. (C, F, I) Tejido cerebral de ratas sanas. Materia gris (MG): En ambos grupos (tratados y no tratados), se muestran abundantes esferoides como cuerpos ovalados con borde regular de 10 a 50 (flecha) y varicosidades axonales como cuerpos ovalados con bordes regulares de 4 a 10 μm de diámetro (cabeza de flecha). Materia blanca (MB): En ambos grupos (tratados y no tratados), escasa presencia de esferoides y varicosidades axonales. Control sano, ausencia de esferoides y varicosidades axonales reactivas a DIC en materia gris y blanca.**

Para evaluar si el patrón de inmunorreactividad de DIC es un buen indicador de daño en el transporte axonal, se cuantificó los esferoides y varicosidades axonales reactivos a DIC en tejido cerebral de los grupos experimentales en un área de 1500

µm alrededor del cisticerco. Al comparar el promedio de esferoides entre materia gris y materia blanca en el grupo no tratados, se encontró más cantidad de esferoides en materia gris en todos los tiempos, aunque fue estadísticamente significativo solo a las 48 horas (valor  $p=0.03$ ), 8 (valor  $p=0.04$ ) y 12 meses (valor  $p=0.007$ ) con un promedio de 67- 86 esferoides/área, respectivamente. Respecto a las varicosidades axonales, la materia gris fue la zona más afectada presentando mayor cantidad (15- 86 varicosidades/área) comparado con la materia blanca (1- 6 varicosidades/área), este incremento fue estadísticamente significativo para todos los tiempos evaluados (valores  $p =0.04$  a las 48 horas, 5 días, 2 meses,  $p=0.003$  a los 8 meses y  $p=0.009$  a los 12 meses) (tabla 7).

Por otro lado, en el grupo tratado al comparar el promedio de esferoides entre materia gris y blanca, solo se encontró diferencia estadística significativa a los 2 (valor  $p=0.05$ ) y 12 meses (valor  $p=0.005$ ), sin embargo, en todos los tiempos hubo una tendencia a mayor daño en materia gris (figura 7). Los esferoides axonales en materia gris estuvieron presentes en un rango de (1-142 esferoides/área), mientras que en materia blanca estuvo ausente (tabla 7). Las varicosidades axonales estuvieron presentes en materia gris en un rango de (8-103 varicosidades/ área), mientras que en materia blanca el número de esferoides fue escaso. Esta diferencia fue estadísticamente significativa a las 48 horas (valor  $p=0.04$ ), 5 días (valor  $p=0.01$ ) y 12 meses (valor  $p=0.005$ ) postratamiento, con una tendencia a mayor daño en materia gris que en materia blanca (Tabla 7). Estos resultados se evidencian en la figura 7, que muestra la predominancia de esferoides y varicosidades axonales en materia gris para los grupos tratados y no tratados comparado con materia blanca y ausencia en el grupo control sano.

Al comparar el promedio de hinchazones axonales entre los grupos infectados (no tratados y tratados) vs control sano por cada tiempo, se encontró diferencias estadísticamente significativas en 3 tiempos (valor  $p=0.05$  a las 48 horas, 5 días y  $p=0.017$  a los 12 meses post tratamiento) a excepción de los tiempos de 2 y 8 meses (Tabla 7). A los 2 meses en ambos grupos infectados (tratados y no tratados) se redujo el promedio de esferoides y varicosidades axonales con un incremento exponencial a los 8 y 12 meses, aunque no fue estadísticamente diferente de los otros tiempos evaluados (valor  $p=0.1$  en el grupo no tratado y  $p=0.27$  en el grupo tratado) (tabla 7, figura 7). Por otro lado, al comparar el promedio de esferoides y varicosidades axonales entre los grupos tratados y no tratados, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, para todos los tiempos evaluados (Anexo 9), indicando que el acúmulo de dineína en los esferoides y varicosidades axonales es similar y está presente en ambos grupos de ratas con NCC. Así mismo, los valores de esferoides comparado con varicosidades axonales fueron similares en todos los tiempos (Anexo 10). Por consiguiente, los resultados obtenidos del patrón de inmunorreactividad de DIC caracterizado por el acúmulo de dineína en las hinchazones axonales con predominancia en materia gris en los grupos infectados tratados y no tratados, serían un indicador de existencia de daño en el transporte axonal en ratas con NCC.



# cisticercos evaluados	48 horas	5 días	2 meses	8 meses	12 meses
No tratados	3	3	3	6	5
Tratados	4	4	5	3	5

**Figura 7. Promedio de hinchazones axonales reactivos a DIC.** A. Promedio de esferoides axonales. B. Promedio de varicosidades axonales. Presentes en mayor cantidad en GM que en WM ( $p < 0.05$ ), con un ligero incremento a lo largo del tiempo. El grupo control presentó ausencia de esferoides y varicosidades axonales ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 7.** Análisis estadístico del promedio de esferoides y varicosidades reactivas a DIC en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control.

Promedio de esferoides								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs Tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean ± sem	Materia blanca mean ± sem	<i>p- value</i> <sup>(a)</sup>	Materia gris mean ± sem	Materia blanca mean ± sem	<i>p- value</i> <sup>(a)</sup>	<i>p- value</i> <sup>(b)</sup>
48 horas	0	21.3 ± 19.24	0	0.0369	1.75 ± 0.85	0.25 ± 0.25	0.1215	0.0567
5 días	0	38.3 ± 22	1 ± 1	0.1212	4 ± 3.67	0	0.1306	0.0507
2 meses	0	6 ± 6	0	0.3173	7.4 ± 4.6	0	0.0539	0.4178
8 meses	0	67.7 ± 32.2	3.7 ± 2.5	0.0463	49 ± 30.5	0	0.1213	0.0608
12 meses	0	86.6 ± 11.55	3 ± 3	0.0071	142.6 ± 65.99	0	0.0053	0.0171
<i>p- value</i> <sup>(c)</sup>	0	0.1093	0.8951		0.2726	0.9653		

Promedio de varicosidades								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs Tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean ± sem	Materia blanca mean ± sem	<i>p- value</i> <sup>(a)</sup>	Materia gris mean ± sem	Materia blanca mean ± sem	<i>p- value</i> <sup>(a)</sup>	<i>p- value</i> <sup>(b)</sup>
48 horas	0	19 ± 6.42	1 ± 1	0.0463	14 ± 5.37	1.5 ± 1.2	0.0421	0.0256
5 días	0	58.3 ± 30.32	0.7 ± 0.7	0.0463	33 ± 23.4	0	0.0139	0.0272
2 meses	0	15.7 ± 10.8	0.33 ± 0.33	0.0463	8.6 ± 4.9	2.6 ± 2.6	0.1475	0.0801
8 meses	0	77.83 ± 14.65	3.33 ± 1.54	0.0037	64.7 ± 34.96	0.33 ± 0.33	0.2463	0.0236
12 meses	0	86.8 ± 26.84	6 ± 2	0.009	103.6 ± 45.21	0	0.0053	0.0183
<i>p- value</i> <sup>(c)</sup>	0	0.0694	0.3083		0.1918	0.7217		

<sup>(a)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre materia gris y materia blanca por la prueba de U de Mann-Whitney

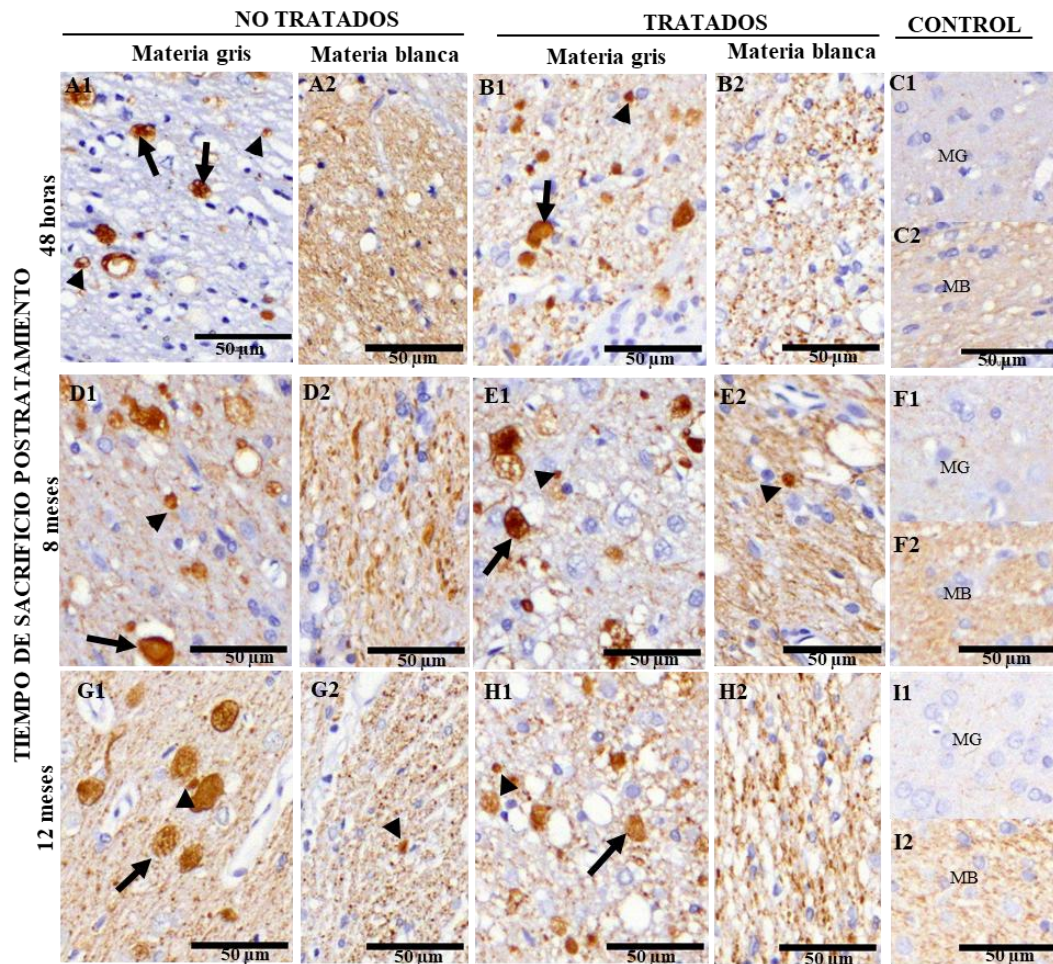
<sup>(b)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación de materia gris entre los 3 grupos experimentales por la prueba de Kruskal-Wallis

<sup>(c)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre los 5 tiempos por cada grupo experimental por la prueba de Kruskal-Wallis

### 6.5 Evaluación de daño axonal mediante el número de hinchazones axonales reactivos a NFP en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios a diferente tiempo postratamiento

La inmunorreactividad de la cadena pesada de neurofilamento (NFP) en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) se caracterizó por presencia de hinchazones axonales en forma de esferoides y varicosidades axonales con acúmulo de neurofilamento, presente desde las 48 horas hasta los 12 meses postratamiento. A diferencia del grupo control sano, en donde el patrón de inmunorreactividad se

caracterizó por ausencia de hinchazones axonales y con un marcaje normal del neurofilamento (en forma de fibras o filamentos) a lo largo del axón de la neurona (Figura 8).

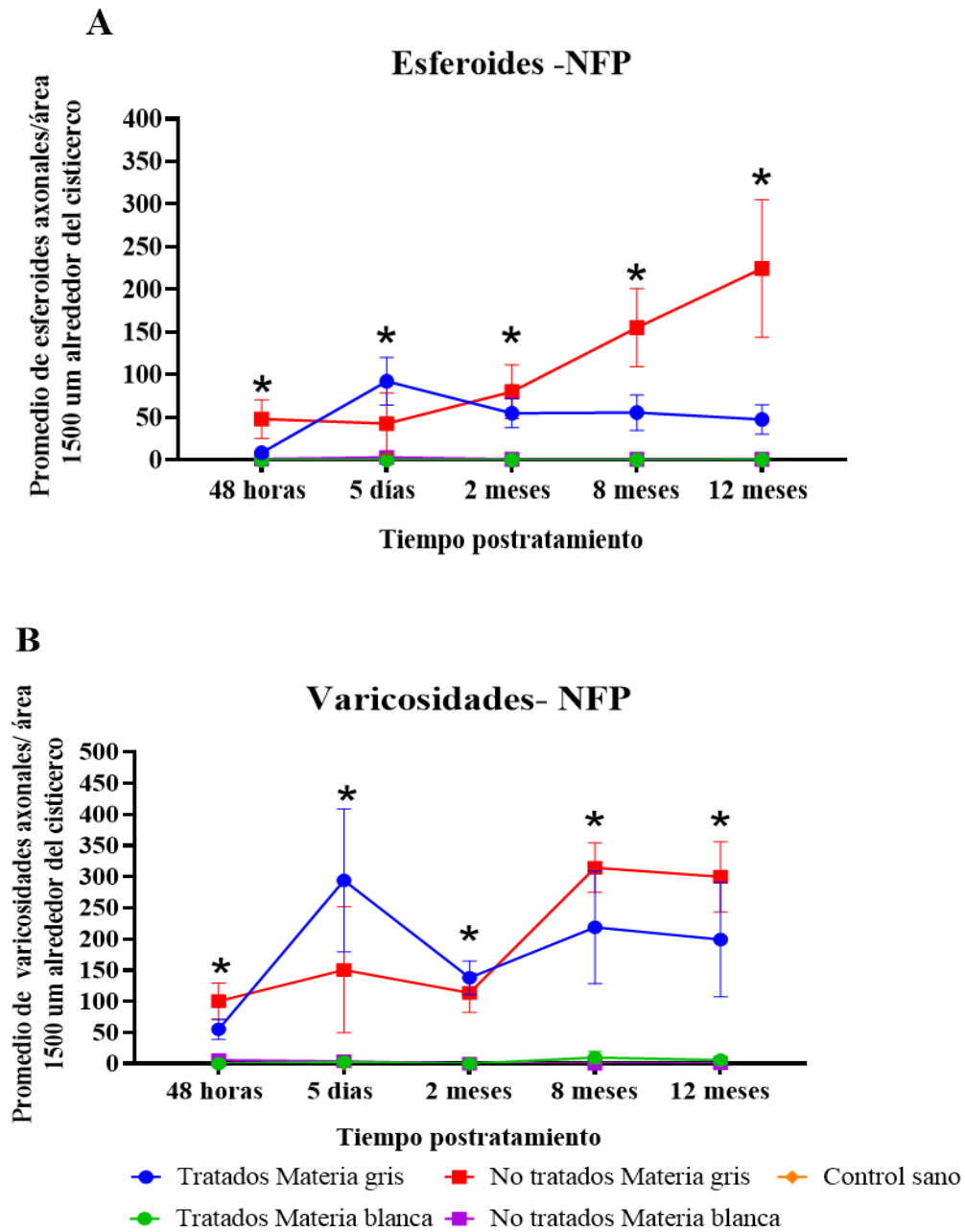


**Figura 8. Inmunorreactividad de NFP en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios sacrificados a diferente tiempo postratamiento.** (A, D, G) Tejido cerebral de ratas con NCC no tratadas. (B, E, H) Tejido cerebral de ratas con NCC tratadas. (C, F, I) Tejido cerebral de ratas sanas. Materia gris (MG): En ambos grupos (tratados y no tratados), se muestran abundantes esferoides como cuerpos ovalados con borde regular de 10 a 50 (flecha) y varicosidades axonales como cuerpos ovalados con bordes regulares de 4 a 10 µm de diámetro (cabeza de flecha). Materia blanca (MB): En ambos grupos (tratados y no tratados), escasa presencia de esferoides y varicosidades axonales. Control sano, ausencia de esferoides y varicosidades axonales reactivas a NFP en materia gris y blanca.

Se cuantificó los esferoides y varicosidades axonales reactivos a NFP en tejido cerebral de los 3 grupos experimentales en un área de 1500  $\mu\text{m}^2$  alrededor del cisticerco. Al comparar el promedio de esferoides entre materia gris y materia blanca en el grupo no tratado, se encontró más cantidad en materia gris (rango de 42- 224 esferoides/  $\mu\text{m}^2$ ), el cual fue estadísticamente significativo en 3 tiempos postratamiento (valores de  $p=0.04$  a los 2 meses,  $p=0.003$  a los 8 meses y  $p=0.007$  a los 12 meses), excepto a las 48 horas y 5 días. Así mismo, las varicosidades predominaron en materia gris presentando de 100-314 varicosidades/  $\mu\text{m}^2$  comparada con la materia blanca (1- 6 varicosidades/ $\mu\text{m}^2$ ). Esta predominancia en materia gris fue estadísticamente significativa en todos los tiempos (valores de  $p=0.04$  a las 48 horas y 5 días,  $p=0.03$  a los 2 meses,  $p=0.002$  a los 8 meses y  $p=0.007$  a los 12 meses) (tabla 8).

De igual forma, en el grupo tratado los esferoides y varicosidades estuvieron presentes en mayor proporción en materia gris, el cual fue estadísticamente significativo en todos los tiempos (tabla 8). Los esferoides axonales en materia gris estuvieron presentes en un rango de 8-92 esferoides/ $\mu\text{m}^2$ , mientras que en materia blanca fue menor a 2 esferoides/ $\mu\text{m}^2$  (valor  $p=0.02$  a las 48 horas y 5 días,  $p=0.007$  a los 2 meses,  $p=0.03$  a los 8 meses y  $p=0.007$  a los 12 meses) (tabla 8). Las varicosidades axonales estuvieron presentes en materia gris en un rango de 55-294 varicosidades/  $\mu\text{m}^2$ , mientras que en materia blanca fue menor a 10 varicosidades/ $\mu\text{m}^2$  (valores  $p=0.02$  a las 48 horas,  $p=0.01$  a los 5 días,  $p=0.005$  a los 2 meses,  $p=0.04$  a los 8 meses y  $p=0.06$  a los 12 meses) (Tabla 8). Esto se evidencia en la figura 9, que muestra la predominancia de esferoides y varicosidades axonales en materia gris para los grupos tratados y no tratados comparado con materia blanca.

Al comparar el promedio de esferoides y varicosidades axonales entre los grupos infectados (no tratados y tratados) vs control sano por cada tiempo, se encontró diferencias estadísticamente significativas en los 5 tiempos evaluados de 48 horas (valor  $p=0.02$ ), 5 días (valor  $p=0.02$ ), 2 meses (valor  $p=0.04$ ), 8 meses (valor  $p=0.006$ ) y 12 meses (valor  $p=0.005$ )(Tabla 8). Por otro lado, al comparar el promedio de esferoides y varicosidades axonales entre los grupos tratados y no tratados, no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, para todos los tiempos evaluados (Anexo 11). En el grupo tratado, hubo una tendencia a mayor número de esferoides y varicosidades axonales a los 5 días postratamiento que luego se redujo, aunque no fue estadísticamente diferente de los otros tiempos (valor  $p=0.069$  para esferoides y  $p=0.24$  para varicosidades) (Tabla 8, Fig. 9). A diferencia del grupo no tratado, donde el promedio de esferoides y varicosidades axonales se incrementó de forma exponencial desde los 2 meses hasta los 12 meses postratamiento (Fig. 9). Así mismo, el número de varicosidades axonales fue mayor a los esferoides en ambos grupos tratados y no tratados, sin embargo, no se encontró diferencias estadísticamente significativas (Anexo 12). Por consiguiente, los resultados obtenidos del patrón de inmunorreactividad de NFP caracterizado por el acúmulo de neurofilamento en las hinchazones axonales con predominancia en materia gris en los grupos infectados tratados y no tratados, son un indicador de la existencia de daño axonal en ratas con NCC.



# cisticercos evaluados	48 horas	5 días	2 meses	8 meses	12 meses
No tratados	3	3	3	6	5
Tratados	4	4	5	3	5

**Figura 9. Promedio de hinchazones axonales reactivos a NFP.** A. Promedio de esferoides axonales. B. Promedio de varicosidades axonales. Presentes en mayor cantidad en GM que en WM ( $p < 0.05$ ), con un ligero incremento a lo largo del tiempo. El grupo control presentó ausencia de esferoides y varicosidades axonales ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 8.** Análisis estadístico del promedio de esferoides y varicosidades reactivas a NFP en tejido cerebral de ratas con NCC (tratadas y no tratadas) y control.

Promedio de esferoides								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	<i>p</i> -value <sup>(b)</sup>
48 horas	0	48 $\pm$ 22.6	1.33 $\pm$ 1.33	0.0722	8.5 $\pm$ 1.71	0	0.0286	0.0272
5 días	0	42.6 $\pm$ 35.67	3 $\pm$ 3	0.2612	92.25 $\pm$ 55.91	0.25 $\pm$ 0.25	0.0286	0.0238
2 meses	0	80 $\pm$ 31.5	1 $\pm$ 0.58	0.0495	55 $\pm$ 16.94	0.2 $\pm$ 0.2	0.0079	0.0471
8 meses	0	155.2 $\pm$ 45.93	0.67 $\pm$ 0.67	0.0028	55.7 $\pm$ 20.73	0	0.0369	0.0066
12 meses	0	224.4 $\pm$ 80.67	0.6 $\pm$ 0.25	0.0079	47.6 $\pm$ 17.17	0.4 $\pm$ 0.4	0.0079	0.0052
<i>p</i> -value <sup>(c)</sup>		0.119	0.8779		0.0699	0.9598		

Promedio de varicosidades								
Grupos	Control	No tratados			Tratados			Control vs No tratado vs tratado en materia gris
Tiempos	Materia gris y blanca	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	Materia gris mean $\pm$ sem	Materia blanca mean $\pm$ sem	<i>p</i> -value <sup>(a)</sup>	<i>p</i> -value <sup>(b)</sup>
48 horas	0	100.33 $\pm$ 29.28	6 $\pm$ 3	0.0463	55.25 $\pm$ 15.99	0	0.0286	0.0238
5 días	0	150.67 $\pm$ 101.2	4 $\pm$ 2.3	0.0495	294.3 $\pm$ 114.86	2.75 $\pm$ 2.75	0.018	0.0238
2 meses	0	113.67 $\pm$ 31.53	0	0.0369	138 $\pm$ 26.7	0	0.0053	0.0471
8 meses	0	314.67 $\pm$ 31.53	0.33 $\pm$ 0.33	0.0028	219 $\pm$ 90.28	10 $\pm$ 10	0.0463	0.0098
12 meses	0	300 $\pm$ 56.32	1	0.0071	199.2 $\pm$ 91.74	6 $\pm$ 5.75	0.0635	0.0311
<i>p</i> -value <sup>(c)</sup>		0.0743	0.335		0.2433	0.7739		

<sup>(a)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre materia gris y materia blanca por la prueba de U de Mann-Whitney

<sup>(b)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación de materia gris entre los 3 grupos experimentales por la prueba de Kruskal-Wallis

<sup>(c)</sup> Valor *p* obtenido de la comparación entre los 5 tiempos por cada grupo experimental por la prueba de Kruskal-Wallis

## 6.6 Determinación de la correlación que existe entre la inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína con el marcador de daño axonal en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios.

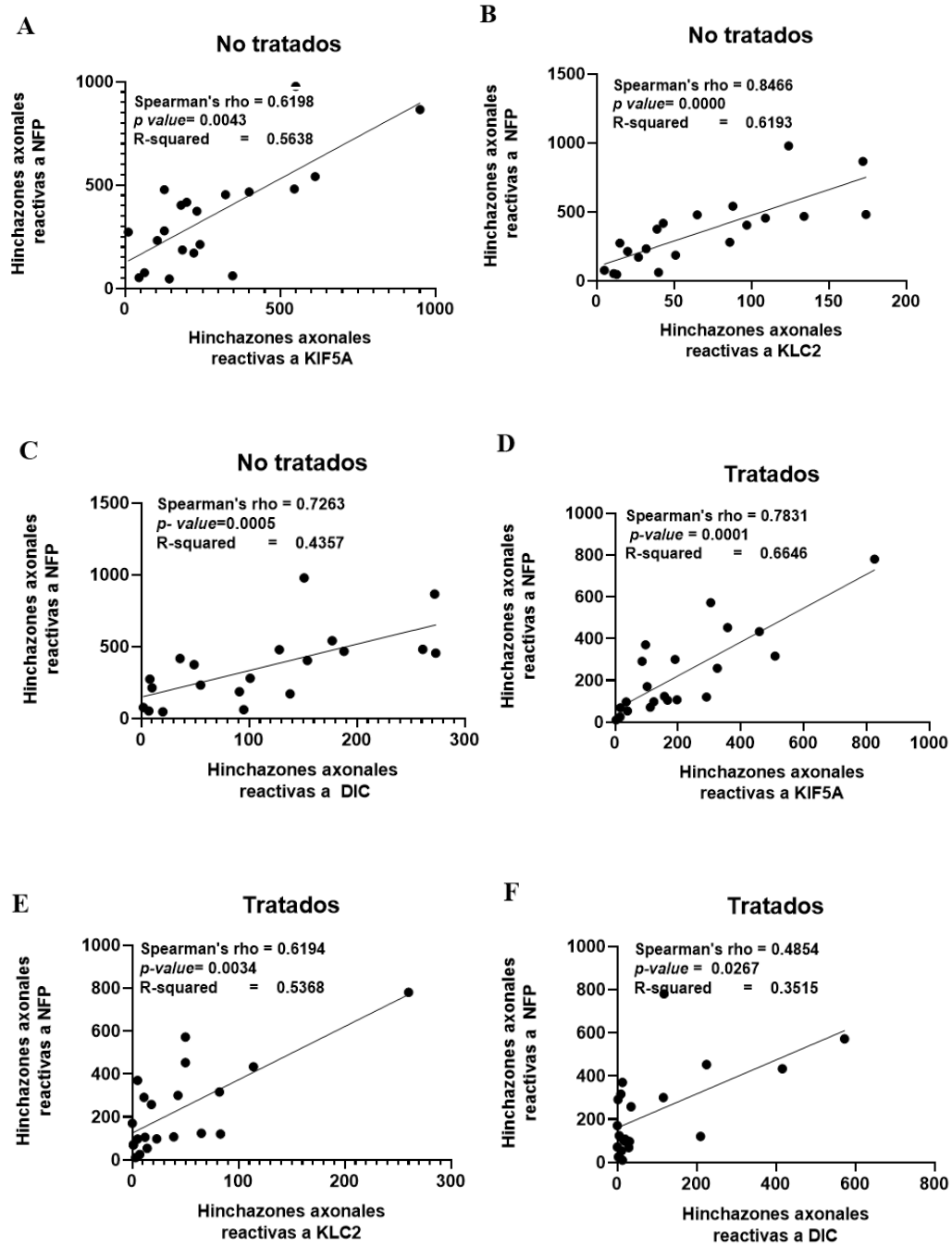
De acuerdo con los resultados obtenidos del patrón de inmunorreactividad para las proteínas motoras (kinesina y dineína) y neurofilamento. En donde, al evaluar cada marcador por separado y grupo experimental (ratas con NCC tratadas y ratas con NCC no tratadas), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los 5 tiempos postratamiento (48 horas, 5 días, 2 meses, 8 meses y 12 meses). Para evaluar la correlación se unieron los valores de inmunorreactividad de los 5 tiempos

postratamiento por biomarcador (KIF5A, KLC2, DIC y NFP) en cada grupo experimental. En cada muestra, se consideró el número total de hinchazones axonales (esferoides + varicosidades) en toda el área analizada (materia gris + blanca).

Como se muestra en la figura 10, se encontró una correlación positiva entre la inmunorreactividad de kinesina y dineína (hinchazones axonales reactivos a estas proteínas) y daño axonal (hinchazones axonales reactivos a NFP). Respecto al grupo de ratas con NCC no tratadas, la correlación entre el número de hinchazones axonales reactivas a KIF5A y KLC2 con NFP, presentó un valor rho de 0.61 (valor  $p=0.0043$ ) y 0.84 (valor  $p=0.00001$ ) indicando una correlación positiva moderada a alta entre ambas variables (Fig. 10 A, B). Así mismo, al evaluar la correlación entre el número de hinchazones axonales reactivos a dineína con NFP, se obtuvo un valor rho de 0.72 el cual también fue estadísticamente significativo (valor  $p=0.0005$ ) (Fig. 10 C), indicando una correlación positiva alta entre ambas variables.

De forma similar, en el grupo de ratas con NCC tratadas, se encontró una correlación positiva alta entre el número de hinchazones axonales reactivas con NFP, el cual estadísticamente significativo con valores rho de 0.78 (valor  $p=0.0001$ ) y 0.61(valor  $p=0.0034$ ) para KIF5A y KLC2 respectivamente Fig. 10 D, E). Respecto a la correlación entre el número de hinchazones axonales reactivas a dineína con NFP, el valor rho obtenido fue de 0.48 (valor  $p= 0.02$ ) indicando una correlación positiva moderada entre ambas variables (Fig. 10 F). Estos resultados obtenidos, demuestran que en ratas con NCC existe una asociación entre el patrón de inmurreactividad de las proteínas motoras (indicadores de daño en el transporte

axonal) con daño axonal, ya que tanto el NFP y las proteínas motoras se encuentran acumulados en las hinchazones axonales (en forma de esferoides y varicosidades axonales) alrededor del tejido que rodea al cisticerco, cuyo cambio patológico se mantiene en el tiempo.



**Figura 10. Análisis de correlación de Spearman en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitario. (A, B, C) Correlación de**

Spearman entre la inmunorreactividad de las proteínas motoras (KIF 5A, KLC2 y DIC) con NFP en el grupo de ratas con NCC no tratados: Las gráficas muestran una correlación positiva moderada entre el entre el promedio de hinchazones axonales reactivos a las proteínas motoras KIF5A, KLC2, DIC con NFP ( $p < 0.05$ ). (D, E, F) Correlación de Spearman entre la inmunorreactividad de las proteínas motoras (KIF 5A, KLC2 y DIC) con NFP en el grupo de ratas con NCC tratadas: Las gráficas muestran una correlación positiva moderada entre el entre el promedio de hinchazones axonales reactivas a las proteínas motoras KIF5A, KLC2 y DIC con NFP ( $p < 0.05$ ).

## VII. DISCUSIÓN:

En el presente estudio se evaluó por primera vez el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras kinesina y dineína como posibles indicadores de daño en el transporte axonal en tejido cerebral de ratas con NCC a diferente tiempo postratamiento y el efecto del tratamiento sobre estos patrones de inmunorreactividad. En el tejido cerebral de ratas con NCC, se observó un patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras, caracterizado por presentarse como acúmulos proteicos en forma de esferoides o varicosidades axonales alrededor del cisticerco. Este patrón de inmunorreactividad fue diferente a lo encontrado en tejido cerebral de ratas sanas, el cual se caracterizó por presencia de un marcaje tenue en el soma de las neuronas y a lo largo de los axones con ausencia de esferoides o varicosidades axonales. El patrón de inmunorreactividad encontrado para las proteínas motoras en el tejido cerebral de ratas con NCC, es un indicador de presencia de daño en el transporte axonal ya que ambas proteínas kinesina y dineína son componentes importantes de la máquina de transporte axonal. Así mismo, se asocia con daño axonal (acúmulo de la proteína neurofilamento en los esferoides o varicosidades axonales), que era de esperarse ya que cualquier alteración en las proteínas motoras llevaría al acúmulo anormal de los componentes que transportan, como son los neurofilamentos.

En este estudio, se buscó conocer si el tratamiento antiparasitario en ratas con NCC podrían tener un efecto en el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras a lo largo del tiempo postratamiento, por ello se evaluó las muestras procedentes del grupo de ratas con NCC que recibieron tratamiento antiparasitario. Los resultados muestran que el tratamiento o protocolo de tratamiento aplicado no fue

eficaz para causa la degeneración de los cisticercos, ya que el porcentaje de cisticercos dañados en el grupo que recibió tratamiento fue menor al 50% y no permitió encontrar diferencias entre ratas con NCC tratadas y no tratadas. No obstante, podemos ver que a las 48 horas se observa que el 50% de cisticercos mostraron un daño en el tegumento y a los 5 días se incrementa ese daño moderado del tegumento del cisticercos, sin embargo, a los 2 y 8 meses este daño se redujo con incremento en el porcentaje de cisticercos viables hasta los 12 meses postratamiento. A partir de estos resultados, es probable que el tratamiento haya causado un daño inicial en la superficie de los cisticercos, que se evidencia en los resultados de 48 horas, 5 días pero que estos hayan sido capaces de recuperarse del daño inicial causado por el tratamiento en el tiempo; por ello la existencia de cisticercos viables sin daño o alteración del tegumento en los últimos meses postratamiento.

De acuerdo con lo reportado en otros estudios en porcinos, el oxfendazol es eficaz para controlar quistes musculares de *T. solium* pero no cerebrales (50.51). Sin embargo, en ratas el uso combinado de praziquantel con oxfendazol aumentó el daño en el cisticercos (90% de eficacia a las 48 horas) comparado con albendazol (83 % de eficacia a las 48 horas) a la dosis de 100 mg/ kg/día de cada uno de los fármacos por un periodo de 7 días (41), mientras que en nuestro estudio la eficacia alcanzada a las 48 horas fue del 50% y la dosis usada fue menor con un periodo de dosificación de menos días. Por el contrario, se reporta que en ratones infectados con *Taenia crassiceps*, tratados con una dosis única de oxfendazol (30 mg/kg) y combinación de oxfendazol con nitazoxanida causaron la degeneración de los cisticercos (52), sin embargo, en nuestro estudio el protocolo de tratamiento

(oxfendazol + prazicuantel) a la dosis aplicada no resultó efectivo. Por lo cual, se sugiere en futuros estudios probar dosis más altas de oxfendazol o incrementar los días de administración para garantizar una mejor eficacia del tratamiento y verificar su influencia en el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras.

Nuestros resultados muestran que las hinchazones axonales reactivas a kinesina, dineína y neurofilamento estuvieron presentes en ratas con NCC tratadas y no tratadas, sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados estarían asociados a la poca eficacia del tratamiento antiparasitario en el grupo de ratas con NCC tratadas.

Se pudo apreciar que las hinchazones axonales reactivas a las proteínas motoras y neurofilamento predominaron en materia gris; en ambos grupos tratados y no tratados. Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillo *et al*, que evaluó el daño axonal a las 48 horas y 2 meses postratamiento donde las hinchazones axonales reactivas a NFP se encontraron en mayor proporción en materia gris; sugiriendo que este daño se debe a menor grado de mielinización en esta zona (41). Los resultados, son similares a lo observado en la enfermedad de esclerosis múltiple, en donde los pacientes son más propensos a la desmielinización y formación de esferoides (31, 53), y se reporta que la pérdida de axones de pequeño calibre se compensaría con la hinchazón de los axones adyacentes para cubrir el área desmielinizada (53). Por otro lado, la mielinización depende de la presencia de oligodendrocitos ya que son los encargados de producir la mielina, importantes para proteger a los axones de cualquier ambiente neurotóxico que induzca degeneración e inflamación en los axones (45). Así mismo, cualquier alteración en los oligodendrocitos afectaría el transporte axonal rápido asociado a dineína y llevaría

al acúmulo de otros componentes (46). En ratas con NCC, se reporta una reducción en la población de oligodendrocitos (marcador Olig2) que se correlaciona de forma negativa con la formación de esferoides (64). Por consiguiente, sugerimos que, el daño en materia gris se debe a la presencia de axones de menor calibre con menor protección por la mielina y reducción en la población de oligodendrocitos, haciéndolos más propensos a la degeneración; siendo importante en futuros estudios evaluar el grado de mielinización de los axones.

Hubo una tendencia a mayor número de varicosidades comparado con los esferoides axonales reactivos a kinesina, dineína y neurofilamento, aunque no fue estadísticamente significativo. Muy pocos estudios hacen esta clasificación en esferoides y varicosidades axonales; y se reportan únicamente como hinchazones axonales. Sin embargo, es probable que las hinchazones axonales de menor diámetro se fusionen con otras para dar la apariencia de esferoides. Esto se ve reflejado en un estudio ex vivo en el nervio óptico de ratón, el cual después de ser sometido a un daño, las hinchazones se fusionaban con hinchazones vecinas dando la apariencia de esferoides de mayor tamaño (38). Otros indican que los esferoides pueden incrementar de tamaño en el tiempo (por incremento en el flujo de calcio y cambios en la osmolaridad) y llevar a la ruptura de la membrana con expulsión del contenido hacia el exterior causando un daño irreversible (31).

Debido a que las proteínas kinesina y dineína, son los principales componentes de la maquinaria de transporte axonal, el acúmulo de estas proteínas en las hinchazones axonales en ratas con NCC con ausencia en el control sano encontradas en este estudio, son un indicador de existencia de daño en el transporte axonal en la NCC, el cual se mantiene en el tiempo. Estos resultados son congruentes con lo reportado

en otras enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple, en donde existe una reducción en la expresión del ARNm y proteína de KIF5A en materia gris del tejido cerebral de pacientes y modelos animales y se caracterizan por presentar esferoides con acúmulo de KIF5A y neurofilamento con incremento en el tiempo (13,55). De igual forma, en caninos se reporta que el virus del distemper canino, genera una reducción en la expresión de KIF5A y DIC con acúmulo a nivel de sustancia blanca (14). Así mismo, mutaciones en el gen KIF5A lleva a la formación de agregados de KIF5A y mitocondrias, lo cual conduce a la muerte de las neuronas por unión alterada a los microtúbulos (56,57). Respecto a KLC2, nuestros resultados coinciden con lo reportado en Alzheimer, en donde en un modelo animal se encontraron esferoides positivos a KLC con reducción en la expresión del ARNm, el cual se asocia con la formación de péptidos  $\beta$  amiloides (63).

A la evaluación de kinesina se encontró un mayor número de hinchazones axonales reactivas a KIF5A comparado con KLC2. La kinesina es una proteína compuesta por 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras, con pesos moleculares de 107 a 117 kDa para KIF5A y de 60 a 70 kDa para KLC (18, 66). En nuestro estudio, esta mayor cantidad de esferoides y varicosidades axonales reactivos a KIF5A podría deberse que ocupa un área mayor dentro del tejido a diferencia de KLC2 el cual se visualiza únicamente en varicosidades axonales, siendo necesario verificar estos resultados a través de inmunofluorescencia y corroborar su colocalización.

Por otro lado, la cantidad de hinchazones axonales reactivas a DIC fue menor a lo encontrado para kinesina y neurofilamento. La baja proporción de hinchazones axonales reactivas a DIC es reportada por Kreutzer *et al.*, quienes no encontraron

esferoides positivos para dineína, pero si para otras proteínas en ratones infectados con el virus de TMEV (13). Así mismo, en Alzheimer se reporta una baja expresión de la proteína en la corteza frontal de pacientes con esta enfermedad (18).

Si bien los estudios de acúmulo de kinesina y dineína en las hinchazones axonales se reportan en materia blanca, es probable que en la NCC el daño empiece en materia gris y se extienda hacia materia blanca en el tiempo. Así mismos, los resultados obtenidos demuestran que una vez que se da el acúmulo de las proteínas en las hinchazones axonales el daño se mantiene en el tiempo con una tendencia a incrementar. Por lo que se sugiere en futuros estudios evaluar el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras y la expresión de los genes que codifican las proteínas motoras y ver si existen cambios significativos en el tiempo.

Se pudo apreciar que las hinchazones axonales reactivas a NFP estuvieron presentes en ratas con NCC tratadas y no tratadas indicando la existencia de daño axonal, sin diferencia estadística en ambos grupos. Nuestros resultados corroboran lo reportado en otros estudios, donde usan el NFP como marcador de daño axonal y encuentran una patología similar con mayor daño en materia gris (6, 41). También en el grupo tratado encontramos una tendencia a mayor número de hinchazones axonales a los 5 días postratamiento que coincide con daño moderado en todos cisticercos, aunque no fue estadísticamente diferente del grupo no tratado. Estudios reportan que el tratamiento incrementa la respuesta inflamatoria a los 5 días postratamiento y en cerdos con cisticercos parenquimales se correlaciona con mayor daño en el cisticerco (42, 43,44, 45). Así mismo, en ratas tratadas se reporta una inflamación con infiltrado no granulomatoso a las 24 horas (40% de cisticercos) y con infiltrado granulomatoso a los 2 meses (25% de cisticercos) con mayor alteración de la

integridad del cisticerco (daño severo, con pérdida del tegumento, infiltrado inflamatorio) a los 2 meses (41). Por lo cual, es importante en pacientes administrar el tratamiento asociado a corticoides para reducir la inflamación (45). Si bien en nuestro estudio no se puede afirmar que el tratamiento incrementa la respuesta inflamatoria y daño axonal comparado con un grupo no tratado, resulta importante evaluar su asociación en futuros estudios.

Encontramos que existe correlación positiva entre las hinchazones axonales reactivas a las proteínas motoras (kinesina y dineína) y neurofilamento, indicando que en la NCC existe una asociación entre los marcadores de daño en el transporte axonal con el daño axonal. Se sabe que el neurofilamento forma parte del citoesqueleto axonal y su transporte está mediado por las proteínas motoras (49). En un estudio previo, se corrobora esta asociación, en donde la ausencia del gen KIF5A lleva a la degeneración neuronal y acúmulo de NFP con pérdida de axones y parálisis (54). Siendo importante en futuros estudios evaluar la asociación con otros componentes que transportan estas proteínas motoras a lo largo del axón.

Si bien en la NCC no existen estudios previos que evalúen estas proteínas motoras, se reporta que el acúmulo de distintos componentes en las hinchazones axonales como APP y NFP podrían estar asociados a daño o alteración de las proteínas motoras (6). Se conoce que las neuronas tienen una alta demanda de energía (que proviene de las mitocondrias) para diversos procesos como el transporte axonal, siendo las proteínas motoras dependientes de ATP para moverse (60). Es así, que cualquier falta o agotamiento de ATP, contribuiría a que los componentes axonales queden acumulados a lo largo del axón. Esto es consistente, con lo reportado en un estudio, donde mutación en KIF5A se asocia con acumulación

distal de mitocondrias (afectando suministro de energía) y unión aberrante a las proteínas transportadas (57). De acuerdo lo reportado, en ratas con NCC existe un incremento del estrés oxidativo que se asocia con mayor gliosis y daño neuronal (65). Se conoce que el exceso de óxido nítrico (proveniente del iNOS de las células inflamatorias) afecta a nivel mitocondrial, ya que inhibe los complejos respiratorios mitocondriales como el citocromo C oxidasa y en consecuencia la producción de ATP (59, 60). Esto concuerda con un estudio *in vitro*, en donde las neuronas expuestas a óxido nítrico, presentan disminución en la expresión del gen y la proteína KIF5A (15). De acuerdo con estos estudios se especula, que en la NCC el acúmulo de las proteínas motoras en las hinchazones axonales estaría asociado a un agotamiento de ATP, por afección inicial de las mitocondrias, el cual queda pendiente de evaluar en otros estudios.

Por otro lado, la proteína dineína se encarga de transportar autofagosomas, importante para la degradación de componentes tóxicos para la neurona (29) y defectos en el transporte afectan la maduración de lisosomas y autofagosomas, incrementando la producción de ROS y daño axonal (61). En ratas con NCC se ha reportado una autofagia disfuncional (7) que favorecería la formación de esferoides y daño mitocondrial generando un ambiente crónico oxidativo, con agotamiento de ATP. También es probable que los antígenos del cisticerco medien una respuesta inflamatoria crónica permanente con afección de las mitocondrias, autofagosomas, agotamiento de ATP y acúmulo de las proteínas motoras en las hinchazones axonales.

Por otro lado, las proteínas motoras se encuentran reguladas por quinasas, que controlan su unión y separación de los componentes transportados y

desregulaciones afectan su funcionalidad (48). Quinasas como, GSK3 $\beta$ , cdk5/p35, JNK, p38 MAPK (p38) y ERK a través de procesos de fosforilación y desfosforilación regulan la proteína motora kinesina (18, 36, 58, 62). Respecto a dineína su actividad se encuentra regulada por dinactina, adaptadores de carga (proteínas D bicaudales, familia de proteínas Hook, spindly, TRAK2, Jil1, HAP1), GSK3 $\beta$ , CK1 (62). Siendo importante, en futuros estudios evaluar si los resultados obtenidos se asocian con desregulación a nivel las quinasas.

Se resumen, que en ratas con NCC existe acúmulo de kinesina y dineína en las hinchazones axonales siendo un indicador de presencia de daño en el transporte axonal que se asocia con el acúmulo de neurofilamento; cuyo proceso patológico parece ser irreversible en el tiempo. Si bien, la alteración en las proteínas motoras, solo se evaluó a través de la técnica de IHC, queda mucho por investigar ya que los procesos que regulan el transporte axonal están ampliamente interconectados. Es probable que múltiples mecanismos sinérgicos (respuesta inflamatoria, daño mitocondrial, agotamiento de ATP, estrés oxidativo y autofagia disfuncional) favorezcan esta alteración. La evaluación de estos procesos y su asociación será útil en futuros estudios para identificar la causa principal que induce este daño en el transporte axonal y dirigir terapias tempranas para mantener la homeostasis axonal.

## VIII. LIMITACIONES

- El uso de rata como modelo animal, al no ser su hospedador natural podría dar un diferente patrón de inmunorreactividad de kinesina y dineína. Así mismo, la vía de infección experimental intracraneal difiere de la vía de infección natural (vía oral). La rata no es el hospedero natural de *T. solium*.
- Tamaño de muestra reducido por la selección de acuerdo a criterios de inclusión (quistes parenquimales y no más de 3 quistes por cerebro).
- Tratamiento antiparasitario no efectivo. Debido a que el tratamiento no fue efectivo, el número de cisticercos dañados fue muy bajo y no permitió identificar si el tratamiento influye en incrementar el acúmulo de las proteínas motoras (kinesina y dineína) en las hinchazones axonales y en consecuencia el daño en el transporte axonal. Así mismo, explicaría la ausencia de diferencia estadísticamente significativa entre grupos de ratas con NCC tratadas y no tratadas.

## **IX. CONCLUSIONES**

- En ratas con NCC, el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras (kinesina y dineína) se caracterizó por la acumulación patológica de las proteínas en forma de esferoides y varicosidades en el tejido que rodea al cisticerco con ausencia de esta alteración en ratas sanas, indicando la existencia de daño en el transporte axonal.
- En ratas con NCC, se encontró daño axonal caracterizado por la acumulación patológica de NFP en forma de hinchazones axonales con ausencia de esta alteración en ratas sanas.
- En ratas con NCC, existe correlación positiva entre el patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras (indicador de daño en el transporte axonal) y daño axonal en tejido cerebral de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios.
- El patrón de inmunorreactividad de las proteínas motoras y neurofilamento fue similar en ambos grupos de ratas con NCC tratadas y no tratadas con antiparasitarios.
- En tejido cerebral de ratas con NCC existe un daño en el transporte axonal caracterizado por la acumulación patológica de las proteínas motoras kinesina (KIF5A, KLC2) y dineína (DIC) en forma de esferoides y varicosidades axonales de las neuronas que rodean al cisticerco que se asocia con el daño axonal, el cual está presente en el tiempo, siendo un daño irreversible.

## **X. RECOMENDACIONES**

- Estandarizar un protocolo de tratamiento antiparasitario para garantizar una adecuada eficacia del tratamiento en ratas con NCC.
- Evaluar la expresión de las proteínas motoras y genes que codifican dichas proteínas para corroborar la desregulación del transporte axonal en la enfermedad de NCC.
- Evaluar las proteínas que regulan la actividad de las proteínas motoras (quinasas) en la NCC.
- Incrementar el tamaño de muestra para reducir el error en los resultados.
- Evaluar el daño en el transporte axonal en otros modelos animales o *in vitro*.
- Evaluar la asociación entre la inflamación, producción de óxido nítrico, daño mitocondrial y autofagia disfuncional con el daño en el transporte axonal.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García H. Neurocysticercosis. *Neurol Clin.* 2018; 36(4): 851-864. doi: 10.1016/j.ncl.2018.07.003
2. Verastegui M, Mejia A, Clark T, Gavidia C, Mamani J, Ccopa F *et al.* Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *Am J Pathol.* 2015;185(8):2259-2268. doi:10.1016/j.ajpath.2015.04.015
3. Coral M, Gabriël S, Abatih E, Praet N, Benitez W, *et al.* *Taenia solium* Human Cysticercosis: A Systematic Review of Seroepidemiological Data from Endemic Zones around the World. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2015; 9(7): e0003919. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003919>
4. Gripper L, Welburn S. Neurocysticercosis infection and disease- A review. *Acta trópica.* 2017;166:218-224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.015>
5. Brutto O. Neurocysticercosis: A review. *The ScientificWorld Journal.* 2012;2012:159821. doi:10.1100/2012/159821
6. Mejia A, Carmen R, Carter E, Dávila D, Castillo G, Morales J, *et al.* Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathol.* 2019;29(3):425-436. DOI:10.1111/bpa.12669
7. Patilla D, Ramírez D. Detección de autofagia en neuronas y células gliales en ratas con Neurocisticercosis [Tesis de pregrado]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2021. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/9987>

8. Millecamps S, Julien J. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. 2013; 14:161-176.  
<https://doi.org/10.1038/nrn3380>
9. Sleight J, Rossor A, Fellows A, Tosolini A, Schiavo G. Axonal transport and neurological disease. *Nature Reviews Neurology*. 2019; 15:691-703.  
<https://doi.org/10.1038/s41582-019-0257-2>
10. Anderson E, White II J, Gunawardena S. Axonal transport and neurodegenerative disease: vesicle-motor complex formation and their regulation. *Degener Neurol Neuromuscul Dis*. 2014; 4:29-47.  
<https://doi.org/10.2147/DNND.S57502>
11. Guillaud L, Emad S, Otsuki M, Terenzio. Anterograde Axonal Transport in Neuronal Homeostasis and Disease. *Front. Mol. Neurosci*.2020; 13:556175.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.556175>
12. Hares K, Wilkins A. Axonal transport proteins as biomarkers of neurodegeneration?. *Biomark. Med.* (2017) 11(8), 589–591.  
<https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0163>
13. Kreutzer M, Seehusen F, Kreutzer R, Pringproa K, Kummerfeld M, Claus P, *et al.* Axonopathy is associated with complex axonal transport defects in a model of multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2012;22(4):454-71. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2011.00541. x.
14. Spitzbarth I, Lempp C, Kegler K, Ulrich R, Kalkuhl A, Deschl U, Baumgartner W, Seehusen F. Immunohistochemical and transcriptome analyses indicate complex breakdown of axonal transport mechanisms in

- canine distemper leukoencephalitis. *Brain Behav.* 2016; 6(7): e00472. DOI: 10.1002/brb3.472
15. Redondo J, Hares K, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Reductions in kinesin expression are associated with nitric oxide-induced axonal damage. *Journal of Neuroscience Research.* 2015;93(6):882-892. DOI: 10.1002/jnr.23556
  16. Sikasunge CS, Johansen MV, Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol.* 2009;160(3-4):242-50. doi:10.1016/j.vetpar.2008.11.015
  17. Carmen P, Davila D, Cauna Y, Bernal E, Bitterfeld L, Sutherland G et al. Blood–brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis. *J Neuro Res.* 2018; 00:1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jnr.24335>
  18. Morel M, Héraud C, Nicaise C, Suain V, Pierre J. Levels of kinesin light chain and dynein intermediate chain are reduced in the frontal cortex in Alzheimer’s disease: implications for axoplasmic transport. *Acta Neuropathol.* 2012; 123:71–84. DOI 10.1007/s00401-011-0901-4
  19. Hares K, Redondo J, Kemp K, Rice C, Scolding N, Wilkins A. Axonal motor protein KIF5A and associated cargo deficit in multiple sclerosis lesional and normal appearing white matter. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017;43 (3):227-241. doi: 10.1111/nan.12305.

20. Cai Z, Shi J, Yang Y, Cao B, Wang F, Huang J, et al. MPP+ impairs autophagic clearance of alpha-synuclein by impairing the activity of dynein. *Neuroreport*. 2009;20(6):569-73. doi: 10.1097/WNR.0b013e32832986c4.
21. Eikerberg D, Lehmbecker A, Brogden G, Tongtako W, Hahn K, Habierski A, Hennermann J, Naim H, Felmy F, Baumgartner W, Gerhauser I. Axonopathy and Reduction of Membrane Resistance: Key Features in a New Murine Model of Human GM1-Gangliosidosis. *J. Clin. Med.* 2020, 9(4), 1004; <https://doi.org/10.3390/jcm9041004>
22. Moyano L, O'Neal S, Ayvar V, Gonzalvez G, Gamboa R, Vilchez P *et al.* High Prevalence of Asymptomatic Neurocysticercosis in an Endemic Rural Community in Peru. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(12). DOI: 10.1371/journal.pntd.0005130
23. Chile N, Clark T, Arana Y, *et al.* In Vitro Study of *Taenia solium* Postoncospherical Form. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(2):e0004396. doi:10.1371/journal.pntd.0004396
24. García H; Nash T, Del Brutto O. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology.* 2014;13 (12), 1202-1215. doi: 10.1016 / S1474-4422 (14) 70094-8
25. Carabin H, Ndimubanzi P, Budke C, Nguyen H, Qian Y, Cowan L, et al. Clinical Manifestations Associated with Neurocysticercosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5 (5): e1152. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001152>
26. De Souza A, Nalini A, Kovoor J, Yeshraj G, Siddalingaiah H, Thennarasu K. Perilesional gliosis around solitary cerebral parenchymal cysticerci and

- long-term seizure outcome: a prospective study using serial magnetization transfer imaging. *Epilepsia*. 2011; 52 (10): 1918–27. doi: 10.1111 / j.1528-1167.2011.03189.x.
27. Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcia M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, *et al*. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. *PLoS Negl Trop Dis*.2020; 14(4): e0008005. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pntd.0008005](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008005)
28. Singh, A.K., Singh, S.K., Singh, A., Gupta, K.K., Khatoon, J., Prasad, A., *et al*. Immune response to *Taenia solium* cysticerci after anti-parasitic therapy, *International Journal for Parasitology*. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.05.007>
29. Yang Y, Coleman M, Zhang L, Zheng X, Yue Z. Autophagy in axonal and dendritic degeneration. *Trends Neurosci*. 2013;36(7):418-428. Disponible en: doi:10.1016/j.tins.2013.04.001
30. Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court F. Axonal Degeneration during Aging and Its Functional Role in Neurodegenerative Disorders. *Front. Neurosci*. 11:451. doi: 10.3389/fnins.2017.00451
31. Yong Y, Hunter S, Stepanova E, Deppmann C. Axonal spheroids in neurodegeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103679>
32. Llorens J. Toxic neurofilamentous axonopathies– accumulation of neurofilaments and axonal degeneration. *Journal of Internal Medicine*. 2013;273 (5):478-89. <https://doi.org/10.1111/joim.12030>

33. Restrepo B, Alvarez J, Castaño J, Arias L, Restrepo M, Trujillo J, Colegial C, Teale J. Brain Granulomas in Neurocysticercosis Patients Are Associated with a Th1 and Th2 Profile. *Infection and immunity*. 2001, 69(7):4554-4560. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001>
34. Cangalaya C, Zimic M, Marzal M, González A, Guerra C, Mahanty S, Nash T, Garcia H. Inflammation Caused by Praziquantel Treatment Depends on the Location of the *Taenia solium* Cysticercus in Porcine Neurocysticercosis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015, 9(12): e0004207. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004207>
35. Finnie W, Manavis J. Axonal spheroids in ovine neuroaxonal dystrophy are immunopositive to kinesin and dynein. *J Vet Diag Invest*. 2017, 29 (6): 852-855. doi: 10.1177/1040638717721579.
36. Morfini G, Szebenyi G, Brown H, Pant H, Pigino G, DeBoer S, Beffert U, Brady S. A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J* 2004,23(11):2235-45. doi: 10.1038/sj.emboj.7600237.
37. Gumy L, Chew D, Tortosa E, Katrukha E, Kapitein L, Tolkvsky A, Hoogenraad C, Fawcett J. The Kinesin-2 Family Member KIF3C Regulates Microtubule Dynamics and Is Required for Axon Growth and Regeneration. *Journal of Neuroscience*. 2013, 33 (28): 11329-11345; DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5221-12.2013>.
38. Beirowski B, Nógrádi A, Babeto I, García G, Coleman M. Mechanisms of axonal spheroid formation in central nervous system Wallerian

- degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69(5):455-72. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181da84db.
39. Didona A, Opal P. The role of neurofilament aggregation in neurodegeneration: lessons from rare inherited neurological disorders. *Molecular Neurodegeneration.* 2019, 14(19). <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0318-4>
40. Dávila D. Evaluación de la respuesta inflamatoria en diferentes tiempos post-infección en un modelo de neurocisticercosis [Tesis de maestría]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2024. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/15159>
41. Castillo G, Fustamante L, Delgado-Kamiche AD, Camen-Orozco RP, Clark T, Bernal E, et al. Understanding the pathogenic mechanisms and therapeutic effects in neurocysticercosis. *Brain Pathology.* 2024. e13237. <https://doi.org/10.1111/bpa.13237>
42. Hamamoto P, Fragoso G, Sciutto E, Fleury A. Inflammation in neurocysticercosis: clinical relevance and impact on treatment decisions. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2021. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1912592>
43. Mahanty S, Orrego MA, Mayta H, Marzal M, Cangalaya C, Paredes A, et al. Posttreatment Vascular Leakage and Inflammatory Responses around Brain Cysts in Porcine Neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015., 9(3): e0003577. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003577>
44. Cangalaya C, Zimic M, Marzal M, González AE, Guerra-Giraldez C, Mahanty S, et al. Inflammation Caused by Praziquantel Treatment Depends

- on the Location of the Taenia solium Cysticercus in Porcine Neurocysticercosis. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(12): e0004207. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004207>
45. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab M, et al. Axonal Swellings and Degeneration in Mice Lacking the Major Proteolipid of Myelin. Science. 1998. 280(5369), 1610–1613. doi:10.1126/science.280.5369.1610
46. Edgar, J. M., McLaughlin, M., Yool, D., Zhang, S. C., Fowler, J. H., Montague, P., Barrie, J. A., McCulloch, M. C., Duncan, I. D., Garbern, J., Nave, K. A., & Griffiths, I. R. Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *The Journal of cell biology*. 2004, 166(1), 121–131. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312012>
47. White C, Coyle C, Rajshkhar V, Singh G, Hauser A, Mohanty A, Garcia H, Nash T. Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis: 2017 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clinical Infectious Diseases*. 2018, 66, Issue 8, 15 April 2018, Pages e49–e75, <https://doi.org/10.1093/cid/cix1084>
48. Gibbs K, Greensmith L, Schiavo G. Regulation of Axonal Transport by Protein Kinases. Trends in Biochemical Sciences. 2015; 40 (10). <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.003>
49. Lee S, Sunil N, Motil J, Shea T. Differential roles of kinesin and dynein in translocation of neurofilaments into axonal neurites. J Cell Sci. 2011; 124 (7): 1022–1031. Doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.079046>

50. Martin E, Aminiel H, Sikalizyo A, Leifsson P, Vang M. Efficacy of ivermectin and oxfendazole against *Taenia solium* cysticercosis and other parasitoses in naturally infected pigs. *Acta Tropica*. 2013, 128(1).  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.06.010>
51. Sikasunge C, Johansen M, Willingham A, Leifsson P, Phiri I. *Taenia solium* porcine cysticercosis: Viability of cysticerci and persistency of antibodies and cysticercal antigens after treatment with oxfendazole. *Veterinary Parasitology*. 2008, 158 (1-2).  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.014>
52. Alves J, Gomes T, Neres V, Batista Y, Lino R, Clare M. Oxfendazole Nitazoxanide combination in experimental neurocysticercosis – Anti-inflammatory and cysticidal effects. *Experimental Parasitology*. 2014, 262.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2024.108764>
53. Oost W, Huitema AJ, Kats K, et al. Pathological ultrastructural alterations of myelinated axons in normal appearing white matter in progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2023;11(1):100. Published 2023 Jun 20. doi:10.1186/s40478-023-01598-7
54. Xia C, Roberts E, Her L, Liu X, Williams D, Cleveland D, Goldstein L. Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol*. 2003;161(1):55-66. doi:10.1083/jcb.200301026.

55. Hares K, Kemp K, Rice C, Gray E, Scolding N, Wilkins A. Reduced axonal motor protein expression in non-lesional grey matter in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 2014; 20(7): 812–821. doi:10.1177/1352458513508836
56. Soustelle L, Aimond F, López C, Brugiotti V, Raoul C, Layalle S. ALS-Associated KIF5A Mutation Causes Locomotor Deficits Associated with Cytoplasmic Inclusions, Alterations of Neuromuscular Junctions, and Motor Neuron Loss. *The Journal of Neuroscience*, 2023; 43(47):8058–8072. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0562-23.2023>
57. Baron D, Fenton A, Saez S, Giampetruzzi A, Sreeram A, Keagle P, Doocy V, Smith N, Danielson E, Andresano M, McCormack M, Garcia J, Bercier V, Van Den L, Brent J, Fallini C, Traynor B, Holzbaur E, Landers J. ALS-associated KIF5A mutations abolish autoinhibition resulting in a toxic gain of function. *Cell reports*. 2022; 39(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110598>
58. Mórotz, G.M., Glennon, E.B., Greig, J. *et al.* Kinesin light chain-1 serine-460 phosphorylation is altered in Alzheimer's disease and regulates axonal transport and processing of the amyloid precursor protein. *acta neuropathol commun.* 2019; 200 (7). <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0857-5>
59. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002; 1 (4): 232–241.

[https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(02\)00102-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(02)00102-3/fulltext)

60. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*. 2009. 11 (3): 541–554. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2234>
61. Maday S. Mechanisms of neuronal homeostasis: Autophagy in the axon. *Brain Res*. 2016;1649(Pt B):143-150. [10.1016/j.brainres.2016.03.047](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.03.047)
62. Berth S, Lloyd T. Disruption of axonal transport in neurodegeneration. *J Clin Invest* 2023 Jun 1;133(11): e168554. doi: [10.1172/JCI168554](https://doi.org/10.1172/JCI168554)
63. Christensen D, Huettenrauch M, Mitkovski M, Pradier L, Wirths O. Axonal degeneration in an Alzheimer mouse model is PS1 gene dose dependent and linked to intraneuronal A $\beta$  accumulation. *Front. Aging Neurosci*. 2014; 139 (6). Doi: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00139>
64. Bustamante A. Evaluación de la asociación entre la densidad de oligodendrocitos y el daño axonal en diferentes tiempos post-infección en un modelo de ratas con Neurocisticercosis [Tesis de pregrado]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2025. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/16926>.
65. Bernal E. Evaluación del estrés oxidativo y daño neuronal en un modelo experimental de ratas con neurocisticercosis que presentan epilepsia [Tesis de maestría]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2024. Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/16979>

66. Hares, K. M., Miners, S., Scolding, N., Love, S., & Wilkins, A. KIF5A and KLC1 expression in Alzheimer's disease: relationship and genetic influences. AMRC Open Research.2019;1(1). <https://doi.org/10.12688/amrcopenres.12861.1>

## **XII. ANEXOS**

### **ANEXO 1: TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA**

**1.Desparafinación e hidratación:** Colocar las láminas en la estufa a 60° C y luego al Xilol I solo metiendo y sacando al momento. Calentar en la estufa y proceder a colocar las láminas en los siguientes solventes: Xilol I, Xilol II, alcohol absoluto II, alcohol 95° I y alcohol 95° II (por 1 minuto en cada solvente). Para el último paso se procederá a hidratar con agua de caño en chorro.

**2.Tinción:** Sumergir las láminas en Hematoxilina de Harris por 2 minutos. Luego, se lavar con agua destilada hasta que el agua esté limpia. Seguidamente se sumergir las láminas en agua ácida 1% (alcohol de 70° + ac. clorhídrico) y se retiró inmediatamente. Después, lavar con agua amoniacal (carbonato de litio en solución saturada) por 1 minuto, el cual torna el tejido a un color azulino. Luego, lavar con agua destilada para retirar los restos de agua amoniacal. Realizar la contratinción con Eosina alcohólica al 5% (coloración citoplasmática) por 30 a 20 segundos.

**3.Deshidratación y montaje:** Colocar las láminas en una batería crecientes de alcoholes: Alcohol de 80°, alcohol de 90°, alcohol de 96° y alcohol absoluto. Luego, secar en una estufa por 5 minutos. Luego pasar las láminas por: xilol I y Xilol II. Finalmente se montar las láminas con solución Entellan.

**ANEXO 2: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA KIF5A**  
**(Cadena pesada de la proteína motora Kinesina)- IgG Rabbit**

**1. Desparafinación:** Colocar las láminas en una estufa a 64°C por 45 min. Luego, colocar en los siguientes solventes: Xilol I (3 minutos por 1 vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces), Xilol III (3 minutos por 2 veces). Secar entre cada Xilol durante 2 minutos. Secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes (en cada uno 2 minutos y de manera consecutiva, no pasar por estufa). Alcohol absoluto I y II, Alcohol 96° I y II, Alcohol 90° I y II y Alcohol de 80° I. Transportar en H<sub>2</sub>O destilada.

**2.Desenmascaramiento:** Colocar las láminas en coplins con la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) + Tween 20 al 0.05% en una olla con agua hirviendo por 30 min. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**3.Bloqueo de peroxidasa endógenas:** En cada lámina colocar 1 mL (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente) de solución Peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 15 min. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**4.Bloqueo de proteínas generales:** Incubar las láminas con la solución de bloqueo (PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de caballo, 5% suero de cabra y 2.5% de BSA) durante 1 hora. Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X.

**5.Incubación con anticuerpo primario:** Incubar las láminas con la solución (PBS1X Tritón X-100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra y

anticuerpo Rb anti-KIF5A a la dilución de 1/300) durante 16 hrs a 4°C. Luego lavar las láminas 3 veces con PBS 1X.

**6.Incubación con anticuerpo secundario:** Incubar las láminas con la solución (PBS 1X con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra y anticuerpo Goat anti-rabbit HRP a la dilución 1/500 ) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X.

**7.Revelado:** Preparar una gota de DAB + 3mL de solución tamponada; colocar sobre la lámina y dejar incubando con la solución por 1'30" (1 minuto 30 segundos) e inmediatamente lavar con agua destilada. Realiza la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 3 segundos.

**8.Deshidratación:** Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70, 90, 96 y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasa por Xilol I y Xilol II por 3 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

## **ANEXO 3: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA KLC2**

### **(Cadena ligera de la proteína motora Kinesina)- IgG Rabbit**

**1. Desparafinación:** Colocar las láminas en una estufa a 64°C por 45 min. Luego, colocar en los siguientes solventes: Xilol I (3 minutos por 1 vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces), Xilol III (3 minutos por 2 veces). Secar entre cada Xilol durante 2 minutos. Secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes (en cada uno 2 minutos y de manera consecutiva, no pasar por estufa). Alcohol absoluto I y II, Alcohol 96° I y II, Alcohol 90° I y II y Alcohol de 80° I. Transportar en H<sub>2</sub>O destilada.

**2. Desenmascaramiento:** Colocar las láminas en coplins con la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) + Tween 20 al 0.05% en una olla con agua hirviendo por 30 min. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**3. Bloqueo de peroxidasa endógenas:** En cada lámina colocar 1 mL (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente) de solución Peróxido de hidrógeno al 3% en metanol por 15 min. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**4. Bloqueo de proteínas generales:** Incubar las láminas con la solución de bloqueo (PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de caballo, 5% suero de cabra y 2.5% de BSA) durante 1 hora. Lavar las láminas 5 veces con PBS 1X.

**5. Incubación con anticuerpo primario:** Incubar las láminas con la solución (PBS1X Tritón X-100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra y

anticuerpo Rabbit anti-KLC2 a la dilución de 1/300) durante 16 hrs a 4°C. Luego lavar las láminas 5 veces con PBS 1X.

**6. Incubación con anticuerpo secundario:** Incubar las láminas con la solución (PBS 1X con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra y anticuerpo Goat anti-rabbit HRP a la dilución 1/500) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X.

**7. Revelado:** Preparar una gota de DAB + 3mL de solución tamponada; colocar sobre la lámina y dejar incubando con la solución por 1'30" (1 minuto 30 segundos) e inmediatamente lavar con agua destilada. Realiza la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 3 segundos.

**8. Deshidratación:** Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70, 90, 96 y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasa por Xilol I y Xilol II por 3 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

## **ANEXO 4: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA DIC (Cadena intermedia de la proteína motora Dineína)- IgG Mouse**

**1. Desparafinación:** Colocar las láminas en una estufa a 64°C por 45 min. Luego, colocar en los siguientes solventes: Xilol I (3 minutos por 1 vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces), Xilol III (3 minutos por 2 veces). Secar entre cada Xilol durante 2 minutos. Secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes (en cada uno 2 minutos y de manera consecutiva, no pasar por estufa). Alcohol absoluto I y II, Alcohol 96° I y II, Alcohol 90° I y II y Alcohol de 80° I. Transportar en H<sub>2</sub>O destilada.

**2. Desenmascaramiento:** Colocar las láminas en un beaker con la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) + Tween 20 al 0.05%. Colocar el beaker en el microondas y cuando el citrato este hirviendo colocar la canastilla con las láminas y mantener hirviendo durante 15 min a una potencia de 6. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**3. Bloqueo de peroxidasas endógenas:** En cada lámina colocar 1 mL (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente) de solución Peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 30 min. Luego lavar las láminas 3 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**4. Bloqueo de proteínas generales:** Incubar las láminas con la solución de bloqueo (PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de caballo, 5% suero de cabra y 2.5% de BSA). Lavar las láminas 3 veces con PBS 1X.

**5. Incubación con anticuerpo primario:** Incubar las láminas con la solución (PBS1X Tritón X-100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra y

anticuerpo Mouse anti- Dynein IC 1/2 a la dilución de 1/25) durante 16 hrs a 4°C.  
Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X.

**6. Incubación con anticuerpo secundario:** Incubar las láminas con la solución (PBS 1X con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra y ) anticuerpo Goat anti-mouse HRP a la dilución 1/100) por 1 hora a temperatura ambiente. Lavar las láminas 4 veces con PBS 1X.

**7. Revelado:** Preparar la solución de revelada dilución de DAB 1/50; colocar sobre la lámina y dejar incubando con la solución por 3'00" (3 minutos) e inmediatamente lavar con agua destilada. Realiza la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 3 segundos.

**8. Deshidratación:** Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70, 90, 96 y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasar por Xilol I y Xilol II por 3 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, montar las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

## **ANEXO 5: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA NFP**

### **(Anti-Neurofilament 200 kDa Antibody, clone RT97)- IgG Mouse**

**Desparafinación:** Colocar las láminas en una estufa a 64°C por 45 min. Luego, se colocaron en los siguientes solventes: Xilol I (3 minutos por 1 vez), Xilol II (3 minutos por 3 veces), Xilol III (3 minutos por 2 veces). Secar entre cada Xilol durante 2 minutos. Secar muy bien antes de pasar a la batería de alcoholes (en cada uno 2 minutos y de manera consecutiva, no pasar por estufa). Alcohol absoluto I y II, Alcohol 96° I y II, Alcohol 90° I y II y Alcohol de 80° I. Transportar en H<sub>2</sub>O destilada.

**Desenmascaramiento:** Colocar las láminas en coplins con la solución de Citrato 10 mM (pH=6,0) + Tween 20 al 0.05% en una olla con agua hirviendo por 30 min. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**Bloqueo de peroxidasas endógenas:** En cada lámina colocar 1 mL (dependiendo del tamaño del tejido, cubrir completamente) de solución Peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 30 min. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X. Entre cada lavado esperar un tiempo de 3 min.

**Bloqueo de proteínas generales:** Incubar las láminas con la solución de bloqueo (PBS 1X Tritón X-100 al 0.05% conteniendo 5% suero de caballo, 5% suero de cabra, 2.5 % leche y 2.5% de BSA). Lavar las láminas 4 veces con PBS 1X.

**Incubación con anticuerpo primario:** Se incubaron las láminas con la solución (PBS1X Tritón X-100 al 0.05% con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra) al

que se agregó el anticuerpo Mouse anti-NFP a la dilución de 1/400) durante 16 hrs a 4°C. Luego lavar las láminas 4 veces con PBS 1X.

**Incubación con anticuerpo secundario:** Se incubaron las láminas con la solución (PBS 1X con 5% suero de caballo y 5% suero de cabra) al que se agregó el anticuerpo Goat anti- mouse HRP a la dilución 1/500 por 1 hora a temperatura ambiente. Lavar las láminas 4 veces con PBS 1X.

**Revelado:** Preparar una gota de DAB + 3mL de solución tamponada; colocar sobre la lámina y dejar incubando con la solución por 2'30" (2 minutos 30 segundos) e inmediatamente lavar con agua destilada. Realiza la contratinción con la solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 3 segundos.

**Deshidratación:** Colocar las láminas en una batería creciente de alcoholes (70, 90, 96 y alcohol absoluto) por 2 minutos cada uno, luego pasa por Xilol I y Xilol II por 3 minutos para luego secar en estufa. Finalmente, se montan las láminas con solución Entellan 1:1 (MERCK).

**ANEXO 6: Tabla de comparación múltiple de Dunn para KIF5A respecto al promedio de esferoides y varicosidades axonales en materia gris para los tres grupos experimentales.**

<b>Tiempo</b>	<b>Comparaciones</b>	<b>Esferoides <i>p- value</i></b>	<b>Varicosidades <i>p- value</i></b>
<b>48 horas</b>	No tratado vs control	0.0056	0.0086
	Tratado vs control	0.2696	0.0743
	Tratado vs no tratado	0.1465	0.5187
<b>5 días</b>	Control vs No tratado	0.0408	0.0394
	Control vs Tratado	0.086	0.0246
	No tratado vs tratado	0.9806	1
<b>2 meses</b>	No tratado vs control	0.1729	0.2577
	Tratado vs control	0.042	0.0089
	No tratado vs tratado	0.9935	0.3324
<b>8 meses</b>	No tratado vs control	0.0037	0.0046
	Tratado vs control	0.0669	0.051
	No tratado vs tratado	0.906	1
<b>12 meses</b>	No tratado vs control	0.0053	0.0083
	Tratado vs control	0.1405	0.0348
	No tratado vs tratado	0.2831	0.8889

**ANEXO 7. Valores *p* obtenidos de la comparación del promedio de esferoides vs promedio de varicosidades axonales reactivos a KIF5A en materia gris.  
*Prueba U de Mann-Whitney***

<b>Grupos Tiempos</b>	<b>No tratados <i>p – value</i></b>	<b>Tratados <i>p- value</i></b>
<b>48 horas</b>	0.1	0.57
<b>5 días</b>	0.1	0.1
<b>2 meses</b>	1	0.4
<b>8 meses</b>	0.1	0.2
<b>12 meses</b>	0.5	0.1

**ANEXO 8: Tabla de comparación múltiple de Dunn para KLC2 respecto al promedio de varicosidades axonales en materia gris para los tres grupos experimentales.**

<b>Tiempo</b>	<b>Comparaciones</b>	<b>Varicosidades <i>p- value</i></b>
48 horas	No tratado vs control	0.0129
	Tratado vs control	0.0572
	No tratado vs tratado	0.7193
5 días	No tratado vs control	0.0226
	Tratado vs control	0.0374
	No tratado vs tratado	1
2 meses	No tratado vs control	0.1156
	Tratado vs control	0.0569
	No tratado vs tratado	1
8 meses	No tratado vs control	0.0021
	Tratado vs control	0.125
	No tratado vs tratado	0.5117
12 meses	No tratado vs control	0.0053
	Tratado vs control	0.0503
	No tratado vs tratado	0.6007

**ANEXO 9: Tabla de comparación múltiple de Dunn para DIC respecto al promedio de esferoides y varicosidades axonales en materia gris para los tres grupos experimentales.**

<b>Tiempo</b>	<b>Comparaciones</b>	<b>Esferoides <i>p- value</i></b>	<b>Varicosidades <i>p- value</i></b>
48 horas	No tratado vs control	0.0232	0.0155
	Tratado vs control	0.1235	0.0494
	No tratado vs tratado	0.6244	0.8321
5 días	No tratado vs control	0.0119	0.0191
	Tratado vs control	0.4432	0.0436
	No tratado vs tratado	0.1377	0.956
2 meses	No tratado vs control	0.5885	0.0412
	Tratado vs control	0.189	0.1139
	No tratado vs tratado	0.8491	0.7351
8 meses	No tratado vs control	0.0209	0.0075
	Tratado vs control	0.1543	0.1327
	No tratado vs tratado	1	0.7783
12 meses	No tratado vs control	0.0288	0.0194
	Tratado vs control	0.0103	0.0158

No tratado vs tratado	1	1
-----------------------	---	---

**ANEXO 10. Valores  $p$ , obtenidos de la comparación del promedio de esferoides vs varicosidades axonales reactivos a DIC en materia gris. Prueba  $U$  de Mann-Whitney**

Grupos	No tratados	Tratados
Tiempos	$p$ - value	$p$ - value
48 horas	0.7	0.06
5 días	0.7	0.14
2 meses	0.3	0.69
8 meses	0.58	0.8
12 meses	0.69	1

**ANEXO 11: Tabla de comparación múltiple de Dunn para NFP respecto al promedio de esferoides y varicosidades axonales en materia gris para los tres grupos experimentales.**

Tiempo	Comparaciones	Esferoides $p$ - value	Varicosidades $p$ - value
48 horas	No tratados vs control	0.0191	0.0129
	Tratado vs control	0.0436	0.0572
	No tratado vs tratado	0.956	0.7193
5 días	No tratado vs control	0.1025	0.1035
	Tratado vs control	0.0094	0.0096
	No tratado vs tratado	0.7177	0.7193
2 meses	No tratado vs control	0.038	0.0936
	Tratado vs control	0.0454	0.0235
	No tratado vs tratado	1	1
8 meses	No tratado vs control	0.0019	0.0037
	Tratado vs control	0.1412	0.0669
	No tratado vs tratado	0.4494	0.906
12 meses	No tratado vs control	0.0016	0.013
	Tratado vs control	0.1162	0.0736
	No tratado vs tratado	0.1627	0.7298

**ANEXO 12. Valores p, obtenidos de la comparación del promedio de esferoides vs varicosidades axonales reactivos a NFP en materia gris. Prueba *U de Mann-Whitney***

<b>Grupos</b>	<b>No tratados</b>	<b>Tratados</b>
<b>Tiempos</b>	<i>p - value</i>	<i>p- value</i>
48 horas	0.4	0.0286
5 días	0.3	0.1429
2 meses	0.4	0.0635
8 meses	0.0411	0.4
12 meses	0.4206	0.3333