



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA A
TOXOCARA CANIS USANDO A LA
RATA COMO MODELO ANIMAL DE
TOXOCARIASIS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

RONALD FRANCISCO OROPEZA
MAGUIÑA

LIMA - PERÚ

2026

ASESORA

Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

JURADO DE TESIS

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

PRESIDENTE

DRA MARITZA MERCEDES CALDERON SANCHEZ DE JIMENEZ

VOCAL

DR. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

SECRETARIA

DEDICATORIA.

A mi madre María y a mi padre Ronald, que me enseñaron la perseverancia.

A mi asesora, la doctora Manuela Verastegui, que me apoyó en todo momento.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la gente del laboratorio 116 y 117 por su apoyo en los experimentos, al personal del LID y laboratorios, y a los profesores de me enseñaron durante la carrera de Biología y Maestría. ¡A todos muchas gracias!

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Tesis Autofinanciada



DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N. º	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	OROPEZA MAGUIÑA RONALD FRANCISCO

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA**, autores del trabajo titulado: **RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA A TOXOCARA CANIS USANDO A LA RATA COMO MODELO ANIMAL DE TOXOCARIASIS**, 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. º	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	VERASTEGUI PIMENTEL MANUELA RENEE	FACI	ASESOR

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

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **11%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3046621201**; fecha de entrega: **30-09-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 30 de septiembre de 2026**

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

Firma del Co-asesor
N° DNI:
ORCID:

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN.....	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
• Objetivo principal	3
• Objetivos específicos	4
III. HIPÓTESIS	4
IV. MARCO TEÓRICO	4
V. MATERIALES Y MÉTODOS	8
• Obtención de parásitos e inoculación	8
• Infección experimental en Animales	10
• Inmunohistoquímica:	12
• Análisis de la inmunoreactividad de los biomarcadores	13
• Análisis estadístico	14
VI. RESULTADOS	15
VII. DISCUSIÓN	31
VIII. CONCLUSIONES	37
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
X. ANEXOS	

RESUMEN

La toxocariasis es una enfermedad parasitaria causada por larvas de nematodos del género *Toxocara*. La transmisión ocurre a través de perros y gatos, los cuales son hospederos definitivos de *Toxocara canis* y *Toxocara cati* respectivamente. El ser humano adquiere la infección mediante la ingestión de huevos embrionados presentes en alimentos, agua o suelo contaminados. Una vez en el hospedero, las larvas eclosionan, pero no alcanzan su estado adulto; en su lugar, migran a diversos órganos, dando lugar al síndrome de larva migrans visceral. Entre los órganos afectados incluyen el hígado, los pulmones, el corazón, los ojos y el sistema nervioso central (SNC). Los efectos más severos en el organismo incluyen la hepatomegalia, daños neuronales, daño a la retina y ceguera permanente. Sin embargo, los mecanismos que median la patología a nivel del sistema nervioso central, especialmente en las infecciones crónicas, permanecen poco comprendidos. En el presente estudio se utilizó un modelo in vivo en ratas para investigar los mecanismos de acción patógena del parásito en el SNC, evaluando el efecto neuroinflamatorio de la toxocariasis en ratas infectadas de forma crónica tras 4 meses de infección. Mediante inmunohistoquímica realizada en cortes de cerebros de ratas infectadas, empleando los marcadores CD68, GFAP e IgG, se encontró un incremento significativo de la astrocitosis, activación de fagocitos y de la alteración permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el tejido circundante al parásito, en comparación con las regiones contralaterales del mismo cerebro y con las áreas correspondientes en ratas control no infectadas. Asimismo, zonas contralaterales a los sitios de infección también mostraron diferencias significativas en todos los marcadores con zonas del cerebro homólogas de ratas control no infectadas,

mostrando que los efectos de la infección se extienden fuera de la periferia donde se localizaron las larvas.

Palabras Clave: Neurotoxocariasis, *Rattus norvegicus*, *Toxocara canis*

ABSTRACT

Toxocariasis is a parasitic disease caused by the larvae of nematodes belonging to the genus *Toxocara*. Transmission occurs through dogs and cats, which are the definitive hosts of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*, respectively. Humans acquire the infection by ingesting embryonated eggs containing larvae present in contaminated food, water, or soil. Once inside the host, the larvae hatch but do not develop into adult worms; instead, they migrate through various organs, causing visceral larva migrans syndrome. The organs affected include the liver, lungs, heart, eyes, and the central nervous system (CNS). The most severe consequences of infection include hepatomegaly, neuronal damage, retinal injury, and permanent blindness. However, the mechanisms underlying the pathology in the central nervous system, particularly during chronic infection, remain poorly understood.

In the present study, an in vivo rat model was used to investigate the pathogenic mechanisms of the parasite in the CNS by evaluating the neuroinflammatory effects of chronic toxocariasis after four months of infection. Immunohistochemistry performed on brain sections from infected rats, using the markers CD68, GFAP, and IgG, revealed a significant increase in astrogliosis, phagocyte activation, and alteration in the blood-brain barrier permeability in the tissue surrounding the parasite, compared to contralateral areas of the same brain and to homologous areas in uninfected control rats. Furthermore, contralateral areas of the infected regions

also showed significant differences in all markers compared to homologous brain areas of uninfected control rats, demonstrating that the effects of the infection extend beyond the periphery where the larvae were located.

Keywords: Neurotoxocariasis, *Rattus norvegicus*, *Toxocara canis*

I. INTRODUCCIÓN

La toxocariasis es la enfermedad producida en humanos por la infección accidental de larvas del nematodo del género *Toxocara*. Es una enfermedad de distribución global, de las que se han detectado dos especies infecciosas para humanos: *Toxocara cati*, que tiene como hospedero definitivo al gato (*Felis catus*), y *Toxocara canis*, que tiene como hospedero definitivo al perro (*Canis lupus familiaris*). A través de sus heces, ambos animales liberan huevos del parásito al ambiente, constituyéndose así en fuentes potenciales de infección para el ser humano. El ser humano se infecta del parásito por varias vías: la principal, que afecta generalmente a niños, es al consumir tierra contaminada con los huevos del parásito. En la vía secundaria de infección se encuentra el consumo de carne de otros animales infectados con larvas del parásito, principalmente ganado que ingirió los huevos presentes en el suelo, o vegetales que han estado en contacto con huevos en etapa madura [1,2,3].

Una vez que ingresa al organismo, el parásito migra desde el intestino a la sangre a varios tejidos, causando dolencias en los distintos órganos en los que se deposita. A este proceso se le conoce como Migración Larval Visceral, y en el caso de *Toxocara* los tejidos infectados incluyen músculo, pulmón, corazón, hígado, ojos, el sistema nervioso central (SNC) y el periférico. Debido a que la infección en humanos es accidental, el parásito no crece ni se reproduce en los mismos, pudiendo permanecer en estado larvario por varios años o décadas sin que el individuo infectado lo note si la carga parasitaria es pequeña. A largo plazo, el efecto crónico en el hígado puede causar hepatomegalia, y en el ojo, ceguera.

La neurotoxocariasis ocurre en caso de que las larvas de *Toxocara* logren migrar al cerebro, y en este caso la sintomatología es variada, pudiendo incluir desde síntomas de déficit cognitivo, epilepsia, encefalitis, meningitis o tumoración intracraneal. A diferencia de otros parásitos cerebrales, las larvas en el cerebro dejan surcos de su recorrido y no llegan a encapsularse, generando lesiones similares a pequeños tumores [3-6].

La neurotoxocariasis en humanos es de difícil detección, debido a que el parásito emplea mecanismos que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero, y como consecuencia, puede permanecer en el organismo durante años sin generar síntomas evidentes o que el hospedero se percate que está infectado. La mayoría de los casos diagnosticados corresponden a situaciones en las que la carga parasitaria es lo suficientemente elevada como para provocar fiebre recurrente en poblaciones expuestas, lo que posibilita su reconocimiento mediante pruebas serológicas. Sin embargo, estas pruebas pueden arrojar falsos negativos cuando la carga parasitaria es baja, y en tales circunstancias, la detección del parásito suele ocurrir tardíamente, generalmente ante la presencia de manifestaciones crónicas o mediante estudios de imagen como la tomografía.

Debido a que el hombre es hospedero aberrante de la enfermedad, modelos de experimentación animal en los que se desee experimentar los mismos síntomas deben ser también de hospederos aberrantes, lo que incluye a los hospederos paraténicos. Para el caso de la toxocariasis, cualquier animal fuera del Orden Carnivora, puede actuar como hospedero paraténico, incluyendo a roedores y ganado doméstico. Sobre la especie del parásito, la mayor diferencia entre hospederos aberrantes se encuentra en la migración al cerebro: En el caso de *T.*

canis, el parásito del perro, estudios en roedores han demostrado una alta capacidad de migración hacia el encéfalo. En contraste, *T. cati* también puede alcanzar el cerebro, pero en una proporción considerablemente menor, evidenciando una menor tendencia a invadir este órgano en comparación con *T. canis* [5-13].

Un aspecto importante que resaltar es que las características neurológicas de la toxocariasis han sido evaluadas más en ratones que en ratas para medir alteraciones de comportamiento, ansiedad y memoria después de la infección. Por otro lado, la mayoría de los estudios realizados con esta enfermedad en relación a marcadores inmunitarios o tipos celulares han empleado solamente cerebros homogenizados, dejando el análisis de la presencia del parásito en zonas específicas del cerebro o la inflamación en cortes de cerebro como algo meramente observacional [5, 9-11].

Para comprender la interacción hospedero-parásito en la neurotoxocariasis, a nivel del tejido cerebral se realizó este estudio en un modelo in vivo de neurotoxocariasis usando ratas Holtzman para evaluar la respuesta neuroinflamatoria mediante la activación de células gliales (astrocitos y microglía) y alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (extravasación de IgG al parénquima cerebral) usando histología e inmunohistoquímica, en ratas infectadas con *Toxocara canis* por vía oral [12-16].

II. OBJETIVOS

Objetivo principal

Determinar si la infección del sistema nervioso central por larvas de *Toxocara canis* activa la respuesta neuroinflamatoria mediante la activación de células gliales y alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Objetivos específicos

- Determinar la activación de las células gliales: astrocitos y microglía
- Determinar la presencia de fagocitos (microglía activada/macrófagos) en el tejido que rodea al parásito.
- Determinar la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica mediante la extravasación de IgG al parénquima cerebral.

III. HIPÓTESIS

La presencia de larvas de *Toxocara canis* en el cerebro de ratas de la especie *Rattus norvegicus* induce la activación de astrocitos, de macrófagos y microglía, así como la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en comparación a ratas control.

IV. MARCO TEÓRICO

Distribución global de la toxocariasis

La toxocariasis humana es una de las enfermedades zoonóticas más descuidadas del último siglo. Fuera del ambiente urbano, *Toxocara sp.* tiene como reservorio a la mayoría de los mamíferos del Orden Carnivora, siendo los cánidos los hospederos principales de *Toxocara canis* y félidos los de *Toxocara cati*. El parásito también infecta a muchos mamíferos menores, como roedores y lagomorfos o aves como hospederos paraténicos, y en caso de que sean aves voladoras, estas favorecen la distribución intercontinental del parásito. Se sabe de una tercera especie llamada

Toxocara leonina que infecta tanto a félidos como cánidos, pero su distribución es menor que las otras especies al infectar perros y gatos. (17,18)

En el caso de la toxocariasis humana, se ha determinado que su distribución es global, afectando principalmente a países de clima subtropical y tropical, donde las condiciones de temperatura y humedad son lo suficientemente elevadas para permitir que los huevos de *Toxocara* maduren con mayor celeridad. El parásito parece disminuir su presencia en países de clima muy frío donde la temperatura anual es menor a 10°C (6.9%), y en países con gran aridez donde la humedad es menor a 40% (6.6%). También se encuentra que su presencia es más fuerte en el campo que en la ciudad. En el caso de islas, pueden convertirse en zonas de alta endemidad como Santa Lucía (86.6%), o en lugares aislados del mismo como Nueva Zelanda (0.7%). En Perú se estima que la seroprevalencia es del 27.5% de los habitantes, cifra alarmante, considerando que existen menos reportes clínicos de pacientes atendidos en centros de salud por esta enfermedad, de los que estiman las pruebas serológicas tomadas en censos [19, 20].

Ciclo de infección de *Toxocara* en humanos

El ciclo de infección del parásito varía según el hospedero. Mientras en perros y gatos el parásito desarrolla una infección intestinal, en el hombre, al ser un hospedero aberrante, el parásito no alcanza la etapa adulta ni se multiplica, sino que desarrolla un ciclo migratorio por el cuerpo de su hospedero, conocido como migración larval visceral. Este ciclo comienza con el ingreso por vía oral del parásito, en forma de huevo maduro, a través del sistema digestivo. Una vez en el

intestino, el huevo libera una larva L3 que migra a través del sistema circulatorio a diferentes órganos del cuerpo, incluyendo hígado, el pulmón, el corazón, el cerebro, los ojos y los ganglios linfáticos. La concentración de larvas en determinados órganos puede variar conforme avanza la infección, y el tiempo en el que permanezcan en los mismos es lo que genera las mayores complicaciones a nivel agudo o crónico. La afección al hígado por lo general puede causar hepatomegalia y la del pulmón suele asociarse con eosinofilia. En el caso de que el parásito llegue a los ojos, la enfermedad es catalogada como migración larval ocular (MLO), generando granulomatosis inflamatoria y si no se trata con rapidez puede provocar pérdida de la visión o ceguera permanente. Al ser el hombre un hospedero aberrante, el parásito no puede completar su ciclo ni escapar del organismo, por lo que puede persistir en el hospedero y generar rebrotes varios años después de su ingreso. El tratamiento de esta enfermedad incluye el empleo de antiparasitarios, principalmente albendazol, administrado durante varios días, así como seguimientos mediante el conteo de eosinófilos para confirmar la eliminación del parásito. En el caso de migración larval ocular, además de los antiparasitarios puede ser necesario realizar operaciones quirúrgicas, sea para extraer la larva o para reparar el daño a la retina [1-4].

Parásitos cerebrales y su efecto en la conducta

Los trastornos neurológicos y conductuales son una de las consecuencias frecuentes de las enfermedades infecciosas del sistema nervioso central. Estos cambios pueden producirse cuando un organismo patógeno logra evadir el sistema inmune, atravesar la barrera hematoencefálica e ingresar en el cerebro y cerebelo.

Existen muchos parásitos intracelulares y extracelulares que pueden invadir el sistema nervioso central en humanos, incluyendo entre ellos: *Toxoplasma gondii*, *Taenia solium*, *Plasmodium sp*, *Trypanosoma cruzi* y el mismo *Toxocara* [9, 10, 21-23].

Para evaluar el efecto de estos parásitos en la conducta, por lo general se emplean modelos animales, siendo la rata y el ratón los más empleados por sus similitudes genéticas y fisiológicas con el ser humano. Los experimentos más comunes para evaluar cambios en la memoria y conducta de animales consisten en el empleo de pruebas, laberintos (T-maze, light/dark box, water maze) y observación periódica. En muchas ocasiones estos experimentos requieren un entrenamiento previo de los animales para que aprendan una acción y luego evaluar su desempeño conforme avanza la infección, comparando los resultados entre animales control y animales infectados [16, 24-26].

En el caso de *Toxocara*, estudios conductuales en roedores infectados con el parásito han probado que la carga parasitaria alta puede generar mayor inmovilidad, disminución de la conducta exploratoria, así como deterioro del aprendizaje y la memoria en los animales infectados [6,7,9,10].

Se especula que muchas de las alteraciones en el comportamiento de hospederos podrían ser parte de un mecanismo del parásito para continuar su ciclo biológico. En el caso de *Toxoplasma gondii*, roedores infectados con el parásito a nivel del cerebro presentan conductas que aumentan su predisposición a ser devorados, incluyendo mayor atracción a lugares con luz, atracción por la orina de gatos o pérdida del miedo al peligro. Por otro lado, la disminución parcial de la cantidad de

parásitos en el cerebro usando tratamientos antiparasitarios se ha demostrado exitosa en mejorar el comportamiento de los animales afectados [27-29].

Marcadores neuroinflamatorios

Para analizar la respuesta inflamatoria producto de una infección del SNC se pueden evaluar varios tipos celulares, entre ellos la microglía, que son células de defensa inmunitaria con capacidad fagocitaria del SNC; los astrocitos, que son células que nutren y dan soporte a las neuronas; y macrófagos, que, si bien no son células propias del SNC pueden infiltrarse en caso de hemorragia o rotura de los capilares sanguíneos. Además, la presencia elevada de ciertos marcadores como IgG, que no es producida por células del cerebro, puede indicar que hubo ruptura o disrupción en la barrera hematoencefálica (BHE). Si bien la presencia o activación de estos tipos celulares puede medirse usando técnicas de histología, SDS-PAGE o PCR, los resultados de cada tipo de análisis tienen cada uno sus diferentes ventajas y desventajas, así como limitaciones y riesgos [30-37].

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Obtención de parásitos e inoculación

Obtención de huevos

Los huevos de *T. canis* se obtuvieron a partir de las heces de perros infectados, procedentes de clínicas veterinarias o muestras de heces recolectadas en parques públicos.

Detección de huevos de *Toxocara canis* en heces

Las muestras de heces obtenidas se sometieron a un análisis mediante la técnica de Ritchie modificada para determinar la presencia de huevos de *T. canis*. Para esta prueba se obtuvieron con una espátula de madera 1 o 2 gramos de materia fecal de cada muestra, y se realizó un tamizado utilizando gasas y varillas en un tubo de centrifugación. El filtrado fue sometido a tres lavados con agua destilada seguidos de una centrifugación a 1500-2000 rpm por 2 minutos, descartando el sobrenadante y conservando el sedimento. A este último sedimento se le agregó 10 mL de formol al 10%, se mezcló bien y se dejó reposar por 5 minutos. Luego se le agregó 3 mL de éter, se tapó el tubo y se mezcló fuertemente por 30 segundos. Se centrifugó la muestra a 1500 rpm por 5 minutos, formándose cuatro capas, de superior a inferior: éter, restos fecales, formol y un sedimento con parásitos. Se descartaron las 3 capas superiores, se mezcló bien el sedimento de parásitos y se extrajo una gota del mismo sobre un portaobjetos, se añadió 10 µL de agua destilada y se le agregó una laminilla para su observación al microscopio óptico. Se analizó la morfología de los huevos para confirmar si eran de *T. canis* o de *T. leonina* [38]. No se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para confirmar la especie de la larva.

Maduración de huevos de *Toxocara canis*

Las muestras de heces en las que se detectó huevos de *Toxocara canis*, se concentraron con el método de sedimentación en copa. Posteriormente, los huevos se recuperaron mediante sucesivos lavados para su recolección. Los huevos de *Toxocara canis* aislados se depositaron en placas de vidrio colocadas dentro de recipientes plásticos acondicionados con gasas humedecidas, a fin de mantener una atmósfera húmeda. Los recipientes se incubaron por 28 días en una estufa a 28°C.

Se realizaron tres revisiones semanales para mantener húmedo el contenedor y observar el progreso de maduración de los huevos.

Los huevos se consideraron maduros, cuando se observaron larvas en movimiento en su interior. La cantidad inicial de huevos se calculó en base a un análisis de proporción, tomando varias alícuotas de la suspensión y extrapolando el número de huevos al volumen total del recipiente. Cuando terminó el periodo de maduración, se realizó otro conteo utilizando el mismo procedimiento, pero esta vez considerando también la cantidad de huevos maduros en los que se observara larvas en movimiento (huevos larvados). Con base en estas proporciones, se estimó el número total de huevos que alcanzaron el estadio larvado y el número de huevos que permanecieron sin embrionar. En total se pusieron a embrionar 32566 huevos a 28°C, por 4 semanas.

2) Infección experimental en animales

Animales de experimentación.

Las ratas Holtzman (*R. norvegicus*), hembras de 6 semanas de edad fueron adquiridas del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se emplearon 18 ratas en total, de las cuales 6 correspondieron al grupo control, a las cuales se les inocularon solución salina por vía oral, y 12 ratas para el grupo infectado, a las cuales se les inocularon los huevos por vía oral. Todas las ratas fueron de 6 semanas de edad. A los animales se les suministró alimento balanceado y agua *ad libitum*.

Inoculación

La infección de los animales se realizó por inoculación por vía oral mediante la ingesta de huevos maduros larvados resuspendidos en solución salina, con una dosis

dependiente del grupo de infección. Para el grupo control se administró por vía oral únicamente solución salina. Para el grupo de infección, se dividió en dos subgrupos de 6 animales cada uno: a un grupo se le inoculó 500 huevos maduros larvados por rata y al segundo subgrupo 1,000 huevos maduros larvados por rata.

Sacrificio de animales y obtención de cerebros

Luego de cuatro meses de iniciada la infección, las ratas fueron anestesiadas con una solución ajustada al peso corporal, utilizando ketamina a razón de 150 mg/kg y xilacina a 15 mg/kg (Véase en Anexo 1).

Una vez anestesiadas, a las ratas se les realizó una perfusión, extrayéndoseles la sangre e inyectándoles PBS heparinizado y luego paraformaldehído al 4%. Se extrajo el cerebro de la cabeza del roedor partiendo el cráneo para poder tener visible el órgano. Los cerebros se depositaron en tubos Falcon con solución de paraformaldehído 4%, para luego ser reemplazada por alcohol al 70%. Los cerebros fueron cortados en 5 secciones coronales, y dispuestos cada uno en un taco. Finalmente fueron sometidos a un proceso de deshidratación por una batería de alcoholes, xilol y parafinización, para finalmente terminar en tacos de parafina.

Procesamiento de muestras para histología

Cerebros de rata procesados en moldes de parafina fueron cortados en secciones de 4-5 μm con un micrótomos, montados en láminas portaobjetos y rotuladas con lápiz de punta de diamante. De cada molde se analizaron láminas cada diez cortes mediante tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar la cantidad y ubicación de los parásitos. Cerebros en los que no se encontró larvas en el cerebro

no fueron evaluados para el estudio final en inmunohistoquímica. Si bien no se descarta que estos animales pudieran tener larvas en otros órganos, el estudio principal se enfoca en neurotoxocariasis y solo se llevó a cabo con animales que presentaran la infección cerebral.

3) Inmunohistoquímica:

Para analizar los diversos biomarcadores, se realizaron pruebas de inmunohistoquímica: Para evaluar astrocitosis se emplearon anticuerpos contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP); para analizar presencia de fagocitos (microglía activada/macrófagos), se utilizaron anticuerpos contra CD68; y para analizar alteración de la barrera hematoencefálica se emplearon anticuerpos contra IgG de rata.

La inmunotinción se realizó según el protocolo del fabricante/laboratorio. Después de un proceso de desparafinación, las láminas se desenmascararon utilizando un buffer de desenmascaramiento (Citrato 1X pH 6.0 + Tween 20 al 0.05). A continuación, se lavaron con PBS y se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena mediante la adición de peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Tras una incubación de 1 hora en la solución de bloqueo de proteínas, las secciones se incubaron con su anticuerpo primario correspondiente. Para los marcadores de GFAP (1/1000, policlonal, Cat #180063, Fisher), CD68 (1/500, monoclonal, clona ED1, Bio-Rad), IgG (1/150, Cat 5220-0364, Seracare), después de añadir el primer anticuerpo, las láminas se incubaron toda la noche a 4°C en cámaras húmedas. Al día siguiente las láminas se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario: en el caso de GFAP, con Anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit

(1/300, Cat 5220-0336, Seracare); y para CD68, con Anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse (1/500, Cat 5220-0341, Seracare). En el caso de IgG, al estar el primer anticuerpo ya vinculado a una peroxidasa de rábano picante (HRP), se pasó directamente al paso de revelado.

Los productos de la reacción se visualizaron utilizando 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB), diluida en 1/100 en PBS con peróxido de hidrógeno al 3%. Los tiempos de revelado fueron de 8 minutos para el marcador GFAP, 5 minutos para CD68 y 2 minutos para IgG. Las láminas se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron en una batería de alcohol y se montaron con EntellanTM en una campana de gases. Para validar los resultados de la tinción, en cada prueba se incluyó como control positivo una lámina con tejido cerebral de rata infectada con cisticercos. Asimismo, se incluyó un control negativo en el que, durante el paso del anticuerpo primario, se aplicó una solución sin anticuerpo. Las células que mostraron una reacción citoplasmática marrón distintiva a GFAP se consideraron positivas. Para CD68, muestras que mostraron la presencia de fagocitos activados, teñidos de marrón, se consideraron positivas. En el caso de IgG, la proteína normalmente no ingresa al encéfalo, salvo haya una alteración en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, por lo que las muestras que presentaran la aparición de conjugados de IgG de coloración marrón se consideraron positivas (37, 39-42).

4) Análisis de la inmunoreactividad de los biomarcadores

Para el análisis de la reactividad de los biomarcadores en los tejidos cerebrales de animales infectados y controles, se tomaron fotografías de las láminas en las que se

realizó inmunohistoquímica. Para la toma de fotos se utilizó un sistema de cámara Basler acA2040-55uc que estaba acoplado a un microscopio óptico, en donde se colocaron las láminas a analizar. La cámara a su vez estaba conectada a un ordenador con el software de captura de imágenes digitales *Microvisioneer Manual WSI*, el cual se empleó para escanear los cortes del cerebro y exportarlos como imágenes digitales. Los escaneos fueron tomados a 20X, con un adaptador de 0.5x. De estos escaneos, se realizaron cortes con el programa *ObjectiveViewer*, para capturar tres tipos de imágenes: A) zonas donde se ubicaron las larvas y su periferia; B) zonas contralaterales del hemisferio donde se ubicaron larvas; C) zonas de cerebros no infectados homólogas a las zonas infectadas [43].

5) Análisis estadístico

Las capturas fueron analizadas usando el programa ImageJ (Fiji). Para las zonas infectadas con parásitos, se analizó la zona alrededor del parásito a una distancia en un radio de 150 μm para GFAP y 75 μm para el análisis de CD68 e IgG. Para las zonas contralaterales y tejido no infectado, se usó el mismo tamaño de radio que en las zonas infectadas, considerando un centro imaginario.

Las imágenes fueron deconvolucionadas con un complemento (plugin) para detectar la coloración de inmunohistoquímica con DAB, y luego se convirtieron a formato binario con la función de umbralización (thresholding) para eliminar errores de fondo. El umbral fue adaptado a cada imagen. La inmunoreactividad de los marcadores CD68, GFAP e IgG fue medida por porcentaje de área (proporción entre el número de píxeles teñidos y el número total de píxeles en cada imagen).

Estos porcentajes de área se compararon estadísticamente con el programa Stata para determinar si existían diferencias significativas entre las zonas periféricas, no infectada, y contralateral para los marcadores del estudio (GFAP, CD68, IgG). Se analizó si las muestras cumplían con la normalidad en las distintas pruebas para decidir entre usar ANOVA o pruebas no paramétricas. Áreas contralaterales que poseían parásitos se descartaron de la medición. Se consideró también realizar un análisis comparativo de los grupos considerando regiones cerebrales específicas si estas presentaban suficientes muestras para la evaluación.

VI. RESULTADOS

Porcentaje de maduración de los huevos:

De los 32566 huevos de *Toxocara canis* que se pusieron a embrionar, se observó que después de 4 semanas de incubación a 28°C, el 98.51% se habían convertido en huevos maduros larvados, ya que presentaban una larva ya desarrollada y en movimiento dentro del huevo.

Tabla 1. Número de huevos maduros (larvados) y porcentaje de huevos larvados en sus distintas placas de incubación.

Placa	Huevos	Maduración %	Huevos larvados
1	322	70.19%	226
2	1279	99.53%	1273
3	1526	98.23%	1499
4	327	73.70%	241
5	5019	96.97%	5000
6	1004	96.97%	1000
7	15628	93.40%	15500
8	5785	83.33%	5667
9	1667	100%	1667
Total	32556	98.51%	32072

Porcentaje de ratas que desarrollaron neurotoxocariasis:

De las ratas inoculadas con dosis de 500 huevos, solo el 33% presentó larvas observables en el cerebro, mientras que, en el grupo inoculado con dosis de 1000 huevos, el 66% presentó larvas observables en el cerebro.

Las seis ratas que desarrollaron infección cerebral fueron empleadas para conformar un nuevo grupo infectado (500–1000 huevos), para los análisis posteriores, independientemente de la dosis inicial administrada, y se compararon con el grupo control.

Tabla 2. Distribución de las ratas experimentalmente infectadas con huevos larvados de Toxocara.

Grupo	N° de animales inoculados con huevos larvados	N° de animales inoculados con S. salina	N° de animales infectados en el cerebro	N° de animales empleados para la histología e IHC
1	6 (500*)	0	2	2
2	6 (1000*)	0	4	4
3	6 (0*)	6	0	6

*Número de huevos larvados suministrados por animal. De las 6 ratas con dosis 500 huevos solo 2 se infectaron, y en las 6 ratas de 1000 huevos solo 4 se infectaron. Estas fueron tratadas como grupo infectado para el análisis contra el grupo control.

Conteo de larvas en el cerebro

La distribución de larvas por hemisferio cerebral se presenta en la Tabla 3, y su localización por regiones encefálicas en la Tabla 4. Si bien se encontró mayor cantidad de larvas ubicadas en el hemisferio derecho, no se encontraron diferencias significativas entre hemisferios ($p=0.0625$). Sobre la ubicación de larvas por región del cerebro, en algunos cerebros infectados, las larvas mostraron predilección por

regiones específicas, como la corteza cerebral (por ejemplo, en el cerebro 1), el cerebelo (cerebro 3) o el cuerpo estriado (cerebro 4).

Tabla 3. Ubicación de las larvas de *T. canis* en el cerebro de ratas infectadas.

Conteo de larvas							
Inóculo (huevos)		500		1000			
Rata		1	2	3	4	5	6
Larvas	Hemisferio izquierdo	3	11	14	10	1	2
	Hemisferio derecho	13	12	16	29	1	3
	Total	16	23	30	39	2	5

*Se observó que existe mayor acumulación de larvas en el hemisferio derecho, aunque no se encontró diferencia significativa por hemisferio ($p < 0.05$).

Tabla 4. Ubicación de las larvas de *T. canis* en el cerebro de ratas infectadas.

Parte	Ratas infectadas							
	Código	1	2	3	4	5	6	Total
Corteza	Ctx	7	7	0	4	0	0	18
Cuerpo Calloso	Cc	1	3	8	7	0	3	22
Cuerpo estriado	Str	1	6	0	22	0	0	29
Globo pálido	Pal	0	0	0	0	0	0	0
Hipocampo	Hip	0	1	0	2	0	0	3
Tálamo	Th	0	0	0	3	0	0	3
Hipotálamo	Hy	3	0	0	0	0	0	3
Mesencéfalo	Mb	0	0	0	0	0	0	0
Rombencéfalo	Hb	0	0	0	0	0	0	0
Cerebelo, corteza	Cbx	1	1	4	1	0	1	8
Cerebelo, fibras	Cbf	2	4	18	0	2	1	27
Medula	My	0	1	0	0	0	0	1
Puente troncoencefálico	Pt	1	0	0	0	0	0	1
Total		16	23	30	39	2	5	115

Inmunoreactividad a biomarcadores por inmunohistoquímicas

La inmunorreactividad de los marcadores CD68, GFAP e IgG, que fue medida en base al porcentaje de píxeles por área reactiva (periferia, contralateral y homóloga

zona no infectada homóloga), fue evaluada para determinar el cumplimiento del supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Ninguno de los marcadores presentó una distribución normal ($p < 0,05$), tanto para los 3 biomarcadores y los 3 grupos de área, por lo que se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal–Wallis para la comparación entre grupos (tabla 5). Debido a que solo cinco regiones del cerebro evaluados presentaron más de 5 larvas como mínimo (corteza, cuerpo caloso, cuerpo estriado, cerebelo y fibras del cerebelo), serán estas regiones las evaluadas para analizar del efecto de regiones, usando también el análisis no paramétrico de Kruskal–Wallis.

Tabla 5. Análisis estadístico de Kruskal Wallis entre grupos para medir la inmunorreactividad a GFAP, CD68 e IgG, medidas en porcentaje de área con reacción positiva.

	IP vs NI			NI vs IC			IP vs IC		
Pruebas	χ^2	gl	p	χ^2	gl	p	χ^2	gl	p
GFAP	107.895	2	0.0001**	6.522	2	0.0107*	37.619	2	0.0001**
CD68	156.798	2	0.0001**	31.425	2	0.0001**	74.448	2	0.0001**
IgG	165.877	2	0.0001**	56.773	2	0.0001**	45.622	2	0.0001**

Leyenda: IP, Periferia de las zonas infectadas con larvas; NI, zonas no infectadas homólogas a zonas infectadas; IC, zonas contralaterales a las zonas infectadas. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

Inmunorreactividad a GFAP

En cuanto a la astrocitosis, a nivel cuantitativo (figura 1, tabla 5) la inmunorreactividad a GFAP en el tejido cerebral infectado cercano a larvas ($ME \pm EE$: 6.416 ± 0.4189 , DE : 4.492, IC 95%: 5.5955–7.2374) fue positiva y significativamente mayor a la de las zonas contralateral ($ME \pm EE$: 2.81 ± 0.312 , DE : 2.542, IC 95%: 2.1970–3.4235, $P < 0.001$) y no infectada ($ME \pm EE$: 1.635 ± 0.116 , DE : 1.245, IC 95%: 1.4070–1.8622, $P < 0.001$). También se encontró diferencia significativa entre la zona contralateral y la zona control ($P < 0.05$) Todo esto indica

un incremento en la respuesta de astrocitosis ante la presencia de *T. canis* en el cerebro de ratas infectadas en comparación a ratas control, respuesta que es mayor en las zonas periféricas al parásito, y un poco menor en las zonas contralaterales. A nivel cualitativo, el tejido infectado y el tejido contralateral (Figura 2A y 2C) mostraron astrocitos con un marcaje más intenso y prolongaciones celulares más prominentes en comparación con el grupo control (Figura 2B).

En lo que respecta a la inmunoreactividad entre distintas regiones específicas de cerebros no infectados (Figura 3 y Figura 4), los valores de GFAP fueron significativamente mayores en el cuerpo calloso que en otras zonas del cerebro (corteza, cuerpo estriado, cerebelo y fibras del cerebelo), y esta tendencia se repitió al comparar valores de tejido infectado. Por otro lado, en tejido infectado se encontró una diferencia significativa entre corteza y cerebelo, que no existía en cerebros control (Anexo 2 y 3). Para verificar si la astrogliosis solo ocurría en ciertas regiones del cerebro se compararon los resultados de periferia de larvas con los de control no infectado en una misma región (Anexo 4). El resultado fue que las cinco regiones evaluadas presentaron diferencias significativas entre tejido infectado y control. En el caso de regiones de tejido contralateral, se observó una respuesta heterogénea: alta y estadísticamente similar a la del grupo infectado-periferia en la región del cerebelo, muy baja al no ser estadísticamente diferente al control en la región de corteza y cuerpo estriado, y estadísticamente diferente a ambos grupos en la región de cuerpo calloso.

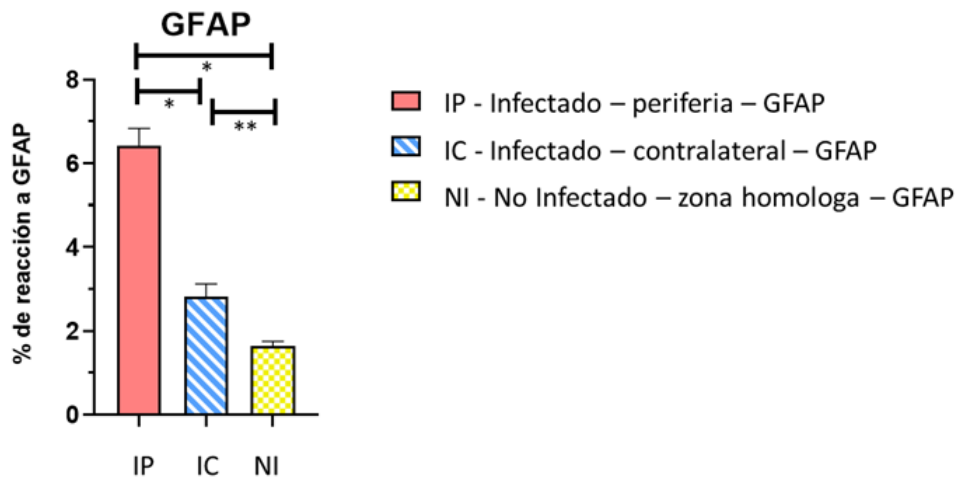


Figura 1. Medición de la activación de astrocitos, expresada como porcentaje del área con reacción positiva a GFAP, en cerebros de ratas infectadas con *Toxocara canis* y en cerebros de ratas control no infectadas. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar. Los diferentes grupos fueron evaluados y comparados estadísticamente. Zonas evaluadas: IP, infectado-periferia (n = 115); IC, infectado-contralateral (n = 66) y NI, control no infectado (n = 115). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (* P < 0.001; ** P < 0.05).

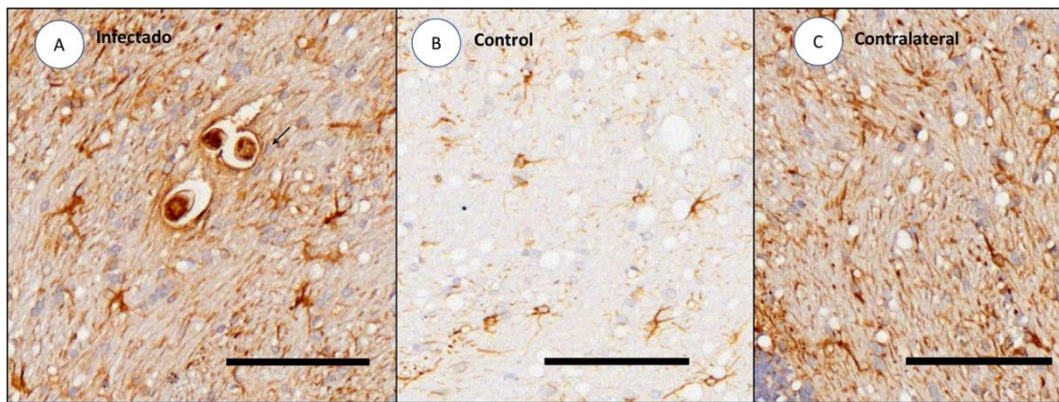


Figura 2. Inmunohistoquímica de GFAP y comparación visual de la reactividad. (A) Tejido alrededor de una larva, señalada por una flecha. (B) Tejido alrededor de una zona homóloga a la infectada en un cerebro de rata no infectada, se puede apreciar que la intensidad es menos intensa en B. (C) Tejido contralateral al observado en A. Se observa gran intensidad en la tinción aun en el hemisferio opuesto del cerebro. Barras: 100 μ m.

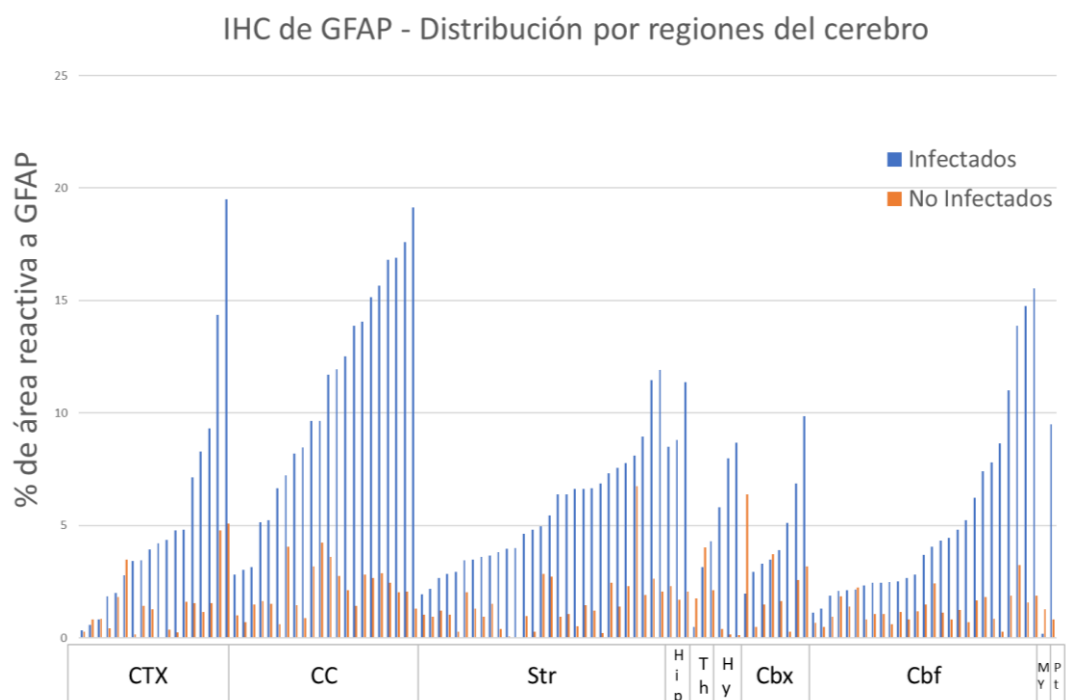


Figura 3. Porcentaje de área de reactividad de GFAP alrededor de larvas en el cerebro en base a la región del cerebro donde se ubicaron las larvas. Se compara los resultados con muestras control en regiones homólogas a las regiones infectadas. Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

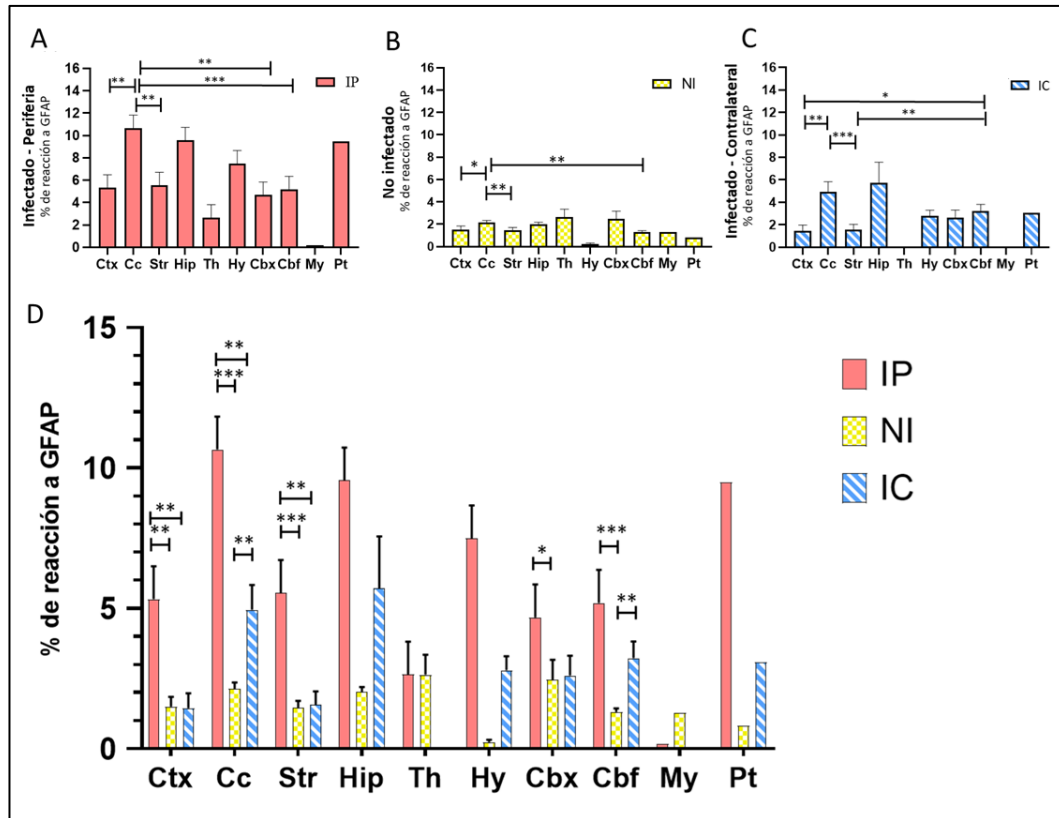


Figura 4. Medición de la activación de astrocitos, expresada como porcentaje del área con reacción positiva a GFAP, considerando regiones específicas del encéfalo, en cerebros de ratas infectadas con *Toxocara canis* y en cerebros de ratas control no infectadas. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar. Las diferentes regiones cerebrales que tuvieran más de 5 muestras fueron evaluadas en los diferentes grupos de análisis y comparadas estadísticamente. **A:** infectado–periferia (IP, n = 115); **B:** control no infectado (NI, n = 115); **C:** infectado–contralateral (IC, n = 66), **D:** Comparación entre grupos IP, NI e IC. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre algunas regiones de los grupos (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001). Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

Inmunorreactividad a CD68

En cuanto a la activación de fagocitos (Figura 5), la inmunorreactividad a CD68 en el tejido cerebral infectado cercano a larvas fue positiva y significativamente mayor ($ME \pm EE$: 5.303 ± 0.475 , DE: 5.092, IC 95%: 4.372– 6.233) que la de tejidos de cerebros no infectados ($ME \pm EE$: 0.002 ± 0.00045 , DE: 0.005, IC 95%: 0.083– 0.533, $P < 0.001$) y a la de contralateral ($ME \pm EE$: 0.307 ± 0.114 , DE: 0.933, IC 95%: 0.001–0.003, $P < 0.001$), independientemente de la región analizada. La inmunorreactividad del tejido contralateral al área infectada fue significativamente mayor a la del grupo control ($P < 0.001$). Esto indica que existe activación de la microglía y diferenciación en células macrofágicas, cerca de parásitos, y también en menor medida en zonas contralaterales a la infección (Figura 6).

Como observación cualitativa, muchas larvas que originaron granulomas (Figura 7A) presentaron una intensa tinción para CD68 en los fagocitos que formaban el complejo. Asimismo, algunas regiones con gran acumulación de larvas (Figura 7B) presentaron una gran concentración de fagocitos.

En cuanto al efecto de las regiones del cerebro, de entre las zonas infectadas con larvas (Figura 8A), solo en el cuerpo estriado se observó una reacción significativa más fuerte que en el resto de los grupos (Anexo 5 y 6). De entre las zonas control (Figura 8B), hubo una diferencia significativa entre la región de cuerpo calloso y la de fibras del cerebelo, aunque sus medias fueron extremadamente bajas (menores a 0.01% de área reactiva) y macroscópicamente no se observó reacción del marcador en cerebros control (Figura 7C), por lo que la diferencia carece de relevancia biológica. De entre las zonas contralaterales evaluadas (Figura 7D), la región del cuerpo calloso presentó los valores más altos (Figura 8C), mientras que los valores de la región de cuerpo estriado y corteza del cerebelo no se diferenciaron significativamente de los resultados de la región control (Figura 8D, Anexo 7).

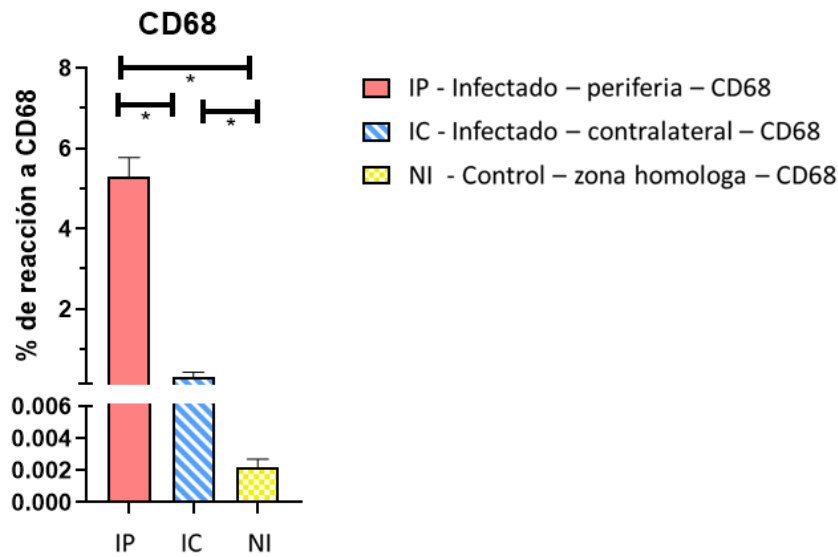


Figura 5. Medición de la activación de fagocitos, expresada como porcentaje del área con reacción positiva a CD68, en cerebros de ratas infectadas y no infectadas con *Toxocara canis*. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar. Los diferentes grupos fueron evaluados y comparados estadísticamente. Zonas evaluadas: IP, infectado–periferia (n = 115); IC, infectado–contralateral (n = 66) y NI, control no infectado (n = 115). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (*, $P < 0.001$).

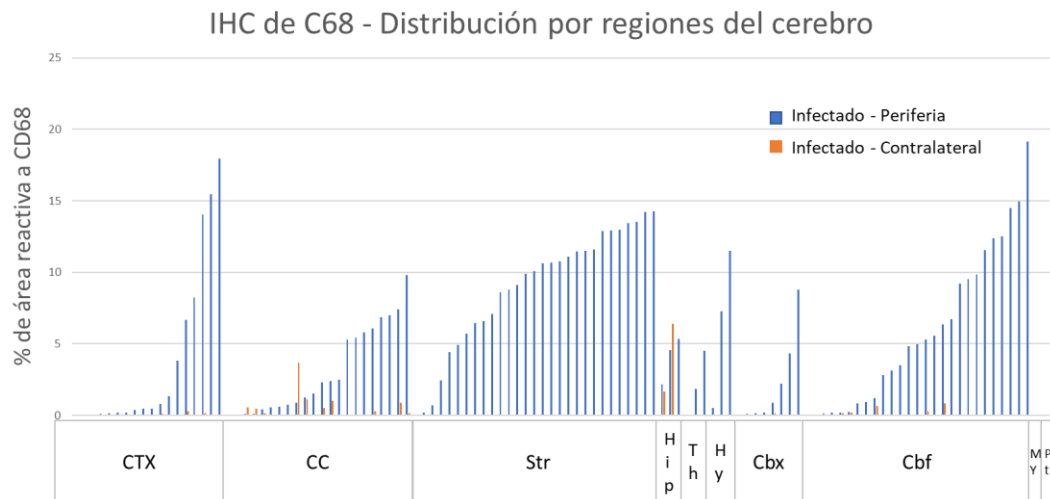


Figura 6. Porcentaje de área de reactividad de CD68 alrededor de larvas en el cerebro en base a la zona del cerebro donde se ubicaron las larvas. Se compara los resultados con muestras contralaterales. Las muestras de controles no infectados no se incluyeron en el análisis debido a que presentaron valores nulos o extremadamente bajos. Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

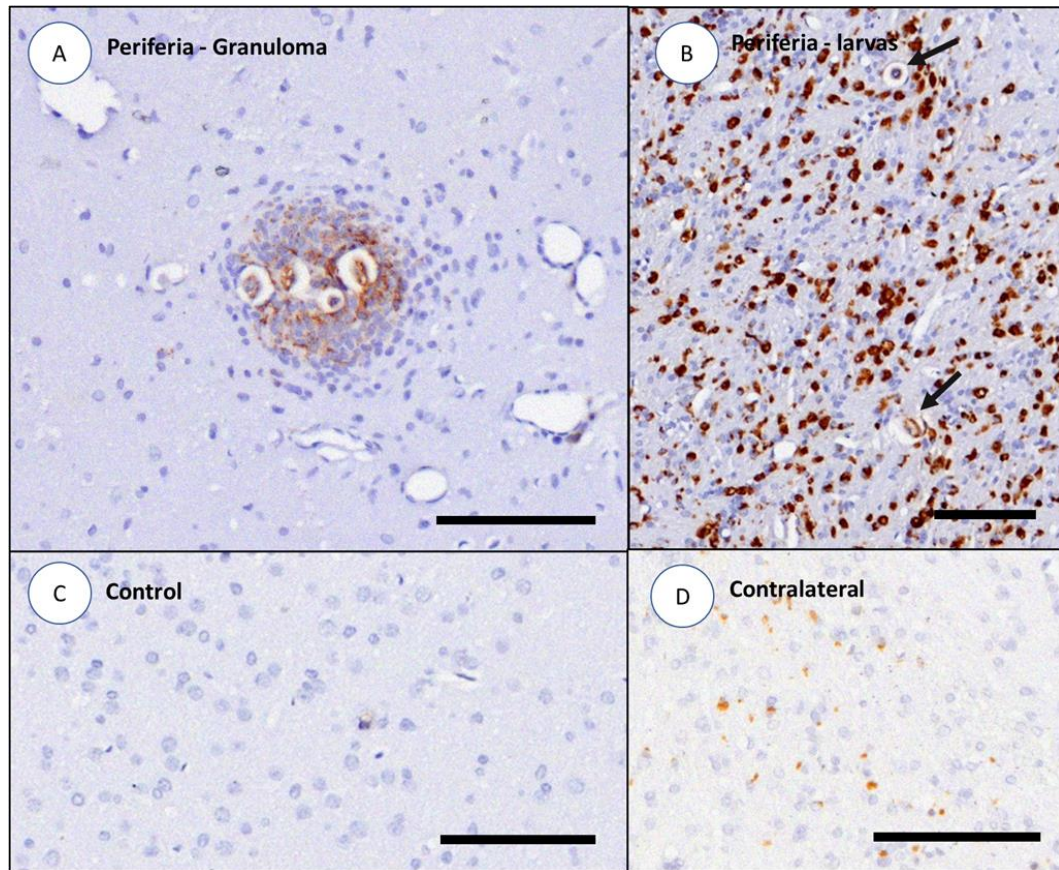


Figura 7. Inmunohistoquímica de CD68 y comparación visual de la reactividad. (A) Granuloma alrededor de un parásito. (B) Reacción de la microglía ante la presencia de múltiples parásitos cercanos en el tejido cerebral, zona del cuerpo estriado; flechas señalan parásitos. (C) Tejido control de rata no infectada, no se observa inmunorreactividad apreciable. (D) Región contralateral de una región con larvas, sí se observa inmunorreactividad. Barras: 100 μ m.

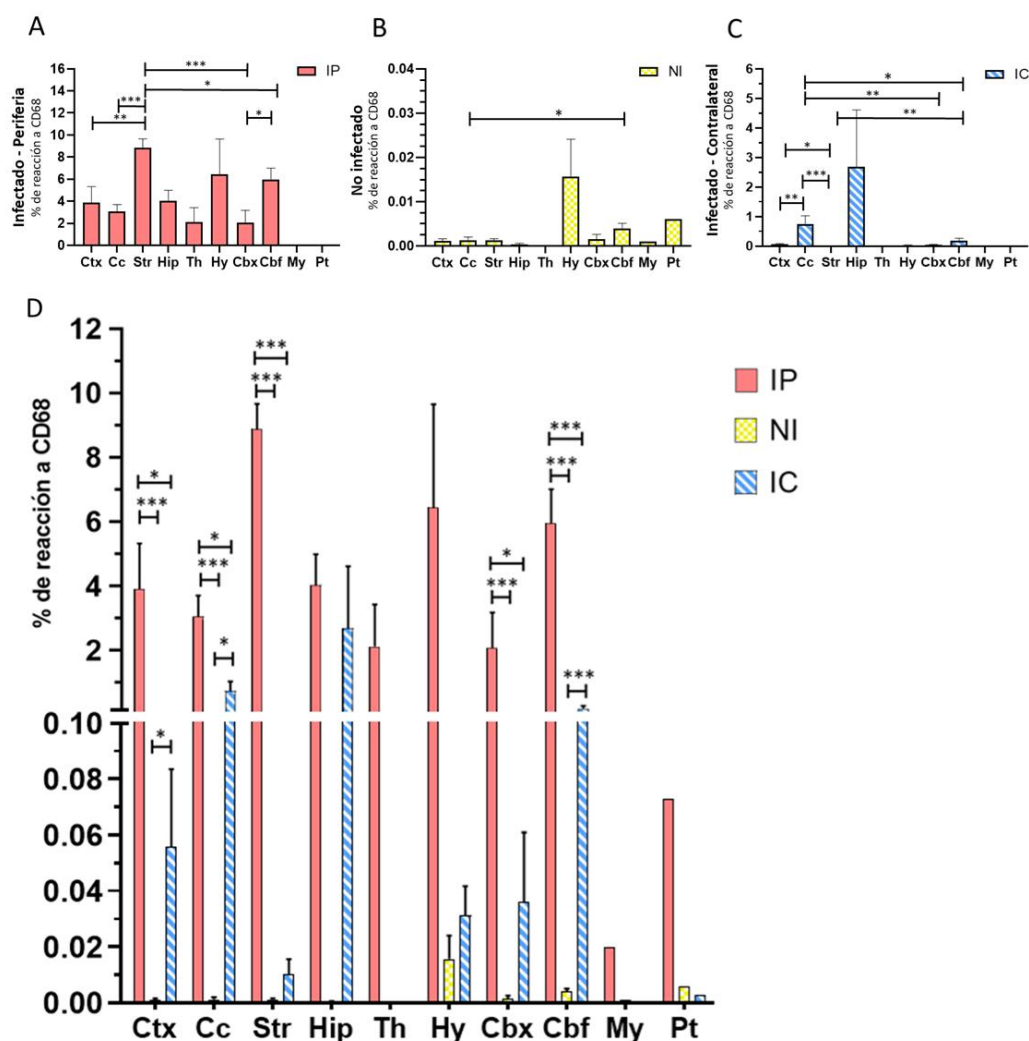


Figura 8. Medición de la activación de fagocitos, expresada como porcentaje del área con reacción positiva a CD68, considerando regiones específicas del encéfalo, en cerebros de ratas infectadas con *Toxocara canis* y en cerebros de ratas control no infectadas. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar. Las diferentes regiones cerebrales que tuvieran más de 5 muestras fueron evaluadas en los diferentes grupos de análisis y comparadas estadísticamente. **A:** infectado-periferia (IP, n = 115); **B:** control no infectado (NI, n = 115); **C:** infectado-contralateral (IC, n = 66), **D:** Comparación entre grupos IP, NI e IC. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre algunas regiones de los grupos (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001). Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

Alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica

En cuanto a la medición de la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Figura 9), la inmunorreactividad a IgG en el tejido cerebral infectado cercano a larvas (ME±EE: 1.000±0.11, DE: 1.182, IC 95%: 0.7837 - 1.2157) fue significativamente mayor a la de tejidos de cerebros no infectados (ME±EE: 0.002±0.0004, DE: 0.005, IC 95%: 0.1379 - 0.2532, $P < 0.001$) y a la de la región contralateral (ME±EE: 0.195±0.029, DE: 0.239, IC 95%: 0.0012 - 0.0030, $P < 0.001$). También se encontró que la reactividad del tejido contralateral al área infectada fue significativamente mayor a la del tejido de cerebros no infectados ($P < 0.001$). Estos hallazgos evidencian que existe una alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica causada por el parásito *T. canis* en infecciones crónicas al cerebro de ratas.

Como observación cualitativa de la inmunohistoquímica, la distribución de IgG alrededor del parásito era difuminada (Figura 10A), aunque lo suficientemente intensa para diferenciarse del tejido control sin IgG (Figura 10B) y del contralateral (Figura 10C). En lo que respecta a la inmunoreactividad entre distintas zonas del cerebro (Anexo 8, 9, 10), entre zonas infectadas no se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados (corteza, cuerpo calloso, cuerpo estriado, cerebelo y fibras del cerebelo). En cerebros control se observó una diferencia estadística entre la región de cuerpo estriado vs corteza, sin embargo, sus medias fueron extremadamente bajas (menores a 0.01% de área reactiva), por lo que la diferencia probablemente carece de relevancia biológica. En tejido contralateral a la zona infectada, se observó que las regiones de cuerpo estriado y la corteza del cerebelo no mostraron diferencia significativa con el control (Figura 11 y 12).

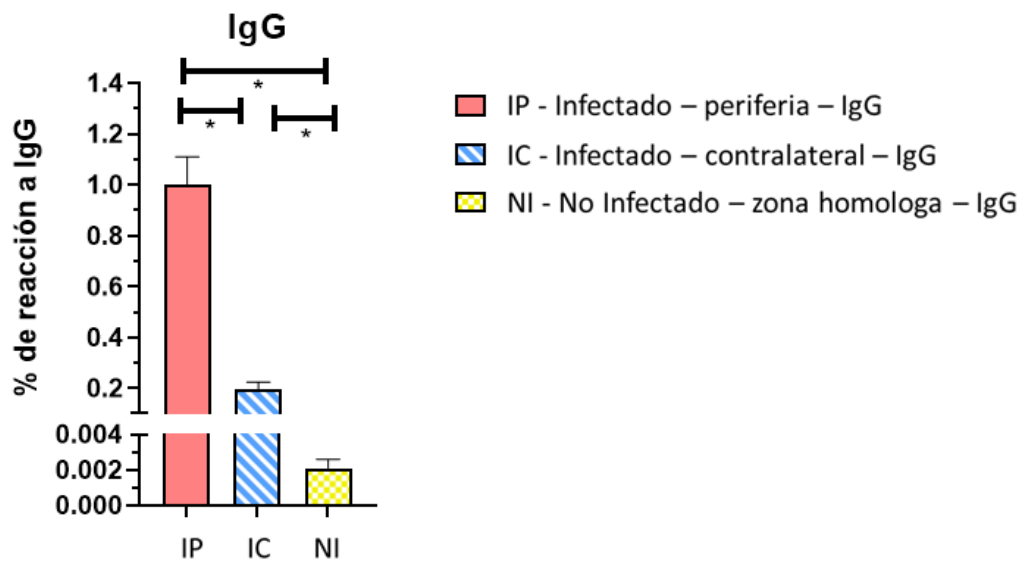


Figura 9. Medición de la extravasación de inmunoglobulina G (IgG), expresada como porcentaje del área con reacción positiva a IgG, en cerebros de ratas infectadas y no infectadas con *Toxocara canis*. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar. Zonas evaluadas: IP, infectado–periferia (n = 115); IC, infectado–contralateral (n = 66) y C, control no infectado (n = 115). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (* $P < 0,001$).

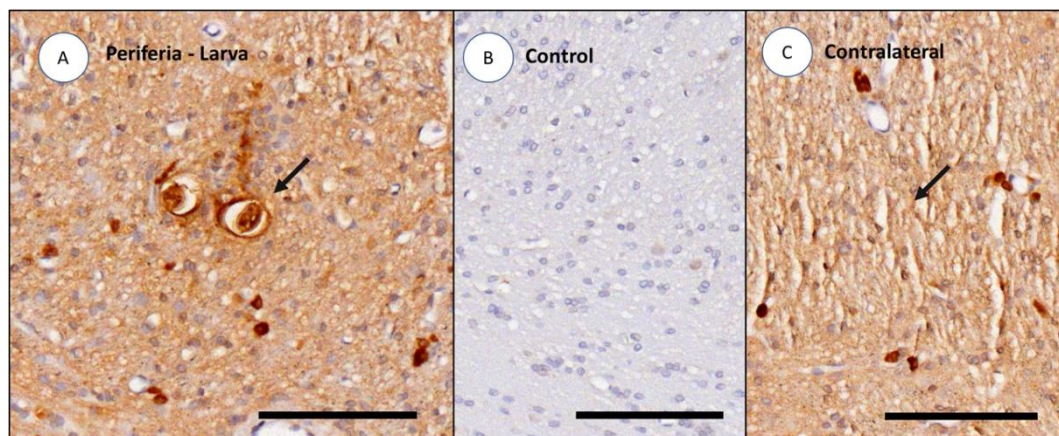


Figura 10. Comparación de la reactividad a IgG y comparación visual de la reactividad. (A) Tejido alrededor de una larva, señalada por una flecha. (B) Tejido de un cerebro de rata no infectada, en una zona homóloga a donde se encontró larvas, se puede apreciar que la intensidad es menos tenue. (C) Tejido contralateral a la foto A, con una flecha señalando el centro imaginario. Se puede apreciar cierta reactividad incluso en el hemisferio opuesto a donde se encontraron larvas. Barras: 100 μ m.

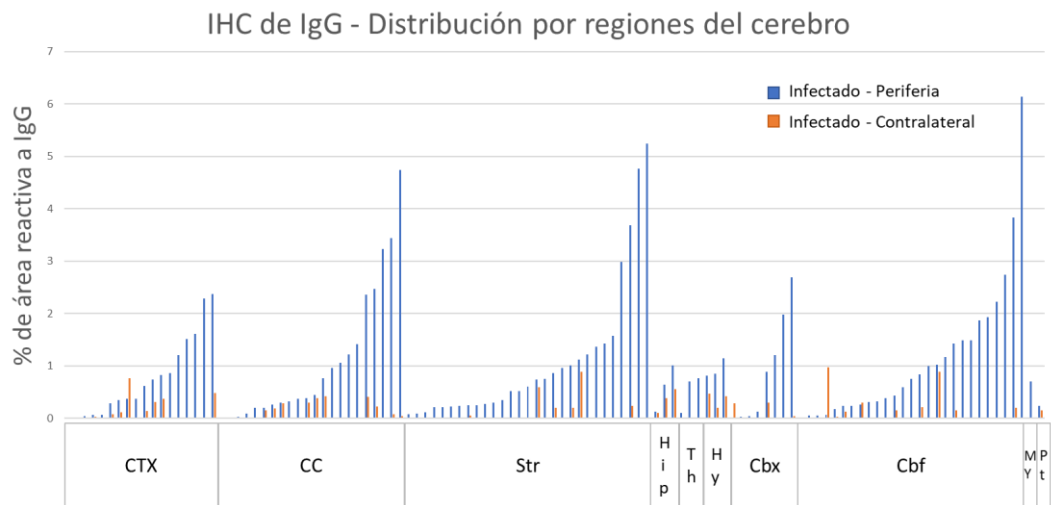


Figura 11. Porcentaje de área de reactividad de IgG alrededor de larvas en el cerebro en base a la zona del cerebro donde se ubicaron las larvas. Se compara los resultados con muestras contralaterales. Las muestras de controles no infectados no se incluyeron en el análisis debido a que presentaron valores nulos o extremadamente bajos. Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

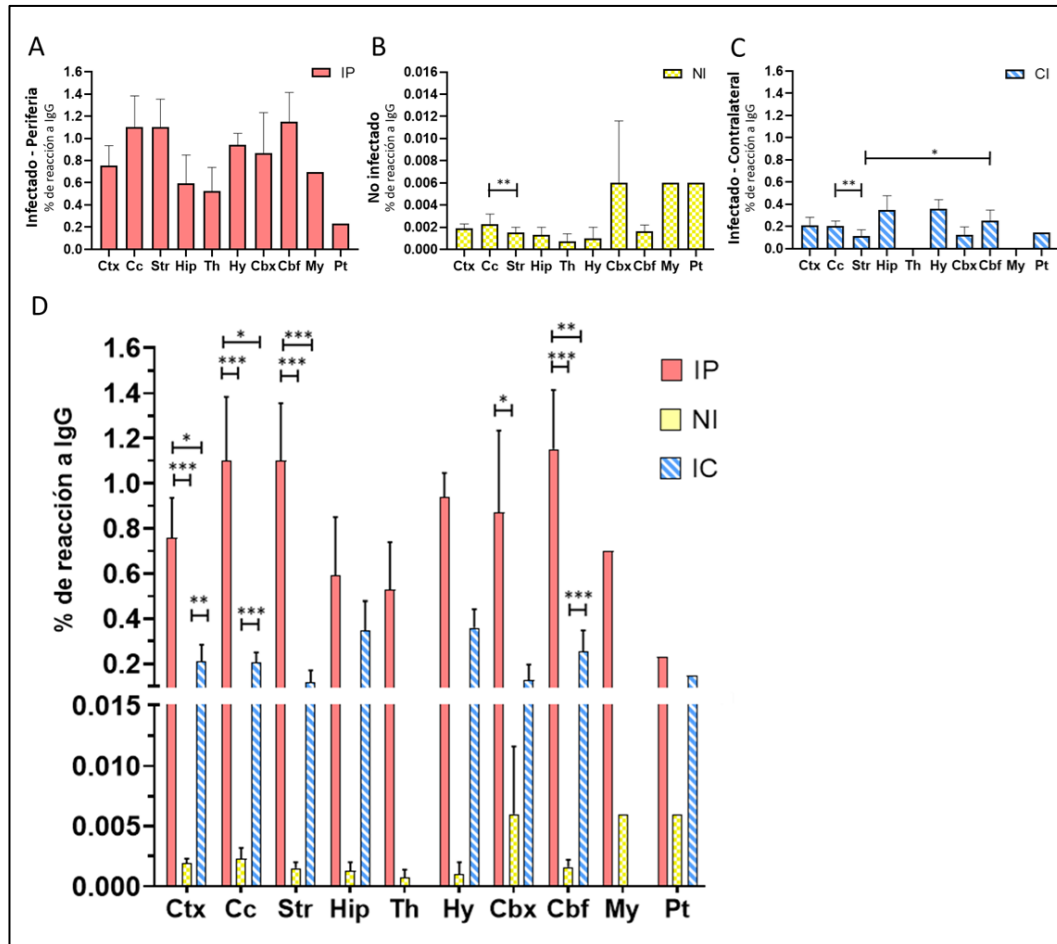


Figura 12. Medición de la extravasación de inmunoglobulina G, expresada como porcentaje del área con reacción positiva a IgG, considerando regiones específicas del encéfalo, en cerebros de ratas infectadas con *Toxocara canis* y en cerebros de ratas control no infectadas. Las diferentes regiones cerebrales que tuvieran más de 5 muestras fueron evaluadas en los diferentes grupos de análisis y comparadas estadísticamente. **A.-** infectado-periferia (IP, n = 115). **B.-** control no infectado (NI, n = 115); **C.-** infectado-contralateral (IC, n = 66), **D.-** Comparación entre grupos IP, NI e IC. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre algunas regiones de los grupos (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001). Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

VII. DISCUSIÓN

En este estudio, mediante inmunohistoquímica se detectó que la presencia de las larvas de *T. canis* en el cerebro, activa a las células gliales, observándose una fuerte inmunorreactividad a GFAP y CD68, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Así mismo se observó que la presencia de larvas en el tejido cerebral altera la barrera hematoencefálica, observándose extravasación al parénquima cerebral de IgG.

Sobre la cantidad de larvas encontradas por cerebro ($ME \pm DE$: 19.17 ± 14.36), el promedio fue similar a otros experimentos con dosis aún más grandes que recrean condiciones de infección crónica; en Janecek et al. (2014) donde se empleó 2000 huevos por rata, para las ratas del día 98 post infección, se obtuvo un promedio de 22.9 larvas en el sistema nervioso central, incluyendo ojos. Dicho estudio utilizó la técnica de digestión artificial de tejido cerebral rápida, la cual permite un conteo más eficiente de las larvas presentes en el tejido. Sin embargo, este método requiere el procesamiento completo del cerebro, lo que impide la realización de análisis adicionales en el mismo tejido, por lo que no fue posible realizar este proceso en el presente estudio, ya que el tejido de cerebro se usó para hacer otros tipos de análisis, como histológicos (coloración con hematoxilina & eosina) e inmunohistoquímica [12].

Sobre el proceso de búsqueda de *T. canis* usando solo técnicas de inmunohistoquímica, es un proceso minucioso y es probable que no se puedan detectarse todas las larvas. Es probable que parte del tejido del parásito se desprenda del tejido principal mientras se realizaron los cortes, lo cual explicaría porque en

ciertos grupos de láminas adyacentes, cuando se compara la misma zona, en algunas hay un espacio vacío, mientras que en otras adyacentes si se encuentra presente el tejido de la larva. Sobre la presencia de larvas en el cerebro, no se encontró diferencias entre el número de larvas por hemisferio cerebral, lo cual concuerda con los resultados del estudio de Janecek et al. (2014), donde se empleó una mayor cantidad de animales, dosis infectiva y varios tiempos de infección; no encontrando una diferencia significativa entre las larvas del hemisferio derecho e izquierdo [13].

Sobre cambios macroscópicos del cerebro, no se encontraron anomalías ni lesiones en ninguno de los cerebros de ratas infectadas, en comparación a los cerebros de ratas control, lo cual concuerda con lo descrito en otros estudios [12, 13].

En lo que respecta al incremento de la inmunorreactividad a GFAP, observado en el tejido cerebral que rodea al parásito, en el presente estudio, se asemeja a lo reportado en otros estudios usando modelos animales, donde se observa astrocitosis (Figura 1). En un reciente estudio de Salamine et al. (2025), donde se empleó ratas con dosis infecciosas de 5000 huevos maduros de *T. canis*, 5 veces más que este estudio, se encontró también diferencias significativas en la inmunorreactividad a GFAP al comparar cerebros sanos con infectados. En otro estudio de Liao et al (2008), comparando ratones controles, inmunosuprimidos e infectados con *Toxocara canis*, al usar SDS-PAGE con cerebros triturados, se observó que el tiempo de infección debe ser posterior a 4 semanas para observar un efecto significativo en el incremento de la inmunorreactividad a GFAP con respecto al control, y que este se incrementa con el tiempo post-infección. En el presente

estudio los análisis de inmunorreactividad se realizaron 4 meses post-infección, lo cual explicaría una inmunorreactividad elevada respecto al control, observándose valores significativamente mayores en la periferia de las larvas respecto al tejido control no infectado, independientemente de la región cerebral evaluada (Figura 5).

La literatura también informa que ciertas regiones del cerebro presentan mayor concentración de astrocitos que otras [44, 45]. Esto se vio presente en el análisis entre regiones control, en donde el cuerpo calloso y cerebelo presentaron mayores valores de media del marcador de GFAP, mientras que el cuerpo estriado y corteza presentan valores menores (Anexo 4). Esta tendencia fue un poco diferente en tejidos infectados con larvas, donde si bien algunos tejidos como el cuerpo calloso resultaron tener la media de porcentaje GFAP más elevada, en otros como las fibras del cerebelo se observó una media alta y sin diferencias significativas con la región del cuerpo calloso, lo que revela que en cerebros infectados ciertas regiones cercanas a las larvas presentan una astrogliosis mayor a lo presente en tejido control. Sobre la astrogliosis en zonas distantes al sitio de infección, los resultados de regiones cerebrales mostraron que no es uniforme, pudiendo ser igual de intensa que la zona infectada (cerebelo), no diferente al control (corteza, cuerpo estriado), o menos intenso que la zona infectada y mayor al control (cuerpo calloso).

Sobre CD68, hasta la fecha no se han encontrado otros estudios que evalúen la expresión de CD68 en cerebros de ratas infectadas con *T. canis*; sin embargo, se han empleado otros marcadores relacionados con la activación de microglía y macrófagos como TGF- β 1 [32] o Iba1 [46] para analizar la respuesta

neuroinflamatoria. De estos estudios, uno en SDS-Page reveló una respuesta positiva de activación de microglía en el cerebro de ratas infectadas con *T. canis*, aunque sin precisar en qué regiones. Otros estudios realizados en ratones [13, 46] hacen hincapié en que existe presencia de activación de microglía en neurotoxocariasis; en Springer et al. (2019), donde se analizó ratones infectados con *T. canis* por varios tiempos (7, 14, 28, 42, 70, 98 días post-infección) se observó la activación de microglía en todos los cerebros de ratón desde el día 7 hasta el día 98 post-infección. El presente estudio confirmó que la activación de fagocitos sucede alrededor del área donde se ubica el parásito, y que se ve reducida pero igual presente en el contralateral, mostrándose en algunos casos presente en forma de granuloma (Figura 6), y que esto sucede incluso 120 días post-infección. En cuanto a la microglía basal por región cerebral, la literatura (47) menciona que esta puede variar bastante entre estudios y hasta marcadores, pero por lo general en ratas sanas está más presente en el hipocampo y zonas anexas a los ventrículos, menos presente en cerebelo y casi escasa en las regiones cercanas a la medula espinal. Esto en parte explicaría la baja media encontrada en los resultados de CD68 en periferia de larvas ubicadas en puente troncoencefálico (Pt) y médula oblongada (My), ya que, al haber pocas células de defensa, habría menor reacción antigénica. También cabe destacar que lejos de la zona infectada, en su región contralateral, la activación y presencia de fagocitos fue heterogénea, siendo no significativamente distinta del control en el cuerpo estriado y corteza del cerebelo, pero sí en corteza, cuerpo calloso y fibras del cerebelo.

Sobre la ruptura de la barrera hematoencefálica, en un estudio de Liao et al (2008) donde se evaluó el ingreso de Evans Blue al cerebro de los ratones infectados con *Toxocara*, muestran que si hay daño a la permeabilidad de barrera hematoencefálica, que llega a ocurrir después de la primera semana de infección, incrementándose en el tiempo conforme el parásito permanece más tiempo en el cerebro [48]. Esto concuerda con nuestros resultados, que demuestran que la infección del parásito afecta la permeabilidad de la barrera encefálica de manera significativa alrededor de la zona donde se encuentra el parásito en el cerebro. En comparación con otros parásitos, estudios de IHC de IgG realizada en ratas con cisticercosis [49], mostraron una respuesta extremadamente intensa alrededor de los bordes del quiste, mientras que en este estudio la respuesta observada fue más difuminada (Figuras 10A y 10C), principalmente por la dispersión de larvas alrededor de todo el cerebro [41]. Por otro lado, se observó que alrededor de parásitos la alteración de la permeabilidad fue homogénea entre regiones infectadas, al no encontrarse diferencias significativas entre las regiones evaluadas; mientras que, en regiones alejadas al sitio de infección en el cerebro, la respuesta de alteración fue heterogénea, y al igual que otras pruebas también fue baja en la región de cuerpo estriado y corteza del cerebelo.

No se han encontrado otros artículos que evalúen los efectos a nivel contralateral de las zonas con larvas en el cerebro de animales infectados con *Toxocara sp.*, por lo que este sería el primero. En un estudio de Carmen et al. (2021) realizado en ratas con cisticercosis, se encontró que la respuesta de varios marcadores de neuroinflamación fue positiva para la región contralateral, mostrando que la

respuesta inflamatoria causada por la presencia del parásito puede afectar a áreas alejadas de la zona de infección, y también que el parásito mismo podría estar influyendo este efecto en zonas específicas del cerebro, afectando su expresión génica [37, 48-51]. En comparación, nuestro estudio confirmó que en la infección de *Toxocara canis* al cerebro de ratas, las zonas distantes a larvas también presentan astrogliosis, activación de fagocitos y alteración de la barrera hematoencefálica, de manera heterogénea entre regiones del cerebro (Figuras 4, 8 y 12). Sobre esta heterogeneidad, se observó que, en los tres marcadores, los tejidos contralaterales siempre tenían baja reacción en la zona de cuerpo estriado y corteza del cerebelo, aun cuando algunos cerebros tuvieran una gran concentración de larvas en estas zonas. Una posible explicación podría relacionarse con las características anatómicas de dichas regiones: El cuerpo estriado en roedores, o complejo caudado-putamen, está compuesto de dos núcleos separados alrededor del tálamo, si la infección ocurre en uno de estos núcleos y el efecto de la inflamación es limitado, es probable que el otro núcleo en la región contralateral no se viera afectada con la misma intensidad que la región infectada. Del mismo modo la corteza del cerebelo, está dividida por lóbulos, así como por distintas capas, que incluyen la capa granular, capa de células de Purkinje y capa molecular; por lo que es probable que la inflamación no llegué hasta los lóbulos lejanos al sitio de infección en suficiente intensidad para ser significativo. Para confirmar estas teorías, futuros estudios podrían considerar el analizar marcadores específicos de ciertas regiones cerebrales o con cepas de ratas knockout con neurotoxocariasis [52, 53].

Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones del estudio fueron en el bajo número de ratas infectadas, la dosis infectiva empleada, y el porcentaje de éxito en la infección.

En futuros experimentos, debería considerarse evaluar diferentes dosis infectivas, hasta 5000 huevos o más por rata, así como varios tiempos de infección y un mayor número de ratas.

Podría también considerarse modelos de infección alternos a la inoculación oral, como una inoculación directa al cerebro.

VIII. CONCLUSIONES

1. Respecto al objetivo general:

Se determinó que la infección del sistema nervioso central por larvas de *Toxocara canis* activa la respuesta neuroinflamatoria en el cerebro de ratas durante la fase crónica, evidenciada por la activación de células gliales y la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

2. Respecto al primer objetivo específico:

Se determinó la activación de las células gliales y microglía, observándose astrocitosis, principalmente en las zonas adyacentes a la presencia del parásito (6.4%) y, en menor intensidad, en regiones distantes y contralaterales (2.8%), en contraste al control no infectado (1.6%).

3. Respecto al segundo objetivo específico:

Se determinó la presencia de fagocitos (microglía activada/macrófagos) en el tejido que rodea al parásito, evidenciando una respuesta inflamatoria localizada alrededor de las larvas (5.3%), con una respuesta de menor intensidad en regiones distantes y contralaterales (0.3%), y con una reacción escasa en el control no infectado (0.002 %).

4. Respecto al tercer objetivo específico:

Se determinó la alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, evidenciada por la extravasación de IgG al parénquima cerebral, observándose este fenómeno principalmente en las zonas cercanas al parásito (1.0%) y, en menor grado, en regiones alejadas del sitio de infección (0.2%), con respecto al control no infectado (0.002%).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Roldan WH; Espinoza YA.; Huapaya PE y Jimenez S. Diagnóstico de la toxocarosis humana. Rev. Perú. med. exp. salud pública [online]. 2010, vol.27, n.4, pp.613-620.
- 2) Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. Int J Parasitol. 2013;43(12-13):999-1008. doi:10.1016/j.ijpara.2013.07.004
- 3) Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara spp.* infections in paratenic hosts. Vet Parasitol. 2013;193(4):375-389. doi:10.1016/j.vetpar.2012.12.033

- 4) Stangogiannis DE, Marval H, de Moreno MM, Martínez M, Stangogiannis DC. Infección experimental en ratones con larva migrans ocular [Experimental ocular larva migrans infection in mice]. Arch Soc Esp Oftalmol. 2007;82(2):89-93. doi:10.4321/s0365-66912007000200006
- 5) Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghouth U. Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders?. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):663-686. doi:10.1128/CMR.00106-14
- 6) Janecek E, Waindok P, Bankstahl M, Strube C. Abnormal neurobehaviour and impaired memory function as a consequence of *Toxocara canis*- as well as *Toxocara cati*-induced neurotoxocarosis. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(5):e0005594. Published 2017 May 8. doi:10.1371/journal.pntd.0005594
- 7) Holland CV, Cox DM. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour?. J Helminthol. 2001;75(2):125-135.
- 8) Santos SV, Lescano SZ, Castro JM, Chieffi PP. Larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected *Rattus norvegicus* and analysis of the rat as potential reservoir for this ascarid. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(6):933-934. doi:10.1590/s0074-02762009000600020
- 9) Corrêa FM, Chieffi PP, Lescano SA, Santos SV. Behavioral and memory changes in *Mus musculus* coinfectd by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2014;56(4):353-356. doi:10.1590/s0036-46652014000400014
- 10) Queiroz ML, Viel TA, Papa CH, Lescano SA, Chieffi PP. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* coinfectd by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*.

Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(1):51-53. doi:10.1590/s0036-46652013000100009

- 11) Chieffi PP, Aquino RT, Pasqualotti MA, Ribeiro MC, Nasello AG. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis* larvae. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(5):243-246. doi:10.1590/s0036-46652010000500004
- 12) Lescano SZ, Queiroz ML, Chieffi PP. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(6):627-628. doi:10.1590/s0074-02762004000600016
- 13) Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. Parasit Vectors. 2014;7:194. Published 2014 Apr 22. doi:10.1186/1756-3305-7-194
- 14) Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci. 2008;9(1):46-56. doi:10.1038/nrn2297
- 15) Maes M, Berk M, Goehler L, Song C., Anderson G, Gałeczki P, & Leonard B. Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. BMC Med. 2012;10:66. Published 2012 Jun 29. doi:10.1186/1741-7015-10-66

- 16) Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behav Brain Res.* 2013;256:119-127. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.035
- 17) Rostami A, Riahi SM, Fallah Omrani V, Wang T, Hofmann A, Mirzapour A, et al. Global Prevalence Estimates of *Toxascaris leonina* Infection in Dogs and Cats. *Pathogens.* 2020;9(6):503. Published 2020 Jun 23. doi:10.3390/pathogens9060503
- 18) Okulewicz A, Perec-Matysiak A, Buńkowska K, Hildebrand J, Toxocara canis, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthologia* 2012; 49. 10.2478/s11687-012-0001-6.
- 19) Rostami A, Riahi SM, Holland CV, Taghipour A, Khalili-Fomeshi M, Fakhri Y, et al. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 2015; 13(12), e0007809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809> (38)
- 20) Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WH, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA, et al. Seroprevalence of human toxocariasis in Andean communities from the Northeast of Lima, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010;52(1):31-36. doi:10.1590/s0036-46652010000100005
- 21) Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa, F, et al. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *Am J Pathol.* 2015;185(8):2259-2268. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.015>
- 22) Idro R, Marsh K, John CC, Newton CR. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res.* 2010;68(4):267-274. doi:10.1203/PDR.0b013e3181eee738

- 23) Lannes-Vieira J, Vilar-Pereira G, Barrios LC, Silva AA. Anxiety, depression, and memory loss in Chagas disease: a puzzle far beyond neuroinflammation to be unpicked and solved. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2023;118:e220287. Published 2023 Apr 3. doi:10.1590/0074-02760220287
- 24) Cole MR, Chappell-Stephenson R. Exploring the limits of spatial memory in rats, using very large mazes. *Learn Behav*. 2003;31(4):349-368. doi:10.3758/bf03195996
- 25) Hodkova H, Kodym P, Flegr J. Poorer results of mice with latent toxoplasmosis in learning tests: impaired learning processes or the novelty discrimination mechanism?. *Parasitology*. 2007;134(Pt 10):1329-1337. doi:10.1017/S0031182007002673
- 26) Tan D, Vyas A, Infection of male rats with *Toxoplasma gondii* induces effort-aversion in a T-maze decision-making task, *Brain Behav Immun*. 2016 Mar;53:273-277. doi:10.1016/j.bbi.2016.01.015
- 27) Martynowicz J, Augusto L, Wek RC, Boehm SL, II, Sullivan WJ Jr. 2019. Guanabenz Reverses a Key Behavioral Change Caused by Latent Toxoplasmosis in Mice by Reducing Neuroinflammation. *mBio*, 2019;10(2):e00381-19. Published 2019 Apr 30. doi:10.1128/mBio.00381-19
- 28) Vyas A, Kim SK, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. 2007. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6442– 6447.
- 29) Ihara F, Nishimura M, Muroi Y, Mahmoud ME, Yokoyama N, Nagamune K, Nishikawa Y. 2016. *Toxoplasma gondii* infection in mice impairs long-term

- fear memory consolidation through dysfunction of the cortex and amygdala. *Infect Immun* 84:2861–2870.
- 30) Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. 2012;(65):3564. Published 2012 Jul 30. doi:10.3791/3564
 - 31) Szuran TF, Pliska V, Pokorny J, Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol Behav*. 2000;71(3-4):353-362. doi:10.1016/s0031-9384(00)00351-6
 - 32) Liao CW, Cho WL, Kao TC, Su KE, Lin YH, Fan CK. Blood-brain barrier impairment with enhanced SP, NK-1R, GFAP and claudin-5 expressions in experimental cerebral toxocariasis. *Parasite Immunol*. 2008;30(10):525-534. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01048.x
 - 33) Lee KY, Kang JY, Yun JI, Chung JY, Hwang IK, Won MH, Choi JH, Age-related change of Iba-1 immunoreactivity in the adult and aged gerbil spinal cord, *Anat Cell Biol*. 2017 Jun;50(2):135-142.
 - 34) Lykens JE, Terrell CE, Zoller EE, Divanovic S, Trompette A, Karp CL, et al. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo, *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):877-85.
 - 35) Atmaca HT, Kul O, Karakuş E, Terzi OS, Canpolat S, Antepioğlu T, Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection, *Neuroscience*, 2014 Jun 6;269:184-91.

- 36) Repunte-Canonigo V, Lefebvre C, George O, Kawamura T, Morales, M., Koob, G. F., et al. Gene expression changes consistent with neuroAIDS and impaired working memory in HIV-1 transgenic rats. *Mol Neurodegener.* 2014;9:26. Published 2014 Jul 1. doi:10.1186/1750-1326-9-26
- 37) Salama AM, Elgendy DI, Elmahy RA, Eltantawy AF, Seleem MA, Elgohary AM, et al. The potential relationship between *Toxocara canis* infection and epilepsy in a rat model. *Parasitol Res.* 2025 Sep 4;124(9):98. doi: 10.1007/s00436-025-08528-7. PMID: 40906224; PMCID: PMC12411587. Contralateral (37)
- 38) Anécimo RS, Tonani KA, Fregonesi BM, Mariano AP, Ferrassino MD, Trevilato TM, et al. Adaptation of Ritchie's Method for Parasites Diagnosing with Minimization of Chemical Products. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012;2012:409757. doi:10.1155/2012/409757 (38)
- 39) Yeo HG, Hong JJ, Lee Y, Yi KS, Jeon CY, Park J, et al. Increased CD68/TGF β Co-expressing Microglia/ Macrophages after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rhesus Monkeys. *Exp Neurobiol.* 2019 Aug 31;28(4):458-473. doi: 10.5607/en.2019.28.4.458. PMID: 31495075; PMCID: PMC6751863. (45)
- 40) Delcambre GH, Liu J, Herrington JM, Vallario K, Long MT. Immunohistochemistry for the detection of neural and inflammatory cells in equine brain tissue. *PeerJ.* 2016 Jan 25;4:e1601. doi: 10.7717/peerj.1601. PMID: 26855862; PMCID: PMC4741088. (46)
- 41) Schmidt-Kastner R, Meller D, Bellander BM, Strömberg I, Olson L, Ingvar M. A one-step immunohistochemical method for detection of blood-brain

- barrier disturbances for immunoglobulins in lesioned rat brain with special reference to false-positive labelling in immunohistochemistry. *J Neurosci Methods*. 1993 Feb;46(2):121-32. doi: 10.1016/0165-0270(93)90147-j. PMID: 8474256. (47)
- 42) Linden JR, Flores C, Schmidt EF, Uzal FA, Michel AO, Valenzuela M, et al. *Clostridium perfringens* epsilon toxin induces blood brain barrier permeability via caveolae-dependent transcytosis and requires expression of MAL. *PLoS Pathog*. 2019 Nov 8;15(11):e1008014. doi: 10.1371/journal.ppat.1008014. PMID: 31703116; PMCID: PMC6867657. (48)
- 43) Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio Protoc*. 2019;9(24):e3465. doi:10.21769/BioProtoc.3465 (39)
- 44) Martin PM, O'Callaghan JP. A direct comparison of GFAP immunocytochemistry and GFAP concentration in various regions of ethanol-fixed rat and mouse brain. *J Neurosci Methods*. 1995;58(1-2):181-192. doi:10.1016/0165-0270(94)00175-g (49)
- 45) Taft JR, Vertes RP, Perry GW. Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. *Int J Neurosci*. 2005;115(9):1333-1343. doi:10.1080/00207450590934570 (50)
- 46) Springer A, Heuer L, Janeczek-Erfurth E, Beineke A, Strube C. Histopathological characterization of *Toxocara canis*- and *T. cati*-induced neurotoxocarosis in the mouse model. *Parasitol Res*. 2019;118(9):2591-2600. (40)

- 47) Tan YL, Yuan Y, Tian L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. *Mol Psychiatry*. 2020;25(2):351-367. doi:10.1038/s41380-019-0609-8 (51)
- 48) Boukhvalova MS, Mortensen E, Mbaye A, Lopez D, Kastrukoff L, Blanco J CG. Herpes Simplex Virus 1 Induces Brain Inflammation and Multifocal Demyelination in the Cotton Rat *Sigmodon hispidus*. *J Virol* 94:10.1128/jvi.01161-19. (42)
- 49) Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Cauna Y, Bernal-Teran EG., Bitterfeld L, Sutherland GL, et al. Blood-brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis. *J Neurosci Res*. 2019;97(2):137-148. (41)
- 50) Kopp SJ, Banisadr G, Glajch K, Maurer UE, Grünewald K, Miller RJ, et al. Infection of neurons and encephalitis after intracranial inoculation of herpes simplex virus requires the entry receptor nectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Oct 20;106(42):17916-20. doi: 10.1073/pnas.0908892106. Epub 2009 Oct 5. PMID: 19805039; PMCID: PMC2764878. (43) Contralat
- 51) Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Delgado-Kamiche AD, Celiz RH, Trompeter G, et al. Changes in inflammatory gene expression in brain tissue adjacent and distant to a viable cyst in a rat model for neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(4):e0009295. Published 2021 Apr 27. (44)
- 52) Báez-Mendoza R, Schultz W. The role of the striatum in social behavior. *Front Neurosci*. 2013;7:233. Published 2013 Dec 10. doi:10.3389/fnins.2013.00233
- 53) Hull C, Regehr WG. The Cerebellar Cortex. *Annu Rev Neurosci*. 2022;45:151-175. doi:10.1146/annurev-neuro-091421-125115

X. ANEXOS

ANEXO 1

Sacrificio de animales y extracción de tejidos

Luego de cuatro meses de iniciada la infección, se sacrificaron todos los animales y se siguieron los procedimientos establecidos para la extracción e inclusión de los cerebros. Adicionalmente, se extrajeron muestras de sangre y de líquido cefalorraquídeo (LCR).

- **Anestesia.**— Las ratas fueron anestesiadas con una solución ajustada al peso corporal, utilizando ketamina a razón de 150 mg/kg y xilacina a 15 mg/kg, administradas mediante inyección intraperitoneal en la zona de la pierna.
- **Extracción de líquido cefalorraquídeo y sangre.**— Se extrajo una muestra de LCR de la médula espinal de cada animal. Posteriormente, se abrió la cavidad torácica, se localizó el corazón y se obtuvo sangre a partir de la aurícula derecha hasta que la presión disminuyó lo suficiente. Las muestras de sangre fueron conservadas temporalmente a 4°C para la posterior obtención del plasma. Tanto las muestras de plasma como las de LCR se almacenaron a –70°C.
- **Perfusión y fijación.**— Se empleó un sistema de perfusión introduciendo una cánula roma en el ventrículo izquierdo del corazón hasta alcanzar la arteria aorta. En ese momento se inició la perfusión con PBS heparinizado hasta que cesó el sangrado del animal. A continuación, se inyectó una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS, utilizando un volumen equivalente al empleado de PBS.

- **Extracción del cerebro.**– Los cerebros fueron extraídos retirando primero la piel de la cabeza del roedor, mediante movimientos giratorios con una pinza para liberar el músculo. Una vez retirada la piel, la región craneal fue cortada cuidadosamente hacia afuera hasta exponer el encéfalo. Los cerebros se colocaron en tubos Falcon con una solución de formaldehído al 4 % en PBS a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual se reemplazó la solución por alcohol al 70 % hasta su inclusión en parafina.
- **Inclusión en parafina.**– Los cerebros fueron cortados en 5 secciones coronales y dispuestos en casetes de histología. Estos casetes pasaron por el proceso de deshidratación por una batería de alcoholes; 2 baño en alcohol al 90% por 1 hora, 2 en alcohol al 96% por 1 hora, y 3 en alcohol absoluto por 1 hora, para luego pasar por 3 baños de xilol, una hora cada uno, para permitir la perfusión de parafina en el tejido. Posteriormente, se realizaron 2 baños en ollas con parafina líquida (Paraplast®, Leica Biosystems) en una estufa a 55°C, durante 60 minutos cada uno. Al día siguiente, se efectuó un baño adicional en parafina líquida por 30 minutos, y finalmente el contenido de los casetes fue transferido a moldes de parafina (tacos), empleando moldes de metal y parafina para ajustar la forma. Los moldes fueron llevados a un Ice-pad para que enfríen y se mantuvieron en frío durante toda la noche para su solidificación. Una vez atemperados, los tacos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta la realización de los cortes en el micrótopo.

ANEXO 2

Estadísticos descriptivos de la inmunorreactividad a GFAP, medidas en porcentaje de área con reacción positiva, considerando distintas regiones cerebrales dentro de los grupos evaluados.

Prueba de GFAP					
Periferia de larvas					
Región	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	18	5.3279	4.9659	1.1705	3.034–7.622
Cc	22	10.6619	5.0997	1.0873	8.531–12.793
Str	29	5.5515	2.5697	0.4772	4.616–6.487
Hip	3	9.5613	1.5805	0.9125	7.773–11.350
Th	3	2.6433	1.9457	1.1233	0.442–4.845
Hy	3	7.4940	1.4962	0.8638	5.8009–9.1871
Cbx	8	4.6770	2.5638	0.9065	2.9003–6.4537
Cbf	27	5.1946	4.1991	0.8081	3.6107–6.7785
My	1	0.1780	--	--	--
Pt	1	9.4940	--	--	--
Control no Infectado					
Región	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	18	1.4946	1.4981	0.3531	0.8025–2.1867
Cc	22	2.1317	1.0498	0.2238	1.6930–2.5703
Str	29	1.4632	1.3025	0.2419	0.9891–1.9372
Hip	3	2.0187	0.3036	0.1753	1.6751–2.3623
Th	3	2.6403	1.2263	0.7080	1.2527–4.0280
Hy	3	0.2300	0.1583	0.0914	0.0508–0.4092
Cbx	8	2.4660	1.9960	0.7057	1.0829–3.8491
Cbf	27	1.3056	0.6670	0.1284	1.0540–1.5572
My	1	1.2870	--	--	--
Pt	1	0.8110	--	--	--
Contralateral de infectado					
Región	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	11	1.4424	1.7482	0.5271	0.4093–2.4755
Cc	12	4.9523	3.0343	0.8759	3.2355–6.6690
Str	19	1.5671	2.0662	0.4740	0.6380–2.4961
Hip	3	5.7117	3.2041	1.8499	2.0859–9.3374
Th	0	--	--	--	--
Hy	3	2.8013	0.8553	0.4938	1.8335–3.7692
Cbx	5	2.6122	1.5699	0.7021	1.2361–3.9883
Cbf	12	3.2275	2.0622	0.5953	2.0607–4.3943
My	0	--	--	--	--
Pt	1	3.08	--	--	--

Anexo 2 (Continuación) - Leyenda: n, número de muestras; DE, desviación estándar; EE, error estándar, IC 95%, intervalo de confianza al 95%. Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

ANEXO 3

Comparaciones pareadas del porcentaje de reacción a GFAP entre distintas regiones del cerebro dentro de cada grupo experimental.

GFAP - Análisis entre regiones del cerebro					
Periferia de larvas					
Región	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.0016**	0.2506	0.9115	0.9261
Cc	--	--	0.0003**	0.0065**	0.0001***
Str	--	--	--	0.3563	0.1174
Cbx	--	--	--	--	0.1174
Cbf	--	--	--	--	--

Control no infectado					
Región	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.0296*	0.7593	0.1486	0.6514
Cc	--	--	0.0097**	0.9253	0.0043**
Str	--	--	--	0.1304	0.9151
Cbx	--	--	--	--	0.1461
Cbf	--	--	--	--	--

Contralateral de infectado					
Región	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.0021**	0.6827	0.2342	0.0193*
Cc	--	--	0.0009***	0.1400	0.1489
Str	--	--	--	0.0816	0.0040**
Cbx	--	--	--	--	0.833
Cbf	--	--	--	--	--

Leyenda: Se muestran los valores de porcentaje empleando el test de Kruskal-Wallis de dos vías entre cada comparativa (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Se evaluaron las zonas de periferia infectada, control no infectado y zona contralateral. Se emplearon para el análisis regiones de cerebros que tuvieran más de 5 muestras para evaluar. Ctx: Corteza, Cc: Cuerpo calloso, Str: Cuerpo estriado, Cbx: Corteza del cerebelo, Cbf: Fibras del cerebelo.

ANEXO 4

Efecto de la región del cerebro en el análisis comparativo de marcador de GFAP entre zonas infectadas (IP), no infectadas (NI) y contralaterales (IC).

Región	GFAP				
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Grupo IP vs IC	0.0014**	0.0001***	0.0001***	0.0460*	0.0001***
Grupo NI vs IC	0.7874	0.0044**	0.4416	0.7697	0.0013**
Grupo IP vs IC	0.0040**	0.0025**	0.0001**	0.1073	0.1806

Leyenda: Se muestran los valores de porcentaje empleando el test de Kruskal-Wallis de dos vías (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) para comparar una misma región del cerebro específica (Ctx: Corteza, Cc: Cuerpo calloso, Str: Cuerpo estriado, Cbx: Corteza del cerebelo, Cbf: Fibras del cerebelo) entre dos de los grupos evaluados.

ANEXO 5

Estadísticos descriptivos de la inmunorreactividad a CD68, medidas en porcentaje de área con reacción positiva, considerando distintas regiones cerebrales dentro de los grupos evaluados.

Prueba de CD68					
Periferia de larvas					
Zona	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	18	3.9033	6.0128	1.4172	1.1256–6.6811
Cc	22	3.0553	3.0376	0.6476	1.7860–4.3246
Str	29	8.8675	4.2695	0.7928	7.3135–10.4214
Hip	3	4.0277	1.6645	0.9610	2.1441–5.9112
Th	3	2.1150	2.2646	1.3075	-0.4477–4.6777
Hy	3	6.4457	5.5463	3.2022	0.1694–12.7219
Cbx	8	2.0796	3.1039	1.0974	-0.0713–4.2305
Cbf	27	5.9506	5.5083	1.0601	3.8728–8.0283
My	1	0.0200	--	--	--
Pt	1	0.0730	--	--	--
Control no Infectado					
Zona	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	18	0.0011	0.0023	0.0005	0.00006–0.0022
Cc	22	0.0012	0.0037	0.0008	-0.0004–0.0027
Str	29	0.0012	0.0020	0.0004	0.0005–0.0020
Hip	3	0.0003	0.0006	0.0003	-0.0003–0.0010
Th	3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000–0.0000
Hy	3	0.0157	0.0145	0.0084	-0.0007–0.0321
Cbx	8	0.0015	0.0031	0.0011	-0.0007–0.0037
Cbf	27	0.0039	0.0062	0.0012	0.0015–0.0062
My	1	0.0010	--	--	--
Pt	1	0.0060	--	--	--

Contralateral de infectado					
Zona	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	11	0.0556	0.0929	0.0280	0.0008–0.1105
Cc	12	0.7383	1.0021	0.2893	0.1713–1.3052
Str	19	0.0102	0.0236	0.0054	-0.0004–0.0208
Hip	3	2.6927	3.3242	1.9192	-1.0690–6.4543
Th	0	--	--	--	--
Hy	3	0.0313	0.0180	0.0104	0.0109–0.0517
Cbx	5	0.0362	0.0552	0.0247	-0.0122–0.0846
Cbf	12	0.1914	0.2741	0.0791	0.0363–0.3465
My	0	--	--	--	--
Pt	1	0.0030	--	--	--

Anexo 5 (continuación) - Leyenda: n, número de muestras; DE, desviación estándar; EE, error estándar, IC 95%, intervalo de confianza al 95%. Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

ANEXO 6

Comparaciones pareadas del porcentaje de reacción a CD68 entre distintas regiones del cerebro, dentro de cada grupo experimental: periferia infectada, control no infectado y zona contralateral.

CD68 - Análisis entre zonas del cerebro					
Periferia de larvas					
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.407	0.0028**	0.7812	0.1024
Cc	--	--	0.0001***	0.3022	0.1056
Str	--	--	--	0.0009***	0.0274*
Cbx	--	--	--	--	0.0373*
Cbf	--	--	--	--	--

Control no infectado					
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.4893	0.616	0.8698	0.0726
Cc	--	--	0.1919	0.4693	0.0113*
Str	--	--	--	0.8842	0.1024
Cbx	--	--	--	--	0.2299
Cbf	--	--	--	--	--

	Contralateral de infectado				
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.0018**	0.0280*	1	0.1638
Cc	--	--	0.0001***	0.0098**	0.0242*
Str	--	--	--	0.0806	0.0010**
Cbx	--	--	--	--	0.1695
Cbf	--	--	--	--	--

Anexo 6 (continuación) - Leyenda: Se muestran los valores de porcentaje empleando el test de Kruskal-Wallis de dos vías entre cada comparativa (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Se emplearon para el análisis regiones de cerebros que tuvieran más de 5 muestras para evaluar. Ctx: Corteza, Cc: Cuerpo calloso, Str: Cuerpo estriado, Cbx: Corteza del cerebelo, Cbf: Fibras del cerebelo.

ANEXO 7

Efecto de la región del cerebro en el análisis comparativo de marcador de CD68 entre periferia de zonas infectadas (IP), no infectadas (NI) y contralateral a zonas infectadas (IC).

	CD68				
Zonas	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Grupo IP vs NI	0.0001***	0.0001***	0.0001***	0.0010***	0.0001***
Grupo NI vs IC	0.0117*	0.0001*	0.7523	0.1049	0.0005***
Grupo IP vs IC	0.0013*	0.0243*	0.0001***	0.0128*	0.0001***

Leyenda: Se muestran los valores de porcentaje empleando el test de Kruskal-Wallis de dos vías (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) para comparar una misma región del cerebro específica (Ctx: Corteza, Cc: Cuerpo calloso, Str: Cuerpo estriado, Cbx: Corteza del cerebelo, Cbf: Fibras del cerebelo) entre dos de los grupos evaluados.

ANEXO 8

Estadísticos descriptivos de la inmunorreactividad a IgG, medidas en porcentaje de área con reacción positiva, considerando distintas regiones cerebrales dentro de los grupos evaluados

Prueba de IgG					
Periferia de larvas					
Zona	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	18	0.7574	0.7569	0.1784	0.4078–1.1071
Cc	22	1.1018	1.3207	0.2816	0.5499–1.6536
Str	29	1.1012	1.3628	0.2531	0.6052–1.5972
Hip	3	0.5930	0.4469	0.2580	0.0872–1.0988
Th	3	0.5277	0.3664	0.2115	0.1131–0.9422
Hy	3	0.9407	0.1824	0.1053	0.7343–1.1471
Cbx	8	0.8705	1.0259	0.3627	0.1596–1.5814
Cbf	27	1.1510	1.3672	0.2631	0.6353–1.6667
My	1	0.7000	--	--	--
Pt	1	0.2320	--	--	--
No Infectado					
Zona	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	18	0.0019	0.0018	0.0004	0.0011–0.0028
Cc	22	0.0023	0.0041	0.0009	0.0006–0.0040
Str	29	0.0015	0.0028	0.0005	0.0005–0.0025
Hip	3	0.0013	0.0012	0.0007	0.0000–0.0026
Th	3	0.0007	0.0012	0.0007	-0.0006–0.0020
Hy	3	0.0010	0.0017	0.0010	-0.0010–0.0030
Cbx	8	0.0060	0.0158	0.0056	-0.0049–0.0169
Cbf	27	0.0016	0.0031	0.0006	0.0004–0.0028
My	1	0.0060	--	--	--
Pt	1	0.0060	--	--	--
Contralateral					
Zona	n	Media	DE	EE	IC 95%
Ctx	11	0.2089	0.2486	0.0750	0.0620–0.3558
Cc	12	0.2058	0.1550	0.0448	0.1180–0.2935
Str	19	0.1158	0.2404	0.0552	0.0077–0.2239
Hip	3	0.3467	0.2285	0.1319	0.0881–0.6052
Th	0	--	--	--	--
Hy	3	0.3593	0.1442	0.0833	0.1961–0.5226
Cbx	5	0.1270	0.1564	0.0700	-0.0101–0.2641
Cbf	12	0.2532	0.3310	0.0955	0.0659–0.4404
My	0	--	--	--	--
Pt	1	0.1470	--	--	--

Anexo 8 (continuación) - Leyenda: n, número de muestras; DE, desviación estándar; EE, error estándar, IC 95%, intervalo de confianza al 95%. Ctx: Corteza; CC: Cuerpo Calloso, Str; Cuerpo estriado; Hip: Hipocampo; Th: Tálamo, Hy: Hipotálamo; Cbx: Cerebelo, Corteza; Cbf: Cerebelo, Fibras; Pt: Puente troncoencefálico; My: Médula oblongada.

ANEXO 9

Comparaciones pareadas del porcentaje de reacción a IgG entre distintas regiones del cerebro, dentro de cada grupo experimental: periferia infectada, control no infectado y zona contralateral.

IgG - Análisis entre zonas del cerebro					
Periferia de larvas					
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.6636	0.5115	0.8676	0.4445
Cc	--	--	0.7609	0.5266	0.7025
Str	--	--	--	0.3759	0.8121
Cbx	--	--	--	--	0.3875
Cbf	--	--	--	--	--
Control no infectado					
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.2112	0.0497*	0.1367	0.0793
Cc	--	--	0.34	0.9389	0.5341
Str	--	--	--	0.4881	0.7482
Cbx	--	--	--	--	0.7052
Cbf	--	--	--	--	--
Contralateral de infectado					
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Ctx	--	0.5795	0.0617	0.4602	0.6664
Cc	--	--	0.0093**	0.3428	0.6033
Str	--	--	--	0.2783	0.0167*
Cbx	--	--	--	--	0.5261
Cbf	--	--	--	--	--

Leyenda: Se muestran los valores de porcentaje empleando el test de Kruskal-Wallis de dos vías entre cada comparativa (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Se emplearon para el análisis regiones de cerebros que tuvieran más de 5 muestras para evaluar. Ctx: Corteza, Cc: Cuerpo calloso, Str: Cuerpo estriado, Cbx: Corteza del cerebelo, Cbf: Fibras del cerebelo.

ANEXO 10

Efecto de las regiones del cerebro en el análisis comparativo de marcador de IgG entre periferia de zonas infectadas (IP), no infectadas (NI) y contralateral a zonas infectadas (IC).

Zonas	IgG				
	Ctx	Cc	Str	Cbx	Cbf
Grupo IP vs NI	0.0001***	0.0001***	0.0001***	0.0103*	0.0001***
Grupo NI vs IC	0.0020**	0.0001***	0.0787	0.0691	0.0001***
Grupo IP vs IC	0.0327*	0.0211*	0.0001***	0.2128	0.0021**

Leyenda: Se muestran los valores de porcentaje empleando el test de Kruskal-Wallis de dos vías (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$) para comparar una misma región del cerebro específica (Ctx: Corteza, Cc: Cuerpo calloso, Str: Cuerpo estriado, Cbx: Corteza del cerebelo, Cbf: Fibras del cerebelo) entre dos de los grupos evaluados.
