



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**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 para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología**

**Autor:**

Alejandra Jimena Bustamante Portocarrero

**Asesora:**

Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

**Co asesora:**

Mg. Danitza Griselda Davila Villacorta

Lima – Perú

**2025**

**Jurado calificador**

**Presidente:** Dr. Holger Maita Malpartida

**Vocal:** Dra. Patricia Sheen Cortavarria


**Secretario:** Dr. Javier Arturo Bustos Palomino

Feedback Studio - Google Chrome  
ev.turnitin.com/app/carta/es/?lang=es&o=2626224458&ro=103&s=1&u=1165482885

turnitin

1 de 1: Uigict FACI FAVEZ  
Evaluación de la asociación entre la densidad de oligodendr... >

Similitud 11% Marcas de alerta



**UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

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 para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

**Autor:**  
Alejandra Jimena Bustamante Portocarrero

**Asesora:**  
Dra. Manuela Renee Verastegui Pimentel

**Co asesora:**  
Mg. Danitza Griselda Davila Villacorta

Lima - Perú  
2025

Página 1 de 58 13739 palabras 111%

Informe estándar  
Informe en inglés no disponible Más información

**11% Similitud estándar** Filtros

165 Exclusiones →

**Fuentes**  
Mostrar las fuentes solapadas

- 1 Internet  
repositorio.upch.edu.pe 4%  
54 bloques de texto 595 palabra que coinciden
- 2 Internet  
hdl.handle.net 1%  
24 bloques de texto 211 palabra que coinciden
- 3 Trabajos del estudiante  
Universidad Peruana Cayetano Heredia <1%  
4 bloques de texto 57 palabra que coinciden
- 4 Internet  
cybertesis.unmsm.edu.pe <1%  
4 bloques de texto 47 palabra que coinciden

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradezco a Dios por darme la oportunidad de culminar este camino hacia la titulación.

A mis papás, Dora y Roberto, por su amor incondicional, su guía y apoyo en cada paso de mi vida.

A la Dra. Manuela Verástegui, quien me acogió en su laboratorio desde el inicio, por compartir conmigo su conocimiento y brindarme su apoyo y tiempo invertido.

A Danitza, mi co asesora y amiga, por su paciencia, confianza y constante apoyo a lo largo de este proceso.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, en especial a Fabio, Milagros, Solange, Edith, Ayme, Josselyn, Karla y Oksana. Su amistad y apoyo hicieron que este camino fuera más enriquecedor y llevadero.

A Betty y Claudia, por su amistad y las palabras de aliento que tuvieron para mí en cada momento.

Finalmente, a todas las personas que, aun sin comprender del todo mi trabajo, me acompañaron con su cariño y apoyo desde que comencé a realizar este trabajo hasta el día de la sustentación.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Marco Teórico .....	4
1.1.1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .....	4
1.1.2. Neurocisticercosis.....	5
1.1.2.1. Epidemiología .....	5
1.1.2.2. Clasificación de la neurocisticercosis según la ubicación del cisticerco .....	6
1.1.2.2.1. NCC parenquimal .....	7
1.1.2.2.2. NCC extraparenquimal .....	7
1.1.2.3. Patología.....	8
1.1.2.4. Modelo animal en rata para la neurocisticercosis .....	9
1.1.3. Oligodendrocitos .....	10
1.1.4. Biomarcadores de oligodendrocitos, daño axonal y apoptosis.....	11
1.2. Planteamiento del problema.....	13
1.3. Justificación.....	14
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
2.1. Hipótesis .....	15
2.2. Objetivos.....	15
2.2.1. Objetivo general.....	15
2.2.2. Objetivos específicos .....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Área de estudio.....	16
3.2. Consideraciones éticas .....	16
3.3. Obtención de tejidos cerebrales .....	16
3.3.1. Obtención y activación de oncosferas de <i>T. solium</i> .....	16
3.3.2. Infección intracraneal de ratas .....	17
3.3.3. Procesamiento de las muestras.....	17
3.4. Procedimientos .....	18
3.4.1. Inmunohistoquímica .....	18
3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	19
3.4.3. Adquisición, procesamiento y análisis de imagen .....	20
3.5. Análisis estadísticos.....	21

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	22
4.1.	Descripción de la muestra .....	22
4.2.	Densidad y distribución de oligodendrocitos .....	22
4.3.	Densidad de Oligodendrocitos en materia blanca .....	26
4.5	Asociación entre la densidad de oligodendrocitos (Olig 2) y el daño axonal (NFP) 29	
4.6	Densidad de oligodendrocitos que están en apoptosis .....	32
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>VII.</b>	<b>LIMITACIONES</b> .....	40
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	41
	<b>ANEXOS</b> .....	47

## RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una infección producida por el cisticerco de *Taenia solium* cuando se posiciona en el sistema nervioso central (SNC), causando epilepsia tardía en regiones endémicas como Latinoamérica, Asia y África.

En algunas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, hay una disminución en la población de oligodendrocitos (OLs) en el SNC, los cuales son células encargadas de producir mielina para el recubrimiento axonal permitiendo que las señales sean saltatorias. La disminución de OLs, puede producir daño axonal, no obstante, esto se desconoce en Neurocisticercosis.

El objetivo del estudio fue evaluar la asociación entre la densidad de oligodendrocitos y el daño axonal en el modelo de ratas con neurocisticercosis en diferentes tiempos post infección.

Para ello, se utilizó tejidos de cerebros de ratas Holtzman que fueron infectados por la vía intracraneal con oncosferas activadas de *T. solium* y sacrificadas en 5 meses post-infección (mpi) (un mes, un mes y medio, tres meses, seis meses y doce meses). La cuantificación de OLs e hinchazones axonales se realizó mediante inmunohistoquímica usando los biomarcadores olig2 y NFP. Además, se determinó el porcentaje de OLs en apoptosis mediante inmunofluorescencia indirecta doble usando los biomarcadores Olig2 y caspasa-3.

La población de OLs en ratas con neurocisticercosis disminuyó significativamente a partir del 6.0 mpi en materia blanca, específicamente en cuerpo calloso. Además, se observó una asociación entre la densidad de OLs y la formación de hinchazones axonales a partir de los 3.0 mpi. Por otro lado, se observó un pequeño porcentaje de OLs que entran en apoptosis en ratas infectadas, sugiriendo que la disminución de la densidad de OLs podría deberse a otro tipo de muerte celular. Estos hallazgos proporcionan una base para futuras investigaciones sobre la patología en neurocisticercosis.

**Palabras clave:** Neurocisticercosis, oligodendrocitos, daño axonal, apoptosis, neurofilamento.

## ABSTRACT

Neurocysticercosis is a parasitic infection caused by the larval stage of *Taenia solium* when it is positioned in the central nervous system (CNS). This disease is the main cause of epilepsy in endemic regions such as Latin America, Asia and Africa.

In some neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis, there is a decrease in the population of oligodendrocytes (OLs) in the CNS, which are cells responsible for producing myelin to coat axons allowing signals to jump. Decrease in OLs may result in axonal damage can occur; however, this is unknown in neurocysticercosis. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the association between oligodendrocyte density and axonal damage in brain tissues from rats with Neurocysticercosis sacrificed at different post-infection times.

For this purpose, 10-14 day old Holtzman rats were infected intracranially with activated *T. solium* oncospheres and then sacrificed at 5 post-infection times (one month, one and a half months, three months, six months and twelve months). Identification of the number of oligodendrocytes and axonal swellings was performed by immunohistochemistry. In addition, to determine the proportion of OLs in apoptosis, double indirect immunofluorescence was performed.

The population of OLs showed a statistically significant decrease at sixth month post-infection (mpi) in white matter, specifically in corpus callosum. No significant differences were shown in gray matter. In addition, an indirect proportional association between OLs and axonal swelling (axonal damage) was observed from 6 mpi onwards. On the other hand, there is a small proportion of OLs that enter apoptosis in the presence of the parasite. These findings provide a basis for future research on pathology in neurocysticercosis.

**Keywords:** neurocysticercosis, oligodendrocytes, axonal damage, apoptosis, neurofilament.

## I. INTRODUCCIÓN

La Neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria provocada por la infección del cisticerco de *Taenia solium* cuando se instala en el sistema nervioso central (SNC) (1). Esta enfermedad es endémica en regiones de Latinoamérica, África y Asia en donde se crían cerdos en condiciones poco salubres, sin letrinas o un adecuado sistema de desagüe, lo que permite que los cerdos tengan mayor facilidad en acceder a las heces humanas que contienen los proglótidos grávidos de *Taenia solium* (2,3).

Actualmente se sabe que la NCC causa daño axonal y ha sido evidenciado en muestras de tejido de cerebro humanos, de cerdos y de rata con NCC (4,5). No obstante, se desconoce los factores implicados en este daño axonal. Al comparar con la esclerosis múltiple, una enfermedad neurodegenerativa, que presenta daño axonal, se ha reportado que hay una asociación del daño axonal con la disminución en la densidad de oligodendrocitos (OLs). Esto es debido a que la disminución de la densidad de OLs causa una disminución en la producción de mielina, lo que hace que los axones sean más susceptibles a ser dañados por agentes neurotóxicos (6,7). En el caso de NCC no existen estudios entre la población de OLs y la asociación con el daño axonal.

La NCC es considerada una enfermedad crónica, debido a que los síntomas pueden aparecer meses o años después de que el cisticerco se ha posicionado en el cerebro (1). A partir de ello, se encuentran diversos desafíos para poder investigar a mayor profundidad la enfermedad, por lo que el uso de modelos animales ha sido indispensable para ampliar el conocimiento de la patología (8). Sin embargo, aún hay ciertos vacíos por estudiar.

Es por ello que en el presente estudio tiene como objetivo evaluar la densidad de OLs y la asociación que puede tener con el daño axonal en un modelo de ratas con neurocisticercosis en diferentes tiempos post-infección, por medio de las técnicas de inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Este trabajo proporcionará información importante sobre la patología de la enfermedad y mecanismos subyacentes.

## 1.1. Marco Teórico

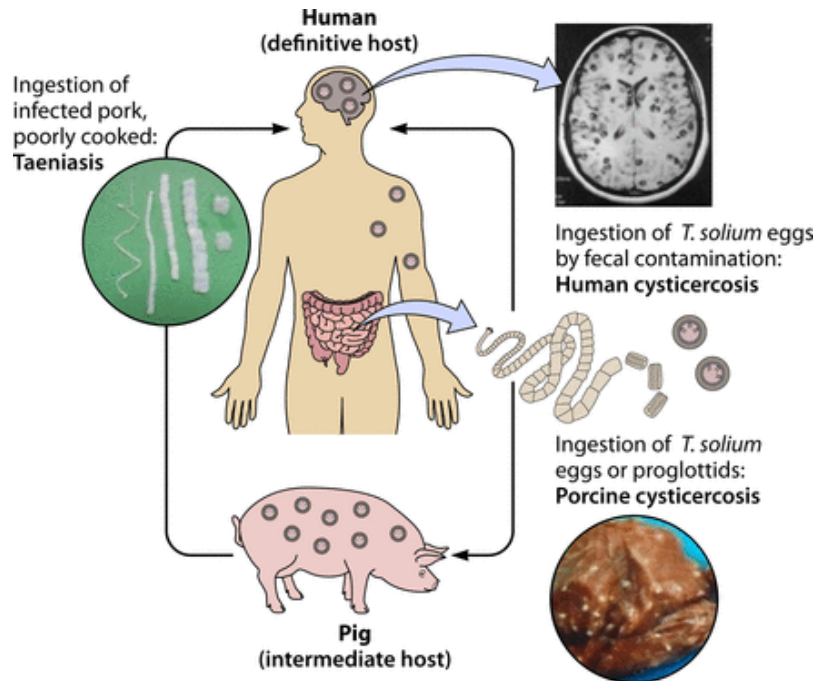
### 1.1.1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

*Taenia solium* es un parásito helminto perteneciente a la clase Cestoda (9). El ciclo de vida incluye a dos hospederos: el ser humano como hospedero definitivo y el cerdo como hospedero intermediario (Fig.1) (1,10,11), causándoles teniasis y cisticercosis respectivamente.

La teniasis, enfermedad provocada por el estadio adulto del parásito, se adquiere por el consumo de carne de cerdo mal cocida infectada con los cisticercos (estadio larval de parásito) o quistes de *Taenia solium*. Estos cisticercos evaginan a nivel de intestino delgado y el escólex se adhiere a la mucosa y así se desarrolla hasta el estadio adulto (1,11).

Por otro lado, la cisticercosis es la enfermedad provocada por el estadio larval o cisticerco. El cerdo adquiere la cisticercosis al ingerir los huevos de *Taenia solium* contenidos en las heces humanas provenientes de un individuo con teniasis. Estos eclosionan en el intestino delgado y se libera el embrión hexacanto u oncosferas, las cuales penetran la pared del intestino y llegan al torrente sanguíneo donde se diseminan a diferentes órganos del cuerpo para continuar su desarrollo hasta cisticercos (1,11,12).

La cisticercosis humana, al igual que el cerdo, se da cuando el hombre consume accidentalmente huevos de *T. solium* a través de agua o alimentos contaminados con huevos presentes en la materia fecal de individuos con teniasis.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Taenia solium*.  
Obtenido de García et. al 2020.

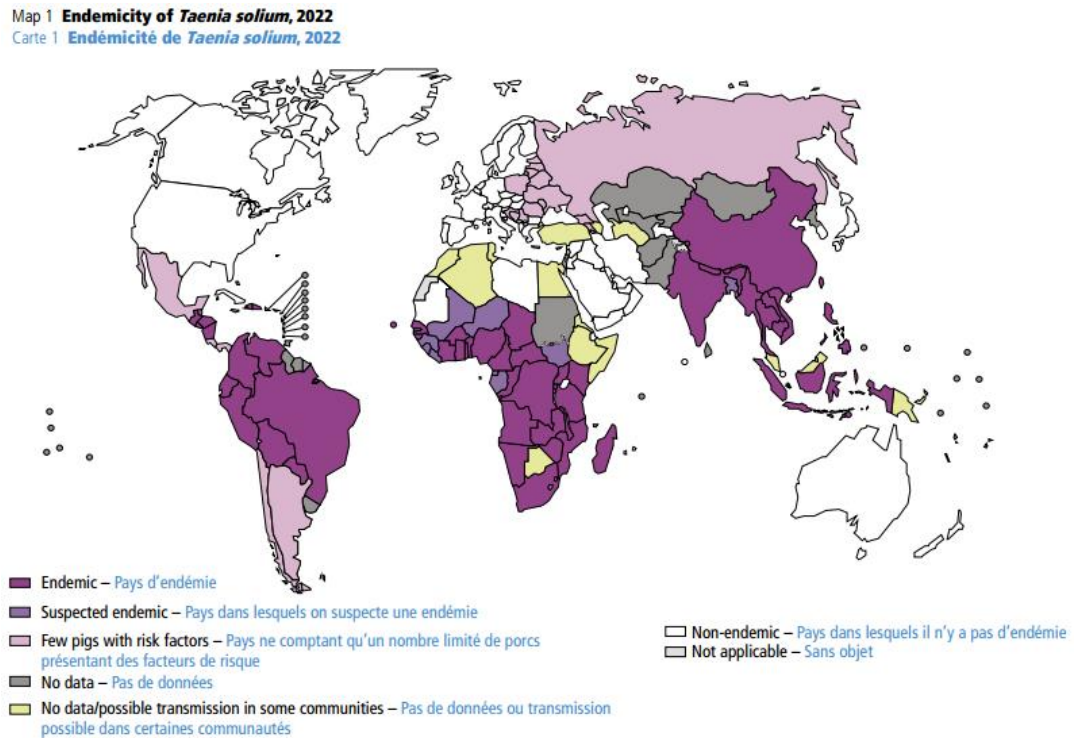
## 1.1.2. Neurocisticercosis

### 1.1.2.1. Epidemiología

La neurocisticercosis (NCC) es la infección causada por el estadio larval de *T. solium* cuando se aloja a nivel del sistema nervioso central (SNC) (1). Esta enfermedad es una de las principales causas de convulsiones y epilepsia adquirida en regiones endémicas en diversos países de Latinoamérica, Asia y África (Fig.2). (10,13,14). Sin embargo, es considerada como una enfermedad desatendida según la Organización Mundial de la salud (OMS) (2).

Esta enfermedad se presenta principalmente en zonas con deficientes hábitos de saneamiento e higiene permitiendo que se dé el ciclo biológico (3). Las principales deficiencias son: no contar con los servicios de matadero con la supervisión de un veterinario, la ausencia de letrinas, la defecación al aire libre, la cría tradicional de cerdos y suministro inadecuado de agua y falta de drenaje (3,15). Debido a la globalización, la

NCC ha incrementado en países no endémicos debido a la migración de individuos infectados a regiones no endémicas (16,17).



**Figura 2.** Endemicidad de *Taenia solium*. Organización Mundial de la Salud (2022)

### 1.1.2.2. Clasificación de la neurocisticercosis según la ubicación del cisticerco

La complejidad de la enfermedad varía dependiendo de diversos factores como la cantidad y tamaño de los cisticercos, su ubicación dentro del cerebro, viabilidad del parásito y la respuesta inmune del hospedador (1,18).

Con respecto a la ubicación del cisticerco, la NCC se clasifica en NCC parenquimal o NCC extraparenquimal.

#### **1.1.2.2.1. NCC parenquimal**

En la NCC parenquimal, el cisticerco se encuentra ubicado en regiones que abarca la materia gris y materia blanca, denominado parénquima cerebral. Las principales manifestaciones clínicas son los cuadros de convulsiones y epilepsia (3), donde se ha reportado que aproximadamente el 80% de casos de NCC sintomáticos presentan convulsiones recurrentes (1). Otros síntomas clínicos reportados en NCC parenquimal son dolores de cabeza crónicos, déficit cognitivo y síntomas psiquiátricos (11,18). Sin embargo, también se han reportado casos de NCC asintomáticos o sin respuesta clínica confirmados por estudios de neuroimágenes. Esto puede ser por el número o localización del parásito en el SNC, y/o, la respuesta inmune del hospedero. Además, el parásito presenta mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero (1,18,19).

Los cisticercos pasan de un estado viable hasta una involución, lo que genera un aumento en los procesos de inflamación local, provocando su degeneración total (11). Años atrás se creía que los síntomas mencionados anteriormente estaban asociados a la degeneración del quiste, no obstante, se ha demostrado que estas manifestaciones clínicas se presentan en cualquier estado de viabilidad del cisticerco (18).

El tratamiento más utilizado para la NCC parenquimal es el uso de antiparasitarios como el praziquantel y el albendazol (1). Sin embargo, estos medicamentos al causar la muerte del parásito exacerban la respuesta inflamatoria empeorando la sintomatología neurológica de los pacientes o causando nuevas manifestaciones clínicas en ellos (1,11). Es por ello que se recomienda el uso de corticoesteroides como la dexametasona para contrarrestar o reducir estos efectos (11,20).

#### **1.1.2.2.2. NCC extraparenquimal**

En la NCC extraparenquimal, el cisticerco se ubica en los espacios subaracnoideos o en los ventrículos (11). Este tipo de NCC es poco común, pero de mayor severidad que la NCC parenquimal, teniendo una peor prognosis (21). Tiene la mayor tasa de mortalidad, siendo aproximadamente el 20% en pacientes que no reciben un tratamiento óptimo (1).

La NCC subaracnoidea es la más compleja, ya que el parasito presenta una proliferación descontrolada de la membrana (22). A este tipo de cisticerco también se le conoce como cisticerco racemoso, por tener la apariencia de un racimo de uvas (20,22). La NCC ventricular puede provocar hidrocefalia si no se trata adecuadamente, ya que hay una obstrucción en el flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR). Además, puede provocar otros síntomas como náuseas, vómitos y dolor de cabeza. Cuando los cisticercos se ubican en espacios extraparenquimales, pueden tener un efecto masa y pueden causar hipertensión intracraneal (21). (11)

### **1.1.2.3. Patología**

La respuesta inflamatoria es una característica de la patofisiología de la NCC (20). En NCC existe una etapa asintomática y otra sintomática. En el caso de la asintomática, muchas personas infectadas con el estadio larval del parásito pueden carecer de síntomas por mucho tiempo, entre meses y años (1,21). Esto se debe a que al parasito se le atribuye la capacidad de evadir la respuesta inmune por parte del hospedero, por medio de antígenos de *Taenia solium*, como el enmascaramiento de los antígenos del cisticerco por las inmunoglobulinas del huésped y el bloqueo del sistema del complemento por medio de antígenos liberados (21).

De acuerdo con las investigaciones de García y colaboradores y Fleury y colaboradores, la respuesta inmunológica está relacionada al estado de viabilidad del cisticerco (1,23). En la etapa vesicular, la reacción inflamatoria alrededor del quiste es leve, siendo constante a lo largo del tiempo, lo cual hace que sea una infección crónica. También se ha reportado la presencia de una capsula inflamatoria formada por células plasmáticas, linfocitos, macrófagos y eosinófilos, así como activación de las células gliales. Además, se observa alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (24). Por otro lado, al ser una inflamación crónica va a causar con el tiempo daño neuronal (hinchazón axonal) (4,24). Cuando el cisticerco continúa su desarrollo y pasa a la etapa coloidal, el infiltrado inflamatorio tiene presencia de macrófagos y células T y se destaca la respuesta inflamatoria de tipo Th1 mediada por linfocitos. Posteriormente, cuando los quistes comienzan a degenerarse, las células más abundantes en el infiltrado celular son

los linfocitos B y T, las células plasmáticas, macrófagos y mastocitos. Luego, el cisticerco colapsa y las membranas junto con el escólex son reemplazados por un tejido fibrótico. Por último, cuando el quiste se calcifica, en algunos casos, tiene poca inflamación que puede ser asociada con la ruptura de la barrera hematoencefálica (1,23).

#### **1.1.2.4. Modelo animal en rata para la neurocisticercosis**

A lo largo del tiempo, se ha intentado estudiar la patología de la NCC con diferentes modelos animales, ya que en humanos es difícil disponer muestras por la ubicación de los quistes y el lento desarrollo de la enfermedad (25). Hasta la fecha se han empleado diversos modelos animales como cerdos, perros, gatos, ratones, ovejas y ratas (26). Estos modelos, han permitido la comprensión de la patología en NCC y los procesos involucrados con la infección de cisticercos en el SNC, con el fin de poder elucidar la patogénesis de la enfermedad y cómo esta se va desarrollando en el tiempo y así poder seguir estudiando nuevas terapias (8).

En el 2015, Verástegui y colaboradores desarrollaron un novedoso modelo animal en ratas, en donde se realiza la infección con oncosferas de *Taenia solium* por la vía intracraneal (25). Además, reportan una patología similar a la observada en la NCC humana (4).

Gracias a este modelo se han realizado estudios histopatológicos observando diversas manifestaciones o cambios que se presentan en el tejido cerebral por la presencia del parásito. En primer lugar, se encontró un infiltrado celular próximo al cisticerco conformado por astrocitos reactivos y microglías activas y fagocitos (4). Este cambio también ha sido reportado en modelos porcinos. Asimismo, se reportó la presencia de hinchazón axonal formado por esferoides o varicosidades, las cuales fueron observadas también en muestras de cerebro de cerdos y humanos (4). Posteriormente, en otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación reportan una disrupción en la barrera hematoencefálica y angiogénesis (27). Estos resultados coinciden con el estudio realizado en cerdos con NCC (28). Estas características se han reportado también en otras enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple (29).

### 1.1.3. Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos (OLs) son uno de los principales tipos de células gliales del SNC, junto a las microglías y astrocitos, representando aproximadamente el 75% de este tipo de células (30,31). Son los responsables de generar la mielina que recubre al axón y de agrupar los canales de sodio en los espacios intermedios libres de mielina conocidos como los nódulos de Ranvier, con el fin de que la señal sináptica sea más rápida (30–32). Otras funciones de los OLs son: proveen soporte metabólico y trófico asegurando la unión del axón y la mielina y aseguran la homeostasis iónica en el SNC, ya que amortiguan el aumento de potasio extracelular y suministran lactato como fuente de energía (31,32).

Estas células son el único fenotipo celular maduro dentro del SNC adulto con una población de células progenitoras existente, generalizada y proliferativa conocidas como las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) (31). A partir de estas, los OLs se diferencian en OLs inmaduros y maduros mielinizantes. (30). Específicamente, se ha reportado que, en ratones, las OPC constituyen hasta el 9% de las células en la materia blanca y el 3% en la materia gris (33). Los OLs están presentes en mayor cantidad en la materia blanca, específicamente en cuerpo calloso, donde también hay mayor presencia de mielina (34). Asimismo, los OLs son más numerosos entre las células gliales de la materia blanca, que corresponde aproximadamente el 69% (35).

Los OLs tienden a disminuir en condiciones patológicas porque son células muy vulnerables a daños. Una de las principales razones es que los OLs tienen una capacidad limitada para hacer frente al daño oxidativo. Además, tienen una capacidad limitada para hacer frente al estrés oxidativo por lo que cualquier estrés metabólico u oxidativo sobrecarga a las células y provoca apoptosis (36). De igual manera, la presencia de citoquinas inflamatorias también produce apoptosis en OLs; y, por último, los OLs son susceptibles de morir por la liberación descontrolada de glutamato y ATP (36,37).

#### 1.1.4. Biomarcadores de oligodendrocitos, daño axonal y apoptosis

El factor de transcripción de Oligodendrocitos (Olig2) es un biomarcador dentro de los factores de transcripción que son los reguladores fundamentales en el desarrollo y diferenciación de los OLs y la mielinización (38,39). Los genes *olig* son necesarios y suficientes para la generación de oligodendrocitos y la mielinización (39). Tanto Olig1 como Olig2 tienen funciones parecidas, pero no se superponen en la proliferación y diferenciación. Teniendo Olig1 mayor importancia en la etapa posterior del desarrollo de OLs, mientras que Olig2 es fundamental para el desarrollo del linaje de los OLs. Olig2 es considerado como un biomarcador universal, ya que se expresa en cada etapa de desarrollo de los OLs como en las OPC, OLs inmaduros y OLs maduros mielinizantes (30,40).

Por otro lado, el neurofilamento es una proteína estructural ubicada en el citoesqueleto de los axones, el cual es esencial para el crecimiento radial de los axones, el mantenimiento y la velocidad de la conducción nerviosa a lo largo de los axones (41). Está compuesto por cuatro subtipos de proteínas: ligeras, intermedias, pesadas y internexina, las cuales se ensamblan entre ellas para poder formar filamentos que proporcionan soporte estructural y estabilidad a los axones (41). Actualmente, dicha proteína es usada como marcador para identificar el daño axonal en diferentes enfermedades neurológicas como la esclerosis múltiple, el Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y neurocisticercosis (4,42–44). En estas situaciones, los neurofilamentos tienden a liberarse al líquido cefalorraquídeo y al torrente sanguíneo (4,42). Asimismo, esta proteína se acumula en grandes cantidades dentro de los axones proximales de las neuronas que son afectadas como consecuencia de una fosforilación aberrante (4,41). En el caso de la NCC, reportes previos han demostrado la presencia de hinchazón o inflamación axonal por la aparición de esferoides y varicosidades, los cuales se han visto en humanos, cerdos y el modelo animal de NCC en ratas (4,5). Sin embargo, se desconoce si una posible disminución de OLs estaría asociado al daño axonal y la desmielinización.

Por último, la caspasa-3 es una enzima capaz de romper enlaces peptídicos de proteínas por el lado carboxi-terminal (45). La principal función es la degradación

controlada de ciertas proteínas durante el proceso de muerte celular programada: apoptosis. La caspasa-3 clivada es considerada un marcador de apoptosis general, ya que esta proteasa es necesaria para muchos cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis. (45,46). Anteriormente, se han realizado estudios donde evaluaron la apoptosis de OLs en otras enfermedades como la esclerosis múltiple, en donde afirman que la apoptosis produce una desmielinización de los axones (47) o en una lesión en la médula espinal por una administración de glutamato (46).

## 1.2. Planteamiento del problema

La NCC es una enfermedad causada por el estadio larval del helminto *T. solium* cuando se aloja en el SNC, la cual es la principal causa de epilepsias adquirida en regiones endémicas como Latinoamérica, Asia y África (1,2,11,18,19). Entre el 30 y 50% de casos con epilepsia en zonas endémicas están asociadas a la NCC (1,10,17).(10). Este hecho es considerado un importante problema de salud pública, ya que la principal consecuencia es la epilepsia adquirida (1,10,18).

Esta enfermedad es compleja, ya que la sintomatología clínica puede aparecer meses o años después de que el parásito se haya posicionado en el SNC y en ocasiones, los pacientes pueden ser asintomáticos (3). A pesar de los avances en su estudio, aún existen importantes vacíos en el conocimiento sobre su patología. Al ser una enfermedad crónica, presenta desafíos para la investigación, especialmente debido a la limitada disponibilidad de muestras humanas. Es por ello que se utilizan modelos animales con el fin de entender sus mecanismos patogénicos y evaluar la progresión de la enfermedad. (1,11,28,48)

Una de las principales patologías en el cerebro de pacientes con NCC es el daño axonal, el cual se ha reportado en otras enfermedades asociadas a la desmielinización como la esclerosis múltiple (4,49). En estos estudios mencionan una posible relación o participación de los OLs, ya que son las células encargadas de producir las vainas mielina que envuelven a los axones, protegiéndolos ante cualquier factor externo que pueda causar algún daño (30). Por lo mencionado es importante determinar si la población de OLs se ve afectado en la NCC, lo que podría estar causando una desmielinización de los axones y estaría asociado al daño axonal.

En la actualidad se desconoce si la presencia del parásito en el SNC causa una disminución en la población de OLs y si esta disminución está asociada con el daño axonal. Asimismo, no existen estudios que evalúen esta asociación y la densidad de la población de OLs en la progresión de la NCC. Por tal razón, en este estudio se empleó un modelo animal en ratas con NCC, de las cuales se obtuvo muestras de tejido cerebral en diferentes tiempos post infección, para evaluar la densidad del linaje de OLs mediante el marcador Olig2; también se evaluó si el cambio en la densidad de OLs está asociada

con la presencia de esferoides axonales empleando el marcador de neurofilamento; y finalmente se evaluó si la disminución de la densidad de OLs se debe a la apoptosis empleando el marcador casp-3.

### **1.3. Justificación**

Estudios previos en otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple, han demostrado que la disminución de la densidad de oligodendrocitos puede provocar la desmielinización en los axones, haciendo que los axones sean más vulnerables desencadenando el daño axonal (6,7). De igual manera, se ha observado que la pérdida de OLs ocurre principalmente a través de la apoptosis, un proceso de muerte celular programada (50). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce si la presencia del cisticerco en el SNC causa una disminución en la densidad de oligodendrocitos ni se ha estudiado la posible asociación con el daño axonal. Es importante conocer si hay asociación entre ellos porque permitirá obtener una visión más detallada de la patología de la enfermedad y sus mecanismos. Este conocimiento será importante para avanzar en el entendimiento de la progresión de la enfermedad y de sus implicaciones en el tiempo.

## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. Hipótesis**

La presencia del parásito en el cerebro de las ratas con NCC produce una disminución de la densidad de oligodendrocitos contribuyendo al daño axonal en diferentes tiempos post-infección.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo general**

Evaluar la densidad de oligodendrocitos y la asociación con el daño axonal en diferentes tiempos post-infección en tejidos de cerebro de ratas con neurocisticercosis.

#### **2.2.2. Objetivos específicos**

1. Comparar la densidad de Oligodendrocitos en tejido de cerebros de ratas según la ubicación y el tipo de materia blanca y gris a lo largo del tiempo mediante la inmunoreactividad a Olig2.
2. Determinar el número de hinchazones axonales a lo largo del tiempo en tejidos de cerebros de ratas infectadas entre materia gris y materia blanca mediante la inmunoreactividad a NFP con la técnica de inmunohistoquímica.
3. Determinar la asociación entre la densidad de oligodendrocitos y la presencia de hinchazones axonales en los diferentes tiempos post-infección.
4. Identificar por inmunofluorescencia la presencia de oligodendrocitos en apoptosis usando el marcador Caspasa-3 en los diferentes tiempos post-infección.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Área de estudio**

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas (LIEI) y el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

#### **3.2. Consideraciones éticas**

Este estudio fue evaluado por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con código SIDISI 208700. Para el presente estudio se usaron los tejidos de cerebros post-mortem de ratas albinas de la línea Holtzman, fijados en parafina que han sido almacenados en láminas portaobjetos de un proyecto madre con aprobación ética código SIDISI 66826.

#### **3.3. Obtención de tejidos cerebrales**

En el proyecto madre se emplearon los siguientes procedimientos:

##### **3.3.1. Obtención y activación de oncosferas de *T. solium***

Para la obtención y activación de las oncosferas de *Taenia solium* se usó el protocolo estandarizado por Verástegui y colaboradores (9). Se recolectaron tenias adultas de *T. solium* de pacientes recién diagnosticados con teniasis, de las cuales se obtuvieron las proglótides grávidas por medio de tamizado y se realizó una homogenización suave en agua para poder obtener los huevos. Los huevos fueron lavados tres veces en agua destilada, y después se centrifugaron a 3500 rpm a temperatura ambiente por cinco minutos. La eclosión de las oncosferas in vitro se realizó con el pellet obtenido en la centrifugación de los huevos junto con hipoclorito de sodio al 15% en agua. Las

oncosferas se lavaron dos veces usando el medio RPMI. Posteriormente, las oncosferas fueron activadas por medio de una incubación a 37°C por 1 hora con líquido intestinal artificial (1% de pancreatina, 0.2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1% de bilis real de cerdo, con medio RPMI 1640 [pH 8.04]). Finalmente, las oncosferas se lavaron tres veces con el medio RPMI y se contaron usando una cámara de Neubauer. Se consideraron oncosferas activadas aquellas que mostraban motilidad activa (9).

### **3.3.2. Infección intracraneal de ratas**

Se infectaron a 60 ratas que tenían entre 10 a 14 días de nacidas por medio de la inoculación intracraneal con oncosferas activadas (25), otras 18 fueron inoculadas con solución salina (animales control no infectados). Estas fueron anestesiadas previamente con Ketamina y Xilacina. Se inocularon 120 oncosferas activadas en 50 µL de solución salina usando jeringas de tuberculina. La inoculación se realizó en el bregma cerebral.

### **3.3.3. Procesamiento de las muestras**

Las ratas fueron sacrificadas en cinco grupos con diferentes meses post infección: 1.0 (n=11), 1.5 (n=15), 3.0 (n=9), 6.0 (n=11) y 12.0 mpi (n=14), las cuales fueron anestesiadas con Ketamina (100 mg/kg) y Xilacina (10 mg/kg) para proceder con la perfusión con 210 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1X con pH 7.3. Luego se agregaron aproximadamente 140 mL de paraformaldehído al 4% y se extrajeron los cerebros.

Los cerebros fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante toda una noche y, posteriormente, fueron deshidratados en una batería ascendente de alcoholes y luego se pasaron por una batería de xilol para terminar siendo embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 3 µm por medio de un micrótopo, los cuales fueron colocados en láminas portaobjetos que fueron tratadas previamente con una solución de poli-L-lisina. Las láminas fueron observadas al microscopio para confirmar la presencia del quiste y se compararon con las láminas que tenían la tinción H&E del estudio previo.

### **3.4. Procedimientos**

#### **3.4.1. Inmunohistoquímica**

Las láminas utilizadas para el biomarcador Olig2 fueron desparafinadas colocándolas en estufa a 60°C por 30 minutos, luego se pasaron por una batería de Xilol por 3 minutos en cada uno y una batería decreciente de alcoholes para deshidratar las muestras. Para el desenmascaramiento o también llamado revelación de antígenos, las láminas fueron sumergidas en un beaker de 1 L que contenía buffer citrato (citrato de sodio 10 mM, tween 20 al 0.05%, pH 6.0) a 96°C por 30 minutos. Posteriormente, las láminas fueron lavadas con PBS 1X, pH: 7.25 y se realizó el bloqueo de peroxidasas endógenas con una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, PBS 1X y metanol por 15 minutos. Luego, las muestras fueron lavadas nuevamente con PBS 1X y se incubaron por una hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo de proteínas generales que estuvo compuesta por 10% suero de conejo, 5% suero de caballo, 2.5% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS Tritón X-100 al 0.05%. Para la incubación del anticuerpo primario, se lavaron las láminas con PBS 1X y se realizó una solución que contenía 5% suero de conejo, 5% suero de caballo en PBS Tritón X-100 al 0.05% y se agregó el anticuerpo IgG de cabra anti-Olig2 (anexo 1) en una dilución de 1/300, la cual se incubó en las láminas toda la noche a 4°C en cámaras húmedas. Las muestras fueron lavadas en PBS 1X y fueron incubadas con una solución que contenía 5% suero de conejo, 5% suero de caballo en PBS 1X y el anticuerpo secundario (IgG de conejo anti-IgG de cabra en una dilución de 1/400, anexo 1) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las láminas y se procedió a realizar la detección de la reacción antígeno-anticuerpo, en donde se usó el cromógeno 3,3'diaminobenzidina (DAB) (Dako) y el enhancer, este último con el fin de poder potencial el marcaje obtenido. Por último, se hizo la contratinción con hematoxilina, la deshidratación con una batería creciente de alcoholes y el montaje con Entellan (MERCK) (detalle del protocolo en anexo 2).

En el caso de la inmunohistoquímica realizada para las muestras con el biomarcador para neurofilamento NFP, la desparafinación fue la misma que para las láminas con Olig2. El desenmascaramiento se realizó con citrato 10mM en coplins por 30 minutos. El

bloqueo de peroxidasas se llevó a cabo con 3% de peróxido de hidrógeno en PBS por 30 minutos y para la solución de bloqueo de proteínas generales se usó 2% de BSA, 10% de suero de caballo y 2% de leche, todo en PBS Tritón X-100 al 0.05% a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, el anticuerpo primario utilizado fue IgG de cabra anti-NFP (anexo 1) y fue incubado en una concentración de 1:1000 junto con 5% de suero de cabra en PBS Tritón X-100 al 0.05%, toda la noche a 4°C y para el anticuerpo secundario se usó IgG de cabra anti-IgG de ratón en una dilución de 1/500 (anexo 1) con 5% de suero de cabra en PBS 1X, dejándolo incubar por 1 hora a temperatura ambiente. El revelado, la contratinción y deshidratación se realizó de la misma forma que para las muestras de Olig2 (el protocolo a detalle se encuentra en el anexo 3).

### **3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta**

Las láminas fueron desparafinadas de la misma manera que la inmunohistoquímica para Olig 2 y NFP. El desenmascaramiento se realizó con buffer citrato 10 mM a pH 6 por 30 minutos en un beacker a 96°C. Para la permeabilización de las membranas se utilizó PBS Tritón X-100 al 0.01% por 10 minutos. Posteriormente, se lavaron las muestras en PBS 1X pH: 7.25 y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con la solución de bloqueo de proteínas generales que contenía 2% de ovoalbúmina y 2% de BSA. Después se volvieron a lavar las láminas con PBS 1X y se procedió a incubar la solución de anticuerpos primarios (IgG de cabra anti-Olig2 con una dilución de 1/300 e IgG de ratón anti-Caspasa-3 a una dilución de 1/100, anexo 1) junto con 1% de ovoalbúmina en PBS Tritón X-100 al 0.05% toda la noche a 4°C en cámaras húmedas. Luego, las láminas fueron lavadas en PBS 1X y se incubaron los anticuerpos secundarios respectivos (anexo 1) con 2% de ovoalbúmina y 2% de BSA en PBS 1X por 60 minutos a temperatura ambiente cubriéndolos para evitar el contacto de la luz por los fluoróforos usados. Por último, se realizó el montaje de las láminas con DAPI y se sellaron los bordes con esmalte (detalle del protocolo en anexo 4).

### 3.4.3. Adquisición, procesamiento y análisis de imagen

Las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica fueron adquiridas con una amplificación de 200X por medio del microscopio Zeiss Axio Lab acoplado a una cámara, previa instalación del software manualWSI. El software permitió hacer un escaneo panorámico de los cerebros y así reconocer las zonas requeridas para el análisis alrededor del cisticerco trabajadas posteriormente con el software Image J v.1.49.

Para los tejidos de cerebros infectados se seleccionó el área alrededor del quiste hasta una distancia de 500  $\mu\text{m}$ ; mientras que, para los tejidos de cerebros no infectados, se tomaron áreas semejantes a las zonas donde estaban los quistes en los cerebros infectados. Para delimitar las zonas alrededor del cisticerco, es decir materia blanca, materia gris y cuerpo calloso, se utilizó el Atlas Cerebral Escalable de ratas (<https://scalablebrainatlas.incf.org/rat/PLCJB14>).

Para cuantificar la cantidad de OLs inmunoreactivos a Olig2 se usó la herramienta “Color deconvolution”, con la opción para muestras hechas con hematoxilina (H) y DAB y se usó la imagen de color marrón correspondiente al DAB y fueron convertidas a color binario (es decir, blanco y negro, donde el color negro representa la presencia de DAB). Posteriormente, se utilizó la herramienta análisis de partículas, la cual hizo un conteo de la inmunoreactividad previa configuración y se obtuvo el conteo de los puntos de color negro que representan a los OLs.

En el caso de los esferoides y varicosidades inmunoreactivos a NFP, se empleó la herramienta “cell counter” o contador de células, el cual permitió poder marcar cada acúmulo observado. Cabe resaltar que el análisis se realizó en una distancia de 500  $\mu\text{m}$  del cisticerco y en zonas de materia blanca cerca al cisticerco y zonas de materia gris que están próximas al cisticerco y a la materia blanca evaluada.

Para la cuantificación de la inmunofluorescencia se utilizó la herramienta “cell counter” para marcar los olig2 (verde), la caspasa-3 (rojo) y la colocalización (amarillo). Se obtuvo el porcentaje de oligodendrocitos que entran en apoptosis.

En ambos casos, para obtener el número de células por  $\text{mm}^2$ , se usó el conteo de células y el área de las zonas que están en  $\mu\text{m}^2$ , por lo que se procedió a realizar la conversión a  $\text{mm}^2$ .

### **3.5. Análisis estadísticos**

Los datos fueron colectados por el programa Image J y ordenados en Microsoft Excel. Posteriormente, los datos se analizaron con el programa Stata 14 y los gráficos se realizaron con el programa Prism Graphpad versión 9. Para evaluar si existen diferencias entre las ratas no infectadas e infectadas a través del tiempo se realizó la prueba Kruskal Wallis. Asimismo, se utilizó la prueba no paramétrica Wilcoxon para poder evaluar si hay diferencias significativas en cada tiempo post-infección entre no infectados e infectados. Por último, se utilizó la prueba de Spearman para evaluar si existe asociación entre la densidad de oligodendrocitos y las hinchazones axonales. Se consideró un nivel de significancia de 0.05.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Descripción de la muestra

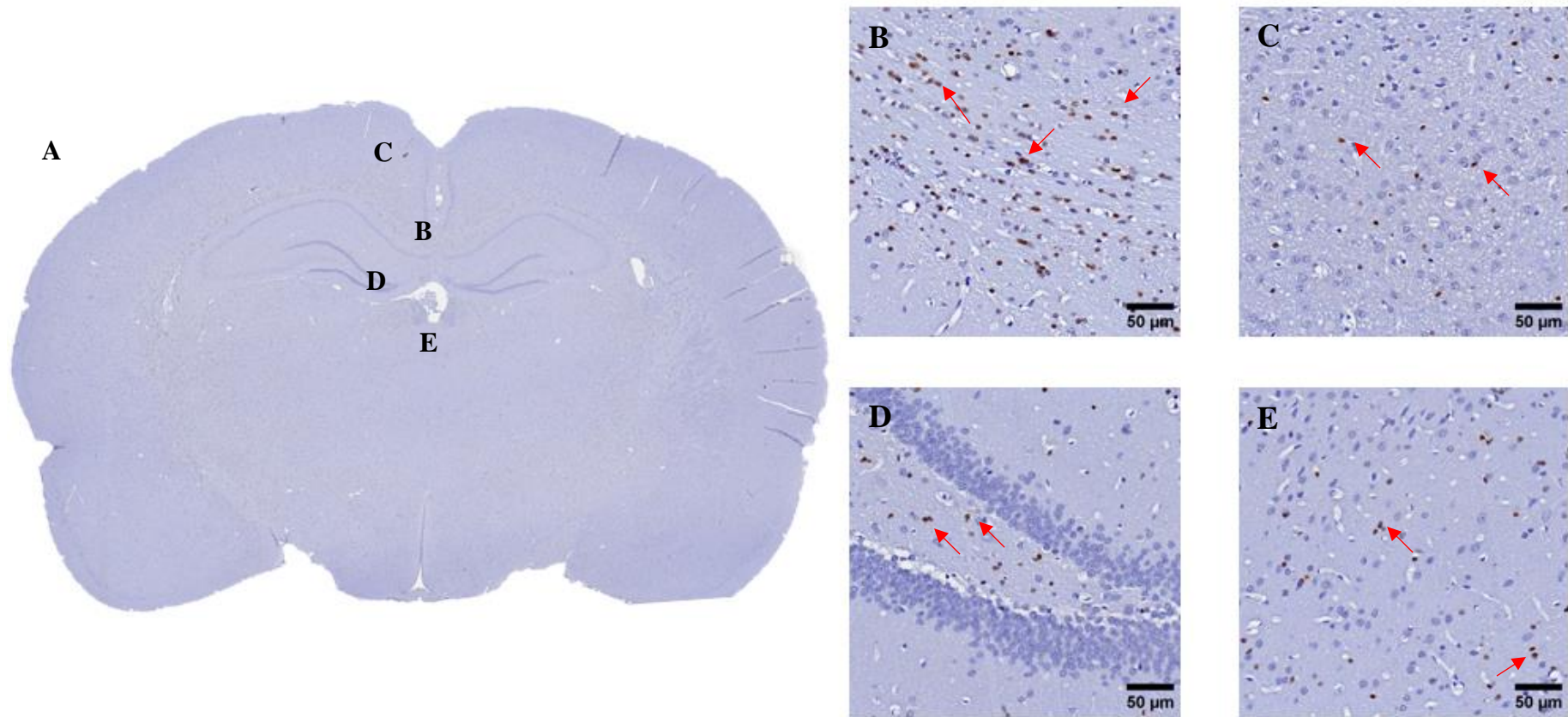
Para el presente estudio se utilizaron 60 cerebros de ratas infectadas y 18 cerebros de ratas sanas como controles. Se identificaron 71 cisticercos viables, 42 en el parénquima cerebral (P), y 29 en las meninges (M). La distribución de quistes por ubicación y tiempo post-infección se encuentra en la Tabla N°1.

**Tabla 1.** Distribución de quistes por ubicación en el cerebro de ratas en los diferentes tiempos post-infección.

Meses post-infección (mpi)	#Cerebros no infectados	Cisticercos parenquimales #cerebros infectados (#cisticercos)	Cisticercos meningeales #cerebros infectados (#cisticercos)	Total #cerebros infectados (#cisticercos)
<b>1.0</b>	2	7 (7)	4 (4)	<b>11 (11)</b>
<b>1.5</b>	3	9 (9)	6 (6)	<b>15 (15)</b>
<b>3.0</b>	3	6 (8)	3 (4)	<b>9 (12)</b>
<b>6.0</b>	4	6 (7)	5 (7)	<b>11 (14)</b>
<b>12.0</b>	6	8 (11)	6 (8)	<b>14 (19)</b>
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>(42)</b>	<b>(29)</b>	<b>60 (71)</b>

### 4.2. Densidad y distribución de oligodendrocitos

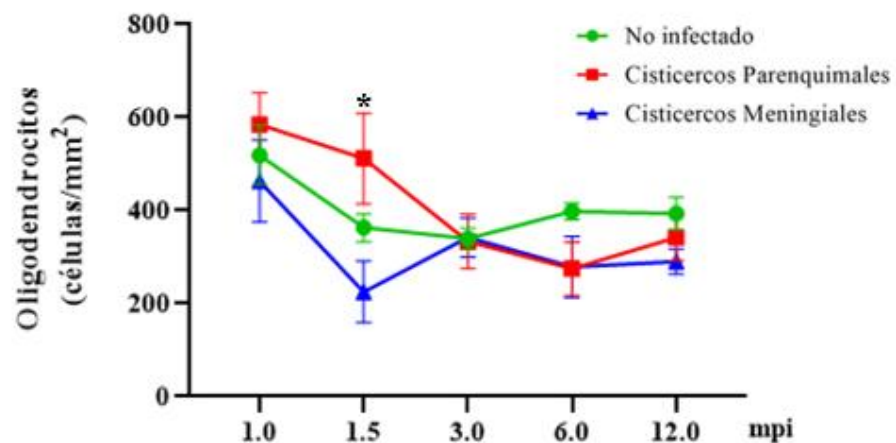
Se evaluó el linaje de OLs por medio del biomarcador Olig2 mediante la técnica de inmunohistoquímica. Tanto para los cerebros infectados como para los no infectados se pudo observar una distribución heterogénea en todo el cerebro, sin embargo, en el cuerpo calloso se encontró mayor cantidad de OLs inmunoreactivos a Olig2 a diferencia de otras zonas del cerebro. Asimismo, se observó la misma morfología de OLs en cerebros de ratas sanas e infectadas, observando circunferencias pequeñas que pueden medir desde 10  $\mu\text{m}$  (Figura 3).



**Figura 3.** Inmunoreactividad de Olig2 en cerebros de ratas.

Corte de cerebro de rata no infectada de 1.0 mpi. **A:** Corte coronal de un cerebro de rata no infectada. **B:** Cuerpo calloso. **C:** Corteza. **D:** Hipotálamo. **E:** Tálamo. Flechas rojas: OLs inmunoreactivos a Olig2. Barra de escala: 50 µm.

Al evaluar la densidad de OLs alrededor de todo el cisticerco, sin considerar si las zonas analizadas están en materia blanca o materia gris, se pudo apreciar que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los cerebros con cisticercos parenquimales o meningeales respecto a los cerebros no infectados (Tabla 2). En la figura 4 se puede apreciar que la cantidad de OLs alrededor del cisticerco tiende a disminuir conforme pasa el tiempo luego de la infección. No se apreciaron diferencias significativas a lo largo del tiempo en los cisticercos parenquimales y meningeales.



**Figura 4.** Cuantificación de Oligodendrocitos (células/mm<sup>2</sup>) alrededor del cisticerco según su ubicación (cisticerco parenquimal y cisticerco meningeal).

(\*) p value < 0.05. Media ± SEM.

**Tabla 2.** Comparación de la densidad de Oligodendrocitos según la ubicación del cisticerco en cada tiempo post-infección

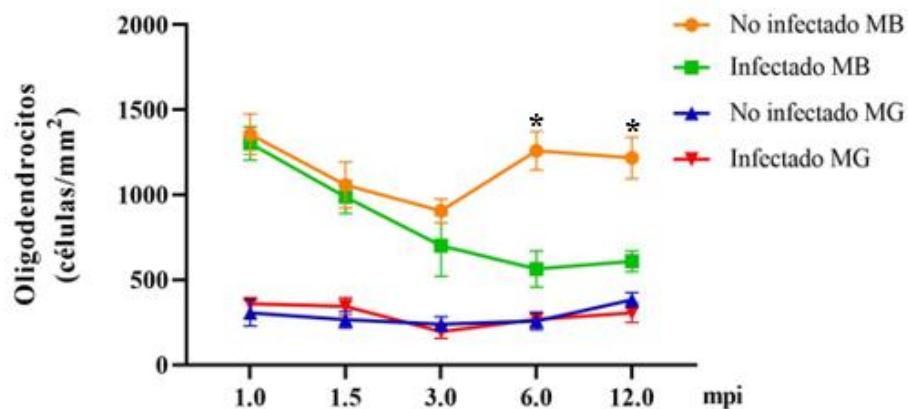
Meses post-infección (mpi)	No infectado (n)	Parenquimal (n)	Meningeal (n)	p value*	p value <sup>±</sup>	p value <sup>«</sup>
1.0	519 (2)	585.14 (7)	463.25 (4)	1.0000	0.6878	0.3286
1.5	363.33 (3)	512 (9)	225.17 (6)	0.6805	0.5308	<b>0.0426</b>
3.0	339.33 (3)	333.75 (8)	342 (4)	1.0000	1.0000	1.0000
6.0	398 (4)	274.86 (7)	279 (7)	1.0000	1.0000	1.0000
12.0	393.67 (6)	342.09 (11)	290 (8)	0.3378	0.1313	0.7627

La tabla 2 representa al promedio del conteo de oligodendrocitos por mm<sup>2</sup>. Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para la evaluación de la cantidad OLs en ratas con NCC entre no infectados, cisticercos parenquimales y cisticercos meningeales por cada tiempo post-

infección. \*: representa los valores de p value obtenidos cuando se compararon a los no infectados con los cisticercos parenquimales. ‡: representa los valores de p value obtenidos cuando se compararon a los no infectados con los cisticercos meningeales. †: representa los valores de p value obtenidos cuando se compararon a los cisticercos parenquimales con los cisticercos meningeales.

Por otro lado, al evaluar la cantidad total de OLs alrededor del quiste por cada tiempo post infección, se observó una diferencia estadísticamente significativa a los 1.5 mpi en los cisticercos parenquimales respecto a los cisticercos meningeales (Tabla 2). Sin embargo, en los demás tiempos post infección no hubo diferencias significativas entre los cerebros no infectados con aquellos que tuvieron cisticercos parenquimales o cisticercos meningeales.

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de oligodendrocitos en cisticercos parenquimales teniendo en cuenta si la zona evaluada es materia blanca o materia gris. Se observó que, en materia gris, tanto en infectados como en no infectados se ve un ligero aumento desde a los 3.0 mpi hasta los 12.0 mpi, llegando aproximadamente a 400 células/mm<sup>2</sup>. Sin embargo, no se observó diferencias estadísticamente significativas. En el caso del área evaluada de materia blanca, a partir de los 1.5 mpi comienza a evidenciarse una tendencia a disminuir la densidad de OLs en cerebros infectados respecto a los no infectados (Figura 5). A los 6.0 mpi y 12.0 mpi existen diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos de ratas no infectadas e infectadas (Tabla 3). Al comparar los cerebros infectados y los no infectados entre los diferentes tiempos post-infección, se pudo apreciar una diferencia estadísticamente significativa entre el 1.0 mpi y el 6.0 y 12.0 mpi (p=0.0162 y p=0.0067, respectivamente).



**Figura 5.** Cuantificación de Oligodendrocitos (células/mm<sup>2</sup>) en materia blanca y materia gris en diferentes tiempos post-infección.

(\*) p value<0.05. Media±SEM.

**Tabla 3.** Comparación de la densidad de Oligodendrocitos entre no infectados e infectados en materia blanca y materia gris

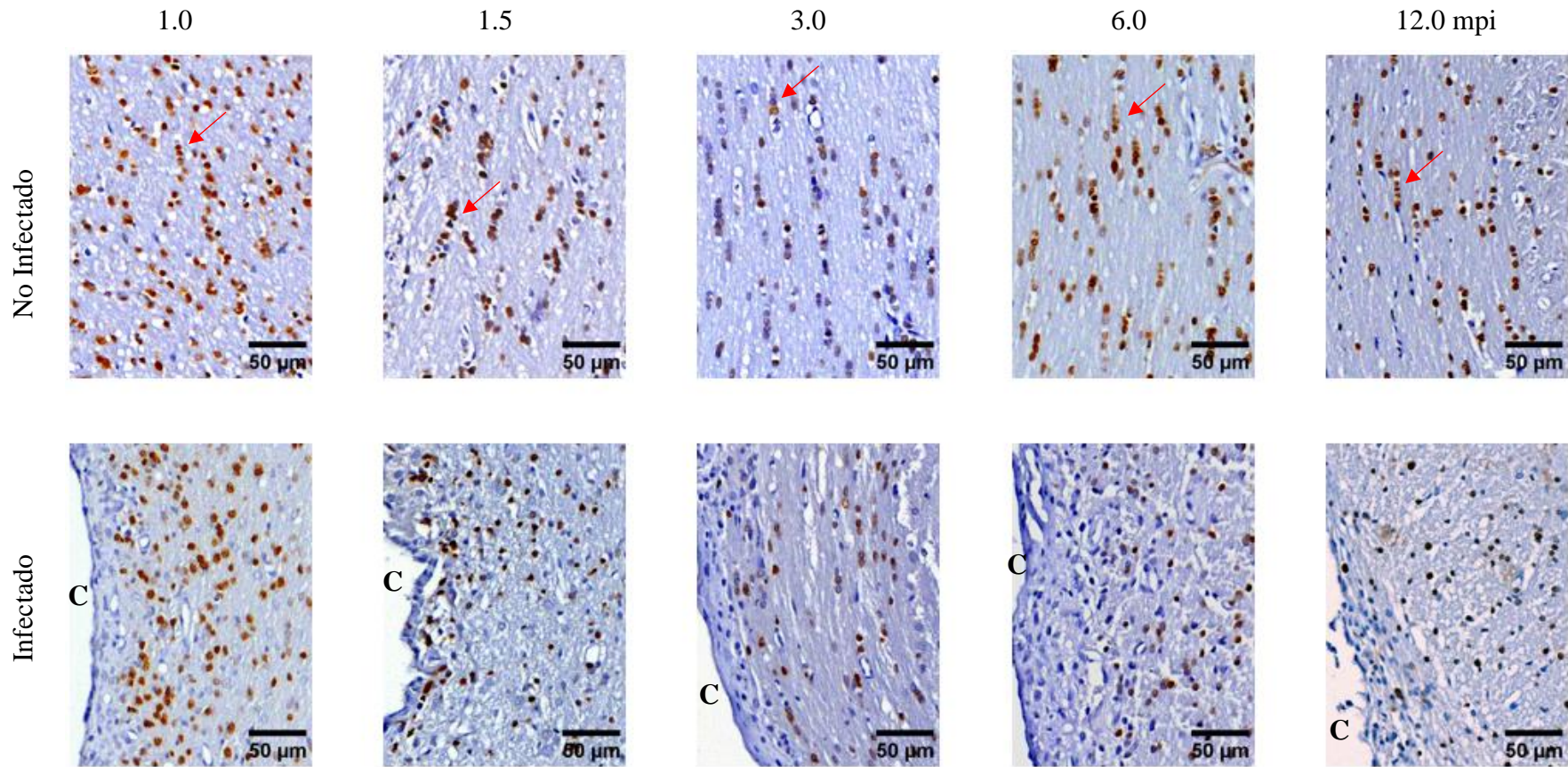
Meses post-infección (mpi)	Materia Gris			Materia Blanca		
	No infectado (n)	Infectado (n)	p value*	No infectado (n)	Infectado (n)	p value±
1.0	306 (2)	350.73 (7)	0.5537	1356.5 (2)	1240 (6)	0.6015
1.5	266.33 (3)	296.87 (9)	0.7671	1058.33 (3)	987.67 (6)	0.6056
3.0	239.67 (3)	244.33 (8)	1.0000	905.33 (3)	701.14 (7)	0.5688
6.0	258.25 (4)	243.93 (7)	0.9154	1259 (4)	641 (4)	<b>0.0105</b>
12.0	382.5 (6)	307.06 (11)	0.2432	1217 (6)	659 (8)	<b>0.0034</b>

La tabla 4 representa al promedio del conteo de oligodendrocitos por mm<sup>2</sup>. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de la cantidad OLs entre no infectados e infectados según zona analizada (materia blanca y materia gris). \*: representa los valores de P value obtenidos cuando se compararon a los tejidos no infectados con los infectados en materia gris. ±: representa los valores de P value obtenidos cuando se compararon a los tejidos no infectados con los infectados en materia blanca.

#### 4.3. Densidad de Oligodendrocitos en materia blanca

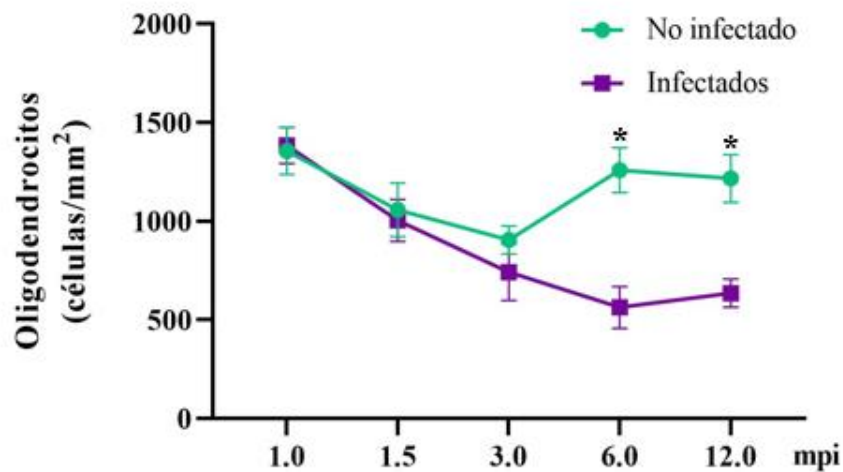
Se analizó la densidad de OLs en la materia blanca, específicamente el cuerpo calloso, ya que en los resultados previos se observó mayor inmunoreactividad de Olig2 tanto en cerebros infectados y no infectados. En la figura 6, se puede apreciar que la morfología de OLs en el cuerpo calloso es la misma que en otras zonas del cerebro, pero tienen una distribución distinta. Específicamente, en esta zona, los OLs en los cerebros de ratas no infectados se juntan en forma de cadenas. En el caso de los cerebros infectados no se ve la misma frecuencia de los OLs en forma de cadena. Además, se observa que la cantidad de OLs va variando de acuerdo con tiempo post-infección.

Al realizar la cuantificación se pudo observar que en los cerebros no infectados tienen una disminución de OLs hasta el tiempo 3.0 mpi, observándose un incremento de OLs hasta los 6.0 mpi, manteniéndose constante hasta los 12 mpi (Figura 7). En el caso de los



**Figura 6.** Inmunoreactividad de oligodendrocitos en cuerpo calloso en diferentes tiempos post-infección.  
 C: cisticerco. Flechas rojas: oligodendrocitos en cadenas. Barra de escala: 50 μm.

cerebros infectados se ve una pérdida de oligodendrocitos a partir de los 1.5 mpi hasta los 6.0 mpi y luego, se mantiene hasta los 12.0 mpi, observándose una diferencia estadísticamente significativa a los 6.0 y 12.0 mpi se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las ratas no infectadas (Tabla 4). A lo largo del tiempo, se aprecia diferencias estadísticamente significativas en las ratas de 1 mpi con las de 3.0, 6.0 y 12.0 mpi y las de 1.5 mpi con las de 6.0 mpi y 12.0 mpi (Tabla 5).



**Figura 7.** Cuantificación de Oligodendrocitos (células/mm<sup>2</sup>) en cuerpo caloso en diferentes tiempos post-infección. (\*) p value<0.05. Media±SEM.

**Tabla 4.** Comparación de la densidad de Oligodendrocitos entre no infectados e infectados en cuerpo caloso en cada tiempo post-infección

Meses post-infección (mpi)	No Infectado (n)	Infectado (n)	p value
1.0	1356.5 (2)	1384.4 (6)	1.0000
1.5	1058.33 (3)	1004.33 (6)	0.7963
3.0	905.33 (3)	742.17 (7)	0.8815
6.0	1259 (4)	641 (4)	<b>0.0105</b>
12.0	1217 (6)	691.5 (8)	<b>0.0067</b>

La tabla 4 representa al promedio del conteo de oligodendrocitos por mm<sup>2</sup>. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de la cantidad OLs entre no infectados e infectados en cuerpo caloso.

**Tabla 5.** Comparación de la densidad de Oligodendrocitos en cuerpo calloso según el tiempo de infección

Meses post-infección (mpi)	p value	
	No Infectado	Infectado
1.0 vs. 1.5	0.1157	0.0606
1.0 vs. 3.0	<b>0.0218</b>	<b>0.0050</b>
1.0 vs. 6.0	0.3327	<b>0.0005</b>
1.0 vs. 12.0	0.2578	<b>0.0006</b>
1.5 vs. 3.0	0.1794	0.1402
1.5 vs. 6.0	0.1736	<b>0.0352</b>
1.5 vs. 12.0	0.2134	<b>0.0481</b>
3.0 vs. 6.0	<b>0.0274</b>	0.2326
3.0 vs. 12.0	0.0318	0.3053
6.0 vs. 12.0	0.4045	0.3930

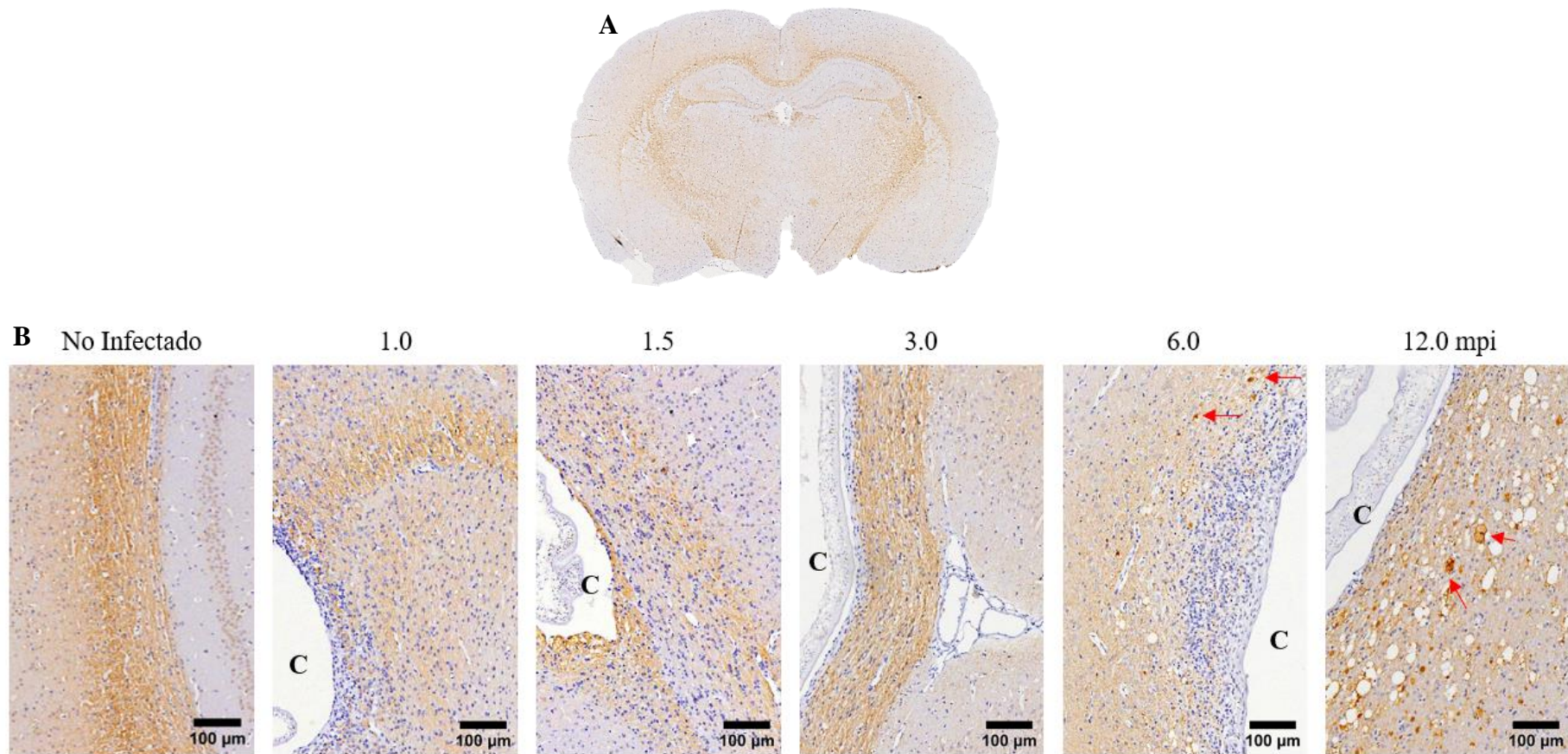
Prueba no paramétrica Kruskal Wallis para la evaluación de OLs en cuerpo calloso según el tiempo post-infección en ratas no infectadas e infectadas.

#### **4.5 Asociación entre la densidad de oligodendrocitos (Olig 2) y el daño axonal (NFP)**

Para evaluar si existe una asociación entre la densidad de oligodendrocitos y el daño axonal en Neurocisticercosis, se evaluó la relación entre la cantidad de OLs inmunoreactivos a Olig2 y el conteo de hinchazones axonales (esferoides y varicosidades), producidos por la acumulación de la proteína de neurofilamento, inmunoreactivas al biomarcador Neurofilamento (NFP).

En tejidos de cerebros de ratas no infectadas se observó la inmunoreactividad del marcador en forma de fibras, lo cual es característico del biomarcador en muestras controles. Por otro lado, en los tejidos infectados se evaluaron aquellos que tenían cisticercos parenquimales ubicados cerca al cuerpo calloso. A partir de los 3.0 mpi las hinchazones axonales en materia gris (Figura 8). Para los 6.0 y 12.0 mpi se observó un aumento en las hinchazones axonales, tanto en materia blanca como en materia gris. Sin embargo, en materia blanca el daño axonal es menor que en materia gris, obteniéndose una diferencia estadísticamente significativa a los 12.0 mpi (Figura 9, tabla 6).

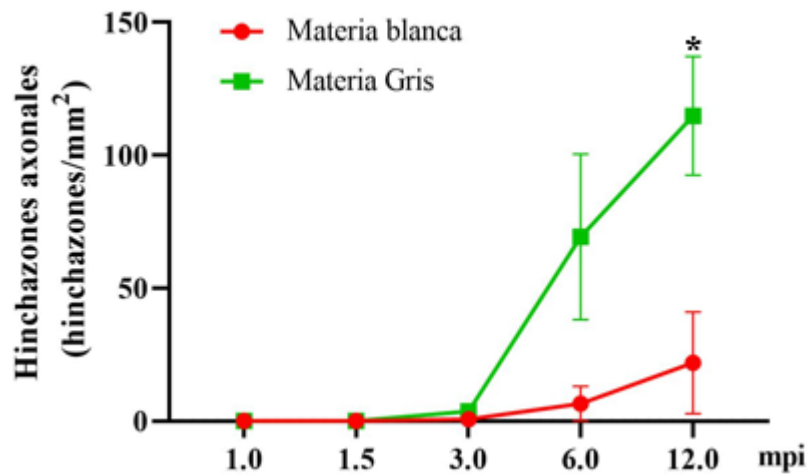
A partir de los resultados encontrados se observó que la densidad de oligodendrocitos disminuye hasta los 6.0 mpi, manteniéndose constante hasta los 12.0 mpi. En cambio, en



**Figura 8.** Inmunoreactividad a Neurofilamento.

**A.** Corte coronal de cerebro de rata no infectada de 1.0 mpi inmunoreactivo a neurofilamento. **B.** Inmunoreactividad de NFP en un tejido de cerebro de ratas no infectada y en tejido de cerebro de ratas infectadas en diferentes tiempos post-infección. C: cisticerco. Flechas rojas: hinchazones axonales. Barra de escala: 100 μm

las hinchazones axonales, tanto en materia gris como en materia blanca, aumentan a partir de los 3.0 mpi tal como se observa en la figura 10. Sin embargo, al realizar la prueba de Spearman no se encontró una asociación significativa ( $p=0.9283$  con un  $\rho$  de  $-0.0215$ ).

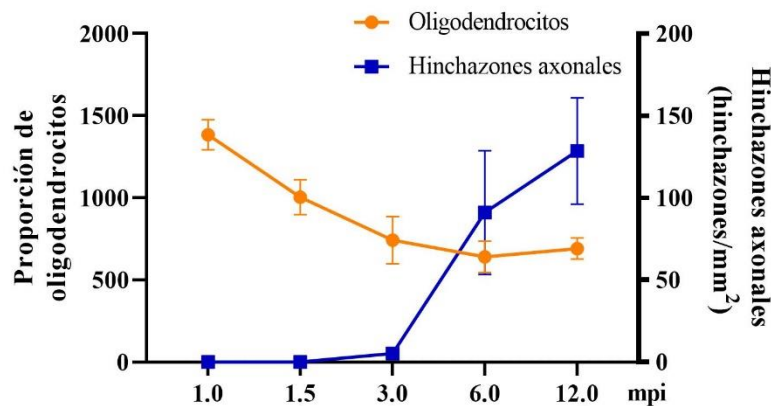


**Figura 9.** Cuantificación del daño axonal por medio de las hinchazones axonales a través del tiempo en materia blanca y materia gris. (\*)  $p$  value  $< 0.05$ . Media  $\pm$  SEM.

**Tabla 6.** Comparación de la cantidad de hinchazones axonales entre materia blanca y materia gris en cada tiempo post-infección

Meses post-infección (mpi)	Materia gris (n)	Materia blanca (n)	p value
1.0	0 (6)	0 (6)	1.0000
1.5	0 (5)	0 (5)	1.0000
3.0	3.71 (7)	0.72 (7)	0.2300
6.0	104.01 (4)	9.82 (4)	0.0907
12.0	85.61 (7)	21.91 (7)	<b>0.0333</b>

La tabla 6 representa el promedio del conteo de hinchazones axonales por  $\text{mm}^2$ . Prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de la cantidad de hinchazones axonales entre materia blanca y materia gris en cada tiempo post-infección.



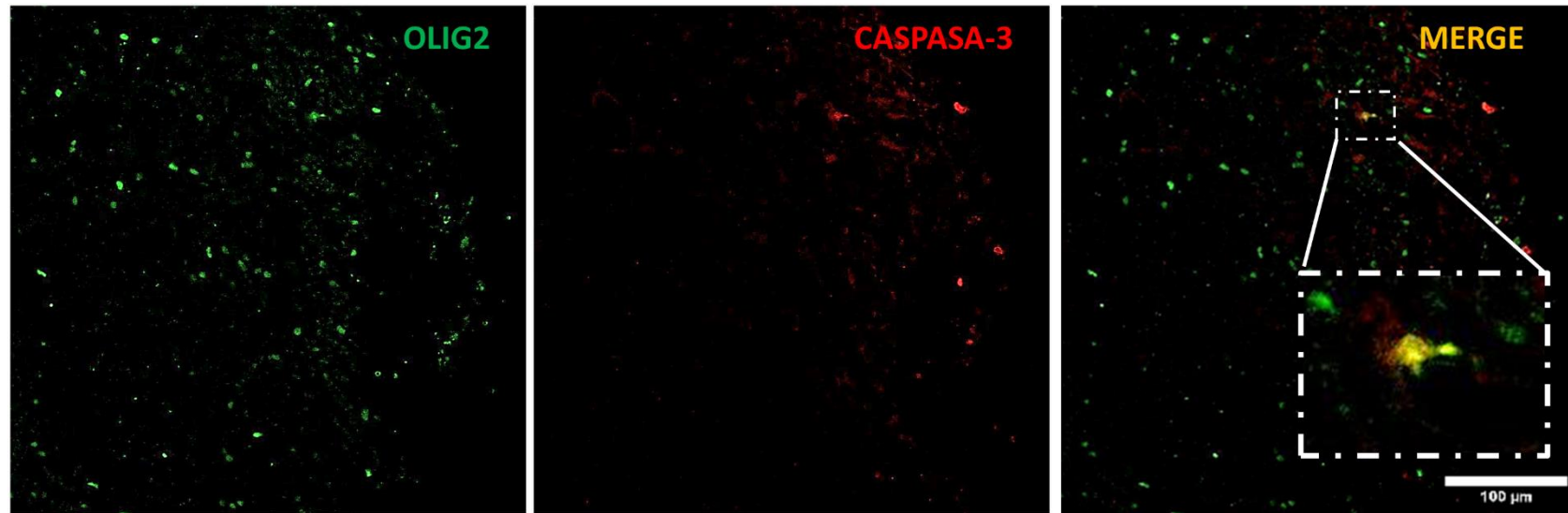
**Figura 10.** Asociación entre el conteo de Oligodendrocitos inmunoreactivos a Olig2 y el conteo de hinchazones axonales reactivos a Neurofilamento. Media $\pm$ SEM.

#### 4.6 Densidad de oligodendrocitos que están en apoptosis

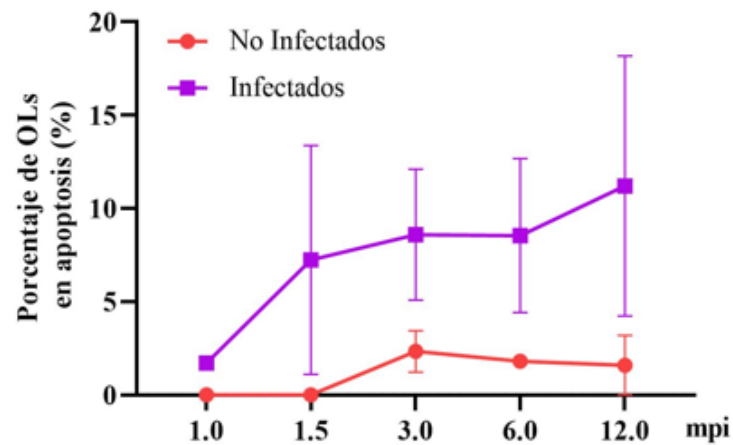
Para poder evaluar si esta disminución en la densidad de OLs es debido a que las células entran a una muerte programada por apoptosis, se realizó una inmunofluorescencia indirecta doble, utilizando el marcador Olig2 y Caspasa-3.

Se observó que la colocalización entre ambos biomarcadores fue mínima en cerebro de ratas infectadas (figura 11), donde Olig2 está marcado de color verde, Caspasa-3 de color rojo y la colocalización es de color amarillo. El análisis estadístico no es significativo por lo que solo se aprecia que los OLs que pasan por apoptosis tienden a aumentar en el tiempo. A los 12.0 mpi se muestra 10% de OLs en apoptosis en cerebros infectados, mientras que en los no infectados es menor de 5% (Tabla 7).

Por otro lado, en el caso de los cerebros no infectados, no se apreció la presencia de OLs en apoptosis en los primeros tres meses post- infección. A partir de los 6.0 mpi se vio una tendencia a aumentar la cantidad de OLs en apoptosis, mas no fue significativo al realizar el estadístico (Figura 12).



**Figura 11.** Inmunofluorescencia doble de Olig2 y Caspasa-3 en un cerebro de rata con NCC. Olig2: verde. Caspasa-3: rojo. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.** Porcentaje de OLs que mueren por apoptosis.

Media±SEM.

**Tabla 7.** Comparación de la cantidad oligodendrocitos en apoptosis entre no infectados e infectados en cada tiempo post-infección

Meses post-infección (mpi)	No infectado (n)	Infectado (n)	p value
1.0	0 (2)	0 (2)	0.1025
1.5	0 (2)	7.24 (2)	0.1025
3.0	2.34 (2)	8.60 (2)	0.0833
6.0	1.81 (2)	8.54 (2)	0.1213
12.0	1.60 (2)	11.21 (2)	0.1213

La tabla 7 representa al promedio de oligodendrocitos en apoptosis. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para la evaluación de la cantidad OLs entre no infectados e infectados en cuerpo calloso.

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó por primera vez si la Neurocisticercosis afecta la densidad o número de oligodendrocitos usando el modelo animal de NCC en ratas. Se observó que la presencia del cisticerco en el cerebro de ratas infectadas experimentalmente con oncosferas de *T. solium* produce una disminución en la densidad de OLs sobre todo en materia blanca.

Respecto a la morfología encontrada en el presente estudio, solo se pudo apreciar el núcleo de los OLs de forma circular tanto en inmunohistoquímica como en inmunofluorescencia, ya que Olig2 es un biomarcador nuclear (51). No obstante, de acuerdo con Osanai y colaboradores, existen cuatro tipos de morfologías de los oligodendrocitos maduros, pero no se pueden diferenciar por inmunotinciones (52). De igual manera, en el cuerpo caloso de las ratas no infectadas, los OLs se presentan de forma continua, formando cadenas, lo cual coincide con lo reportado por Osanai (52). Sin embargo, en el caso de las ratas infectadas se pierde levemente la distribución mencionada.

En este estudio se encontró que la densidad de OLs cuantificada alrededor de todo el cisticerco, no tiene diferencias significativas entre los cerebros con cisticercos parenquimales y meningeales respecto a los no infectados, sin tomar en cuenta si es materia blanca o materia gris. Sin embargo, en el grupo control sano, se aprecia una tendencia a disminuir los oligodendrocitos en los primeros tres meses y luego aumentan para mantenerse en el tiempo, a diferencia de los cerebros infectados, en el cual se observa una disminución de OLs hasta 6.0 meses post-infección y luego se mantiene el número de OLs en el tiempo. De acuerdo con el estudio de Werkman y colaboradores, los OLs se muestran distribuidos de forma heterogénea en todo el cerebro y son los más numerosos entre las células gliales en la materia blanca, representando el 69% de células (35). Específicamente, se encuentra mayor población de estas células en el cuerpo caloso (34). Esto se vio reflejado en la presente investigación, ya que se apreció una distribución de OLs heterogénea en el cerebro de ratas infectadas y no infectadas, pero con mayor número de estas células en el cuerpo caloso.

Al no observar diferencias estadísticamente significativas en el número de OLs totales alrededor del cisticerco, se dividió el área del tejido que rodea al cisticerco en materia

blanca y materia gris, del tejido próximo al cisticerco. Los resultados obtenidos confirman lo que se ha reportado previamente y en este estudio se aprecia una clara diferencia en la cantidad de OLs en materia blanca, teniendo mínimo 500 células/mm<sup>2</sup>, mientras que en la materia gris la cantidad máxima es de 500 células/mm<sup>2</sup>. Observándose una diferencia estadísticamente significativa en el número de OLs de materia blanca entre cerebros con cisticercos y cerebros controles sanos.

Asimismo, en la materia blanca se puede observar una disminución significativa a partir de los 6 mpi en los cerebros de ratas infectadas, mientras que en los no infectados hay una disminución en los primeros 3.0 mpi, pero vuelve a aumentar y mantenerse hasta los 12.0 mpi. En la materia gris el número de OLs no presenta diferencias entre cerebros infectados y no infectados.

De acuerdo con Werkman, las células precursoras de oligodendrocitos (OPC por sus siglas en inglés) constan del 8% del linaje de OLs en el cuerpo calloso, aproximadamente 120 células/mm<sup>2</sup> (35), lo cual puede ser una posible razón de apreciar hay mayor cantidad de OPC en esta zona. Asimismo, afirman que el porcentaje de las OPC en la materia blanca disminuye en gran medida después del día 16 posnatal y, posteriormente, la proporción de OPC que prolifera permanece relativamente estable que permite la reparación de daños (35,53), por lo que esto podría ser una explicación a la disminución de OLs en los primeros meses post infección en ratas controles o no infectadas y ratas con NCC. Sin embargo, no se puede confirmar lo mencionado, ya que el factor de transcripción de oligodendrocitos (Olig2) es considerado un biomarcador universal, ya que se observa inmunoreactividad en todas las etapas de formación de los OLs (las OPC, OLs inmaduros y OLs maduros o mielinizantes) (54). Con el uso de biomarcadores más específicos para cada etapa de los OLs, como PDGFR- $\alpha$  para las OPC, O4 para OLs inmaduros y CC1 para OLs mielinizantes, se podría evaluar a detalle lo mencionado (30,54).

En un estudio realizado por Knowles y colaboradores, han asociado la presencia de epilepsia con un aumento en la densidad de OLs, específicamente de OPC y una mielinización mal adaptativa, es decir que aumenta en cantidad (55). Sin embargo, en NCC como se ha podido ver en el presente estudio, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, que la densidad de OLs totales disminuye, considerando todo el linaje de OLs, y también se presenta una disminución de mielina (49,55). No obstante,

junto con la investigación de Wekman, coincide que podría haber un aumento de las OPC con el fin de generar más OLs, por lo que se reitera que sería importante realizar una evaluación de la densidad de OLs de acuerdo con la etapa de desarrollo de la célula.

Posteriormente, se evaluaron exclusivamente los cisticercos parenquimales que tienen proximidad con el cuerpo caloso, ya que se ha evaluado en otros estudios que, en esa zona, los OLs son los principalmente afectados al haber un daño o lesión cerebral y por ser la zona con mayor cantidad de OLs como se mencionó anteriormente (35,55). En una investigación de Dent y colaboradores, evaluaron la densidad de OLs en el cuerpo caloso después de una lesión hasta los 3.0 mpi y encontraron que hay una pérdida significativa de OLs (37), lo cual se puede evidenciar también en el presente estudio. En los cerebros de ratas no infectadas, la población de OLs es entre 1000 y 1500 células/mm<sup>2</sup>, en materia blanca, observándose en los tres primeros meses una disminución del número de OLs, pero a partir del 3.0 mpi se incrementa el número de OLs, hasta el sexto mes, manteniéndose constante hasta 12.0 mpi. En el caso de los cerebros que tienen NCC, hay una disminución de OLs hasta 6.0 mpi, manteniéndose constante hasta 12.0 mpi.

Por otro lado, se ha reportado daño axonal en el tejido de cerebro que rodea al cisticercos en humanos y ratas con NCC, observándose por medio de la acumulación de neurofilamento en los axones formando las hinchazones axonales (4). Asimismo, otro grupo de investigación evaluó sobre esta acumulación de neurofilamento en cerdos y se reportaron que estos acúmulos no se observan en lesiones tempranas, sino en tardías (5). Al comparar la cantidad de OLs con la cantidad de hinchazones axonales en todos los tiempos evaluados, se observó que existe una relación inversamente proporcional, donde los OLs disminuyen en el tiempo mientras que las hinchazones axonales comienzan a aparecer a partir del 3.0 y aumenta a los 6.0 y 12.0 mpi. Sin embargo, la asociación no es significativa ( $p=0.9283$  y  $p=-0.0215$ ). Se recomienda aumentar el tamaño muestral para obtener una confirmación estadística más robusta para confirmar los datos obtenidos (figura 10).

En otro estudio realizado por Castillo y colaboradores en un modelo de ratas con NCC, observaron que hay una gran cantidad de hinchazones axonales en materia gris y casi nula en la materia blanca (56). Sin embargo, dicha investigación se realizó en ratas sacrificadas a los 4.0 mpi. En el presente estudio se ha podido apreciar que el número de

hinchazones axonales en materia blanca también va aumentando conforme va avanzando la enfermedad, a pesar de que el cisticerco siga siendo viable (57).

Por último, se evaluó si la cantidad de OLs que disminuye como hemos visto en los resultados anteriores, es provocado por la muerte celular programada llamada apoptosis. En diversos estudios, se ha evidenciado que la mayor cantidad de OLs que mueren, ya sea de forma natural o por alguna lesión en el cerebro, tomando la ruta de la apoptosis (50). Es por ello se realizó una inmunofluorescencia doble de Olig2 con Caspasa-3, encontrándose bajas proporciones de OLs ubicados en el cuerpo calloso en apoptosis. Esto indica que los oligodendrocitos no mueren necesariamente por apoptosis, pueden tomar otras vías de muerte celular programada, como la piroptosis o necroptosis (59). En un estudio se reportó que los OLs presentan mayor inmunoreactividad de Gasdermina D (biomarcador de piroptosis) en el cuerpo calloso (59).

Los OLs son vulnerables a diferentes estímulos como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la inflamación que desencadenan la muerte celular programada por apoptosis (36,37). En el caso de la excitotoxicidad, los OLs tienen diferentes receptores como el AMPA o NMDA que los hacen vulnerables a la toxicidad del glutamato, predisponiéndolos a una muerte celular (60). Por otro lado, los OLs se exponen a citoquinas inflamatorias que pueden inducir la apoptosis como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) (61,62). En un estudio realizado por Carmen y colaboradores, se evaluaron citoquinas inflamatorias en el modelo de ratas con NCC a los 4.0 mpi y se observó una sobreexpresión de  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL-6$  (58).

En el presente estudio se ha podido evidenciar que la densidad de OLs en ratas con NCC presenta diferencias con los cerebros no infectados a partir del tercer mes post-infección en materia blanca. De acuerdo con Chile y colaboradores, el parásito cambia la expresión de proteína conforme se va desarrollando de oncosfera, postoncosfera y cisticerco, por lo que podría asociarse a la modulación de la respuesta inmune del hospedero, lo cual podría afectar en la proliferación de los OLs. (12).

Por otro lado, se sabe que la pérdida de oligodendrocitos contribuye a la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (EM) (63). La esclerosis múltiple es una de las enfermedades desmielinizantes mejor caracterizadas del SNC. Se ha visto en un estudio con ratones que aquellos que carecen de la proteína

proteolopídica 1 (PLP1) desarrollan hinchazones axonales que conducen a la degeneración axonal y una deficiencia en el transporte axonal (31).

En NCC, las principales patologías neurológicas se observan en la materia gris, no obstante, también hay efectos en la materia blanca, tal como se ha podido apreciar en el presente estudio. En el caso de la esclerosis múltiple, los daños se ven en mayor proporción en materia blanca que en materia gris. Sin embargo, en otra enfermedad neurodegenerativa como es el Alzheimer, la mayoría de las patologías se encuentra como la NCC, en la materia gris, pero también se presentan alteraciones en la materia blanca. (64). Se ha reportado que la disfunción de los OLs mediada por la proteína beta-amiloide y la degradación de mielina pueden deberse a la neuroinflamación y por la formación de ovillos neurofibrilares a través de la inflamación y el estrés oxidativo (65,66). Por medio de este estudio, se ha observado que en NCC los daños son menos severos que en la esclerosis múltiple, además que estos daños se ven en mayor proporción en materia gris que en materia blanca.

Gracias al presente estudio se ha podido comprender el rol de los OLs en la patología de la NCC. Además, la presente puede ser considerada como punto de partida para futuras investigaciones, tal es el caso del estudio de los OLs con biomarcadores más específicos para cada etapa de maduración de estas células. Asimismo, sería importante evaluar otras vías de muerte celular programada que podrían estar afectando a los OLs en la NCC.

## VI. CONCLUSIONES

- La densidad de oligodendrocitos en materia blanca disminuye a partir de los 3.0 mpi, observándose una diferencia significativa en los tiempos de 6.0 y 12.0 meses post-infección.
- El número de hinchazones axonales en materia blanca es menor que en materia gris. En materia blanca comienza a presentar el daño axonal a partir de los 6.0 mpi.
- No existe asociación estadística entre la densidad de OLs y el daño axonal, pero se evidencia una tendencia a la disminución de OLs y el aumento de daño axonal.
- El porcentaje de OLs con muerte celular programada por apoptosis es bajo, sugiriendo que la disminución de la densidad de OLs podría deberse a otro tipo de muerte celular.

## VII. LIMITACIONES

- No se usó la vía de infección oral como sucede en la NCC humana.
- El modelo animal de rata es un modelo en el cual el animal no es un hospedero natural del ciclo de vida de *Taenia solium*.
- Se empleó un biomarcador que reconoce todo el linaje de los oligodendrocitos, en lugar de uno específico para cada etapa de su desarrollo.
- El tamaño de muestra utilizado para el objetivo 4 fue pequeño (n=2), lo que limitó la aplicación de un análisis estadístico robusto

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2014;13(12):1202. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6108081/](#)
2. Coyle CM, Mahanty S, Zunt JR, Wallin MT, Cantey PT, White AC, et al. Neurocysticercosis: Neglected but Not Forgotten. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012;6(5). Disponible en: [/pmc/articles/PMC3362619/](#)
3. Carabin H, Ndimubanzi PC, Budke CM, Nguyen H, Qian Y, Cowan LD, et al. Clinical Manifestations Associated with Neurocysticercosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2011;5(5). Disponible en: [/pmc/articles/PMC3101170/](#)
4. Mejia Maza A, Carmen-Orozco RP, Carter ES, Dávila-Villacorta DG, Castillo G, Morales JD, et al. Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathology* [Internet]. 2019;29(3):425. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6482075/](#)
5. Sikasunge CS, Johansen M V., Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol* [Internet]. 2009;160(3–4):242–50. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19117683/>
6. Dutta R, Trapp BD. Mechanisms of Neuronal Dysfunction and Degeneration in Multiple Sclerosis. *Prog Neurobiol* [Internet]. enero de 2010 [citado el 7 de marzo de 2025];93(1):1. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3030928/>
7. Criste G, Trapp B, Dutta R. Axonal loss in multiple sclerosis: causes and mechanisms. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2014 [citado el 7 de marzo de 2025];122:101–13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24507515/>
8. Garcia HH, Verastegui MR, Arroyo G, Bustos JA, Gilman RH. New animal models of neurocysticercosis can help understand epileptogenesis in neuroinfection. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2022;15:1039083. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2022.1039083/full>
9. Verastegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velásquez J, Farfán M, et al. *Taenia solium* Oncosphere Adhesion to Intestinal Epithelial and Chinese Hamster Ovary Cells In Vitro. *Infect Immun* [Internet]. 2007;75(11):5158. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2168301/](#)
10. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalez G, Llanos-Zavalaga fernando, Tsang VC, et al. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2010;27(4):592–7. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342010000400016&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342010000400016&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

11. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis and its impact in neurological disease. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2020;33(3). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00085-19>
12. Chile N, Clark T, Arana Y, Ortega YR, Palma S, Mejia A, et al. In Vitro Study of *Taenia solium* Postoncospherical Form. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016;10(2):e0004396. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004396>
13. Garcia HH, Gilman R, Herrera G, Diaz F, Miranda E, Gilman R, et al. Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. *Lancet* [Internet]. 1993;341(8839):197. Disponible en: </pmc/articles/PMC2917763/>
14. Maquera-Afaray J, Capaquira E, Conde L, Almenara G, Lima I, Basadre J, et al. Cisticercosis diseminada: reporte de un caso en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* [Internet]. 2014;31(2). Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/61/1976>
15. Fleury A, Trejo A, Cisneros H, García-Navarrete R, Villalobos N, Hernández M, et al. *Taenia solium*: Development of an Experimental Model of Porcine Neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015;9(8):e0003980. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003980>
16. Gripper LB, Welburn SC. Neurocysticercosis infection and disease—A review. *Acta Trop* [Internet]. 2017;166:218–24. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X16306507?via%3Dihub>
17. García HH, Gonzalez AE, Evans CAW, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* [Internet]. 2003;362(9383):547–56. Disponible en: <http://www.thelancet.com/article/S0140673603141177/fulltext>
18. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Neurohospitalist* [Internet]. 2014;4(4):205. Disponible en: </pmc/articles/PMC4212415/>
19. Mahanty S, Garcia HH. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2010;91(2):172–84. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20035822/>
20. Nash TE, Mahanty S, Garcia HH. Corticosteroid use in neurocysticercosis. *Expert Rev Neurother* [Internet]. 2011;11(8):1175. Disponible en: </pmc/articles/PMC3721198/>
21. Prodjinotho UF, Lema J, Lacorcía M, Schmidt V, Vejzagic N, Sikasunge C, et al. Host immune responses during *Taenia solium* Neurocysticercosis infection and treatment. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(4):1–16. Disponible en: </pmc/articles/PMC7162612/>
22. Nash TE, Garcia HH. Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2011;7(10):584. Disponible en: </pmc/articles/PMC3350327/>
23. Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. *Parasite Immunol* [Internet]. 2016;38(3):147–57. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667781/>

24. Davila Villacorta DG. Evaluación de la respuesta inflamatoria en diferentes tiempos post-infección en un modelo de neurocisticercosis. 2024; Disponible en: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/15159>
25. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, et al. Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. *Am J Pathol* [Internet]. 2015;185(8):2259. Disponible en: </pmc/articles/PMC4530126/>
26. Sitali MC, Schmidt V, Mwenda R, Sikasunge CS, Mwape KE, Simuunza MC, et al. Experimental animal models and their use in understanding cysticercosis: A systematic review. *PLoS One* [Internet]. 2022;17(7). Disponible en: </pmc/articles/PMC9295976/>
27. Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Cauna Y, Bernal-Teran EG, Bitterfeld L, Sutherland GL, et al. Blood-Brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis. *J Neurosci Res* [Internet]. 2019;97(2):137. Disponible en: </pmc/articles/PMC7011581/>
28. Guerra-Giraldez C, Marzal M, Cangalaya C, Balboa D, Orrego MÁ, Paredes A, et al. Disruption of the blood–brain barrier in pigs naturally infected with *Taenia solium*, untreated and after anthelmintic treatment. *Exp Parasitol* [Internet]. 2013;134(4):443. Disponible en: </pmc/articles/PMC4095782/>
29. Zierfuss B, Larochelle C, Prat A. Blood–brain barrier dysfunction in multiple sclerosis: causes, consequences, and potential effects of therapies. *Lancet Neurol* [Internet]. 2024;23(1):95–109. Disponible en: <http://www.thelancet.com/article/S1474442223003770/fulltext>
30. Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells* [Internet]. 2019;8(11). Disponible en: </pmc/articles/PMC6912544/>
31. Ettl B, Schlachetzki JCM, Winkler J. Oligodendroglia and Myelin in Neurodegenerative Diseases: More Than Just Bystanders? *Mol Neurobiol* [Internet]. 2016;53(5):3046. Disponible en: </pmc/articles/PMC4902834/>
32. Domingues HS, Portugal CC, Socodato R, Relvas JB. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2016;4:71. Disponible en: </pmc/articles/PMC4923166/>
33. Dawson MRL, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: An abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Molecular and Cellular Neuroscience* [Internet]. 2003;24(2):476–88. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14572468/>
34. Ohtomo R, Iwata A, Arai K. Molecular Mechanisms of Oligodendrocyte Regeneration in White Matter-Related Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018;19(6). Disponible en: </pmc/articles/PMC6032201/>
35. Werkman IL, Lentferink DH, Baron W. Macroglial diversity: white and grey areas and relevance to remyelination. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2020 78:1 [Internet]. 2020;78(1):143–71. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-020-03586-9>

36. Mu J, Li M, Wang T, Li X, Bai M, Zhang G, et al. Myelin Damage in Diffuse Axonal Injury. *Front Neurosci* [Internet]. 2019;13. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6433984/](#)
37. Dent KA, Christie KJ, Bye N, Basrai HS, Turbic A, Habgood M, et al. Oligodendrocyte Birth and Death following Traumatic Brain Injury in Adult Mice. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3). Disponible en: [/pmc/articles/PMC4370677/](#)
38. Zhang K, Chen S, Yang Q, Guo S, Chen Q, Liu Z, et al. The Oligodendrocyte Transcription Factor 2 OLIG2 regulates transcriptional repression during myelinogenesis in rodents. *Nature Communications* 2022 13:1 [Internet]. 2022;13(1):1–13. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29068-z>
39. Jakovcevski I, Zecevic N. Olig Transcription Factors Are Expressed in Oligodendrocyte and Neuronal Cells in Human Fetal CNS. *The Journal of Neuroscience* [Internet]. 2005;25(44):10064. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6725798/](#)
40. Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, et al. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* [Internet]. 2002;109(1):75–86. Disponible en: <http://www.cell.com/article/S0092867402006785/fulltext>
41. Yuan A, Rao M V., Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. el 15 de julio de 2012 [citado el 4 de abril de 2024];125(14):3257–63. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3516374/](#)
42. Zetterberg H, Skillbäck T, Mattsson N, Trojanowski JQ, Portelius E, Shaw LM, et al. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Concentration With Alzheimer Disease Progression. *JAMA Neurol* [Internet]. 2016;73(1):60. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5624219/](#)
43. Poesen K, De Schaepdryver M, Stubendorff B, Gille B, Muckova P, Wendler S, et al. Neurofilament markers for ALS correlate with extent of upper and lower motor neuron disease. *Neurology* [Internet]. 2017;88(24):2302–9. Disponible en: [https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.0000000000004029?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.0000000000004029?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed)
44. Håkansson I, Tisell A, Cassel P, Blennow K, Zetterberg H, Lundberg P, et al. Neurofilament light chain in cerebrospinal fluid and prediction of disease activity in clinically isolated syndrome and relapsing–remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* [Internet]. 2017;24(5):703–12. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ene.13274>
45. Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. el 1 de noviembre de 2016 [citado el 14 de julio de 2024];2016(11):958–62. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27803251/>
46. Xu GY, Liu S, Hughes MG, McAdoo DJ. Glutamate-Induced Losses of Oligodendrocytes and Neurons and Activation of Caspase-3 in the Rat Spinal Cord. *Neuroscience* [Internet]. 2008;153(4):1034. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2562633/](#)

47. Prineas JW, Parratt JDE. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* [Internet]. 2012;72(1):18–31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22829266/>
48. De Almeida SM, Torres LFB. Neurocysticercosis--retrospective study of autopsy reports, a 17-year experience. *J Community Health* [Internet]. 2011;36(5):698–702. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21416341/>
49. Yeung MSY, Djelloul M, Steiner E, Bernard S, Salehpour M, Possnert G, et al. Oligodendrocyte generation dynamics in multiple sclerosis. *Nature* [Internet]. 2019;566(7745):538. Disponible en: </pmc/articles/PMC6420067/>
50. Caprariello A V., Mangla S, Miller RH, Selkirk SM. Apoptosis of oligodendrocytes in the CNS results in rapid focal demyelination. *Ann Neurol* [Internet]. 2012;72(3):395. Disponible en: </pmc/articles/PMC3464960/>
51. Yokoo H, Nobusawa S, Takebayashi H, Ikenaka K, Isoda K, Kamiya M, et al. Anti-Human Olig2 Antibody as a Useful Immunohistochemical Marker of Normal Oligodendrocytes and Gliomas. *Am J Pathol* [Internet]. 2004;164(5):1717. Disponible en: </pmc/articles/PMC1615653/>
52. Osanai Y, Yamazaki R, Shinohara Y, Ohno N. Heterogeneity and regulation of oligodendrocyte morphology. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2022;10. Disponible en: </pmc/articles/PMC9644283/>
53. Hamanaka G, Ohtomo R, Takase H, Lok J, Arai K. White-matter repair: Interaction between oligodendrocytes and the neurovascular unit. *Brain Circ* [Internet]. 2018;4(3):118. Disponible en: </pmc/articles/PMC6187946/>
54. Valério-Gomes B, Guimarães DM, Szczupak D, Lent R. The absolute number of oligodendrocytes in the adult mouse brain. *Front Neuroanat* [Internet]. 2018;12:398556. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/neuroanatomy/articles/10.3389/fnana.2018.00090/full>
55. Bottes S, Jessberger S. Live imaging of remyelination in the adult mouse corpus callosum. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2021;118(28). Disponible en: </pmc/articles/PMC8285919/>
56. Knowles JK, Xu H, Soane C, Batra A, Saucedo T, Frost E, et al. Maladaptive myelination promotes generalized epilepsy progression. *Nat Neurosci* [Internet]. el 1 de mayo de 2022 [citado el 7 de marzo de 2025];25(5):596. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9076538/>
57. 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* [Internet]. 2024;e13237. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bpa.13237>
58. Mercadante AA, Tadi P. Neuroanatomy, Gray Matter. *StatPearls* [Internet]. 2023; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553239/>

59. Carmen-Orozco RP, Dávila-Villacorta DG, Delgado-Kamiche AD, Celiz RH, Trompeter G, Sutherland 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* [Internet]. 2021;15(4). Disponible en: [/pmc/articles/PMC8104410/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35111111/)
60. Pollock NM, Fernandes JP, Woodfield J, Moussa E, Hlavay B, Branton WG, et al. Gasdermin D activation in oligodendrocytes and microglia drives inflammatory demyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2024;115:374–93. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159123003215?via%3Dihub>
61. Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* [Internet]. el 22 de diciembre de 2005 [citado el 7 de marzo de 2025];438(7071):1162. Disponible en: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1416283/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219674/)
62. Horiuchi M, Itoh A, Pleasure D, Itoh T. MEK-ERK signaling is involved in interferon-gamma-induced death of oligodendroglial progenitor cells. *J Biol Chem* [Internet]. el 21 de julio de 2006 [citado el 7 de marzo de 2025];281(29):20095–106. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16728393/>
63. Jurewicz A, Matysiak M, Tybor K, Kilianek L, Raine CS, Selmaj K. Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain* [Internet]. noviembre de 2005 [citado el 7 de marzo de 2025];128(Pt 11):2675–88. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219674/>
64. Pandey S, Shen K, Lee SH, Shen YAA, Wang Y, Otero-García M, et al. Disease-associated oligodendrocyte responses across neurodegenerative diseases. *Cell Rep* [Internet]. 2022;40(8):111189. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124722010063?via%3Dihub>
65. Mot AI, Depp C, Nave KA. An emerging role of dysfunctional axon-oligodendrocyte coupling in neurodegenerative diseases. *Dialogues Clin Neurosci* [Internet]. 2018;20(4):283. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6436955/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30111111/)
66. Cai Z, Xiao M. Oligodendrocytes and Alzheimer’s disease. *International Journal of Neuroscience* [Internet]. 2016;126(2):97–104. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00207454.2015.1025778>
67. Dan L, Zhang Z. Alzheimer’s disease: an axonal injury disease? *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2023;15:1264448. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/aging-neuroscience/articles/10.3389/fnagi.2023.1264448/full>

## ANEXOS

### ANEXO 1: Anticuerpos utilizados en el estudio

Anticuerpo	Marca	Código	Concentración	Tipo	Técnica
IgG de cabra anti - Olig2	R&D Systems	AF2418	0.2 mg/mL	Policlonal	IHQ
IgG de conejo anti-IgG de cabra	KPL	5220-0362	0.5 mg/mL	Policlonal	IHQ
IgG de ratón anti-Neurofilamento (p-NFP200kD)	Merck	MAB5262	1 mg/mL	Monoclonal	IHQ
IgG de conejo anti – Caspasa-3 activada	Merck	AB3623	0.5 mg/mL	Policlonal	IFI
IgG de burro anti – IgG de cabra marcado con Alexa fluor 594	Invitrogen	A11058	2 mg/mL	Policlonal	IFI
IgG de burro anti – IgG de conejo marcado con Alexa fluor 488	Life technology	A21206	2 mg/mL	Policlonal	IFI

### ANEXO 2: Protocolo de inmunohistoquímica para Olig2

#### I. Desparafinación

Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30 minutos
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 vez)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 veces)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 veces)
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos entre xiloles
- Dejar secar 4 minutos en estufa antes de pasar por los alcoholes
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

#### II. Desenmascaramiento

- Preparar 800 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM (pH 6). Agregar Tween-20 al 0.05%.
- Colocar las láminas con canastilla en el beacker durante 20 minutos en el citrato hirviendo en stir plate.
- Dejar atemperar
- Rodear el tejido con el plumón hidrofóbico.

- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS 1X) a pH 7.2, 4 veces cada 4 min.

### **III. Bloqueo de peroxidases endógenas**

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS y metanol (1:1)
- Dejar incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con PBS 1X a pH 7.2, 4 veces cada 4 min

### **IV. Bloqueo de proteínas generales**

- Preparar solución de bloqueo:
  - PBS Tritón X-100 al 0.05%
  - 10% suero de conejo
  - 5% suero de caballo
  - 2.5% BSA
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con PBS 1X, 4 veces cada 4 min.

### **V. Incubación con anticuerpo primario**

- Preparar solución de ab1:
  - PBS Tritón al 0.05%
  - 5% suero de conejo
  - 5% suero de caballo
  - IgG de cabra Anti-Olig2 en dilución 1/300
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
- Lavar las láminas con PBS 1X, 4 veces cada 4 min.

### **VI. Incubación con anticuerpo secundario**

- Preparar solución de anticuerpo secundario:
  - PBS 1X
  - 5% suero de conejo
  - 5% suero de caballo
  - Anticuerpo secundario 1/400 (IgG de conejo anti-IgG de cabra)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con PBS 1X, 4 veces cada 4 min.

### **VII. Revelado**

- Preparar solución de revelado:
  - 400ul de solución tamponada por lámina
  - DAB en dilución (1/100)
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 2 minutos.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.
- Agregar 4 gotas por lámina de enhancer por 1 minuto y medio.

- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada

### **VIII. Contratinción**

- Colocar láminas en canastilla portaláminas y sumergirlas en solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 seg.
- Lavar las láminas con abundante agua de grifo.

### **IX. Deshidratación**

- Colocar la canastilla en batería alcoholes (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 2 min en cada uno, dejar secar las láminas por 4 min.
- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 2 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

## **ANEXO 3: Protocolo de inmunohistoquímica para Neurofilamento (NFP)**

### **I. Desparafinación**

Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30 minutos
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 vez)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 veces)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 veces)
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos entre xiloles
- Dejar secar 4 minutos en estufa antes de pasar por los alcoholes
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

### **II. Desenmascaramiento**

- Preparar 800 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM (pH 6). Agregar Tween-20 al 0.05%.
- Colocar los coplins con las láminas en una olla con agua fría. Al hervir, se cuentan 30 minutos.
- Dejar atemperar
- Rodear el tejido con el plumón hidrofóbico
- Lavar las láminas 4-5 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

### **III. Bloqueo de peroxidadas endógenas**

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS.
- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con PBS 1X a pH 7.2, 4 veces cada 4 min

#### **IV. Bloqueo de proteínas generales**

- Preparar solución de bloqueo:
  - PBS Tritón al 0.05%
  - 10% suero de caballo
  - 2% BSA
  - 2% leche
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con PBS 1X, 4 veces cada 4 min.

#### **V. Incubación con anticuerpo primario**

- Preparar solución de ab1:
  - PBS Tritón al 0.05%
  - 5% suero de cabra
  - IgG de cabra Anti-NFP en dilución 1/1000
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
- Lavar las láminas con PBS 1X, 4 veces cada 4 min.

#### **VI. Incubación con anticuerpo secundario**

- Preparar solución de anticuerpo secundario:
  - PBS 1X
  - 5% suero de cabra
  - Anticuerpo secundario 1/500 (IgG de cabra anti-IgG de ratón)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con PBS 1X, 4 veces cada 4 min.

#### **VII. Revelado**

- Preparar solución de revelado:
  - 400ul de solución tamponada por lámina
  - DAB en dilución (1/100)
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5 minutos.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.

#### **VIII. Contratinción**

- Colocar láminas en canastilla portaláminas y sumergirlas en solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 seg.
- Lavar las láminas con abundante agua de grifo.

## **IX. Deshidratación**

- Colocar la canastilla en batería alcoholes (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 2 min en cada uno, dejar secar las láminas por 4 min.
- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 2 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

### **ANEXO 4: Protocolo de inmunofluorescencia indirecta – doble marcaje para Olig2 y Caspasa-3 activada**

#### **I. Desparafinación**

Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas

- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30 minutos
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos (1 vez)
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos (3 veces)
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos (2 veces)
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos entre xiloles
- Dejar secar 4 minutos en estufa antes de pasar por los alcoholes
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

#### **II. Desenmascaramiento**

- Preparar 800 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM (pH 6). Agregar Tween-20 al 0.05%.
- Colocar las láminas con canastilla en el beacker durante 30 minutos en el citrato hirviendo en stir plate.
- Dejar atemperar
- Rodear el tejido con el plumón hidrofóbico
- Lavar las láminas 4-5 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

#### **III. Permeabilización (10 minutos)**

- Incubar la solución PBS 1X + Tritón X-100 0.1% por 10 min a T° ambiente.
- Lavar las láminas 4-5 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

#### **IV. Bloqueo de proteínas generales (1 hora a T° ambiente)**

- Preparar la solución de bloqueo:
  - PBS Tritón X-100 al 0.05%

- 2 % Ovoalbúmina
- 2% BSA
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas 4-5 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

#### **V. Incubación con anticuerpo primario**

- Preparar la solución de ab1:
  - PBS Tritón X-100 al 0.05%
  - 1% Ovoalbúmina
  - Dilución de anticuerpo de conejo anti-Caspasa 3, forma activa (clivada) fue de 1/100
  - Dilución de anticuerpo de cabra anti-Olig2 fue de 1/300
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
- Lavar las láminas 4-5 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

#### **VI. Incubación con anticuerpo secundario**

- Preparar la solución de anticuerpo secundario:
  - PBS 1X
  - 2% BSA
  - 2% Ovoalbúmina
  - Dilución de anticuerpo Alexa fluor 594 de burro anti cabra (1/200)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente sin exposición a la luz.
- Lavar las láminas 4-5 veces con PBS 1X. Cada lavado de 5 min.

#### **VII. Montaje**

- Agregar DAPI aprox. 10-40 uL por lámina cubriendo completamente el tejido, colocar el cubreobjeto y sellar con esmalte.
- Conservar en 4° a 20°C hasta la lectura.