



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EVALUACIÓN DE FACTORES
ANGIOGÉNICOS Y DISRUPCIÓN DE LA
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN
UN MODELO DE
NEUROCISTICERCOSIS

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

ROGGER PIERE CARMEN OROZCO

LIMA - PERÚ

2016

Tesis asesorada por la Dra. Manuela Verástegui Pimentel

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres y hermanos por su continuo apoyo.
- Al laboratorio de investigación en enfermedades infecciosas a cargo de la Dra. Manuela Verástegui.
- Al FONDECYT por su colaboración mediante el convenio 014-2013-FONDECYT, que permitió mis estudios de Maestría.
- Al FINCyT por su colaboración mediante el Contrato 129-FINCyT-IB-2013
- Al proyecto de adquisición del Microscopio confocal contrato 133-FINCyT-ECL-2014.
- A mis amigos y compañeros del Laboratorio.

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	Pg.
Resumen	-
Abstract	-
Lista de abreviaturas	-
Lista de figuras	-
Lista de tablas	-
Introducción	1
Planteamiento del problema	3
Marco teórico	6
Justificación de la investigación	16
Objetivos	17
Materiales y métodos	18
Resultados	26
Figuras	42
Tablas	59
Discusión	65
Conclusiones	74
Bibliografía	75
Anexos	85

RESUMEN

La Neurocisticercosis (NCC) es una infección helmíntica que afecta al sistema nervioso central (SNC) causada por el estadio larval de *T. solium* (cisticerco). Debido a que la alteración vascular y la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) contribuyen con la patología de NCC, se postula que la angiogénesis podría contribuir con la patogénesis de esta enfermedad. El presente estudio emplea un modelo animal de NCC en ratas y evalúa la expresión de dos factores angiogénicos: el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-A) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), junto a tres marcadores de disrupción de la BHE: el antígeno de barrera endotelial (EBA), la inmunoglobulina G (IgG) y el fibrinógeno, mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Se encontró sobreexpresión de VEGF-A ($P=0.0005$) y FGF2 ($P=0.0233$) en el tejido que rodea al cisticerco y se observó sobreexpresión de VEGF-A en astrocitos. Además se encontró la presencia de IgG ($P<0.0001$) y un alto número de vasos con poca expresión de EBA ($P=0.0001$) en el tejido cerebral que rodea al cisticerco sugiriendo compromiso de la BHE. Asimismo, se encontró sobreexpresión de fibrinógeno en el tejido fibrótico ($P<0.0001$). Finalmente se encontró correlación entre los niveles de VEGF-A e IgG en quistes corticomeningeales. Los resultados indican que es necesario el estudio del rol de la expresión de VEGF-A en la astrogliosis y su contribución con la disrupción de la BHE en NCC.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a helminth infection which affects the central nervous system (CNS) and it is caused by the larval stage of *T. solium* (cysticercus). Since vascular alteration and blood brain barrier (BBB) disruption contribute to NCC pathology, it is postulated that angiogenesis could contribute to the pathology of this disease. This study uses a model for NCC in rats and evaluates the expression of two angiogenic factors; the vascular endothelial growth factor (VEGF-A) and the fibroblast growth factor (FGF2), besides three markers for blood brain barrier disruption: the endothelial barrier antigen (EBA), immunoglobulin G (IgG) and fibrinogen, using immunohistochemical and immunofluorescence techniques. VEGF-A and FGF2 overexpression ($P=0.0005$ and $P=0.0233$, respectively) was found in the tissue surrounding the cysts and VEGF-A overexpression was observed in astrocytes. It was also found the presence of IgG ($P<0.0001$) and a high number of less stained vessels to EBA ($P=0.0001$) in the tissue surrounding the cyst suggesting compromise of the BBB. Otherwise fibrinogen overexpression ($P<0.0001$) was found in fibrotic tissue. Finally, correlation between VEGF-A and IgG levels was found in corticomeningeal cysts. These results indicate, further studies are needed to study the roll of VEGF expression in the astrogliosis and its contribution to the BBB disruption in NCC.

LISTA DE ABREVIATURAS

Neurocisticercosis	NCC
Inmunoglobulina G	IgG
Factor de crecimiento vascular endotelial	VEGF
Factor de crecimiento de fibroblastos	FGF
Factor de crecimiento vascular endotelial A	VEGF-A
Receptor de VEGF tipo 1	VEGFR1
Receptor de VEGF tipo 2	VEGFR2
Factor de crecimiento de fibroblastos 2	FGF2
Antígeno de barrera endotelial	EBA
Barrera Hematoencefálica	BHE
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF
Factor de crecimiento epidérmico	EGF
Factor de crecimiento transformante beta	TGF- β
Peroxidasa de rábano picante	HRP
Metaloproteinasas	MMPs
Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1	Iba-1
Proteína ácida fibrilar glial	GFAP
Enfermedad de Alzheimer	EA
Fibrinógeno	Fgn
Interleucina	IL
Moléculas de adhesión de unión	JAM
Medio Roswell Park Memorial Institute	RPMI
Fluido intestinal artificial	AIF
Diaminobencidina	DAB
4',6-diamino-2-fenilindol	DAPI

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Área de imagen analizada (Objetivo 40X, para VEGF-A, FGF2, EBA, Fibrinógeno)
- Figura 2.** Procesamiento de imágenes para los marcadores VEGF-A, FGF2, Fibrinógeno e IgG.
- Figura 3.** Expresión de VEGF en parénquima cerebral.
- Figura 4.** Expresión de VEGF en ventrículos cerebrales.
- Figura 5.** Imágenes de doble marcaje entre Iba-1 y GFAP alrededor del cisticerco de *T. solium*
- Figura 6.** Doble marcaje entre Iba-1 y VEGF-A
- Figura 7.** Doble marcaje entre GFAP y VEGF-A
- Figura 8.** Expresión de FGF2 en parénquima cerebral.
- Figura 9.** Expresión de FGF2 en ventrículos cerebrales.
- Figura 10.** Doble marcaje entre Iba-1 y FGF2
- Figura 11.** Expresión de IgG en parénquima cerebral.
- Figura 12.** Expresión de IgG en ventrículos cerebrales.
- Figura 13.** Expresión de Fibrinógeno en parénquima cerebral.
- Figura 14.** Expresión de Fibrinógeno en ventrículos cerebrales.
- Figura 15.** Caracterización del antígeno de barrera endotelial.
- Figura 16.** Expresión del antígeno de barrera endotelial.
- Figura 17.** Distribución de vasos que presentan poca inmunoreactividad a EBA en cerebros infectados.

LISTA DE TABLAS

- | | |
|---------|--|
| Tabla 1 | Número de quistes y cerebros control utilizados en la investigación por localización |
| Tabla 2 | Resultados promedio de los marcadores empleados |
| Tabla 3 | Comparación de la inmunoreactividad a VEGF-A |
| Tabla 4 | Comparación de la inmunoreactividad a FGF2 |
| Tabla 5 | Comparación de la inmunoreactividad a IgG |
| Tabla 6 | Comparación de la inmunoreactividad a Fibrinógeno |
| Tabla 7 | Promedio de vasos con poca inmunoreactividad al Antígeno de Barrera Endotelial |
| Tabla 8 | Promedio de vasos inmunoreactivos al Antígeno de Barrera Endotelial |
| Tabla 9 | Análisis de Correlación entre marcadores angiogénicos y de disrupción de BHE |

INTRODUCCIÓN

La NCC es la infección helmíntica más común que afecta al SNC (1), en países en vías de desarrollo (2), especialmente en aquellos donde existe consumo y crianza de cerdos en condiciones de baja salubridad (3). El Perú es considerado un país endémico para la NCC y presenta alta prevalencia de esta enfermedad en las zonas rurales que no cuenta con un sistema de agua y desagüe adecuado y donde se crían cerdos libremente (1-2).

Los estudios histopatológicos en seres humanos y en modelos animales han permitido describir las características de la respuesta inflamatoria y de la lesión tisular de la NCC (4-6). La angiogénesis y la disrupción de la BHE podría contribuir con la patogenia de la NCC en seres humanos (5,7), debido a que se ha encontrado: alteración vascular, oclusión y engrosamiento de vasos en muestras post mortem de pacientes, así como disrupción de la BHE en cerdos con NCC (6,8,9). Sumado a ello, la alteración vascular y la disrupción de la BHE contribuyen con la patología de diversas enfermedades del sistema nervioso central, tales como los accidentes cerebrovasculares, la isquemia, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer entre otras (10) por lo que resulta de interés estudiar tanto los procesos de angiogénesis como de disrupción de la BHE en la NCC.

El presente trabajo estudia la angiogénesis mediante la evaluación de la expresión de dos factores angiogénicos; el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) y el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y su relación con la disrupción de la BHE en un modelo animal para la NCC. Este modelo animal fue desarrollado en el laboratorio de investigación en enfermedades infecciosas (LIEI) (11). El modelo se basa en la inoculación intracraneal de oncósferas activadas de *T. solium* en ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Holtzman), las cuales logran desarrollar cisticercos viables en el cerebro. Este modelo permite el estudio de la progresión de la patología desde que el parásito se aloja en el cerebro hasta que se desarrolla el cisticerco, mediante el uso de biomarcadores moleculares.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NCC es un serio problema de salud pública, con alta prevalencia en países en vía de desarrollo donde se crían cerdos libremente (12). Nuestro país posee como zonas endémicas a toda la sierra, la costa norte y la selva alta; por lo que continúa siendo un problema de salud pública pese a los programas de control ejecutados (13, 14). La NCC presenta como principal manifestación clínica a la epilepsia, reportándose que el 29% de casos de epilepsia son debidos a la NCC en países donde *T. solium* es endémica (15). Por ello resulta necesario el conocimiento de la patología de NCC en vías de mejorar el pronóstico y el tratamiento de personas que padecen esta enfermedad (16).

El estudio de autopsias de individuos con NCC ha hecho posible la descripción de la inflamación en el tejido que rodea al parásito (17,18). Además, el estudio de biopsias en pacientes con NCC y el uso de modelos animales han permitido establecer que la sintomatología y la patología depende del número, la localización y la viabilidad de los parásitos (6,9,19,20). El uso de técnicas de imagen como resonancia magnética y tomografía computarizada, permiten evaluar la presencia de inflamación y degeneración del cisticerco (21,22) sin embargo no brindan información de los cambios fisiológicos y moleculares en esta enfermedad.

Una de las principales características patológicas de esta enfermedad es la presencia de células inflamatorias, fibrosis, gliosis y alteración de la BHE (5, 9, 23). Debido al estrecho nexo entre estos fenómenos con la angiogénesis, se cree que la angiogénesis podría contribuir con la patología de la NCC. Estudios histopatológicos en pacientes con NCC reportan la presencia de alteración y engrosamiento de vasos sanguíneos en el SNC, por lo que el estudio de la alteración vascular resulta de suma importancia en esta enfermedad. Estudios en el modelo natural de NCC porcina (6,9) muestran evidencia de disrupción de la BHE, por lo que el presente estudio plantea el uso de biomarcadores específicos para la evaluación de factores angiogénicos y la ruptura de la BHE que pueden ser empleados en secciones de tejido cerebral.

La alteración de la densidad y morfología vascular se encuentran muy vinculadas con los procesos de angiogénesis, siendo VEGF-A y FGF2 los principales factores que pueden inducir la activación de las células endoteliales promoviendo así la angiogénesis (10). Se postula que la sobreexpresión de VEGF-A y FGF2 podría contribuir con la disrupción de la BHE en distintas enfermedades (24). Sin embargo, actualmente no existen estudios de estos marcadores en la NCC.

Se han desarrollado modelos animales para estudiar la patología de la NCC: sin embargo, estos modelos no emplean a *T. solium* como agente causante de la infección (25, 26). La presente investigación fue realizada en un modelo animal que emplea oncósferas activadas de *T. solium* como agente infeccioso y tiene como

objetivo evaluar la expresión de VEGF-A y FGF2 y su asociación con la disrupción de la BHE.

MARCO TEORICO

Ciclo de Vida de *Taenia solium*:

Taenia solium es un parásito helmíntico que posee como hospedero definitivo al ser humano, éste aloja a nivel intestinal al gusano adulto, causando así teniasis. El gusano adulto de *T. solium* posee diferentes segmentos denominados proglótidos, los más distales al escólex del gusano son los denominados proglótidos grávidos y contienen huevos maduros de la *Taenia*, que son expulsados junto con las heces humanas. Las heces humanas que contienen los huevos de *Taenia* y se encuentran en el ambiente pueden ser ingeridos por cerdos (27,28). Dentro del estómago del cerdo la cubierta del huevo es degradada por acción de los jugos gástricos y posteriormente por acción de las secreciones pancreáticas, la oncósfera se libera de la membrana oncosferral logrando así activarse. Esta oncósfera activada atraviesa la pared intestinal del cerdo y a través de vía hemática o linfática, migra a diferentes tejidos del hospedero y se desarrolla en metacéstode o cisticerco en diferentes órganos o tejidos, como músculos esqueléticos, cerebro, corazón, lengua y otros tejidos, produciendo así la cisticercosis porcina. Los seres humanos al comer carne de cerdo infectada y mal cocida, ingieren accidentalmente al cisticerco, el cual va a desarrollar en el intestino humano al gusano adulto, completando así su ciclo natural (12,29). La problemática radica cuando los seres humanos ingieren accidentalmente los huevos de *Taenia solium*, y estos se desarrollan en cisticerco a nivel del SNC causando la NCC (16,30).

El tratamiento para esta enfermedad puede incluir largos periodos con drogas antihelmínticas; siendo las más usadas el praziquantel y el albendazol. El tratamiento también puede incluir corticosteroides y drogas anti-epilépticas, en algunos casos la cirugía es necesaria para eliminar el parásito. El esquema de tratamiento varía dependiendo del número, tamaño, la ubicación, el desarrollo y la viabilidad de los quistes así como de la severidad de los síntomas clínicos que presenta cada paciente (13).

Respuesta inmune en la NCC:

La patología de esta enfermedad es dependiente de la viabilidad del cisticerco. En quistes viables, la característica más resaltante es la presencia de tejido fibrótico alrededor del cisticerco; se cree que este tejido es formado como un mecanismo de aislamiento que permite excluir al parásito del contacto directo con el parénquima cerebral y a la vez permite al parásito aislarse del entorno, y además presenta poca cantidad de células inflamatorias (31).

Una característica importante de la NCC es la presencia de gliosis. Las glías son células del sistema nervioso central, que permiten el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Dentro de las principales glías del SNC, se encuentran los astrocitos, las microglías y los oligodendrocitos. La presencia de lesión tisular, provoca reactividad de estas células conllevando a la gliosis. Es así que se puede observar astrogliosis, microgliosis y oligodendrogliosis, dependiendo del tipo celular

involucrado (32). En NCC se ha descrito la presencia de abundante astrogliosis, donde el astrocito presenta un estado hipertrófico. La astrogliosis puede tener efectos perjudiciales como beneficiosos para el individuo, inhibiendo el crecimiento del axón o promoviendo a la regeneración tisular (33,34). Los quistes en degeneración en pacientes con NCC muestran gran inflamación con abundancia de macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T gamma delta, eosinófilos, aumento de infiltrados perivasculares, aumento de la gliosis reactiva como cicatriz gliótica y aumento en el grosor de la fibrosis (35).

Tanto el perfil de citoquinas como las alteraciones patológicas dependen de la viabilidad del cisticerco. Los pacientes sintomáticos en general presentan niveles de interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-17 (IL-17) e interleucina-23 (IL-23) significativamente elevados, los pacientes sintomáticos que presentan granulomas expresan preferentemente citoquinas del tipo pro inflamatorio como el TNF- α y la interleucina 6 (IL-6) (36), mientras que en los pacientes asintomáticos, el perfil de citoquinas es variado. Éstos mantienen los niveles de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, IL-4) significativamente elevados siendo el perfil de citoquinas muy variable (37)

Álvarez en 2002 (4), clasificó la respuesta inflamatoria provocada por el cisticerco en cerdos en cuatro estadios diferentes: El estadio I fue definido por la presencia de colágeno de tipo I y quistes aparentemente viables, el tipo II se caracterizó por una respuesta similar al tipo I pero con mayor cantidad de infiltrados

inflamatorios. Se clasifica al estadio III en aquellos quistes donde es evidente el inicio de la formación del granuloma, en el estadio IV los parásitos presentaban gran cantidad de eosinófilos y la membrana del quiste empezaba a degenerar, sin embargo, los quistes en el estadio IV se detectaron principalmente en corazón y no en el cerebro del cerdo. Restrepo y colaboradores en 2001 (7) al trabajar con biopsias humanas con cisticerco indican que el aumento del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) está asociado con la fibrosis observada. Debido a las consecuencias deletéreas de las cicatrices fibróticas, éste podría ser un posible motivo de estudio; con la finalidad de identificar y caracterizar las moléculas que involucran la deposición de colágeno. Estudios en cerdos infectados indican que en quistes granulomatosos, el tejido fibroso invade completamente al parásito formando una cicatriz con poca cantidad de infiltrados celulares (38).

La fibrosis es una alteración que provoca el remodelamiento de la matriz extracelular y se encuentra presente en patologías como: fibrosis pulmonar, esclerosis sistémica, cirrosis, enfermedades cardiovasculares, entre otras. El tejido fibrótico es producto de una respuesta anormal a consecuencia de la irritación o el daño tisular. La fibrosis se desarrolla por la hiperproliferación de fibroblastos que se diferencian en miofibroblastos e inducen la síntesis y secreción de elementos de la matriz extracelular como colágeno de tipo I y fibronectina (39). Existen reportes que asocian la fibrosis y la angiogénesis (40), además indican que VEGF-A promueve la formación de fibrosis en modelos animales que emplean ratones (41) En la NCC se observa tejido fibrótico alrededor del cisticerco. Estudios de

tomografía computarizada muestran alteraciones en patrones vasculares que sugieren cicatrices arteriales o fibrosis (23). Estudios histológicos indican la presencia de engrosamiento de la capa adventicia con fibrosis medial e hiperplasia endotelial (31). En el caso de arterias pequeñas se encuentra que la reacción fibrótica reemplaza la túnica media y prolifera de forma concéntrica hasta producir oclusión del lumen de vasos (42,43).

Angiogénesis:

El proceso por el cual se forman nuevos vasos a partir de vasos ya existentes se denomina angiogénesis (44). Este proceso involucra a la migración de las células endoteliales luego de su activación promoviendo el remodelamiento de la matriz extracelular, activación de metaloproteinasas (MMPs) y secreción de distintos factores de crecimiento. Entre los factores de crecimiento que median la migración y activación de células endoteliales se tiene a VEGF-A, FGF2, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de la epidermis (EGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), Angiopoyetinas 1 y 2 y sus receptores Tie (45), angiostatina, endostanina (46), integrinas y MMPs. La angiogénesis se encuentra relacionada a distintas patologías como cáncer, malformaciones vasculares, obesidad, psoriasis, alergias, hipertensión, artritis (10). Dentro del sistema nervioso central la angiogénesis se encuentra asociada a patologías como accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, Esclerosis Múltiple y muy frecuentemente a tumores cerebrales (47).

El VEGF o factor de crecimiento vascular endotelial pertenece a una familia de más de siete proteínas que incluyen a VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. El factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) fue descubierto en 1980. El VEGF-A puede unirse a los receptores tipo 1 y 2 (VEGFR1 y VEGFR2) lo que transduce la señal para iniciar la angiogénesis mediante la activación de células endoteliales (48) y la permeabilidad vascular.

El VEGF-A al unirse a su receptor estimula la vía de las MAP quinasas (RAS/RAF/MEK/ERK y PI3kinasa/AKT/mTOR) induciendo la proliferación y señales de supervivencia celular (49). Sin embargo, la respuesta celular provocada por VEGF depende del tipo de isoforma que activa al receptor. Existen diferentes isoformas de VEGF-A denominadas de acuerdo a su longitud de aminoácidos como; VEGF 206, 189, 183, 165, 162, 148, 145, 121 y 111 (50) (siendo las más estudiadas las isoformas 189, 165,121). Las isoformas 206, 189, 183, 162 y 145 presentan dentro de su estructura una secuencia de 24 aminoácidos que permite la unión de estas proteínas a la matriz extracelular. Las isoformas solubles, dentro de las que se encuentran el VEGF-A 121 y 111, inducen la activación paracrina en células endoteliales y son las isoformas con mayor potencial angiogénico. La isoforma VEGF-A 165 contiene un 50% del fragmento que confiere capacidad de unión a la matriz extracelular siendo parcialmente soluble y moderadamente afín a la matriz extracelular (51). Existen isoformas intracelulares que son producidas en situaciones de hipoxia, estas isoformas incluyen a las isoformas anteriormente mencionadas, más la adición de una secuencia peptídica de alrededor de 180

aminoácidos (52) Las isoformas anteriormente mencionadas corresponden a las proteínas presentes en seres humanos, en el caso de ratas, estas presentan las mismas isoformas sin embargo presentan disminución de un aminoácido en cada una de ellas.

FGF2 es un factor angiogénico que se une a heparina y se encuentra en la matriz extracelular, puede interactuar con múltiples receptores tirosina quinasa, integrinas, gangliósidos y actúa sinérgicamente con VEGF-A en la inducción de angiogénesis (53). Tanto VEGF-A como FGF2 son producidos en el SNC por glías y neuronas. Se ha mencionado que la angiogénesis cumple un rol importante en la patología asociada a NCC (5,7), nuestro grupo de investigación ha demostrado que existe aumento en la expresión de VEGF-A en regiones cercanas a quistes parenquimales de *T. solium* (11).

El VEGF se sobreexpresa en casos de hipoxia, lesión tisular, isquemia, inflamación, fibrosis y gliosis (51), gran parte de estas características encontradas en nuestro modelo animal. La inflamación, fibrosis y gliosis son las principales características reportadas en NCC, además de la epilepsia. Recientes investigaciones muestran que la angiogénesis está asociada a la disrupción de la BHE en epilepsia del lóbulo temporal y en modelos experimentales de epilepsia con pilocarpina (54–56). Diversos estudios en modelos de lesión cerebral, isquemia y epilepsia indican que el astrocito es una de las principales células que expresa VEGF-A promoviendo la regeneración tisular aunque en periodos prolongados

provoca la inhibición del crecimiento del axón (57–59). Como parte del sistema microvascular, los pericitos brindan soporte y mantenimiento de la BHE (60), de tal forma que estas células también pueden producir factores angiogénicos.

El factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2) es un potente factor neurotrófico (61) y además es un potente factor angiogénico (62). Se encuentra expresado en muchos tipos celulares dentro del cerebro como astrocitos, células endoteliales de capilares, pericitos y neuronas (63,64).

BHE:

La BHE es una barrera fisiológica que impide que metabolitos y sustancias del plasma sanguíneo puedan ingresar libremente al parénquima cerebral (65,66). Físicamente la BHE incluye una delgada capa de células endoteliales no fenestradas unidas por proteínas de unión estrecha que incluyen; a Claudina, Ocludina, Zónula Ocludens-1 (ZO-1) y moléculas de adhesión de unión (Junctional Adhesion Molecules, JAMs) (67,68), esta unión estrecha impide que compuestos de peso molecular mayor a 500 Dalton ingresen libremente al tejido cerebral (69). El descubrimiento de esta propiedad presente en el cerebro fue inicialmente reportada en estudios realizados con colorantes que eran inyectados directamente al torrente sanguíneo sin producir tinción alguna en el sistema nervioso central, mientras que la adición de colorantes en el líquido cefalorraquídeo si evidenciaba la tinción del

cerebro, indicando que existen propiedades especiales en este tejido que permiten mantener aislado al tejido nervioso del sistema circulatorio (70-72).

En el plasma sanguíneo se encuentran proteínas como inmunoglobulinas, albúmina, fibronectina (38), factores de coagulación como Von Willebrand y fibrinógeno (73). Debido a que el SNC es un órgano inmunoprivilegiado, las proteínas séricas anteriormente mencionadas no deberían ser capaces de atravesar la BHE por lo que la existencia de estas proteínas en el parénquima cerebral es atribuida a un aumento en la permeabilidad de la BHE. Se cree que el aumento en la permeabilidad de la BHE, es la causa de distintas patologías y se menciona que la disrupción de la BHE conduce a cuadros de convulsiones. Existen reportes en los cuales proteínas presentes en el suero pueden contener factores de crecimiento que posteriormente induzcan epilepsia, como el fibrinógeno, el cual contiene formas inactivas de TGF-beta (74). Otra proteína sérica que podría ingresar al parénquima cerebral es la albúmina, esta proteína también es vinculada a la generación de convulsiones(56). Además de las proteínas que forman uniones estrechas, el antígeno endotelial de barrera conocido como EBA (*endothelial barrier antigen*) (75), es un marcador empleado para evaluar la disrupción de la BHE en ratas. Actualmente se desconoce la función que ejerce esta proteína en la integridad de la BHE, numerosos artículos mencionan que esta proteína disminuye o deja de expresarse en casos en los que ha existido alteración de la BHE (76). La BHE no solo está conformada por células endoteliales y uniones estrechas, existe una sinergia entre el endotelio, pericitos y los pies del astrocito, siendo en última

instancia los astrocitos las células que mantienen el correcto balance de iones extracelulares como intracelulares del parénquima cerebral en conjunción con las células endoteliales, de tal forma que tanto los astrocitos como las células endoteliales secretan factores de crecimiento que permiten la integridad de la BHE (65,66,68). Existen investigaciones recientes que asocian a la astrogliosis con la disrupción de la BHE (77,78) y la astrogliosis además de producir citoquinas de tipo antiinflamatorio, inducen la expresión de VEGF-A (77). Se menciona el engrosamiento y alteración de vasos en biopsias de pacientes con NCC, la alteración de los vasos podrían significar el aumento o susceptibilidad a la disrupción en la BHE. Además se ha demostrado que existe disrupción de la BHE en el modelo natural de NCC en cerdo realizado mediante la técnica de Evans blue donde se detecta extravasación de albúmina al parénquima cerebral (6).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

- Es necesario el estudio de las bases biológicas involucradas en la patología de NCC debido a que su conocimiento permitirá comprender mejor la clínica observada en esta enfermedad.
- El conocimiento de la respuesta inmune del hospedero frente a la NCC va ayudar a comprender la patología de la enfermedad y a buscar nuevos blancos terapéuticos.
- Determinar alteración de la BHE, en el modelo animal de NCC, va ayudar a comprender la alteración vascular reportada en pacientes con NCC, así como los factores asociados a esta patología.
- Estudiar la angiogénesis de acuerdo a lo planteado en el presente trabajo no sólo aporta nuevos conocimientos en la enfermedad de NCC sino que proporciona un nuevo modelo para el estudio de daño cerebrovascular.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo general

- Evaluar la presencia de marcadores angiogénicos y de disrupción de la BHE en el modelo de NCC usando ratas.

Objetivos específicos:

1. Demostrar que existe aumento en la expresión de VEGF-A y FGF-2 en cerebros de ratas que presenten NCC en comparación a los cerebros control.
2. Identificar las principales células del sistema nervioso que expresan VEGF-A y FGF-2.
3. Demostrar la presencia de proteínas asociadas al incremento en la permeabilidad de la BHE (IgG y fibrinógeno) y la disminución en la expresión del EBA en ratas infectadas con *T. solium*.
4. Evaluar si existe correlación entre los niveles de los factores angiogénicos encontrados y los marcadores de disrupción de BHE.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Lugar de estudio:

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de investigación de enfermedades infecciosas (LIEI) y laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Material biológico:

Animales: Se emplearon ratas Holtzman provenientes del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia de 12 a 15 días después de nacidas, luego de la infección intracraneal los animales fueron trasladados a ambientes de la facultad de medicina veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM).

Parásitos: Los huevos de *T. solium* fueron proporcionados por el LIEI.

Consideraciones Éticas:

La investigación se realizó siguiendo las consideraciones éticas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, contando con aprobación por parte del Comité institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA), con código de inscripción 64637.

Obtención y Activación de oncósferas de *T. solium*

Para la obtención y activación de oncósferas de *T. solium* se empleó el método descrito por Verástegui et al. (79). Los huevos de *T. solium* fueron lavados 3 veces con agua destilada, se centrifugó a 2500rpm a temperatura ambiente por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en hipoclorito de sodio comercial al 0.75% en agua, se agitó la solución por 3 a 5 min con la finalidad de eliminar la cubierta del huevo y liberar las oncósferas. Las oncósferas fueron lavadas 3 veces usando medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI). Posteriormente, las oncósferas fueron activadas con fluido intestinal artificial (AIF) por 45min a 37 grados centígrados. Después de su activación las oncósferas fueron lavadas 3 veces con medio RPMI. Se contabilizó el número de oncósferas activadas usando el método hemocitométrico empleando una cámara de Neubauer, las oncósferas que no presentaban membrana oncosferal y se movían fueron consideradas como oncósferas activadas.

Infección intracraneal de ratas

Se realizó la infección de 38 ratas mediante la inoculación intracraneal con oncósferas activadas (11), otras 11 fueron inoculadas con solución salina (animales control). Los animales fueron previamente anestesiados con Ketamina (80mg/kg) y Xilacina (5mg/kg). La inoculación intracraneal consistió en la inyección de 140 oncósferas activadas en 50ul de solución salina usando jeringas para tuberculina. La inoculación se realizó en el extremo anterior de la sutura sagital (bregma). Las ratas fueron alimentadas *ad libitum* hasta los 6 meses después de la infección, con

ciclos luz y oscuridad de 12h en los ambientes de la FMV-UNMSM. Después de 6 meses de infección se procedió a la eutanasia de los animales. Estos animales fueron anestesiados con sobredosis de Ketamina (150mg/Kg) y Xilacina (20mg/Kg). Antes de proceder a la obtención de la muestra se verificó si el animal estaba completamente anestesiado.

Procesamiento de muestra para histología

Los tejidos cerebrales de los grupos estudiados fueron post-fijados en paraformaldehído al 4% en solución tampón de fosfato salino (PBS), los cerebros de las ratas fueron divididos en 2 grupos.

El primer grupo fue procesado según las técnicas estándar de procesamiento histológico. Los tejidos fueron deshidratados por una batería ascendente de alcoholes de 70%, 90%, 95% hasta alcohol absoluto, posteriormente fueron inmersos en Xilol y embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes de 4um de grosor, se verificó que los cortes comprendieran regiones cercanas al escólex del parásito, que sirvió como punto de referencia.

El segundo grupo de cerebros fue lavado con agua destilada y sumergidos en una batería ascendente de sucrosa desde el 10% hasta almacenarlo en sucrosa al 30% para obtener cortes congelados en criostato. Se obtuvieron cortes de 20um de

grosor para los cortes congelados, se usó el gel compuesto para corte a temperatura óptima (OCT) como matriz de soporte para la realización de los cortes congelados.

Inmunohistoquímica.

Se realizó inmunohistoquímica de láminas en parafina. Para ello las láminas fueron calentadas en estufa a 56°C, posteriormente desparafinadas con xileno, y deshidratadas mediante una batería decreciente de alcoholes. Se realizó el desenmascaramiento de epítopes para cada marcador empleado (anexo 1), las láminas fueron lavadas con PBS y se añadió solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% para el bloqueo de la peroxidasa endógena, posteriormente se añadió solución de bloqueo de proteínas, para dejar las láminas incubando durante toda la noche con su respectivo anticuerpo primario (Anti-VEGF-A, Anti-FGF2, Anti-EBA, Anti-Fibrinógeno, Anti-IgG de rata, descripción de anticuerpos en el anexo 1). Las láminas fueron lavadas y posteriormente incubadas con su respectivo anticuerpo secundario (anexo 1). En los casos en que se usó anticuerpo secundario marcado con biotina, las láminas fueron lavadas y se incubó con estreptavidina marcada con HRP (detalle de los protocolos en el anexo 3). Después de un nuevo ciclo de lavados, las láminas fueron reveladas con solución de DAB (Dako), teñidas con hematoxilina, deshidratadas y montadas con solución Entellan (MERCK).

Inmunofluorescencia

Se emplearon 4 cerebros infectados y 2 cerebros no infectados para la inmunofluorescencia. Los cerebros fueron cortados en criostato, obteniéndose cortes de 30um de espesor, estos tejidos fueron colocados en microplacas de 12 pozos que contenían PBS. Las secciones de tejido fueron permeabilizados en una solución de PBS tritón al 1% por toda una noche, luego fueron lavadas con PBS y se agregó el anticuerpo primario correspondiente (IgG de conejo anti-VEGF-A o IgG de ratón anti-FGF2, anexo2). Después de la incubación por 2 días las láminas fueron lavadas con PBS y se agregó su respectivo anticuerpo conjugado (IgG de burro anti-IgG de conejo marcada con Alexa fluor 488 o IgG de burro anti-IgG de ratón marcada con Alexa fluor 488). Después de 3 horas de incubación los tejidos fueron lavados y se agregó un segundo anticuerpo primario (IgG de ratón anti-GFAP o IgG de cabra anti-Iba-1 para el caso de las láminas marcadas con VEGF-A. Para las láminas con FGF2 se realizó doble marcaje solo con el anticuerpo anti-Iba-1). Luego de 2 días de incubación las láminas fueron lavadas e incubadas con su respectivo anticuerpo conjugado (IgG de burro anti-IgG de Ratón marcada con Alexa fluor 594 y IgG de burro anti-IgG de cabra marcada con Alexa fluor 594). Las láminas fueron lavadas con PBS posteriormente montadas usando un kit para prolongar la fluorescencia que contiene 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) de la compañía Invitrogen. Para las láminas de doble marcaje entre GFAP e Iba-1 se siguió el mismo procedimiento, primero se añadió la IgG de ratón anti GFAP, seguido de su respectivo anticuerpo secundario. Después de la incubación y lavado, se agregó la IgG de cabra anti-Iba-1 y finalmente su respectivo anticuerpo secundario (anexo 2).

Análisis de tejidos e imágenes

Adquisición de imágenes

Las imágenes fueron adquiridas usando el microscopio Zeiss Axio Lab, la cámara AxioCam ERc5 y el software ZEN 2 de distribución gratuita. Las imágenes fueron tomadas a 40X para los marcadores; EBA, Fibrinógeno, VEGF, FGF2.

Para los tejidos no infectados, se tomó 6 imágenes de regiones pertenecientes a corteza cerebral, estas imágenes sirvieron como control para los quistes clasificados como parenquimales y corticomeningeales. Se empleó el tejido de corteza cerebral como control para quistes corticomeningeales debido a que la región analizada en éstos es la región de corteza cerebral que está en contacto con el cisticerco. Para el caso de regiones ventriculares, se tomó 4 imágenes alrededor de ventrículos laterales que sirvieron para la comparación de los quistes ventriculares.

En el caso de tejidos infectados; se tomaron 6 imágenes del tejido cerebral alrededor del parásito para cada cisticerco analizado. Las imágenes abarcaron 210um x 280um según se muestra en la Figura 1.

Para el marcador IgG las imágenes fueron adquiridas con el objetivo de 10X debido a que el área de inmunoreacción para este marcador fue mucho mayor. En

el caso de los cerebros control, se adquirieron 2 imágenes de regiones corticales para cada sección de cerebro. Estas láminas fueron usadas para la comparación con los quistes clasificados como parenquimales y corticomeningeales. Además, se tomaron 2 imágenes alrededor de los ventrículos para ser comparadas con los quistes presentes en ventrículo. En el caso de cerebros infectados, se tomaron 2 imágenes alrededor de cada parásito.

Procesamiento y análisis de imágenes

Las imágenes fueron procesadas y analizadas con el software ImageJ v1.47t. Para los marcadores: Fibrinógeno, VEGF, FGF2, se realizó la deconvolución de color mediante la opción “Colour deconvolution” (Figura 2), se seleccionó la opción para láminas hechas con hematoxilina (H) y DAB, las imágenes de color marrón correspondientes al DAB (Figura 2D) fueron convertidas en binario (blanco y negro, donde el color negro representa la presencia de DAB), se empleó la opción de ajuste automático para cada imagen (Figura 2E). Se recortó 40um a ambos lados de las imágenes debido a que luego de la conversión en binario es posible observar esquinas inmunoreactivas a los marcadores, esto debido a la aberración óptica propia de los objetivos. Finalmente, se realizó la medición del porcentaje de área inmunoreactiva, que representa el porcentaje del área abarcada por los pixeles de color negro por área total de la imagen (Figura 2G).

Para el caso de IgG se realizó el mismo procedimiento de deconvolución; sin embargo, antes de realizar la medición del porcentaje de área, se seleccionó solo la región cercana al parásito con una distancia no mayor a 400um, debido a que ya se reportó que la reacción inflamatoria es focalizada y la inflamación se extiende hasta 300um alrededor del cisticerco (11). Se realizó la medición del porcentaje de área inmunoreactiva y se calculó el promedio del porcentaje de área de las 2 fotos tomadas para cada cisticerco. De igual forma para las secciones de cerebro correspondiente a los controles. Estos valores fueron los empleados para el análisis descriptivo y estadístico.

Para el marcador EBA, los vasos fueron contabilizados en las imágenes tomadas a 40X con la ayuda del plugin “Cell counter” del software imageJ. Para este marcador se tomaron 10 imágenes al azar alrededor de cada quiste, 10 imágenes de corteza cerebral de cada tejido cerebros control y 6 imágenes alrededor de los ventrículos cerebrales de cada cerebro control. Se contabilizó el número de vasos teñidos, vasos con poca tinción. Los vasos fueron reconocidos debido a que las células endoteliales presentan un núcleo muy alargado. Se calculó el promedio de vasos poco teñidos por imagen para cada cisticerco y se usó esta variable para la comparación estadística.

RESULTADOS

Descripción de la muestra

En total se encontraron 27 quistes correspondientes a 13 ratas infectadas. Se analizaron ratas que presentaron de 1 a 5 quistes. De los 27 quistes encontrados 8 correspondieron a quistes clasificados como corticomeningeales (CM), 11 parenquimales (P) y 8 quistes ventriculares (V) (Tabla 1). En el caso de cerebros control, se analizó 9 cerebros de ratas no infectadas, se realizó la cuantificación para cada marcador en tres secciones de tejido por cada cerebro. Los datos correspondientes a los cerebros control del área de corteza fueron empleados para la comparación de los quistes localizados en parénquima como para los quistes clasificados como corticomeningeales. Estos 9 cerebros control también fueron empleados para la evaluación de regiones ventriculares, para la comparación con los quistes localizados en los ventrículos (Tabla 1).

Al observar macroscópicamente los cerebros infectados, se encontró que todos los cisticercos presentaron el líquido vesicular color transparente. Además, todos los quistes estudiados mostraron integridad de las capas del tegumento sin infiltración celular al ser evaluados mediante la tinción H&E.

EXPRESIÓN DE FACTORES ANGIOGENICOS

Factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A)

El VEGF-A es la principal proteína involucrada en la inducción de angiogénesis y cumple un rol fundamental en el desarrollo vascular del SNC. Se realizó inmunohistoquímica en secciones de cerebro de tejido cerebral para detectar la distribución de VEGF-A alrededor de cisticercos en el modelo de NCC usando ratas.

En cerebros normales, se encontró tinción a VEGF-A tenue en regiones corticales, principalmente en células con apariencia de neuronas y glías (Figura 3A-3C), se encontró mayor inmunoreacción en regiones periventriculares y meninges (Figura 4A-4C). En el caso de ratas infectadas se encontró fuerte inmunoreacción alrededor de cisticercos (Figura 3E, 3H, 4D); esta inmunoreacción no fue homogénea alrededor del parásito, siendo de tipo reticular, focalizada (Figura 3F, 3I) y en algunos casos se encontró regiones perivasculares muy reactivas a este marcador (Figura 3G). Al comparar los valores de inmunoreactividad por área de VEGF-A entre el tejido alrededor del parásito y el grupo control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0005$) (Figura 3a, Tabla 2).

Se encontró que la inmunoreactividad a VEGF-A variaba entre los quistes analizados tanto en intensidad como en extensión, por lo que se analizó la expresión de este marcador por localización del cisticerco y se comparó los valores de

inmunoreactividad con su respectivo grupo control (Tabla 3). En el caso de los quistes ventriculares, se encontró quistes que no presentaron cambios en la expresión de este marcador (Figura 4F), mientras que en dos quistes se encontró exacerbación en la expresión de esta proteína (Figura 4D, 4E). Se observó que la expresión de VEGF-A en los dos quistes mencionados fue abundante en regiones cercanas al núcleo cerebral ependimal y subependimal (Figura 4) que se encuentra muy cercano a los ventrículos cerebrales.

El 25% (2/8) de quistes ventriculares analizados presentaron niveles de VEGF superiores a lo encontrado en cerebros control. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de quistes localizados en ventrículo y el grupo control ($p=0.1073$). Se encontró que el 100% (11/11) de quistes parenquimales así como el 100% (8/8) de quistes corticomeningeales poseen inmunoreactividad a VEGF superior a la encontrada en el grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas en quistes parenquimales ($P=0.0005$) y en quistes corticomeningeales ($P=0.0012$) al ser comparados con el grupo control (Tabla3).

La expresión de VEGF-A fue muy variable entre los tejidos que rodean los diferentes quistes. Esto es evidente al observar los altos valores del error estándar de la media (SEM) encontrados (2.533 para quistes parenquimales y 2.447 para quistes corticomeningeales), mientras que en el caso de regiones corticales de cerebros control esta variabilidad fue menor (0.105, Tabla 3).

Se realizó inmunofluorescencia de la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1, Figura 5A) como marcador de macrófagos y microglía junto a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, Figura 5B), como marcador de astrocitos. Con la finalidad de confirmar si era posible distinguir dichas células dentro de la gliosis en el tejido alrededor del parásito. El doble marcaje entre estas proteínas permitió confirmar que ambas proteínas detectan células independientes dentro de la gliosis (Figura 5D). Por lo que estos marcadores fueron empleados para evaluar si los astrocitos o la microglía expresan los factores angiogénicos estudiados, VEGF-A o FGF2.

El doble marcaje de VEGF con Iba-1 (Figura 6) mostró que en cerebro normal la mayoría de células positivas a VEGF-A no colocalizan con Iba-1 (Figura 6E), al igual que en cerebros infectados (Figura 6F). En el caso del doble marcaje entre GFAP y VEGF-A (Figura 7) fue posible observar que en cerebros no infectados, la distribución de VEGF-A (Figura 7A) es similar a la encontrada en GFAP (Figura 7C), observándose colocalización (Figura 7E). De igual forma, en el caso de cerebros infectados, la mayor parte del patrón de expresión encontrado en VEGF-A (Figura 7D), colocaliza con el marcador GFAP (Figura 7E), indicando que la mayor expresión de VEGF-A se encuentra en astrocitos.

Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2)

FGF2 es un potente agente mitogénico implicado en el desarrollo vascular y neurotrófico, esta proteína permite el mantenimiento de la BHE (80-81). En cerebros control se encontró que FGF2 presenta inmunoreactividad en células con apariencia de neuronas (Figura 8C), glías (Figura 8B) y vasos sanguíneos (Figura 8D). En la corteza cerebral se encontró que FGF2 se distribuye en forma discreta e individual, observándose cada célula distanciada una de la otra (Figura 8B). En el caso de ventrículos cerebrales, la mayoría células endimarias mostraron inmunoreacción a este marcador. (Figura 9B, 9C). En cerebros infectados, se encontró alta expresión de FGF2 alrededor del parásito (Figura 8E-8I) y se observó regiones adyacentes al parásito con mayor presencia de esta proteína (Figura 8F), además se encontró inmunoreacción dentro de la fibrosis (Figura 9E). Al comparar los porcentajes de inmunoreactividad por área a FGF2, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0233$) entre el tejido alrededor del parásito de todos los quistes estudiados y el grupo control (Tabla 2).

Se encontró que el 25% (2/8) de quistes ventriculares presentaban niveles de FGF2 superiores a lo encontrado en el grupo control, sin embargo no se observó diferencias estadísticamente significativas ($P=0.6605$). Se encontró inmunoreacción en células endimarias tanto en cerebros infectados como no infectados (Figura 9), a pesar de no encontrar diferencias significativas, ciertas regiones ventriculares de cerebros infectados mostraron abundante inmunoreacción (Figura 9D-E) encontrándose también zonas muy semejantes a las regiones control

(Figura 9F). El 50% (4/8) de quistes corticomeningeales presentó valores de inmunoreactividad a FGF2 superior a lo encontrado en grupo control, sin embargo, no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P=0.1779$). Si bien es cierto no se encuentran diferencias significativas es posible observar grupos de células positivas a FGF2 que se encuentran conglomerados alrededor parásito (Figura8H, 8I), distribución no encontrada en cerebros control (Figura8B-8D).

En el caso de quistes parenquimales (Figura 8E-8G), en el 90% (9/10) se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0033$) al ser comparados con su grupo control. Al igual que en quistes corticomeningeales, la expresión de FGF2 se presentó como pequeñas agrupaciones de células alrededor del parásito (Figura 8F).

Al realizar inmunofluorescencia de doble marcaje entre FGF2 e Iba-1 (Figura 10), en cerebros no infectados, muy pocas células presentaron colocalización (Figura 10E). De igual forma en el caso de cerebros infectados, no se observó colocalización entre Iba-1 y FGF2 (Figura10F), indicando que este factor debe ser expresado por otra célula diferente a microglía.

EVALUACION DE LA DISRUPCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFALICA

Presencia de Inmunoglobulina G (IgG)

La IgG es una proteína de aproximadamente 150kDa y se encuentra presente en el torrente sanguíneo, la presencia de esta proteína en el parénquima cerebral es usada como marcador de la disrupción de la BHE. La extravasación de IgG fue evaluada por inmunohistoquímica (Figura 11). En cerebros control la inmunoreacción a esta proteína fue ausente en todo el parénquima cerebral (Figura 11B), no evidenciándose reacción en regiones corticales (Figura 11C) ni en la base del cerebro, pero si en meninges. El lumen de ciertos vasos sanguíneos presentó inmunoreacción a IgG sin mostrar extravasación al neurópilo. En ventrículos cerebrales (Figura 12), se encontró la presencia de IgG en el plexo coroideo (Figura 12C). Sin embargo, en regiones circunventriculares la inmunoreacción fue muy tenue y casi ausente (Figura 12A, 12B). En el caso de cerebros infectados, la reacción a IgG se presentó alrededor de todo el parásito (Figura 11A) para la mayoría de quistes analizados. Se encontró que ciertos quistes presentaban áreas muy marcadas a IgG (Figura 11D, 11E) mientras que en otros quistes se observaba lo opuesto (Figura 11F). Además, se observaron células fuertemente inmunoreactivas a IgG (Figura 11E). Al realizar la cuantificación de inmunoreactividad por área, se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la inmunoreactividad a IgG entre cerebros infectados y el grupo control (Tabla 2).

El 100% (8/8) de quistes ventriculares presentó valores de inmunoreactividad superior a lo encontrado en regiones control (Tabla 5), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0367$) en esta localización. En el caso de quistes parenquimales, el 90% (9/10) presentaron valores de inmunoreactividad a IgG superior a lo encontrado en cerebros control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0004$) al ser comparados a sus respectivas regiones control (Tabla 5). De igual forma el 100% (7/7) de quistes corticomeningeales presentó valores de inmunoreactividad superior a lo encontrado en el grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0012$).

La presencia de IgG fue abundante en la mayoría de quistes parenquimales y corticomeningeales, solo uno de los 11 quistes parenquimales no mostró reacción evidente a IgG (Figura 11G). Si bien es cierto se encuentra mayor inmunoreacción en quistes ventriculares en comparación a su región control, esta reacción fue muy tenue (Figura 12F), en comparación a lo encontrado en quistes corticomeningeales y parenquimales (Figura 12D, 12E).

Fibrinógeno

El fibrinógeno es una proteína presente en el plasma sanguíneo con un peso molecular de aproximadamente 350kDa, por lo que no logra atravesar la BHE. La presencia de esta proteína en el parénquima cerebral es usada como un indicador de la disrupción de la BHE.

No se encontró la presencia de fibrinógeno en el parénquima cerebral de los animales control (Figura 13A, 13B), si bien es cierto se encontró inmunoreacción en el lumen de ciertos vasos, no se observó el marcaje de fibrinógeno en el neurópilo (Figura 13B). Se encontró el marcaje de esta proteína en meninges y en regiones que rodean vasos de gran calibre (Figura 13C). En el caso de los ventrículos cerebrales, se observó la tinción de esta proteína en células endoteliales (Figura 14C) y en vasos del plexo coroideo. En cerebros infectados la reacción se concentró dentro de la fibrosis, pudiéndose observar el marcaje en forma de fibras (Figura 13E, 14E, 14F). La reacción a fibrinógeno no fue homogénea alrededor de los parásitos de tal forma que se encontraron regiones más intensas que otras (Figura 13H, 13I). Se encontró esta proteína alrededor de ciertos vasos en el tejido bordeando al parásito (Figura 13F) y se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de inmunoreactividad por área de fibrinógeno entre cerebros infectados y no infectados ($P < 0.0001$, Tabla 2).

El 42.8% de quistes ventriculares (3/7) presentó valores de inmunoreactividad a fibrinógeno (Tabla 6, Figura 14D) superior a lo encontrado en cerebros control (Figura 14A), sin embargo, no se encontró diferencias estadísticamente significativas ($P=0.1229$, Tabla 6). En el caso de quistes localizados en parénquima (Figura 13D), el 100% de los quistes estudiados (10/10) presentó inmunoreacción a fibrinógeno superior a lo encontrado en el grupo control (Tabla 6), hallándose diferencias estadísticamente significativas ($P=0.0009$). De igual forma el 100% (7/7) de los quistes corticomeningeales, presentó mayor inmunoreacción a fibrinógeno en comparación a lo encontrado en el grupo control, siendo también la diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0027$, Tabla 6).

El porcentaje de quistes con alta inmunoreactividad a fibrinógeno fue menor en quistes ventriculares (42.8%) en comparación a los quistes parenquimales y corticomeningeales, donde en ambos casos el 100% de quistes presentó inmunoreactividad superior a su grupo control. Esto es evidente al observar los ratios de expresión, donde quistes parenquimales y corticomeningeales presentaron ratios alrededor de 80, mientras que quistes ventriculares presentó un ratio de 5,57 (Tabla 6).

Resultados Antígeno de barrera endotelial (EBA)

El anticuerpo monoclonal usado para la detección de EBA reconoce proteínas presentes en el endotelio vascular de vasos sanguíneos que presentan integridad en la BHE (82). Se ha reportado que la disminución en la expresión de esta proteína refleja la disrupción de la BHE (83).

Se encontró una fuerte inmunoreacción de EBA en el endotelio vascular de cerebros del grupo control (Figura 15A), en el caso de cerebros que presentaban quistes se encontró que alrededor del parásito había vasos sanguíneos que presentaban una débil inmunoreactividad a este marcador (Figura 15B). Fue posible detectar a los vasos poco reactivos debido a que en estos se observó el núcleo alargado y citoplasma típico de células endoteliales (Figura 15B). Se encontró vasos poco inmunoreactivos a EBA en quistes parenquimales, corticomeningeales y ventriculares (Figura 16). Al contabilizar los vasos poco reactivos de todos los quistes estudiados, se encontró que el tejido alrededor del parásito presentó mayor cantidad de estos vasos por área en comparación a los cerebros control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P=0.0001$, Tabla 2).

Se encontró que solo el 14% (1/7) de quistes ventriculares (Figura 16D, 16E) presentó valores superiores a lo encontrado en cerebros control (Figura 16F), no hallándose diferencias estadísticamente significativas entre estos ($P=0.3036$, Tabla 7). En el caso de cerebros corticomeningeales (Figura 16C) el 100% de

quistes (7/7) presentó valores superiores a lo encontrado en sus regiones control (Figura 16A), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$, Tabla 7). De manera semejante el 82% (9/11) de quistes parenquimales presentó valores promedio de vasos con poca inmunoreactividad a EBA superiores a lo encontrado en regiones control (Figura 16B), encontrándose también diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.0015$) entre tejido alrededor del quiste y la región control (Tabla 7).

Se contabilizó el número total de vasos por campo inmunoreactivos a este marcador, representado como la suma de vasos con reactividad normal y los vasos con poca reactividad a EBA. Al evaluar el número total de vasos entre cerebros control y cerebros infectados de acuerdo a la localización del cisticerco, se encontraron diferencias significativas entre los quistes parenquimales y regiones control ($P = 0.001$, Tabla 8). De igual manera, los quistes clasificados como corticomeningeales presentaron diferencias significativas ($P = 0.0012$, Tabla 8) al ser comparados con regiones control. Lo mismo se encontró entre quistes ventriculares al compararlos con sus regiones control ($P = 0.0043$, Tabla 8).

Se evaluó la distribución espacial de los vasos con alteración en la expresión de EBA (vasos pocos reactivos) en cerebros infectados, para lo cual se realizó la medición de la distancia de estos vasos hasta el cisticerco (Figura 17). Se encontró que tanto los quistes parenquimales, corticomeningeales como ventriculares presentaba una distribución similar. Los vasos poco reactivos se concentran

alrededor de las 50um en la proximidad al parásito. No se encontró vasos poco reactivos a EBA después de 200um, teniendo como referencia a la proximidad del parásito (Figura 17).

Análisis por número de quistes

Dentro de los cerebros infectados 6 ratas presentaron 1 quiste, 3 ratas presentaron 2 quistes, 2 ratas presentaron 3 quistes, 1 rata presento 4 quistes y 1 rata presentó 5 quistes.

Se evaluó la inmunoreactividad para todos los marcadores empleados, por número de parásitos, mediante la prueba Kruskal Wallis, encontrándose diferencias estadísticamente significativas para los marcadores de VEGF-A ($P=0.0032$) y el número de vasos poco reactivos a EBA ($P=0.0146$), pero no para IgG ($P=0.0533$), FGF2 ($P=0.1662$) y Fibrinógeno ($P=0.4994$).

Teniendo en cuenta que la localización del cisticerco influye en la expresión de los marcadores analizados, se analizó la expresión de estos factores de acuerdo al número de quistes por cada localización del cisticerco, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los marcadores analizados.

Correlación entre marcadores angiogénicos y de disrupción de la BHE

Se evaluó la correlación entre los marcadores de disrupción de la BHE y los marcadores angiogénicos mediante el análisis de correlación de Spearman (Tabla 9). En este caso se sectorizó al tejido en 2 o 3 zonas alrededor del parásito, y se tomaron nuevas imágenes con el objetivo de 5X, de tal forma que cada zona poseía la misma región para cada uno de los marcadores analizados. En el caso del marcador EBA, debido a que no se logró observar los vasos poco reactivos a este marcador a una magnificación de 5X, no fue utilizado para el análisis de correlación.

Se encontró que en quistes parenquimales, hubo correlación estadísticamente significativa ($P=0.012$) entre los marcadores VEGF-A y fibrinógeno. En el caso de quistes corticomeningeales se encontró correlación significativa entre los marcadores VEGF-A y FGF2 ($P=0.025$), VEGF-A e IgG ($P=0.001$) y entre FGF2 y fibrinógeno ($P=0.046$).

Debido a que se encontró que quistes parenquimales y corticomeningeales presentaban un comportamiento muy similar en la mayoría de marcadores evaluados, se agrupó a estos datos y se calculó los valores de correlación. Se encontró correlación entre VEGF-A y FGF2 ($P=0.0411$), entre VEGF-A e IgG ($P=0.0007$), entre VEGF-A y Fibrinógeno ($P=0.0124$) y entre IgG y fibrinógeno ($P=0.0233$). Estos datos indican que existe cierto grado de asociación entre los

marcadores angiogénicos (VEGF-A) y el marcador de disrupción de BHE (IgG). En el caso de quistes ventriculares se encontró correlación significativa entre los valores de FGF2 e IgG ($P=0.005$) y entre FGF2 y fibrinógeno ($P=0.008$, Tabla 9).

FIGURAS

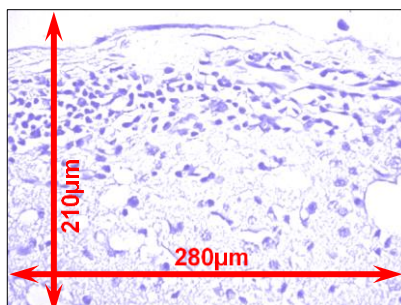


Figura 1. Área de imagen analizada. Objetivo 40X, para VEGF-A, FGF2, EBA, Fibrinógeno.

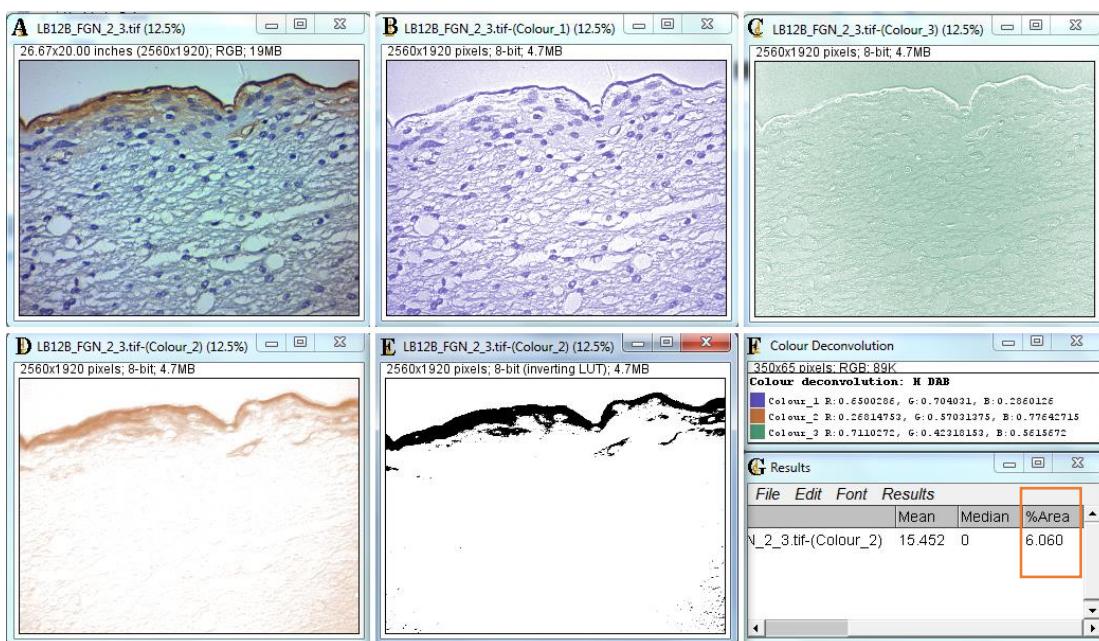


Figura 2. Procesamiento de imágenes para los marcadores VEGF-A, FGF2, Fibrinógeno, IgG. A, imagen adquirida en microscopio. B-D, resultado del método de deconvolución. E, imagen luego del ajuste automático y conversión en imagen binaria. F, ventana del programa mostrando los diferentes canales. G, resultado de cuantificación obtenida mostrando el porcentaje de área (recuadro rojo).

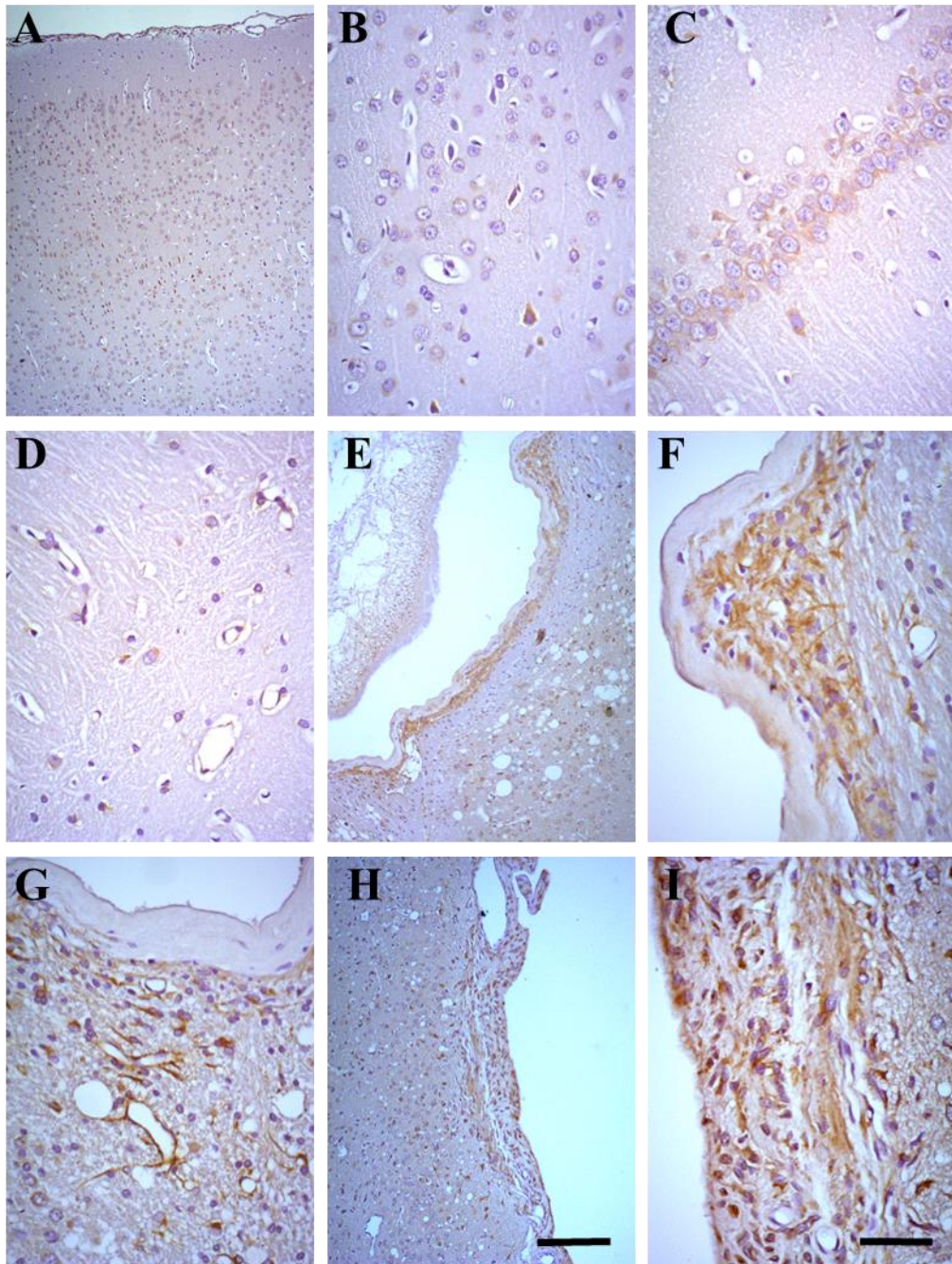


Figura 3. Expresión de VEGF (color marrón) en parénquima cerebral. A, E y H magnificación 100x, barra de escala 200µm. B, C, D, F, G e I magnificación 400x, barra de escala 50µm. A-D, cerebros no infectados. E, cerebro infectado de quistes parenquimales. F, magnificación de E. G muestra patrón de expresión de VEGF-A semejante a vasos. H, cerebro infectado de quiste corticomeningeal. I, ampliación de H.

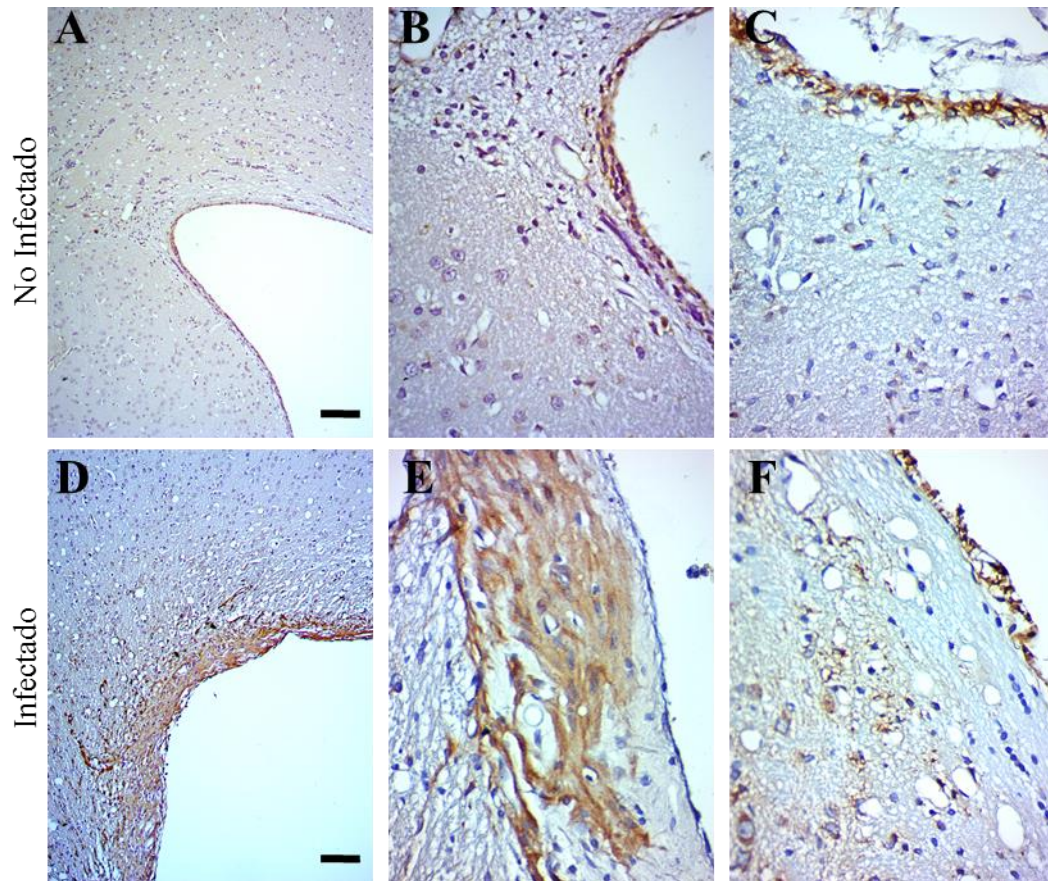


Figura 4. Expresión de VEGF (color marrón) en ventrículos cerebrales. A-C, Imágenes de cerebros no infectados. A, Ventrículo lateral. Magnificación 100x. B y C. Regiones subventriculares. Magnificación 400x. D-E, Imagen de regiones ventriculares de cerebros infectados. D, Ventrículo lateral con alta expresión de VEGF-A. Magnificación 100x. E, Magnificación de D. F, Niveles de VEGF en cerebros infectados con expresión normal a este marcador. E y F, magnificación de 400x.

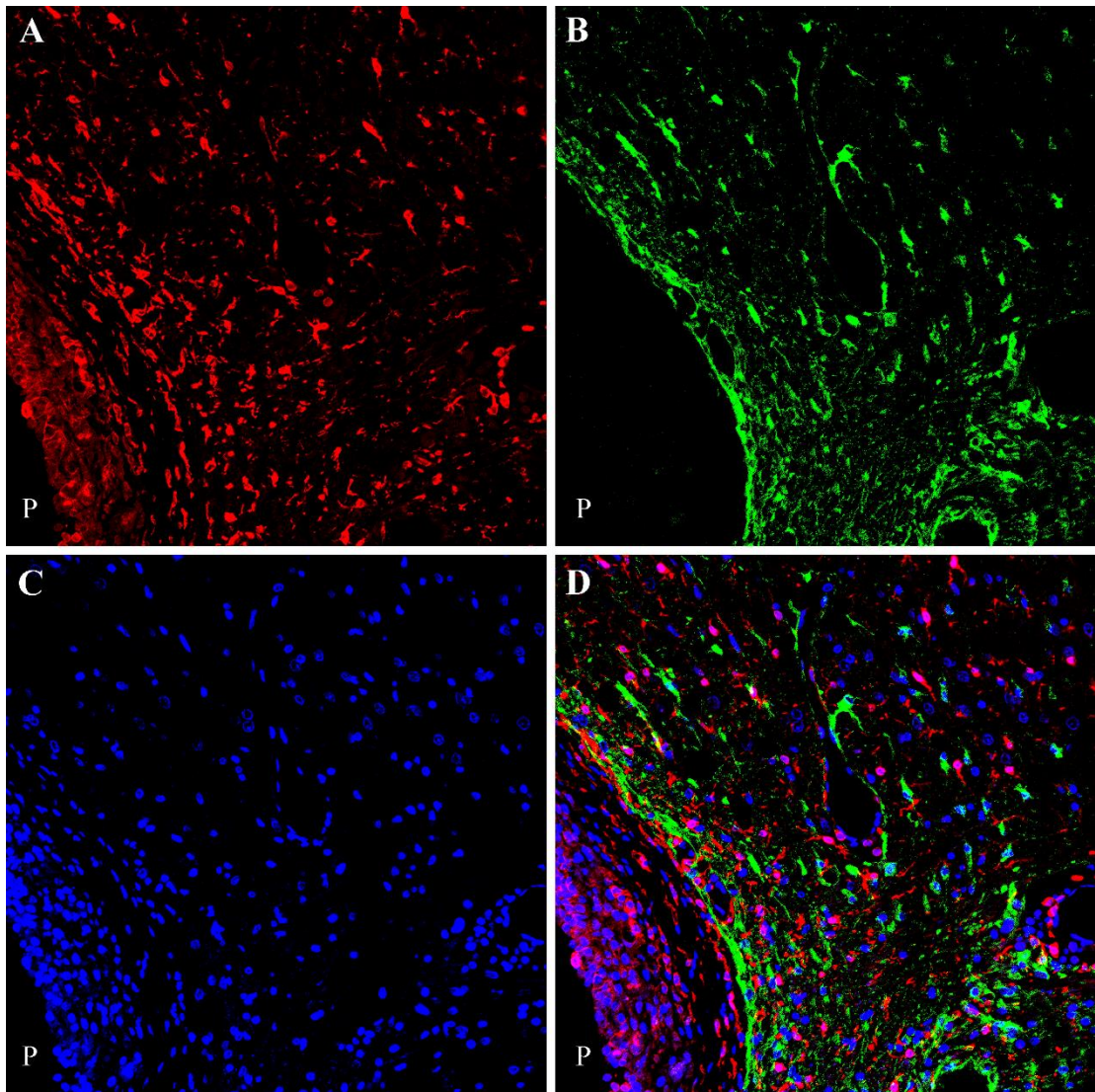


Figura 5. Imágenes de doble marcaje entre Iba-1 y GFAP alrededor del cisticerco de *T. solium*. A, marcador Iba-1 (rojo). B, marcador GFAP (verde). C, DAPI (azul). D, superposición de canales donde se logra diferenciar los tipos celulares, rojo y verde. Magnificación 200X

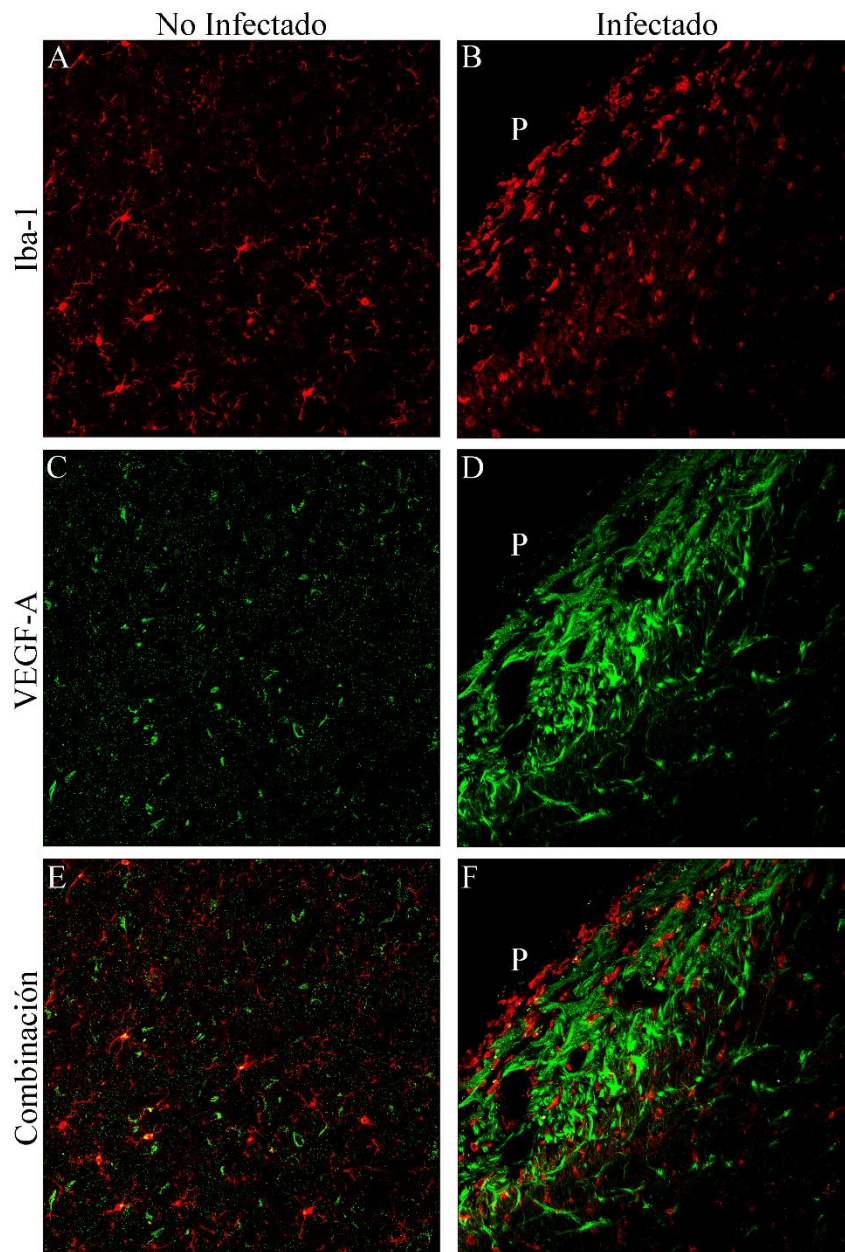


Figura 6. Doble marcaje entre Iba-1 y VEGF-A. Marcador Iba-1 (rojo) en cerebros no infectados, muestra las típicas ramificaciones de microglías (A, E), marcador VEGF-A (verde) en cerebros no infectados (C), muestra pocas células colocalizando con microglía (amarillo, E). Cerebros infectados muestra la pérdida de ramificaciones en microglías (B) y la sobreexpresión de VEGF-A (D). En la combinación de canales, no es evidente el color amarillo y es posible diferenciar el patrón de cada marcador (F).

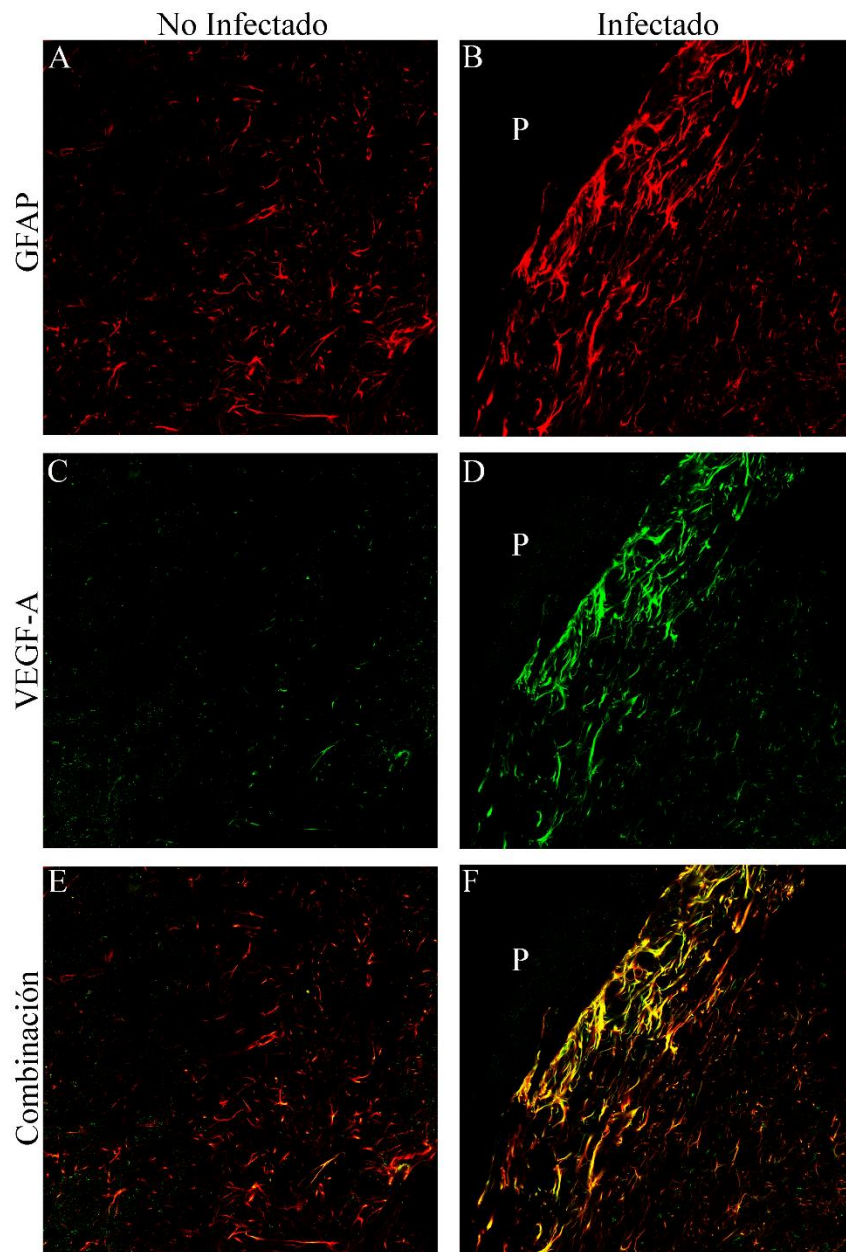


Figura 7. Doble marcaje entre GFAP y VEGF-A. Marcador GFAP (rojo) en cerebros no infectados, muestra la típica forma estrellada de astrocitos (A, E), marcador VEGF-A (verde) en cerebros no infectados (C), muestra un patrón de expresión similar a GFAP (amarillo, E). Cerebros infectados muestra la astrogliosis abundante (B) junto con la sobreexpresión de VEGF-A (D). En la combinación de canales, es evidente el color amarillo indicando colocalización de ambos marcadores (F).

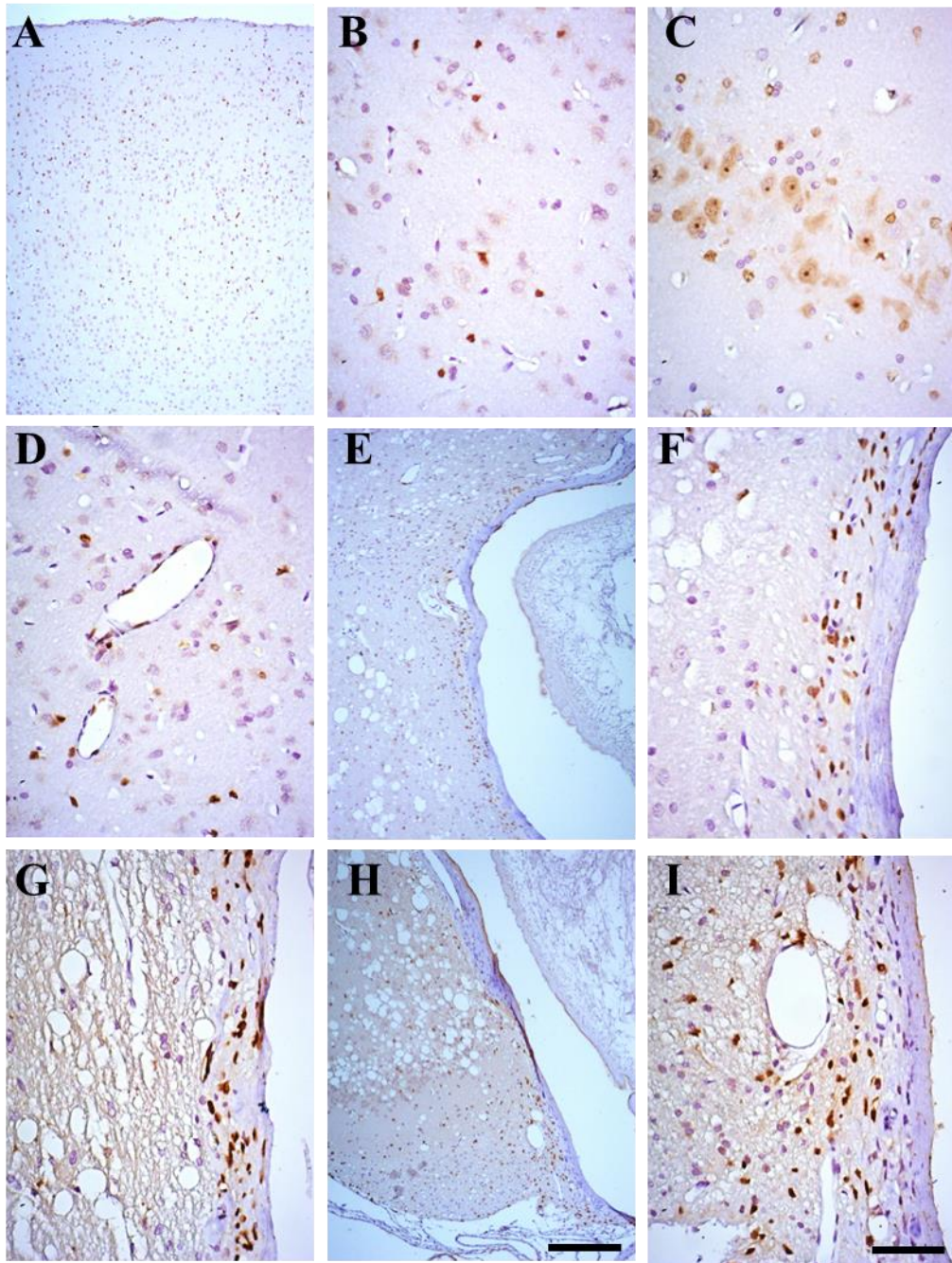


Figura 8. Expresión de FGF2 (color marrón) en parénquima cerebral. A, E y H, magnificación de 100x, barra de escala 200µm. B, C, D, F, G e I, barra de escala 50µm, magnificación de 400x. A-D, expresión de FGF2 en cerebros no infectados. E, sobreexpresión de FGF2 en quiste parenquimal. F, aumento de E, junto con G muestran agrupación de células positivas FGF2 agrupadas. H, sobreexpresión de FGF2 en quiste corticomeningeal. I, ampliación de H.

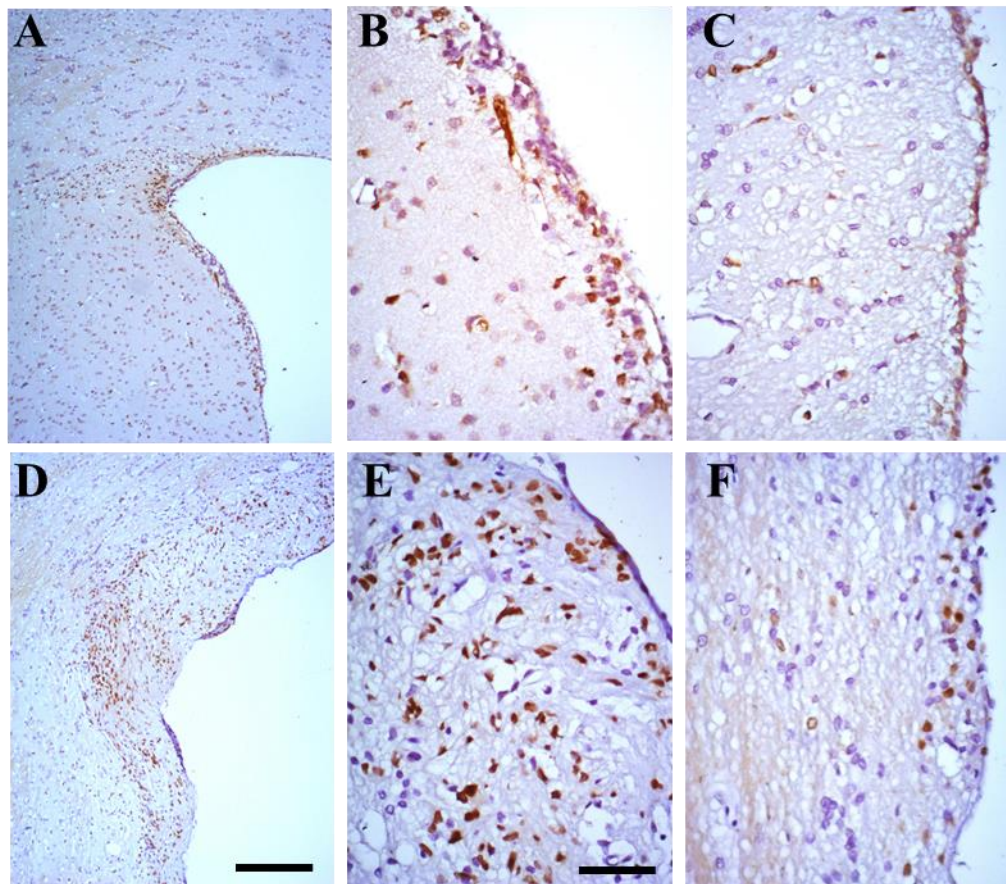


Figura 9. Expresión de FGF2 (color marrón) en ventrículos cerebrales. A-C, Imágenes de cerebros no infectados. A, Ventrículo lateral. B y C. Regiones ventriculares. Magnificación 400x. D-E, Imagen de regiones ventriculares de cerebros infectados. D, Ventrículo lateral con alta expresión de FGF-2. E, Magnificación de D, se observa alta expresión de esta proteína. F, Niveles de FGF en cerebros infectados con expresión normal a este marcador. A y D, magnificación de 100x, barra de escala 200µm. B, C, E y F, magnificación de 400x, barra de escala 50µm.

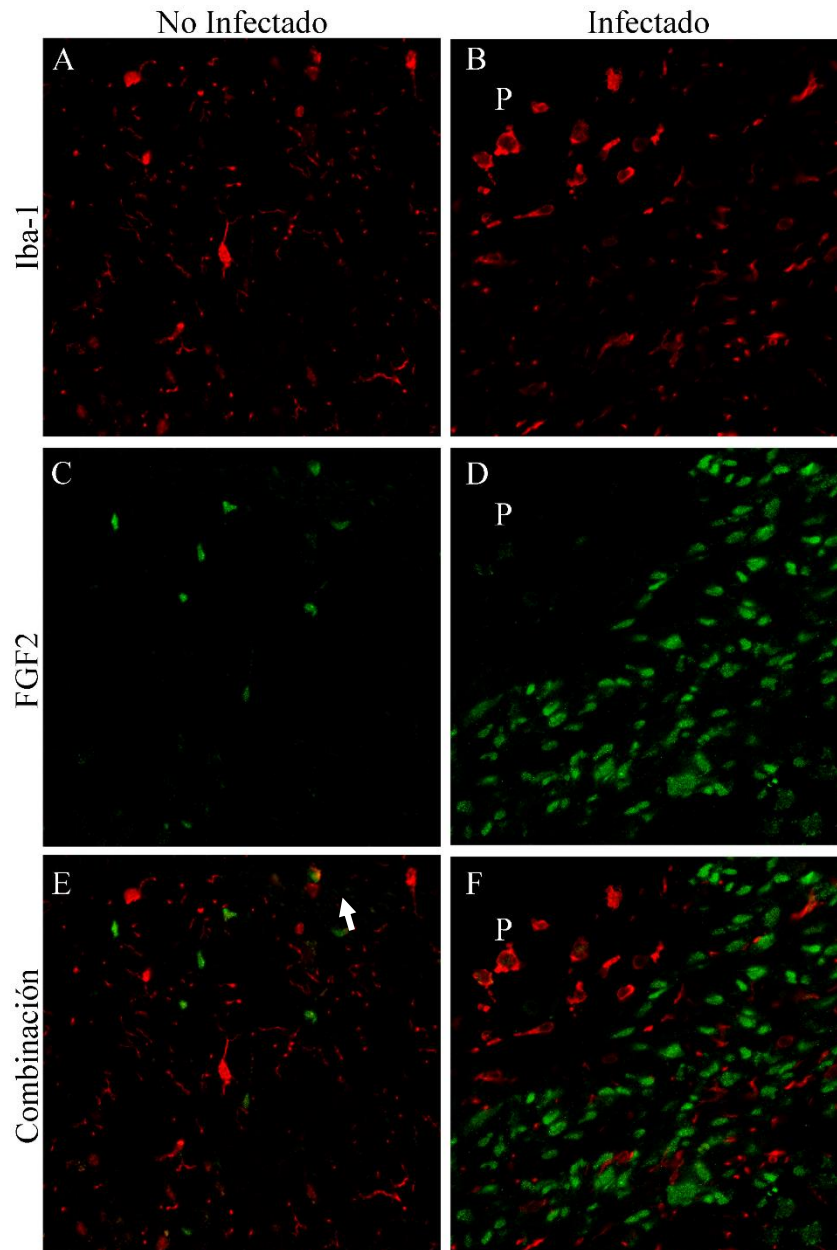


Figura 10. Doble marcaje entre Iba-1 y FGF2. A-E, Marcador Iba-1 (rojo) en cerebros no infectados, muestra las típicas ramificaciones de la microglía. C, marcador FGF2 (verde) en cerebros no infectados. E, muestra pocas células colocalizando con la microglía (flecha). B y D, cerebros infectados; se muestra la pérdida de ramificaciones en microglía (B) y la sobreexpresión de FGF2 (D). F, en la combinación de canales, no es evidente el color amarillo y es posible diferenciar el patrón de cada marcador.

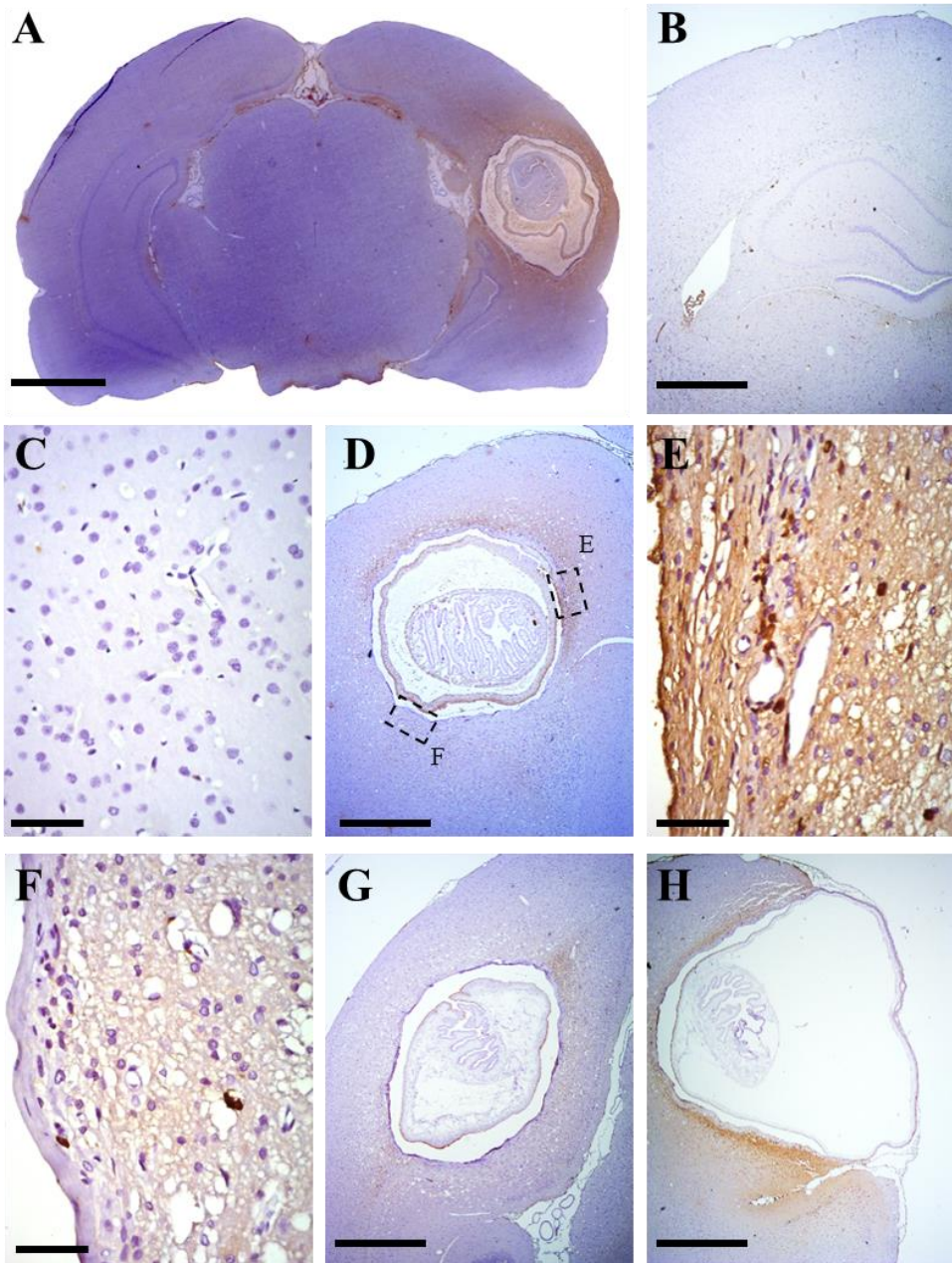


Figura 11. Expresión de IgG (color marrón) en parénquima cerebral. A, barra de escala 2mm. B, D, G y H, magnificación 25x, barra de escala 1mm. C, E y F magnificación 400x, barra de escala 50um. A, cerebro infectado muestra abundante reacción a IgG alrededor del cisticerco de *T. solium*. B, tejido no infectado. C, ampliación de B en región cortical. D, presencia de IgG de forma focalizada. E y F ampliación de D. G, quiste parenquimal con muy poca reacción a IgG. H, quiste corticomeningeal.

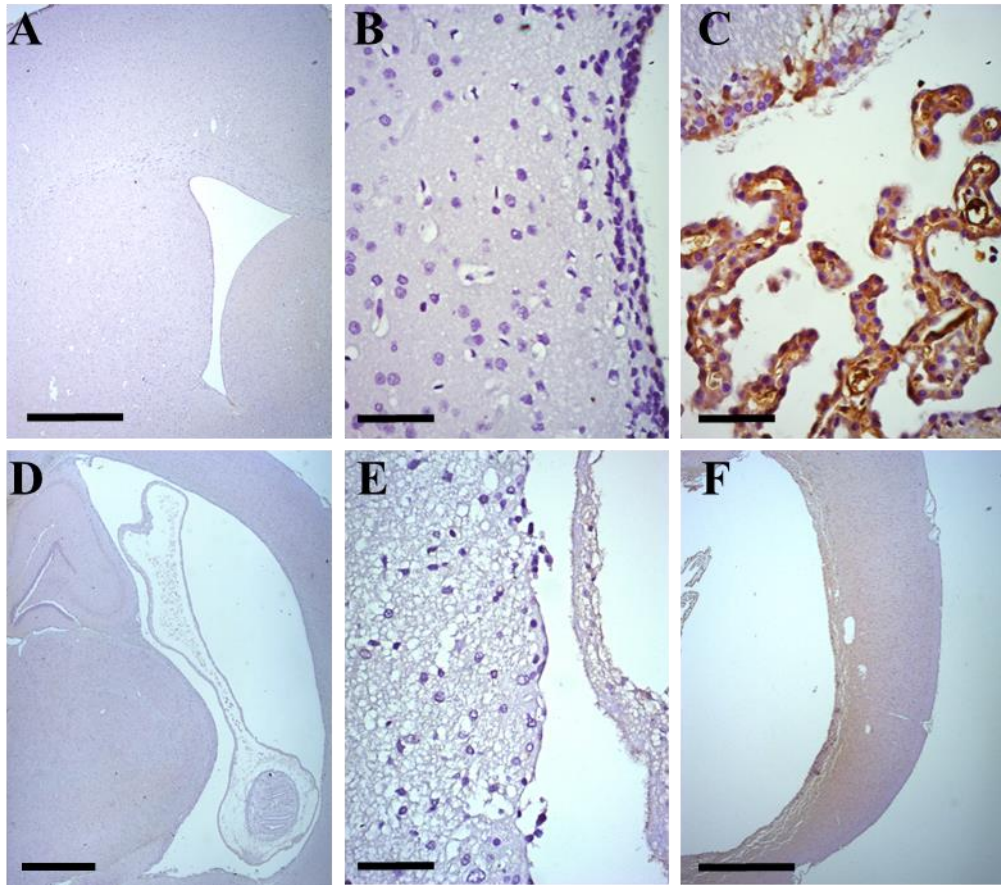


Figura 12. Expresión de IgG (color marrón) en ventrículos cerebrales. A, D, F magnificación 25x, barra de escala 1mm. B, C y E magnificación 400x, barra de escala 50µm. A, marcaje de IgG en cerebro no infectado. B, ampliación de A donde la presencia de IgG es casi ausente. C, presencia de IgG en plexo coroideo, mostrando la abundante inmunoreacción a esta proteína. D, cisticerco ventricular con muy poca reacción a IgG, E ampliación de D. F, región correspondiente a quiste ventricular con reacción a IgG.

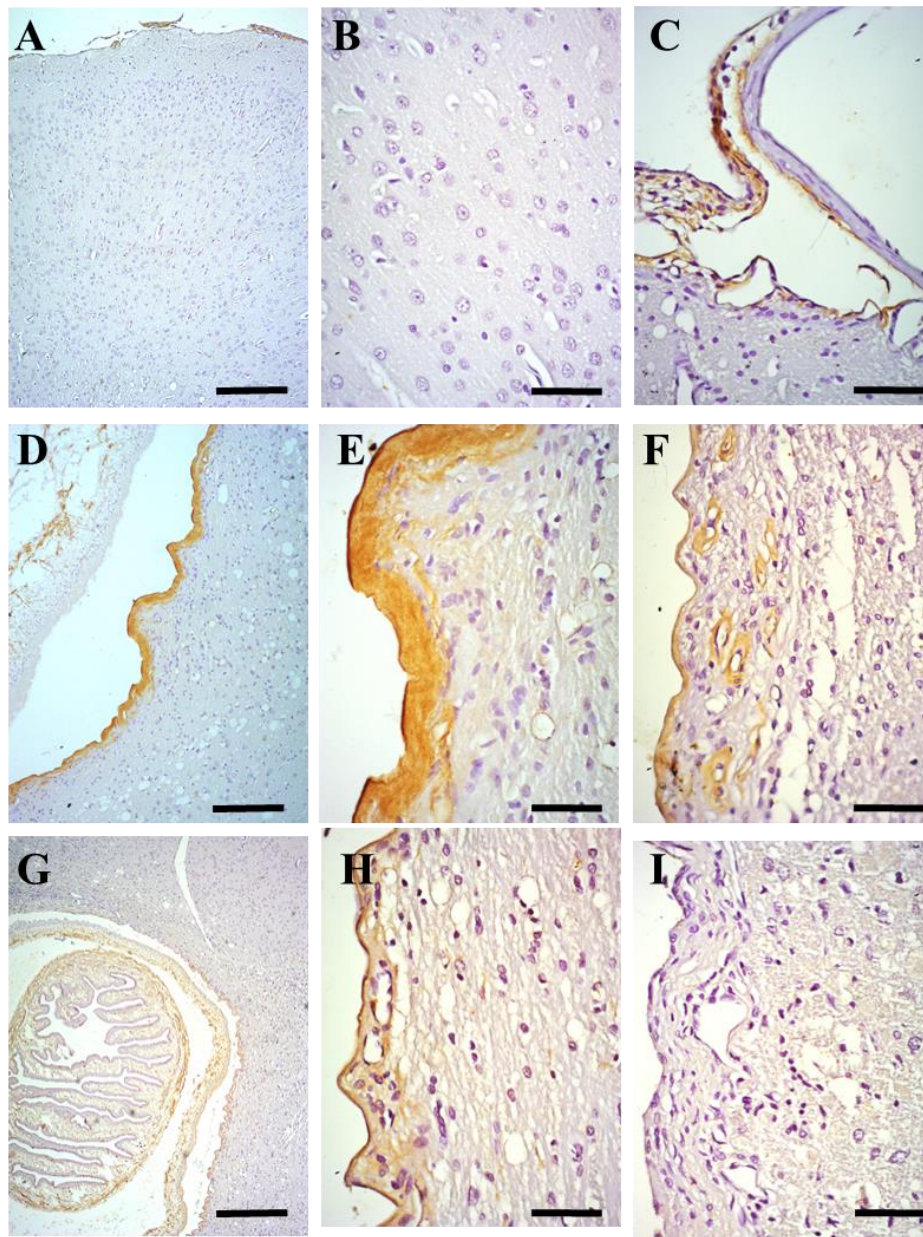


Figura 13. Expresión de fibrinógeno (color marrón) en parénquima cerebral. A, D y G magnificación 100x, barra de escala 200µm. B, C, E, F, H e I magnificación 400x, barra de escala 50µm. A, cerebro no infectado. B, magnificación de A. C, reacción a fibrinógeno en meninges. D, quiste parenquimal. E, ampliación de D, se observan fibras. F, tejido alrededor del parásito donde se muestran vasos engrosados. G, quiste que presenta reacción a fibrinógeno en distintas intensidades. H, ampliación de G con alta reacción a fibrinógeno. I, ampliación de G con leve reacción a fibrinógeno.

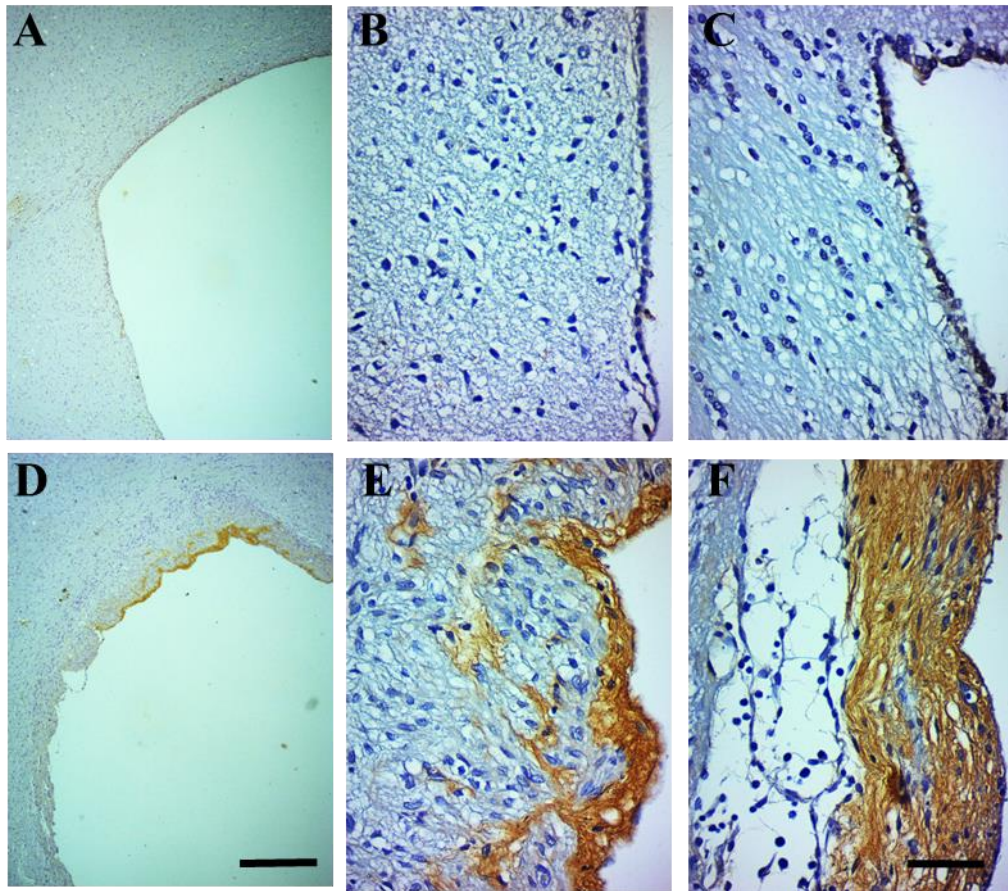


Figura 14. Expresión de Fibrinógeno (color marrón) en ventrículos cerebrales. A, inmunoreactividad a fibrinógeno en ventrículo de cerebros no infectados. B y C, ampliación de A, B, muestra poca reacción a fibrinógeno en células ependimarias. C, muestra evidencia de reacción a fibrinógeno en células ependimarias. D, cerebro infectado, se muestra la gran inmunoreactividad a Fibrinógeno alrededor de los ventrículos. E, ampliación de D. F, muestra la forma de fibras en el marcaje de fibrinógeno en tejido alrededor de ventrículos. A, D magnificación 100x, barra de escala 200um. B, C, E, F, magnificación 400x, barra de escala 50um.

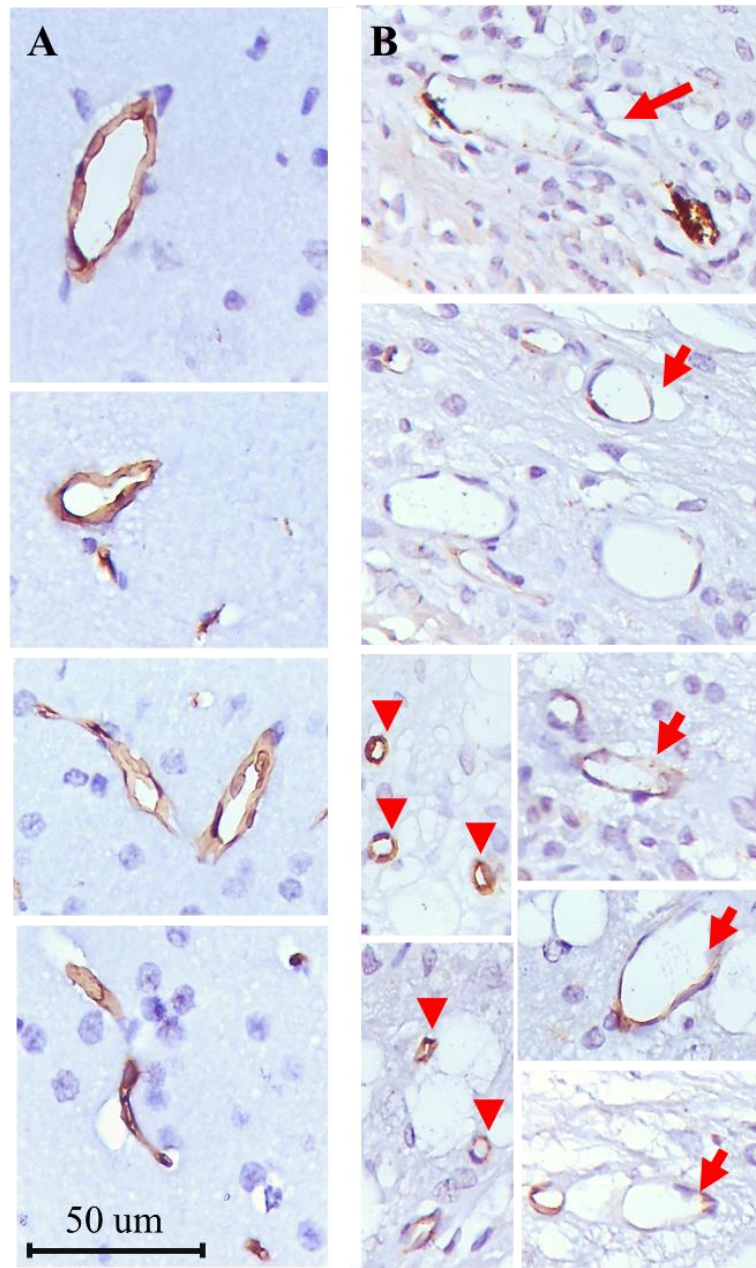


Figura 15. Caracterización del antígeno de barrera endotelial (color marrón). Imagen muestra en el panel izquierdo (A), vasos en cerebros no infectados, se puede observar vasos muy marcados para el antígeno de barrera endotelial (EBA). En el lado derecho (B) se observa vasos de cerebro infectado en la proximidad al cisticerco de *T. solium*, las flechas indican vasos poco reactivos a EBA y vasos con reactividad similar a lo encontrado en cerebros control (cabeza de flecha).

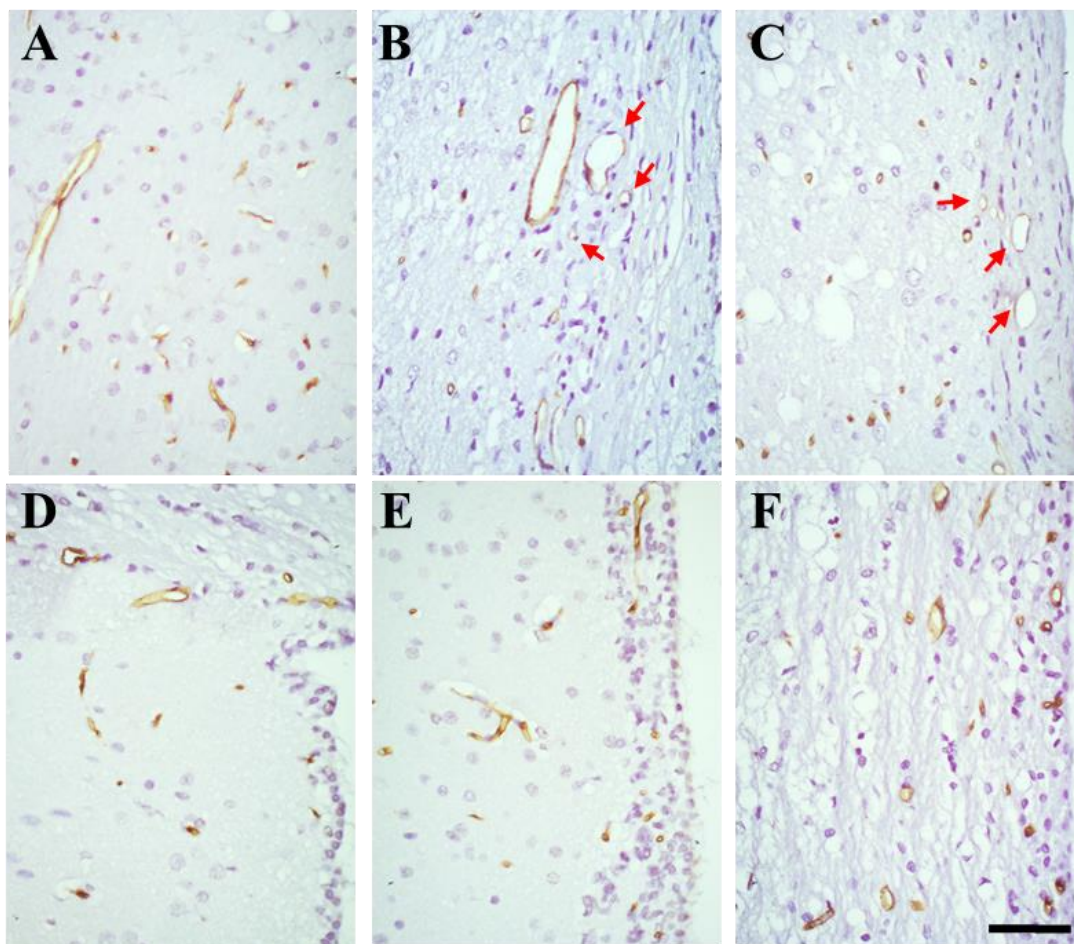


Figura 16. Expresión del antígeno de barrera endotelial (color marrón). A-F magnificación 400x, barra de escala 50um. A, tejido cortical de cerebro no infectado, muestra vasos muy reactivos. B y C, tejido infectado de quistes parenquimales y corticomeningeales, respectivamente, las flechas muestran vasos con poca reacción a EBA. D y E, tejido alrededor de ventrículos cerebrales de cerebros no infectados. F, tejido alrededor de ventrículos alrededor de ventrículos cerebrales en cerebros infectados.

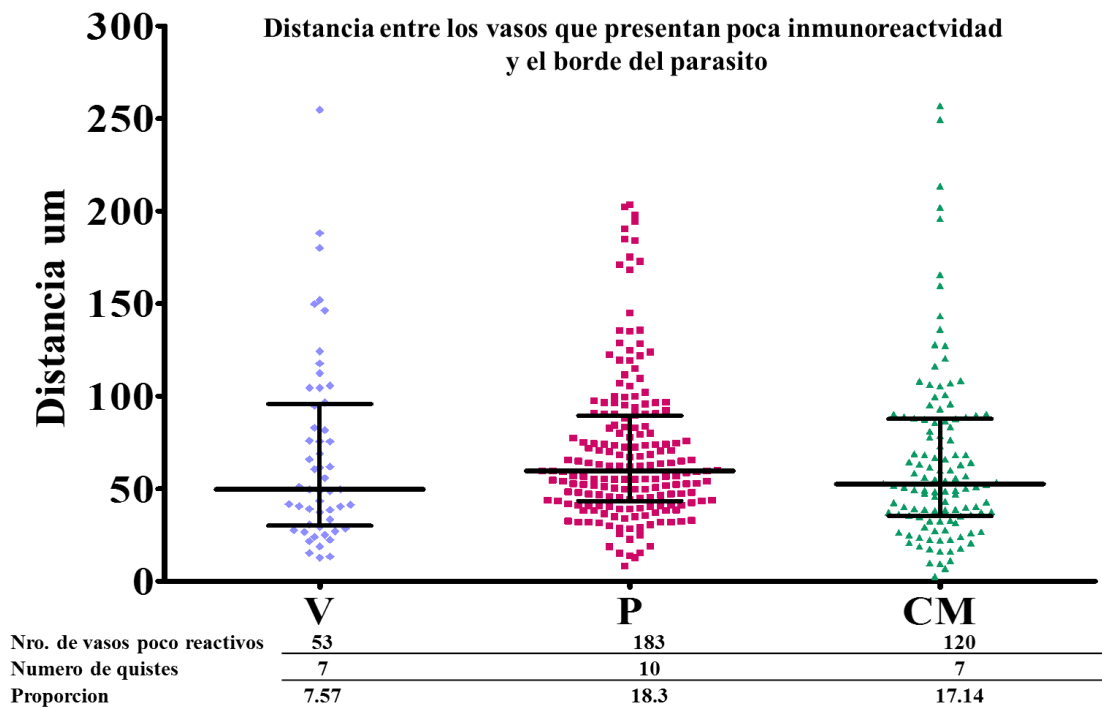


Figura 17. Distribución de vasos que presentan poca inmunoreactividad a EBA en cerebros infectados.

TABLAS

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Tabla 1. Número de quistes y cerebros control según localización

Localización	Número de quistes	Número de cerebros control
Ventrículo	8	6
Parénquima	11	9
Corticomeningeales	8	9

Se muestra la distribución de 27 quistes en 13 ratas infectadas. Para los cerebros control, se analizó 9 cerebros de ratas no infectadas. El área de corteza fue empleada para la comparación de los quistes localizados en parénquima como para los quistes clasificados como corticomeningeales. La región ventricular de estos 9 cerebros fue empleada para la comparación con los quistes localizados en los ventrículos.

Tabla 2. Resultados promedio de los marcadores empleados

Marcador	Porcentaje de área inmunoreactiva		Man-W (p-value)	Ratio Inf/N Inf
	Infectado (n)	No Infectado (n)		
VEGF-A	7.867 ± 1.346 (27)	2.105 ± 1.038 (12)	0.0005	3.74
FGF-2	0.811 ± 0.114 (26)	0.460 ± 0.071 (14)	0.0233	1.76
IgG	45.790 ± 4.902 (26)	5.145 ± 1.480 (10)	<0.0001	8.90
Fibrinogeno	3.683 ± 0.649 (25)	0.223 ± 0.130 (11)	<0.0001	16.51
EBA poco	1.344 ± 0.247 (25)	0.105 ± 0.043 (15)	0.0001	12.76

Se muestran los valores de inmunoreactividad promedio para los marcadores VEGF-A, FGF2, IgG y Fibrinógeno; el promedio de vasos poco reactivos a EBA (EBA poco). Se agrega el error estándar de la media como medida de dispersión.

(n) Representa el número de quistes analizados en el caso de tejido infectado, mientras que en tejido no infectado indica el número de secciones corticales y ventriculares analizadas.

Ratio Inf/Ninf, indica la división entre los valores encontrados para cada marcador entre cerebros infectados y no infectados.

P value, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney entre el grupo de animales infectados y no infectados.

EXPRESIÓN DE FACTORES PROANGIOGENICOS

Tabla 3. Comparación de la Inmunoreactividad a VEGF-A

Localización	Infectado (n)	No infectado(n)	P value ^a	R
Ventrículo	7.955 ± 1.820 (8)	4.459 ± 2.170 (5)	0.1073	1.78
Parénquima	9.147 ± 2.533 (11)	0.423 ± 0.105 (7)	0.0005	21.63
Corticomeninge	6.017 ± 2.447 (8)	0.423 ± 0.105 (7)	0.0012	14.23

P value ^b 0.3498 P value ^c 0.019

Tabla 4. Comparación de la Inmunoreactividad a FGF2

Localización	Infectado (n)	No infectado(n)	P value ^a	R
Ventrículo	0.694 ± 0.182 (8)	0.574 ± 0.173 (5)	0.6605	1.21
Parénquima	0.795 ± 0.099 (10)	0.397 ± 0.055 (9)	0.0033	2.00
Corticomeninge	0.949 ± 0.312 (8)	0.397 ± 0.055 (9)	0.1779	2.39

P value ^b 0.7225 P value ^c 0.641

Las tablas 3 y 4 muestran los valores de inmunoreactividad promedio a VEGF-A y FGF2, respectivamente y el error estándar de la media como medida de dispersión.

(n) Representa el número de quistes analizados en el caso de tejido infectado, mientras que en tejido no infectado indica el número de cerebros analizados.

P value ^a, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney entre el grupo de animales infectados y no infectados para cada localización.

P value ^b, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística Kruskal Wallis dentro del grupo de animales infectados.

P value ^c, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney dentro del grupo de animales no infectados.

R, representa el ratio entre los valores de inmunoreactividad por área de cerebros infectados, respecto al control.

EVALUACIÓN DE LA DISRUPCIÓN DE LA BHE

Tabla 5. Comparación de la Inmunoreactividad a IgG

Localización	Infectado (n)	No infectado(n)	P value ^a	R
Ventrículo	22.733 ± 5.004 (8)	3.030 ± 1.725 (2)	0.0367	7.50
Parénquima	57.963 ± 7.558 (11)	5.674 ± 1.793 (8)	0.0004	10.22
Corticomeninge	53.012 ± 6.337 (7)	5.674 ± 1.793 (8)	0.0012	9.34
	P value ^b 0.0036	P value ^c 0.794		

Tabla 6. Comparación de la Inmunoreactividad a Fibrinogeno

Localización	Infectado (n)	No infectado(n)	P value ^a	R
Ventrículo	2.389 ± 1.234 (7)	0.429 ± 0.270 (5)	0.1229	5.57
Parénquima	4.040 ± 1.029 (11)	0.052 ± 0.017 (6)	0.0009	78.45
Corticomeninge	4.415 ± 1.145 (7)	0.052 ± 0.017 (6)	0.0027	85.73
	P value ^b 0.2746	P value ^c 0.144		

Las tablas 5 y 6 muestran los valores de inmunoreactividad promedio a IgG y Fibrinógeno, respectivamente y el error estándar de la media como medida de dispersión.

(n) Representa el número de quistes analizados en el caso de tejido infectado, mientras que en tejido no infectado indica el número de cerebros analizados.

P value ^a, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney entre el grupo de animales infectados y no infectados para cada localización.

P value ^b, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística Kruskal Wallis dentro del grupo de animales infectados.

P value ^c, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney dentro del grupo de animales no infectados.

R, representa el ratio entre los valores de inmunoreactividad por área de cerebros infectados, respecto al control.

Tabla 7. Promedio de vasos con poca inmunoreactividad al Antígeno de Barrera Endotelial

Localización	Infectado (n)	No infectado(n)	P value ^a	R
Ventrículo	0.270 ± 0.165 (7)	0.125 ± 0.085 (6)	0.3036	2.16
Parénquima	1.577 ± 0.399 (11)	0.092 ± 0.049 (9)	0.0015	17.10
Corticomeninge	2.053 ± 0.372 (7)	0.092 ± 0.049 (9)	0.0008	22.26
	P value ^b 0.0054	P value ^c 0.798		

Tabla 7. Representa el promedio del conteo de vasos poco inmunoreactivos al antígeno de barrera endotelial y el error estándar de la media como medida de dispersión.

Tabla 8. Promedio de vasos inmunoreactivos al Antígeno de Barrera Endotelial

Localización	Infectado (n)	No infectado(n)	P value ^a	R
Ventrículo	19.605 ± 0.991 (7)	14.372 ± 1.214 (6)	0.0043	1.36
Parénquima	22.222 ± 1.860 (11)	36.077 ± 0.739 (9)	0.001	0.62
Corticomeninge	22.717 ± 1.818 (7)	36.077 ± 0.739 (9)	0.0012	0.63
	P value ^b 0.4068	P value ^c 0.002		

Tabla 8. Representa al promedio del conteo de vasos inmunoreactivos al antígeno de barrera endotelial y el error estándar de la media como medida de dispersión

(n) Representa el número de quistes analizados en el caso de tejido infectado, mientras que en tejido no infectado indica el número de cerebros analizados.

P value ^a, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney entre el grupo de animales infectados y no infectados para cada localización.

P value ^b, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística Kruskal Wallis dentro del grupo de animales infectados.

P value ^c, representa los valores de P value obtenidos en la prueba estadística U de Mann-Whitney dentro del grupo de animales no infectados.

R, representa el ratio entre los valores de inmunoreactividad por área de cerebros infectados, respecto al control.

Tabla 9. Análisis de Correlación entre marcadores angiogénicos y de disrupción de BHE

		Parenquimal (P)			Corticomeningeal (CM)			P + CM			Ventricular		
Correlación entre:		Rho	P	n	Rho	P	n	Rho	P	n	Rho	P	n
VEGF-A	FGF2	0.156	0.537	18	0.488	0.025	21	0.329	0.0411	39	0.451	0.106	14
VEGF-A	IgG	0.339	0.216	15	0.673	0.001	21	0.541	0.0007	36	0.310	0.281	14
VEGF-A	Fgn	0.609	0.012	16	0.196	0.394	21	0.407	0.0124	37	0.523	0.054	14
FGF2	IgG	-0.114	0.622	21	0.440	0.046	21	0.180	0.2532	42	0.706	0.005	14
FGF2	Fgn	-0.260	0.242	22	0.233	0.311	21	-0.079	0.6153	43	0.679	0.008	14
IgG	Fgn	0.421	0.073	19	0.408	0.067	21	0.358	0.0233	40	0.341	0.233	14

Se muestran los valores del índice de correlación de Spearman (Rho), el valor del P-value (P) y el número de áreas de tejido alrededor del quiste analizado (n). VEGF-A (Factor de crecimiento vascular endotelial A), FGF2 (Factor de crecimiento de fibroblastos 2), IgG (Inmunoglobulina G), Fgn (Fibrinógeno).

DISCUSIÓN

En este estudio encontramos que VEGF-A y FGF2 se encuentran sobreexpresados en el tejido adyacente al cisticerco de *T. solium* y que la expresión de estos factores angiogénicos varía dependiendo de la localización del parásito. De tal forma que tanto VEGF-A como FGF2 se encuentran sobreexpresados en quistes parenquimales, mientras que solo VEGF-A se encuentra sobreexpresado en quistes corticomeningeales, no encontrándose diferencias en la expresión de estos marcadores en quistes ventriculares. Se comprobó que la mayor parte de VEGF encontrado colocaliza con el patrón de expresión de GFAP (astrocitos), mas no con Iba-1 (microglía).

La presencia de IgG alrededor de los cisticercos de *T. solium* y la presencia de vasos con disminución en la expresión del antígeno de barrera endotelial, sugieren el compromiso de la BHE en el tejido adyacente al cisticerco. En el caso del fibrinógeno se esperaba encontrar la presencia de esta proteína en forma difusa alrededor de los vasos cercanos al parásito, lo que permitiría reforzar los resultados hallados con los otros marcadores de disrupción de BHE, sin embargo la mayor inmunoreacción a fibrinógeno se concentró en la fibrosis. El encontrar al fibrinógeno dentro de la fibrosis, podría indicar que esta proteína puede servir como portador de TGF- β sanguíneo, induciendo a la formación de astrogliosis promoviendo así la formación de la cicatriz glial (74).

VEGF es el principal biomarcador de angiogénesis, debido a que el incremento de VEGF en tejido cerebral induce la proliferación de la vasculatura (84). Su sobreexpresión ha sido asociada a muchas neuropatologías; sin embargo, la contribución de esta proteína en la patología de NCC, aún no ha sido estudiada. Recientes investigaciones muestran que la angiogénesis está asociada con la disrupción de la BHE y que esta podría estar asociada a epilepsia del lóbulo temporal (85). Por lo que estudiar la asociación entre angiogénesis y disrupción de la BHE podría ser un nuevo motivo de investigación en pacientes con NCC que presentan epilepsia. Si bien es cierto la presente investigación, no muestra la presencia de angiogénesis *per se*, el hallazgo del aumento de marcadores angiogénicos nos indica que podría existir remodelamiento vascular y angiogénesis. Por lo que sería necesario un siguiente estudio donde se evalúe la densidad vascular en este modelo.

Los resultados encontrados permiten observar la sobreexpresión de VEGF-A en la astrogliosis. Existen investigaciones que asocian la sobreexpresión de VEGF en astrocitos con la disrupción de la BHE (76–78,86). Esto es debido a la interacción permanente entre los pies de astrocitos y el endotelio vascular, cuya interacción en condiciones normales contribuye con el mantenimiento de las propiedades de BHE (87–89). VEGF es un factor mitogénico, y estudios *in vitro* han demostrado que este factor aumenta la proliferación y movilidad de astrocitos. En modelos de hipoperfusión crónica en ratas, se encuentra que la sobreexpresión de VEGF correlaciona con la angiogénesis, sin embargo no encuentran evidencia

de reactividad astrocitaria (90). Además de los astrocitos, muchas otras de las células del sistema nervioso central pueden producir VEGF-A, tales como microglía, oligodendrocitos, neuronas, células endoteliales, pericitos y células ependimarias. Nuestros resultados muestran que en cerebros control existe una alta expresión de VEGF-A en regiones circunventriculares. Sin embargo, en esta investigación encontramos que en tejido alrededor del cisticerco, la mayor inmunoreactividad encontrada colocaliza con los astrocitos, mas no con la microglía, reflejando el rol importante de esta célula en esta patología.

Teniendo en cuenta que en la NCC existe una gran respuesta inflamatoria, la inflamación también podría contribuir con la producción de los factores angiogénicos reportados en este estudio. En procesos inflamatorios, la angiogénesis es iniciada por diferentes poblaciones celulares como macrófagos, mastocitos, fibroblastos y células endoteliales (91). Estas células producen factores angiogénicos como VEGF, FGF, PDGF, TNF-a entre otros por lo que es necesario establecer si existe asociación entre la inflamación encontrada en NCC y la expresión de los marcadores angiogénicos encontrados (92). Un punto a tomar en cuenta es el efecto de la inflamación crónica presente en NCC, donde recientes investigaciones indican que la angiogénesis acompañada a la inflamación crónica, tiende a intensificar y prolongar la respuesta inmune (91,93). Un ejemplo de la relación entre VEGF y la inflamación, es el efecto de la IL-1 β que en astrocitos induce la expresión de VEGF (86). Los factores angiogénicos también modulan la

respuesta inmune, como la Angiopoyetina-2 (modulador angiogénico), la cual puede incrementar la respuesta inmune (94,95).

La alteración de vasos en el sistema nervioso central y la disrupción de la BHE son características que empeoran los procesos patológicos en diferentes enfermedades del sistema nervioso central. Además se ha reportado que la angiogénesis podría cumplir un rol común en distintas patologías, tales como los accidentes cerebrovasculares, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y en distintos tumores cerebrales (47,96–98). El rol de la angiogénesis en estas patologías parece depender de la duración de la enfermedad, es así que en los accidentes cerebrovasculares se reporta que el incremento en la densidad vascular alrededor de la zona infartada correlaciona con la supervivencia después del infarto. Estudios preclínicos revelan que la administración de VEGF podría mejorar el pronóstico en pacientes mientras que el tratamiento con inhibidores de VEGF agravaría la clínica y la patología de esta lesión (99,100), esto debido a que el VEGF incrementa la neurogénesis al promover la diferenciación y maduración de progenitores neurales. En el caso de la enfermedad de Alzheimer existe asociación entre el deterioro cognitivo y la alteración vascular, por lo que se discute el rol de las isoformas de VEGF y las variantes de este gen como posibles factores de riesgo para esta enfermedad (101). En modelos animales de epilepsia de lóbulo temporal, se ha encontrado que la inhibición de VEGF-A restaura las propiedades de BHE, incrementando la expresión de las proteínas de unión estrecha (54). De igual forma en el modelo de

epilepsia usando pilocarpina se encuentra que ratas tratadas con un inhibidor de VEGF-A (Sunitinib), no desarrollan convulsiones (102).

El anticuerpo empleado para las inmunohistoquímica, detecta las isoformas de VEGF 189, 164, 121, 206 y 145 (Abcam). Sería necesario diferenciar el tipo de isoforma presente en nuestro modelo debido a que esto podría brindar una aproximación de la función que cumple esta proteína en la NCC, explicando si este marcador actúa directamente en la inducción de angiogénesis o no, debido a que VEGF-A presenta isoformas angiogénicas e isoformas antiangiogénicas (103).

FGF2 se encuentra expresado en muchos tipos celulares dentro del cerebro como, astrocitos, células endoteliales de capilares, pericitos y neuronas (63,104). Si bien es cierto se ha encontrado la presencia de este factor alrededor del cisticerco, este no ha sido encontrado de forma abundante como se encuentra VEGF-A. Sin embargo, FGF2 estimula la inducción paracrina de VEGF-A. No se encontró colocalización entre este marcador y la microglía. Es muy probable que esta proteína se sobreexpresen en astrocitos, debido a que normalmente estas células expresan FGF2 (105). Además, FGF2 es un potente factor mitogénico y este factor regula la proliferación en astrocitos (106). La sobreexpresión de FGF2 encontrada alrededor del cisticerco podría explicar la alta presencia de gliosis en NCC. Estudios en tejidos de pacientes con epilepsia muestran sobreexpresión de FGF2 (107), y su sobreexpresión incrementa la excitabilidad y susceptibilidad a convulsiones, sin embargo previene la muerte celular (81).

La literatura menciona que existen parásitos helmínticos que tienen la capacidad para inducir angiogénesis por parte del tejido del hospedero (108) por lo que no se podría descartar que el cisticerco de *T. solium* induzca la expresión de factores angiogénicos en NCC. En *Echinococcus multilocularis*, (cestodo que causa echinococosis alveolar humana), se ha encontrado gran cantidad de nuevos vasos dentro del granuloma y se cree que proteínas del parásito homólogas a factores angiogénicos podrían inducir angiogénesis (109).

Nuestros resultados muestran que existe presencia de IgG en el parénquima cerebral de cerebros de rata infectadas, lo que sugiere la alteración de la permeabilidad de la BHE, sin embargo los resultados podrían ser cuestionables debido a la presencia de células inflamatorias que se encuentran al alrededor del cisticerco de *T. solium*. Teniendo en cuenta que la patología de NCC depende de la inflamación, es posible que la infiltración de células plasmáticas contribuya con la presencia de IgG encontrada o que también las células marcadas correspondan a macrófagos que endocitan esta proteína. Por otro lado, la inflamación también contribuye con la disrupción de la BHE. Por lo que la principal deficiencia de este estudio radica en no haber incluido la evaluación del conteo de células inflamatorias en los quistes analizados.

En esta investigación el estudio de la disrupción de la BHE se encuentra acompañado por un segundo marcador (EBA) (75), si bien es cierto se desconoce la función que ejerce esta proteína en la integridad de la BHE, numerosos artículos

mencionan que esta proteína disminuye o deja de expresarse cuando existe compromiso o alteración de esta barrera (110–113). Nuestros resultados muestran que ciertos vasos no se tiñen en presencia de este marcador indicando la alteración de estos. A pesar de que la expresión de EBA no es homogénea en todo el endotelio vascular de cerebros normales (114), fue evidente encontrar baja expresión de EBA en los vasos del tejido que bordea al parásito en comparación a lo encontrado en el grupo control. No hay estudios en biopsias humanas con NCC donde se halla usado a EBA como marcador de alteración de la permeabilidad de la BHE, sin embargo se ha reportado el engrosamiento y alteración de vasos en biopsias humanas (31). La alteración de las capas que recubren los vasos sanguíneos de pacientes con NCC podría contribuir con la disrupción de la BHE tal como ocurre en distintas patologías (77,78, 96-98).

Se ha demostrado que existe disrupción de la BHE en el modelo natural de NCC en cerdo, observándose extravasación de Evans blue, lo cual podría indicar extravasación de albumina (9). En dicho estudio, se encontró que 38 cisticercos de 108 presentaban tinción con Evans blue, estos datos podrían indicar que cerdos infectados presentan bajo porcentaje de disrupción en la BHE, mientras que en el presente estudio usando cerebros de ratas con NCC se encuentra que más del 90% de cisticercos analizados (parenquimales y corticomeningeales) presentan alteración de la BHE. Estas diferencias pueden deberse a las técnicas empleadas en ambos estudios. La evaluación de la técnica por Evans blue al ser analizada macroscópicamente podría presentar baja sensibilidad al evaluar la disrupción de la

BHE. Mientras que el uso del marcador EBA, IgG, and fibrinógeno al ser evaluados microscópicamente podrían ser más sensibles en detectar disrupción de BHE (74, 112, 114, 115), lo cual refuerza la idea de que existe compromiso de la integridad de la BHE. Sería interesante hacer un estudio comparativo usando Evans blue y marcadores usados en el presente estudio.

Nuestros resultados muestran mayor expresión de marcadores angiogénicos (VEGF-A y FGF2) en comparación a las regiones control, así como mayor abundancia de IgG, aumento en la cantidad de vasos poco reactivos a EBA y mayor cantidad de fibrinógeno en quistes parenquimales y corticomeningeales. Indicando que en quistes parenquimales y corticomeningeales la respuesta celular encontrada es más exacerbada a diferencia de los quistes ventriculares. Esto puede ser debido al estrecho contacto entre el parásito y el tejido cerebral, donde las células son más sensibles a la lesión tisular. Es evidente que no se encuentra mayor compromiso de la integridad de la BHE en quistes ventriculares, detectado por el marcador EBA e IgG. Posiblemente debido a que las células ependimarias presentan una respuesta celular diferente por ser parte de la barrera cerebroventricular. Otro segundo punto a tomar en cuenta, es la presencia del líquido cefalorraquídeo, que podría hacer que antígenos del parásito se diluyan y no logren desencadenar una respuesta alrededor al ventrículo. Además, el contacto parásito hospedero podría mediar lo encontrado en quistes corticomeningeales y parenquimales.

Los resultados del análisis por número de quistes indican que la expresión de los marcadores VEGF y EBA varía dependiendo de la cantidad de quistes presentes, por lo que es posible que exista un incremento en la respuesta celular en todo el cerebro. Sin embargo, debido al poco número de ratas analizadas, no se puede realizar conclusiones precisas.

El encontrar correlación entre los factores angiogénicos y los marcadores de disrupción de la BHE indica que existe algún tipo de asociación entre estas variables. Sin embargo, no muestra relación causal acerca de que si el aumento de marcadores angiogénicos provoca la disrupción de la BHE o viceversa. La sobreexpresión de factores angiogénicos que pueden reflejar un mecanismo compensatorio producto de la lesión. Por lo que es necesario nuevos estudios que permitan profundizar en este tema.

El presente estudio muestra que existe sobreexpresión VEGF-A y FGF2 en NCC, y es el primer estudio en NCC que encuentra la presencia de marcadores angiogénicos sobreexpresados en esta enfermedad. Debido a la gran importancia en rol que cumplen estas proteínas en procesos de supervivencia celular, proliferación, inflamación y su asociación con distintas patologías del sistema nervioso central, resulta de gran importancia el desarrollo de más estudios en este campo.

CONCLUSIONES

1. VEGF-A se encuentra sobreexpresado en el tejido cerebral que rodea al parásito, es expresado principalmente por astrocitos, y su nivel de expresión varía dependiendo la localización del cisticerco.
2. FGF2 se encuentra sobreexpresado en tejido cerebral que rodea al parásito y no se observó expresión de esta proteína en la microglías.
3. IgG se encuentra presente en el tejido cerebral que rodea al parásito, mas no en el tejido cerebral de ratas no infectadas.
4. El fibrinógeno se encuentra presente en abundancia dentro de la fibrosis.
5. Existe mayor número de vasos poco reactivos a EBA en el tejido cerebral que rodea al parásito.
6. Existe correlación entre los valores de inmunoreactividad a IgG y el marcador VEGF-A en quistes corticomeningeales.

BIBLIOGRAFIA

1. Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, et al. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ.* 2000;78(3):399-406.
2. White AC. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1997;24(2):101-113-115.
3. DeGiorgio CM, Medina MT, Duron R, Zee C, Escueta SP. Neurocysticercosis. *Epilepsy Curr.* 2004;4(3):107-11.
4. Alvarez JI, Londoño DP, Alvarez AL, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis. *J Comp Pathol.* 2002;127(2-3):186-93.
5. Sikasunge CS, Johansen MV, Phiri IK, Willingham AL, Leifsson PS. The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood-brain barrier permeability. *Vet Parasitol.* 2009;160(3-4):242-50.
6. 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.* 2013;134(4):443-6.
7. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun.* 2001; 69(7):4554-60.
8. Del Brutto OH. Cysticercosis and cerebrovascular disease: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992; 55(4):252-4.
9. Marzal M, Guerra-Giraldez C, Paredes A, Cangalaya C, Rivera A, Gonzalez AE, et al. Evans blue staining reveals vascular leakage associated with focal areas of host-parasite interaction in brains of pigs infected with *Taenia solium*. *PloS One.* 2014;9(6):e97321.
10. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003;9(6):653-60.
11. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, et al. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *Am J Pathol* 2015;185(8):2259-68.
12. World Health Organization. Preventable epilepsy: *Taenia solium* infection burdens economies, societies and individuals: a rationale for investment and

action. [Internet]. 2016 [citado 13 de junio de 2016]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204716/1/9789241549486_eng.pdf

13. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VCW, et al. Epidemiology and control of cysticercosis in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010;27(4):592-7.
14. World Health Organization, editor. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: oodborne disease burden epiemiology reference group 2007-2015. Geneva: World Health Organization; 2015.
15. Ndimubanzi PC, Carabin H, Budke CM, Nguyen H, Qian Y-J, Rainwater E, et al. A Systematic Review of the Frequency of Neurocysticercosis with a Focus on People with Epilepsy. Preux P-M, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e870.
16. Nash TE, Garcia HH. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(10):584-94.
17. Mac Arthur WP. Cysticercosis as seen in the British Army, with special reference to the production of epilepsy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1934;27(4):343-57.
18. Henneberg R. Die tierischen Parasiten des Zentralnervensystems. En: Antoni N, Henneberg R, McLean AJ, Wartenberg R, editores. *Raumbeengende Prozesse* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1936 [citado 16 de junio de 2016]. p. 286-352. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-99698-6_4
19. Chandy MJ, Rajshekhar V, Prakash S, Ghosh S, Joseph T, Abraham J, et al. Cysticercosis causing single, small CT lesions in Indian patients with seizures. *Lancet Lond Engl*. 1989;1(8634):390-1.
20. 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. Garcia HH, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0003980.
21. Del Brutto OH. Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited. *Pathog Glob Health*. 2012;106(5):299-304.
22. Shetty G, Avabratha KS, Rai BS. Ring-enhancing lesions in the brain: a diagnostic dilemma. *Iran J Child Neurol*. 2014;8(3):61-4.
23. Chawla S, Husain N, Kumar S, Pal L, Tripathi M, Gupta RK. Correlative MR imaging and histopathology in porcine neurocysticercosis. *J Magn Reson Imaging*. 2004;20(2):208-15.
24. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, et al. Correlation of VEGF and Angiopoietin Expression With Disruption of

- Blood??Brain Barrier and Angiogenesis After Focal Cerebral Ischemia: *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;379-92.
25. Matos-Silva H, Reciputti BP, Paula EC de, Oliveira AL, Moura VBL, Vinaud MC, et al. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. *Arq Neuropsiquiatr.* 2012;70(4):287-92.
 26. Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, Mishra PK, Teale JM. *Mesocostoides corti* intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. *Parasitology.* 2010;137(3):359-72.
 27. Mendlovic F, Garza-Rodríguez A, Carrillo-Farga J, González-Domínguez F, Maravilla P, Flisser A. From stillness to motion: 80 years after the first description of *Taenia solium* oncosphere hatching. *Parasit Vectors.* 2014;7(1):12.
 28. Conlan JV, Vongxay K, Khamlome B, Dorny P, Sripa B, Elliot A, et al. A Cross-Sectional Study of *Taenia solium* in a Multiple Taeniid-Endemic Region Reveals Competition May be Protective. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(2):281-91.
 29. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis. *The Lancet.* 2003;362(9383):547-56.
 30. García HH, Evans CAW, Nash TE, Takayanagui OM, White AC, Botero D, et al. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):747-56.
 31. Escobar A, Weidenheim KM. The pathology of neurocysticercosis. En: Singh G, Prabhakar S, editores. *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science [Internet]. Wallingford: CABI; 2002 [citado 16 de junio de 2016]. p. 289-305. Disponible en: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20023159873>
 32. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron.* 2014;81(2):229-48.
 33. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009;32(12):638-47.
 34. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry.* 2005;11(5):400-7.
 35. Nash TE, Bartelt LA, Korpe PS, Lopes B, Houtpt ER. Calcified Neurocysticercus, Perilesional Edema, and Histologic Inflammation. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(2):318-21.
 36. Aguilar-Rebolledo F, Cedillo-Rivera R, Llaguno-Violante P, Torres-López J, Muñoz-Hernandez O, Enciso-Moreno JA. Interleukin levels in cerebrospinal fluid from children with neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(1-2):35-40.

37. Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2011;200(4):255-61.
38. Iburg TM, Karlsson M, Spång F, Sikasunge CS, Johansen MV. The effect of oxfendazole treatment on muscle pathology in pigs infected with *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol*. 2012;190(3-4):442-6.
39. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011;4(2):165-78.
40. Kalluri R, Sukhatme VP. Fibrosis and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000;9(4):413-8.
41. Yang JD, Abdelmalek MF, Pang H, Guy CD, Smith AD, Diehl AM, et al. Gender and menopause impact severity of fibrosis among patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2014;59(4):1406-14.
42. Rodriguez-Carbajal J, Del Brutto OH, Penagos P, Huebe J, Escobar A. Occlusion of the middle cerebral artery due to cysticercotic angiitis. *Stroke*. 1989;20(8):1095-9.
43. Barinagarrementeria F, Cantú C. Cerebrovascular manifestations of neurocysticercosis. En: Singh G, Prabhakar S, editores. *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science [Internet]. Wallingford: CABI; 2002 [citado 5 de julio de 2016]. p. 221-8. Disponible en: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20023159865>
44. Folkman J, Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature*. 1980. 288(5791):551-6.
45. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett*. 2013;328(1):18-26.
46. Salani D, Taraboletti G, Rosanò L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1703-11.
47. de Almodovar CR, Zacchigna S, Carmeliet P. Angiogenesis in the Central Nervous System. En: Figg WD, Folkman J, editores. *Angiogenesis* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2008 [citado 7 de abril de 2016]. p. 489-504. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-71518-6_42
48. Shibuya M. Vascular Permeability/Vascular Endothelial Growth Factor. En: Figg WD, Folkman J, editores. *Angiogenesis* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2008 [citado 7 de abril de 2016]. p. 89-98. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-71518-6_8

49. Guyot M, Pagès G. VEGF Splicing and the Role of VEGF Splice Variants: From Physiological-Pathological Conditions to Specific Pre-mRNA Splicing. En: Fiedler L, editor. VEGF Signaling [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [citado 3 de mayo de 2016]. p. 3-23. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2917-7_1
50. Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO. Molecular Diversity of VEGF-A as a Regulator of Its Biological Activity. *Microcirculation*. 2009;16(7):572-92.
51. Li R, Nauth A, Li C, Qamirani E, Atesok K, Schemitsch EH. Expression of VEGF gene isoforms in a rat segmental bone defect model treated with EPCs. *J Orthop Trauma*. 2012;26(12):689-92.
52. Huez I, Bornes S, Bresson D, Créancier L, Prats H. New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2001;15(12):2197-210.
53. Presta M, Mitola S, Dell'Era P, Leali D, Nicoli S, Moroni E, et al. Fibroblast Growth Factor-2 in Angiogenesis. En: Figg WD, Folkman J, editores. *Angiogenesis* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2008 [citado 7 de abril de 2016]. p. 77-88. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-71518-6_7
54. Morin-Brureau M, Rigau V, Lerner-Natoli M. Why and how to target angiogenesis in focal epilepsies. *Epilepsia*. 2012;53 Suppl 6:64-8.
55. Marchi N, Lerner-Natoli M. Cerebrovascular remodeling and epilepsy. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry*. 2013;19(3):304-12.
56. Friedman A, Heinemann U. Role of Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis. En: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editores. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012 [citado 7 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98210/>
57. Carmignoto G, Gómez-Gonzalo M. The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev*. 2010;63(1-2):138-48.
58. Emsley JG, Macklis JD. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol*. 2006;2(3):175-86.
59. Kawano H, Kimura-Kuroda J, Komuta Y, Yoshioka N, Li HP, Kawamura K, et al. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 2012;349(1):169-80.
60. Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res*. 1998;53(6):637-44.

61. Gómez-Pinilla F, Lee JW, Cotman CW. Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1992;12(1):345-55.
62. Giavazzi R, Sennino B, Coltrini D, Garofalo A, Dossi R, Ronca R, et al. Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1913-26.
63. Baird A, Walicke PA. Fibroblast growth factors. *Br Med Bull.* 1989;45(2):438-52.
64. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol.* 1998;141(7):1659-73.
65. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013;19(12):1584-96.
66. Banks WA. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):275-92.
67. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J Cell Biol.* 1998;141(7):1539-50.
68. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(6):323-37.
69. Fortin D. The blood-brain barrier should not be underestimated in neuro-oncology. *Rev Neurol (Paris).* 2004;160(5 Pt 1):523-32.
70. Goldman EE. Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der ‘vitalen Färbung.’. *Beiträg Klinische Chirurgie.* 1909;64:192–265.
71. Goldman EE. Vitalfärbung am Zentralnervensyatem. Beitrag zur Physio-Pathologie des plexus chorioideus und der Hirnhäute. *Abh preuss, Akad Wiss Phys-Math Kl.* 1913;1:1-60.
72. Willis CL, Leach L, Clarke GJ, Nolan CC, Ray DE. Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. *Glia.* 2004;48(1):1-13.
73. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest.* 1991;87(4):1234-40.

74. Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, et al. Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2010;30(17):5843-54.
75. Lafuente JV, Argandoña EG, Mitre B. VEGFR-2 expression in brain injury: its distribution related to brain-blood barrier markers. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2006;113(4):487-96.
76. Sköld MK, von Gertten C, Sandberg-Nordqvist A-C, Mathiesen T, Holmin S. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma*. 2005;22(3):353-67.
77. Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao M-L, Kopp N, Lee SC, et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006;177(8):5574-84.
78. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106(6):1977-82.
79. Verastegui M, Gilman RH, Arana Y, Barber D, Velasquez J, Farfan M, et al. *Taenia solium* Oncosphere Adhesion to Intestinal Epithelial and Chinese Hamster Ovary Cells In Vitro. *Infect Immun*. 2007;75(11):5158-66.
80. Yoshimura S, Teramoto T, Whalen MJ, Irizarry MC, Takagi Y, Qiu J, et al. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest*. 2003;112(8):1202-10.
81. Zucchini S, Buzzi A, Barbieri M, Rodi D, Paradiso B, Binaschi A, et al. FGF-2 Overexpression Increases Excitability and Seizure Susceptibility but Decreases Seizure-Induced Cell Loss. *J Neurosci*. 2008;28(49):13112-24.
82. Sternberger NH, Sternberger LA. Blood-brain barrier protein recognized by monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(22):8169-73.
83. Okada S, Okeda R, Matsushita S, Kawano A. Immunohistochemical changes of the blood-brain barrier in rat spinal cord after heavy-ion irradiation. *Neuropathology*. 1998;18(2):188-98.
84. Rosenstein JM, Mani N, Silverman WF, Krum JM. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):7086-91.
85. Rigau V, Morin M, Rousset M-C, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain J Neurol*. 2007;130(Pt 7):1942-56.

86. Argaw AT, Asp L, Zhang J, Navrazhina K, Pham T, Mariani JN, et al. Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2454-68.
87. Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart CL, Suda T. Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 [citado 28 de junio de 2016]; Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/34882>
88. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*. 1997;19(1):13-26.
89. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999;23(2):297-308.
90. Hai J, Li S-T, Lin Q, Pan Q-G, Gao F, Ding M-X. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain. *Neurosurgery*. 2003;53(4):963-970-972.
91. Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the Microcirculation [Internet]. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010 [citado 27 de junio de 2016]. (Integrated Systems Physiology—From Cell to Function). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53373/>
92. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(1):67-71.
93. Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(6):515-23.
94. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*. 2006;12(2):235-9.
95. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med*. 2006;12(2):171-2.
96. Wada K, Arai H, Takanashi M, Fukae J, Oizumi H, Yasuda T, et al. Expression levels of vascular endothelial growth factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neuroreport*. 2006;17(7):705-9.
97. Kirk S, Frank JA, Karlik S. Angiogenesis in multiple sclerosis: is it good, bad or an epiphenomenon? *J Neurol Sci*. 2004;217(2):125-30.

98. Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, Martinelli Boneschi F, Fenoglio C, Galbiati S, et al. Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Ann Neurol.* 2005;57(3):373-80.
99. Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(8):887-95.
100. Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, Keep RF. Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume. *Acta Neurochir (Wien).* 2003;145(1):49-53.
101. Chapuis J, Tian J, Shi J, Bensemain F, Cotel D, Lendon C, et al. Association study of the vascular endothelial growth factor gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006;27(9):1212-5.
102. Benini R, Roth R, Khoja Z, Avoli M, Wintermark P. Does angiogenesis play a role in the establishment of mesial temporal lobe epilepsy? *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 2016;49:31-6.
103. Qiu Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 6):1207-13.
104. Araujo DM, Cotman CW. Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1992;12(5):1668-78.
105. de Oliveira GP, Duobles T, Castelucci P, Chadi G. Differential regulation of FGF-2 in neurons and reactive astrocytes of axotomized rat hypoglossal nucleus. A possible therapeutic target for neuroprotection in peripheral nerve pathology. *Acta Histochem.* 2010;112(6):604-17.
106. Gómez-Pinilla F, Vu L, Cotman CW. Regulation of astrocyte proliferation by FGF-2 and heparan sulfate in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1995;15(3 Pt 1):2021-9.
107. Sugiura C, Miyata H, Ueda M, Ohama E, Vinters HV, Ohno K. Immunohistochemical expression of fibroblast growth factor (FGF)-2 in epilepsy-associated malformations of cortical development (MCDs). *Neuropathology.* 2008;28(4):372-81.
108. Dennis RD, Schubert U, Bauer C. Angiogenesis and parasitic helminth-associated neovascularization. *Parasitology.* 2011;138(4):426-39.
109. Stadelmann B, Spiliotis M, Müller J, Scholl S, Müller N, Gottstein B, et al. *Echinococcus multilocularis* phosphoglucose isomerase (EmPGI): A

glycolytic enzyme involved in metacestode growth and parasite–host cell interactions. *Int J Parasitol.* 2010;40(13):1563-74.

110. Westin JE, Lindgren HS, Gardi J, Nyengaard JR, Brundin P, Mohapel P, et al. Endothelial proliferation and increased blood-brain barrier permeability in the basal ganglia in a rat model of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine-induced dyskinesia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2006;26(37):9448-61.
111. Park HJ, Shin JY, Kim HN, Oh SH, Song SK, Lee PH. Mesenchymal stem cells stabilize the blood-brain barrier through regulation of astrocytes. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:187.
112. Ghabriel MN, Zhu C, Hermanis G, Allt G. Immunological targeting of the endothelial barrier antigen (EBA) in vivo leads to opening of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2000;878(1-2):127-35.
113. natah s. s., mouihate a., pittman q. j., sharkey k. a. Disruption of the blood-brain barrier during TNBS colitis. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(3):433-46.
114. Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Cisternino S, Scherrmann J-M. Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(1):81-92.
115. Isasi E, Barbeito L, Olivera-Bravo S. Increased blood–brain barrier permeability and alterations in perivascular astrocytes and pericytes induced by intracisternal glutaric acid. *Fluids Barriers CNS.* 2014;11(1):15.

ANEXOS

Anexo 1: Anticuerpos primarios y secundarios usados en la inmunohistoquímica

Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Empresa y código	Descripción	Tipo	Empresa y código	Descripción	Tipo
Abcam, ab39250	IgG de conejo anti-VEGFA	Policlonal	KPL, 16-15-06	IgG de cabra anti-IgG de conejo marcada con biotina .	Policlonal
Millipore, 05-118	IgG de ratón anti-FGF2 (clona bFM-2)	Monoclonal	KPL, 16-18-06	IgG de cabra anti-IgG de ratón marcada con biotina .	Policlonal
KPL, 14-16-06	IgG de cabra anti-IgG de rata marcada con peroxidasa	Policlonal			
Abcam, ab24764	IgM de ratón anti-EBA (clona SMI-71)	Monoclonal	KPL, 16-18-03	IgG de cabra anti-IgM de ratón marcada con peroxidasa .	Policlonal
LifeSpan BioSciences, LS-B2573	IgG de oveja anti-fibrinógeno	Policlonal	KPL, 14-23-06	IgG de conejo anti-IgG de oveja marcada con peroxidasa .	Policlonal

Anexo 2: Anticuerpos primarios y secundarios usados en la inmunofluorescencia

Anticuerpo primario			Anticuerpo secundario		
Empresa y código	Descripción	Tipo	Empresa y código	Descripción	Tipo
Abcam, ab39250	IgG de conejo anti-VEGFA	Policlonal	Invitrogen, A-21206	IgG de burro anti-IgG de conejo marcada con Alexa fluor 488	Policlonal
Millipore, 05-118	IgG de ratón anti-FGF2 (clona bFM-2)	Monoclonal	Invitrogen, A-21202	IgG de burro anti-IgG de ratón marcada con Alexa fluor 488	Policlonal
Millipore, IF03L- 100UG	IgG de ratón anti-GFAP (clona G-A-5)	Monoclonal	Invitrogen, A-21202	IgG de burro anti-IgG de ratón marcada con Alexa fluor 488	Policlonal
Millipore, IF03L- 100UG	IgG de ratón anti-GFAP (clona G-A-5)	Monoclonal	Invitrogen, A-21203	IgG de burro anti-IgG de ratón marcada con Alexa fluor 594	Policlonal
Abcam, ab5076	IgG de cabra anti-Iba-1	Policlonal	Invitrogen, A-11058	IgG de burro anti-IgG de cabra marcada con Alexa fluor 594	Policlonal

Anexo 3: Protocolos

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE VEGF-A

Empresa: Abcam Número de Catalogo: ab39250

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla porta láminas.
- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30´
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 3 minutos
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 3 minutos en cada concentración de alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Agregar 300 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM pH6 + detergente Tween al 0.05% en un vaso de precipitado de 1 Litro, mantener las láminas en baño María a 65° centígrados por 1 hora.
- Dejar atemperar por 30 min.

3. LAVADO

- Remarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS
- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 5% BSA y 5% suero de cabra.
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

- Preparar solución de anticuerpo primario: PBS Tritón al 0.05%, 5% de suero de cabra + IgG de conejo anti-VEGF-A en dilución 1/100.
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C (16 horas).
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

7. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO

- Preparar solución de anticuerpo secundario: PBS, 10% de suero de cabra, 10% de suero de rata, + Anticuerpo secundario 1/200 (IgG de cabra anti-IgG de conejo marcado con biotina, KPL)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.
- Incubar las láminas con solución de Estreptavidina marcada con HRP (1/200, KPL) por 1 hora.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

8. REVELADO

- Preparar solución de revelado: 1 gota de DAB + 3 mL de solución tamponada
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5min.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.

9. CONTRATINCIÓN

- Colar láminas en canastilla portaláminas y sumergirlas en solución de Hematoxilina de Harris (MERCK) por 1 min.

- Lavar las láminas con abundante agua de grifo.

10. DESHIDRATACIÓN

- Colocar la canastilla en concentraciones crecientes de alcohol (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 3 min en cada uno, dejar secar las láminas por 5 min.
- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 3 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FGF2

Empresa: Millipore Número de Catalogo: 05-118

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30´
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 3 minutos
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 3 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar 600 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM pH6 + detergente Tween al 0.05% en un vaso de precipitado de 1 Litro.
- Colocar la canastilla con las láminas en el vaso de precipitados y hacer hervir por 40min.
- Dejar atemperar por 30 min.

3. LAVADO

- Remarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS
- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 5% BSA y 5% suero de cabra.
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

- Preparar solución de anticuerpo primario: PBS Tritón al 0.05%, 5% de suero de cabra + IgG de ratón Anti-FGF2 en dilución 1/200.
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C (16 horas).
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

7. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO

- Preparar solución de anticuerpo secundario: PBS, 10% de suero de cabra, 10% de suero de rata, + Anticuerpo secundario 1/200 (IgG de cabra anti-IgG de ratón marcado con biotina, KPL)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.
- Incubar las láminas con solución de Estreptavidina marcada con HRP (1/200, KPL) por 1 hora.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

8. REVELADO

- Preparar solución de revelado: 1 gota de DAB + 3 mL de solución tamponada
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5min.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.

9. CONTRATINCIÓN

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

10. DESHIDRATACIÓN

- Colocar la canastilla en batería alcoholes (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 3 min en cada uno, dejar secar las láminas por 5 min.
- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 3 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE IgG

Empresa: KPL

Número de Catalogo: 14-16-06

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30´
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 3 minutos
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 3 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Agregar 600 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM pH6 + detergente Tween al 0.05% en un vaso de precipitado, hacer hervir por 40min.
- Colocar las láminas por 10 min en la solución de desenmascaramiento hirviendo.
- Dejar atemperar por 30 min.

3. LAVADO

- Remarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS
- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 5% BSA
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

- Preparar solución de anticuerpo primario: PBS Tritón al 0.05%, 5% de suero de cabra + IgG de cabra anti-IgG de rata en dilución 1/200.
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C (16 horas).
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

7. REVELADO

- Preparar solución de revelado: 1 gota de DAB + 3 mL de solución tamponada
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5min.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.

8. CONTRATINCIÓN

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

9. DESHIDRATACIÓN

- Colocar la canastilla en batería alcoholes (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 3 min en cada uno, dejar secar las láminas por 5 min.
- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 3 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cobre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA DEL ANTÍGENO DE BARRERA ENDOTELIAL (EBA) [SMI-71]

Empresa: Abcam Número de Catalogo: ab24764

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30´
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 3 minutos
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 3 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Agregar 80 mililitros de solución tamponada de Citrato 10mM pH6 + detergente Tween al 0.05% en un tarro de tinción Coplin junto con las láminas, hacer hervir el tarro Coplin conteniendo las láminas en baño María por 40min.
- Dejar atemperar por 30 min.

3. LAVADO

- Remarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS
- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 5% BSA y 5% suero de cabra.
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

- Preparar solución de anticuerpo primario: PBS Tritón al 0.05%, 5% de suero de cabra + IgM de ratón anti-EBA en dilución 1/500.
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C (16 horas).
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

7. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO

- Preparar solución de anticuerpo secundario: PBS, 10% de suero de cabra, 10% de suero de rata, + Anticuerpo secundario 1/200 (IgG de cabra anti-IgM de Ratón marcada con HRP, KPL)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

8. REVELADO

- Preparar solución de revelado: 1 gota de DAB + 3 mL de solución tamponada
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5min.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.

9. CONTRATINCIÓN

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

10. DESHIDRATACIÓN

- Colocar la canastilla en batería alcoholes (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 3 min en cada uno, dejar secar las láminas por 5 min.

- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 3 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FIBRINOGENO

Empresa: LifeSpan Bioscience

Número de Catalogo: LS-2573

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar las láminas dentro de las canastillas en una estufa (55-64°C) por 30´
- Sumergir las láminas en Xilol I por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 3 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 3 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 3 minutos
- Colocar las láminas en alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), 3 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar solución de desenmascaramiento: 0,05% tripsina pH 7,5 (0,5% de tripsina diluido en 1% de CaCl, calibrar el pH con solución de NaOH).
- Incubar las láminas con solución de desenmascaramiento por 15 min a 37° centígrados

3. LAVADO

- Remarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

- Agregar a las láminas, 3% de peróxido de hidrógeno en PBS
- Dejar incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 2.5% Ovoalbumina y 10% suero de conejo.
- Incubar las láminas con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

6. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

- Preparar solución de anticuerpo primario: PBS Tritón al 0.05%, 10% de suero de conejo + Anticuerpo IgG de Oveja anti-Fibrinógeno en dilución 1/1000.
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo primario toda la noche a 4°C (16 horas).
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

7. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO SECUNDARIO

- Preparar solución de anticuerpo secundario: PBS, 5% de suero de conejo, 10% de suero de rata, + Anticuerpo secundario 1/800 (IgG de conejo anti-IgG de Oveja marcada con HRP, KPL)
- Incubar las láminas en solución de anticuerpo secundario por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar las láminas con solución tamponada de fosfato salino (PBS) a pH 7.2, 4 veces cada 5 min.

8. REVELADO

- Preparar solución de revelado: 1 gota de DAB + 3 mL de solución tamponada
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5min.
- Lavar las láminas inmediatamente con agua destilada.

9. CONTRATINCIÓN

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

10. DESHIDRATACIÓN

- Colocar la canastilla en batería alcoholes (70%, 90%, 96% y Alcohol absoluto) por 3 min en cada uno, dejar secar las láminas por 5 min.
- Colocar la canastilla con las láminas en Xilol I y II por 3 min en cada uno, dejar secar.
- Realizar el montaje de las láminas con solución Entellan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.