



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO
Y DAÑO NEURONAL EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE RATAS CON
NEUROCISTICERCOSIS QUE
PRESENTAN EPILEPSIA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

EDSON GUSTAVO BERNAL TERAN

LIMA – PERÚ

2024

ASESOR

Dra. Manuela Verástegui Pimentel

JURADO DE TESIS

DRA. ISKRA TUERO OCHOA

PRESIDENTE

DRA. MONICA JEHNKY PAJUELO TRAVEZAÑO

VOCAL

MG. RUTH LILIANA CRISTOBAL DELGADO

SECRETARIA

DEDICATORIA.

Dedico este trabajo a mi madre quien con mucho esfuerzo y sacrificio me crio y me dio aquella anhelada educación superior que los padres sueñan para sus hijos.

A mis tíos Alfredo y Emma, quienes en su gran corazón me acogieron y me dieron ejemplo de una convivencia armoniosa.

A mis tutoras, las Doctoras: Manuela y Roxana por su gran apoyo, comprensión, y tolerancia en mi etapa académica.

A mis amigos: José, Hernán, Delia, Liz, Clau, Edith, Nancy y Danny; quienes en etapas críticas fueron mi familia.

AGRADECIMIENTOS.

Al laboratorio de investigación en enfermedades infecciosas a cargo de la

Dra. Manuela Verástegui.

Al Dr. Roberth Gilman, a los Laboratorios de Investigación y Desarrollo – UPCH,

CONCYTEC (FONDECYT) y BANCO MUNDIAL por apoyar y promover la

ciencia en el Perú.

A mis amigos y compañeros del laboratorio.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

“Tratamiento de epilepsia con planta nativa peruana “la valeriana” usando un modelo animal de neuroinfección parasitaria.”

Contrato N.º 093-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO
Y DAÑO NEURONAL EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE RATAS CON
NEUROCISTICERCOSIS QUE
PRESENTAN EPILEPSIA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

EDSON GUSTAVO BERNAL TERAN



Informe estándar ⓘ
Informe en inglés no disponible

10% Similitud

estándar

1 Exclusiones →

Fuentes

Mostrar las fuentes solapadas ⓘ

1 Trabajos del estudio

Universidad Peruana Caye

11 bloques de texto 332 pá cc

2 Internet

www.astmh.org

3 bloques de texto 249 pá coi

3 Internet

www.psicologiaamorebiet

1 bloques de bloques 63 pá cc

4 Internet

vdocuments.com.br

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	5
III. MARCO TEÓRICO	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
V. RESULTADOS	23
VI. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIONES	34
VIII. BIBLIOGRAFÍA	36
VIX. ANEXOS	43

RESUMEN

La Neurocisticercosis (NCC) es la infección del Sistema Nervioso Central (SNC) por el estadio larval del parásito platelminto *Taenia solium*; la epilepsia es la manifestación clínica más común de esta infección y se asocia a procesos inflamatorios como angiogénesis, gliosis y daño neuronal, sin embargo, aún no se ha evaluado si el estrés nitro-oxidativo tiene un rol en el proceso epileptogénico en la NCC. En este estudio se evaluó mediante inmunohistoquímica un indicador de estrés nitro-oxidativo (óxido nítrico sintetasa inducible) y su relación con la presencia de convulsiones recurrentes (epilepsia), así mismo se evaluó si el estrés nitro-oxidativo está asociado a la presencia de esferoides o hinchazón axonal, gliosis (CD68) o astrogliosis (GFAP) en el modelo animal de NCC comparando ratas con NCC que presentan epilepsia, ratas con NCC que no presentan epilepsia y ratas sanas. Se encontró que la inmunorreactividad a óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en ratas con NCC es mayor a la de las ratas sanas siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Así mismo, la inmunorreactividad a iNOS en ratas con NCC que presentan epilepsia es mayor en comparación a ratas con NCC sin epilepsia siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$); por otro lado, se observa que la presencia de macrófagos y astrocitos alrededor del quiste también se ve incrementada en ratas con NCC que presentan epilepsia ($p < 0.05$) y está asociada a la inmunorreactividad de iNOS ($\rho = 0.75$). En cuanto a la presencia de esferoides reactivos a NFP y SOD1 esta fue mayor en ratas con NCC que desarrollaron epilepsia con un $p < 0.05$ y $p = 0.06$ respectivamente; además, existe asociación entre el número de esferoides y la

inmunorreactividad de iNOS ($\rho=0.81$ para NFP y $\rho=0.75$ para SOD1). Los resultados indican que existe estrés nitro-oxidativo en el tejido cerebral de ratas con NCC que presentan epilepsia y está asociado a la gliosis, así como a la presencia de daño neuronal en forma de hinchazón axonal por lo que es necesario profundizar el estudio de este evento con la finalidad de conocer los factores que están mediando esta patología y en un futuro encontrar blancos terapéuticos en la epilepsia por NCC.

PALABRAS CLAVE: Estrés nitro-oxidativo, Neurocisticercosis, Epilepsia, Gliosis, Hinchazón axonal

ABSTRACT

Neurocystercosis (NCC) is an infection of the Central Nervous System (CNS) by the larval stage of the flatworm parasite *Taenia solium*; epilepsy is the most common clinical manifestation of this infection and is associated with inflammatory processes such as angiogenesis, gliosis, and neuronal damage; however, whether nitro-oxidative stress plays a role in the epileptogenic process in NCC has not yet been evaluated. In this study, an indicator of nitro-oxidative stress (inducible nitric oxide synthase) and its relationship with the presence of recurrent seizures (Epilepsy) was evaluated by immunohistochemistry, as well as whether nitro-oxidative stress is associated with the presence of spheroids, or axonal swelling, gliosis (CD68) or astrogliosis (GFAP) in the NCC animal model comparing NCC rats with epilepsy, NCC rats without epilepsy and healthy rats. It was found that immunoreactivity to inducible nitric oxide synthetase (iNOS) in rats with NCC is higher than that of healthy rats, being statistically significant ($p < 0.05$). Likewise, the immunoreactivity to iNOS in rats with NCC that present epilepsy is higher compared to rats with NCC without epilepsy, being statistically significant ($p < 0.05$); On the other hand, it is observed that the presence of macrophages and astrocytes around the cyst is also increased in rats with NCC that present epilepsy ($p < 0.05$) and is associated with iNOS immunoreactivity ($\rho = 0.75$). Regarding the presence of spheroids reactive to NFP and SOD1, it was higher in rats with NCC that developed Epilepsy with $p < 0.05$ and $p = 0.06$ respectively; In addition, there is an association between the number of spheroids and iNOS immunoreactivity ($\rho = 0.81$ for NFP and $\rho = 0.75$ for SOD1). The results indicate that nitro-oxidative

stress exists in the brain tissue of rats with NCC that present epilepsy and is associated with gliosis as well as the presence of neuronal damage in the form of axonal swelling, so it is necessary to study this event in greater depth. with the purpose of knowing the factors that are mediating this pathology and in the future finding therapeutic targets in epilepsy due to NCC.

KEYWORDS:

Oxidative stress, Neurocysticercosis, Epilepsy, Gliosis, Axonal swelling

I. INTRODUCCIÓN

La Neurocisticercosis (NCC) es la infección del Sistema Nervioso Central (SNC) o de las estructuras perimeningeales por el estadio larval del parásito platelminto *Taenia solium*; la variedad y gravedad de los síntomas dependen de la respuesta inmunitaria del huésped, la ubicación, viabilidad y número de parásitos; las convulsiones representan la manifestación clínica más común, aunque también pueden causar déficit cognitivo y de memoria, hipertensión intracraneal y dolor de cabeza (1). En países endémicos, donde no hay una buena infraestructura sanitaria y los cerdos deambulan libremente en la comunidad, es la principal causa de epilepsia adquirida; sin embargo, también se ha reportado casos de NCC en países desarrollados no endémicos debido a la globalización y migración de individuos de zonas endémicas a zonas no endémicas (2).

La epilepsia es un trastorno caracterizado por episodios recurrentes (convulsiones) de disfunción cerebral paroxística debido a una descarga neuronal repentina, desordenada y excesiva (3). las causas de la epilepsia son muy variadas y complejas y pueden estar asociados a factores genéticos, traumas y procesos inflamatorios que involucran principalmente gliosis y estrés oxidativo los cuales podrían causar neurodegeneración, neurogénesis aberrante y reorganización de las redes neuronales que conllevarían a la aparición de procesos epilépticos (4). La epilepsia en la neurocisticercosis, a la fecha, se asocia a procesos inflamatorios como angiogénesis, gliosis y daño neuronal (2); sin embargo, aún no se ha evaluado como otros procesos relacionados a la inflamación como el estrés nitro-oxidativo podrían

estar cumpliendo un rol importante en el desencadenamiento del proceso epileptogénico en la NCC.

El estrés oxidativo se describe como un desequilibrio entre la generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS); aunque se considera que la regulación redox que involucra ROS es esencial para la modulación de funciones celulares críticas (principalmente en astrocitos y microglía) se ha demostrado que en condiciones de producción excesiva ROS y RNS pueden reaccionar con ácidos grasos, proteínas y ADN causando daño a estos sustratos y por tanto causar daño celular siendo las neuronas una de estas células afectadas (Sharma et al., 2019). Algunos estudios demuestran que ROS está asociado con alteración o daño del transporte axonal (Fang et al., 2012), por otro lado, diversos estudios asocian la presencia del estrés nitro-oxidativo como un factor que estaría mediando la epilepsia y enfermedades neurodegenerativas (5,6).

Los avances en la dilucidación de los mecanismos patogénicos de las diferentes enfermedades neurodegenerativas se da gracias a las investigaciones en modelos animales (7); lo mismo viene sucediendo con el estudio de la neurocisticercosis, gracias a la reciente incorporación de un modelo animal de neurocisticercosis en ratas el cual refleja signos clínicos semejantes a lo que ocurre en el hombre, como epilepsia (8), déficit de memoria, ubicación espacial (dato no publicado), así como alteraciones histopatológicas como gliosis, angiogénesis, alteración de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (8), ha permitido determinar que la presencia del parásito en el SNC causa hinchazón axonal o esferoides (9) con reactividad para Neurofilamento

(NFP) y Proteína Precursora Amiloidea (APP) lo cual estaría sugiriendo la existencia de una alteración en el transporte axonal (Carmen-Orozco et al., 2019; Mejia Maza et al., 2018) (9,10). Esta patología podría estar asociada a los síntomas clínicos como presencia de convulsiones o cuadros epilépticos. En el presente estudio se evaluó si la NCC causa estrés nitro-oxidativo y su relación con la presencia de convulsiones recurrentes (Epilepsia), así como si la presencia del estrés nitro-oxidativo está asociado a la presencia de esferoides o hinchazón axonal en el modelo animal de NCC.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La neurocisticercosis es una parasitosis endémica en la mayoría de los países en vías de desarrollo donde no hay una buena infraestructura sanitaria y se crían cerdos. Estudios realizados en zonas endémicas muestran que la neurocisticercosis es la principal causa de epilepsia adquirida (11). En el Perú, en las zonas rurales entre el 30% y el 50% de los casos de epilepsia son casos asociados a neurocisticercosis (12).

Los factores que están mediando la epileptogénesis en la neurocisticercosis no se conocen en su totalidad, existiendo muchas interrogantes, a la fecha se la asocia a factores como la lesión focal, calcificación, esclerosis hipocampal y procesos relacionados con la inflamación como gliosis y disrupción de la barrera hematoencefálica (10,13); sin embargo existen otros procesos como el estrés nitro-oxidativo el cual se asocia a los cuadros de epilepsia y que podría estar implicado en la epileptogénesis de la neurocisticercosis (4).

Además existe evidencia de que el estrés nitro-oxidativo en el tejido cerebral provoca un aumento en la concentración de calcio intracelular, reducción del tamaño axonal, pérdida de la fosforilación del neurofilamento y reducción de la supervivencia neuronal (6) lo que nos lleva a pensar que de existir estrés nitro-oxidativo en neurocisticercosis podría estar asociado al daño axonal (hinchazón axonal) y a la presencia de cuadros epilépticos; por ello en este estudio nos planteamos la pregunta si la NCC incrementa la expresión de marcadores de estrés nitro-oxidativo y si este incremento está asociado al daño neuronal en el tejido cerebral de ratas con neurocisticercosis que desarrollaron epilepsia.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo principal

Evaluar la inmunorreactividad de iNOS como marcador de estrés nitro-oxidativo y la asociación con daño neuronal en un modelo experimental de ratas con neurocisticercosis que presentan epilepsia.

II.2 Objetivos específicos

Determinar y comparar la inmunoreactividad de iNOS como marcador de estrés nitro-oxidativo en el tejido cerebral de ratas con NCC con y sin epilepsia.

Determinar la asociación de iNOS y la inmunoreactividad de CD68 y GFAP, en el tejido cerebral de ratas con NCC con y sin epilepsia.

Comparar el número de esferoides reactivos a Neurofilamento (NFP) y Super-Oxido Dismutasa citoplasmático (SOD1) en el tejido cerebral de ratas con NCC con y sin epilepsia.

Determinar asociación entre la inmunoreactividad de iNOS y la presencia de esferoides en ratas con NCC

III. MARCO TEÓRICO

III.1 Neurocisticercosis por *Taenia solium*

Como muchos helmintos, *T. solium* tiene un ciclo de vida que implica un hospedero definitivo en el que vive en estado adulto, y un hospedero intermediario que alberga el estadio de larva o cisticerco. Siendo el hombre el único hospedero definitivo quien se infecta al ingerir carne de cerdo mal cocida con presencia de larvas de *T. solium*, dando lugar a la teniasis. Por otro lado, el cerdo es el hospedero intermediario natural de este parásito y se infecta al alimentarse de heces de humanos teniásicos depositados al medio ambiente con contenido de huevos o proglótidos que se desprenden del parásito adulto anclado en el intestino del humano; estos huevos eclosionan gracias a las condiciones gastrointestinales del tubo digestivo del cerdo liberándose así la oncosfera o embrión hexacanto que penetra la pared intestinal, y a través del torrente sanguíneo se distribuye a diversos tejidos donde se establece y se desarrolla en cisticerco (14).

Accidentalmente, los humanos también pueden ingerir los huevos de *T. solium* que luego de eclosionar en el sistema gastrointestinal, atravesar la pared intestinal y llegar al torrente sanguíneo se desarrollan en cisticercos en diversos tejidos incluido el SNC, condición a la que se denomina neurocisticercosis (NCC). Es muy probable que esto suceda por autoinfección cuando se transporta los huevos desde la región perianal hasta la boca mediante los dedos

contaminados o por el consumo de alimentos contaminados con los huevecillos de *T. solium* (15).

En la etapa inicial de la neurocisticercosis el paciente por lo general es asintomático y esto se debe a que el estadio larval del parásito (cisticerco) evade la respuesta inmune del huésped y mantiene un equilibrio entre el perfil pro y anti inflamatorio que le permiten sobrevivir por algunos años; sin embargo, dependiendo de diversos factores como la ubicación, número y estado de viabilidad de los cisticercos pueden causar algunos signos clínicos como dolor de cabeza, hipertensión intracraneal, déficit cognitivo y epilepsia. Este equilibrio temporáneo culmina debido a la degeneración del propio parásito o al efecto del tratamiento antiparasitario exacerbando la reacción inflamatoria y consecuentemente las manifestaciones clínicas, principalmente el de la epilepsia (11).

Entre las características más importantes descritas en esta patología están la presencia de tejido fibrótico alrededor del cisticerco, cambio espongiótico, gliosis, daño neuronal a nivel de los axones (Hinchazón axonal) y angiogénesis como parte de una alteración de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica (BHE); además, los quistes en degeneración presentan inflamación exacerbada en el tejido circundante con abundancia de macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T gama delta, eosinófilos e incremento del grosor de la capa fibrótica (8–10,16,17); Estas alteraciones patológicas en su conjunto están asociadas a la aparición de signos clínicos como la epilepsia.

III.2 Epilepsia:

Según la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE), se define como “**crisis epiléptica**” a la aparición transitoria de signos y/o síntomas provocados por una actividad neuronal anómala excesiva o simultánea en el cerebro, y a la **Epilepsia** como un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición continuada a la aparición de crisis epilépticas y por las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales de esta enfermedad. La definición de epilepsia requiere la presencia de al menos una crisis epiléptica. (18).

La epilepsia es uno de los desórdenes cerebrales más comunes y serios en el mundo y afecta a aproximadamente a 50 millones de personas a nivel mundial. La prevalencia de la epilepsia en países desarrollados es de 5.8 de cada 1000 habitantes y 10.3 de cada 1000 habitantes en países en vías de desarrollo y trae como consecuencia problemas físicos, psicológicos, sociales y económicos (19).

La epilepsia puede ser clasificada en tres tipos: idiopática, provocada y sintomática; las epilepsias idiopáticas son las que tienen una causa genética y predominantemente sin ninguna anomalía neuroanatómica; las epilepsias provocadas son las causadas por algún factor ambiental específico; y las epilepsias sintomáticas pueden tener muchas causas como traumas, tumores, infecciones, malformaciones o enfermedades genéticas sistémicas (20).

En las epilepsias de origen infeccioso, que es el caso de la epilepsia en neurocisticercosis, las causas se atribuyen a un entorno inflamatorio en el que participan procesos como la alteración de la barrera hemato-encefálica, gliosis y estrés oxidativo (5).

III.3 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (OS) se define como la condición que ocurre cuando el equilibrio de estado estable de prooxidantes y antioxidantes se altera y prevalecen los prooxidantes, creando el potencial de daño orgánico (5). Los prooxidantes pueden ser radicales libres, átomos o grupos de átomos con un solo electrón desapareado por lo que pueden interactuar con cualquier molécula generando cambios en su estructura. Antiguamente se creía que estas especies reactivas eran exclusivamente perjudiciales para las células, sin embargo ahora se sabe que la regulación de óxido-reducción que involucra ROS es esencial para la modulación de funciones celulares críticas (principalmente en astrocitos y microglía), como el transporte de iones, movilización de calcio y activación de la apoptosis (5,21,22).

También se sabe que el estrés oxidativo está asociado con alteraciones en las vías de señalización de ROS, RNS y óxido nítrico (NO). Las vías del estrés oxidativo y nitrosativo son inducidas por respuestas inflamatorias y los procesos metabólicos mitocondriales posteriores generan moléculas de radicales libres altamente reactivas. Estas especies reactivas de oxígeno y

nitrógeno como el anión superóxido, radical oxidrilo y peroxinitrito pueden reaccionar con otros sustratos. En condiciones normales, la producción de ROS y RNS, son contrarrestadas y equilibradas por lo que en estas condiciones las especies reactivas tienen funciones fisiológicas que incluyen la señalización. Mientras que en condiciones de producción excesiva de ROS Y RNS o si las defensas corporales están comprometidas, estas especies pueden reaccionar con ácidos grasos, proteínas y ADN, causando daño a estos sustratos (23,24).

3.3.1. Estrés oxidativo y nitrosativo (nitro-oxidativo)

Como ya se mencionó, el estrés oxidativo se refiere de forma general al desequilibrio entre oxidantes (radicales libres) y antioxidantes, mientras que el estrés nitrosativo se refiere más específicamente a los procesos en los que los flujos de NO se vuelven lo suficientemente altos como para provocar la nitrosación de aminos, tioles y antioxidantes, lo que da como resultado un exceso de especies oxidativas que conduce a la interrupción de la señalización, el control redox y/o daño molecular como parte del estrés oxidativo (22).

En 1956, Harman propuso la "teoría de los radicales libres" del proceso de envejecimiento donde sugirió que los radicales libres producidos durante la respiración aeróbica tenían efectos dañinos sobre los componentes celulares y los tejidos conectivos, causando un daño acumulativo que resulta en el proceso de envejecimiento y eventualmente la muerte. Ahora se sabe más claramente que aproximadamente el 90% de todo el oxígeno en una célula se consume en

la mitocondria, especialmente en la membrana interna donde ocurre la fosforilación oxidativa. El oxígeno participa en la oxidación de compuestos orgánicos y la producción de energía para el metabolismo celular. Sin embargo, solo se reduce una cantidad muy pequeña de oxígeno consumido (entre 2 y 5%), lo que deja una variedad de sustancias químicas altamente reactivas conocidas como radicales libres, más específicamente, especies reactivas de oxígeno (ROS), así como especies reactivas de nitrógeno (RNS) (26). y la producción excesiva de estos radicales libres está asociado con el daño en las estructuras celulares y la patogenia de las condiciones del sistema nervioso central (SNC), como la enfermedad de Parkinson, la demencia y la epilepsia ya que el SNC es muy sensible al estrés nitro-oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno y la baja actividad de las defensas antioxidantes (27–29).

El SNC tiene una tasa metabólica extraordinaria que consume aproximadamente el 20% de todo el oxígeno inhalado en reposo y solo representa el 2% del peso corporal. Esta enorme demanda metabólica se debe al hecho de que las neuronas son células altamente diferenciadas y necesitan grandes cantidades de ATP para mantener los gradientes iónicos a través de las membranas celulares para los procesos de neurotransmisión. Dado que la mayor parte del ATP neuronal se genera mediante el metabolismo oxidativo, las neuronas dependen fundamentalmente de la función mitocondrial y del suministro de oxígeno (30,31).

Las mitocondrias además de tener funciones vitales en la neurona como la producción de ATP, también están implicadas procesos críticos incluida la oxidación de ácidos grasos, excitotoxicidad, control de la apoptosis y necrosis, regulación del ciclo de aminoácidos, biosíntesis de neurotransmisores y regulación de la homeostasis del calcio citosólico. Las mitocondrias son además el sitio principal de producción de ROS y, por lo tanto, son extremadamente vulnerables al daño oxidativo (32).

Las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, se caracterizan por la pérdida progresiva de poblaciones de células neuronales específicas y están asociadas con agregados de proteínas. Otra característica común de estas enfermedades es una amplia evidencia de estrés oxidativo y nitrosativo, que podría ser responsable de la disfunción o muerte de las células neuronales que contribuye a la patogénesis de la enfermedad (29,33). Así, dado que los trastornos neurodegenerativos son factores de riesgo para la epilepsia y el estrés nitro-oxidativo está relacionado a ambas condiciones sería muy importante considerar este proceso como diana terapéutica tanto de la epilepsia como de los desórdenes neurodegenerativos.

3.3.2. Marcadores de estrés nitro-oxidativo

Dado que el Óxido Nítrico es una molécula gaseosa y es difícilmente detectable en el tejido al igual que sus radicales ROS y RNS; se recurre a la

detección de las enzimas responsables de su producción principalmente la Oxido-Nítrico Sintetasa Inducible (iNOS) para tener una idea del grado de estrés oxidativo que pueda haber en un tejido. Los niveles de esta enzima se han evaluado en numerosos estudios con modelos de epilepsia inducida en ratas con la finalidad de probar drogas que inhiban este proceso con la intención de prevenir o curar la epilepsia (34–37).

III.4 Degeneración Axonal y esferoides como indicadores de daño neuronal.

La degeneración axonal precede y puede ser causa de muerte neuronal en muchas enfermedades del SNC y es provocado por diversos factores como lesiones, infecciones, toxinas y defectos genéticos, también puede ser un evento secundario común de la inflamación, desordenes metabólicos, alteraciones de mielina e isquemia. Una característica de la degeneración axonal que se demuestra en estudios morfológicos e histológicos es la aparición de hinchazones axonales en forma de esferoides que consisten en acumulaciones de muchas proteínas principalmente la proteína precursora amiloide (APP) y otras como Neurofilamento involucradas en el transporte axonal (38–41). En Neurocisticercosis se ha reportado la presencia de estos esferoides inmunorreactivos para APP, Neurofilamento, Ubiquitina, SOD1 y HSP70 en el tejido cerebral que rodea a los cisticercos (9), por lo que se deduce que estaría ocurriendo un fallo en el transporte axonal como consecuencia directa por la

presencia del parásito o indirecta por los procesos inflamatorios en respuesta a la presencia del parásito.

III.5 Modelo animal de neurocisticercosis y Epilepsia

Dado que la NCC es una enfermedad crónica, el estudio de la patogénesis de la enfermedad es difícil hacerlo en el hombre, siendo necesario el uso de modelos animales que presenten una patología y cuadro clínico semejante al hombre. Se ha desarrollado un modelo animal en ratas, en el cual se reporta daño neuronal en el tejido que rodea al parásito y presencia de convulsiones (8). En el modelo animal de NCC se emplean ratas Holtzman, las cuales son inoculadas intracranealmente con oncosferas activadas para inducir NCC. Los cisticercos se desarrollan a los 3 meses después de la inoculación y el porcentaje de infección en las ratas es del 50 a 80%. Este modelo animal es de mucha utilidad porque permite entender la progresión de la enfermedad desde etapas tempranas y tardías de la infección, así como la descripción de eventos relacionados al proceso patogénico ya que de este modelo se pueden obtener muestras de tejido cerebral, líquido cefalorraquídeo y sangre para realizar diversos estudios. Además, casi el 10% de las ratas con Neurocisticercosis desarrollan cuadros clínicos de epilepsia por lo que se convierte en un modelo para estudiar también la epilepsia en NCC o de manera general las epilepsias sintomáticas y consecuentemente mejorar y generar nuevas herramientas de diagnóstico y/o tratamiento (8).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Consideraciones Éticas.

Este proyecto fue evaluado por el Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y se ejecutó una vez que fue aprobado por el mismo.

En este estudio se usaron muestras que provienen de un estudio aprobado por el CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (“Tratamiento de la epilepsia con planta nativa peruana "La Valeriana" usando un modelo animal de neuroinfección parasitaria” con aprobación ética código sidisi: 101281 constancia 059-07-19).

IV.2 Obtención de especímenes (material biológico).

El material biológico que consiste en láminas con secciones de tejido cerebral de ratas con NCC y sin NCC de 4µm de espesor en parafina fue proporcionado por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Estos especímenes fueron obtenidos de acuerdo al protocolo establecido por Verastegui (8). Brevemente se describe como estos animales fueron infectados: se usaron huevos de *T.solium* fueron obtenidos cuidadosamente a partir de proglótides grávidos mediante trituración y homogeneización manual en agua, luego fueron lavados tres veces por centrifugación a 1500 g en agua destilada, seguidamente fueron tratados con hipoclorito de sodio al 0.75% en agua de 5 a

10 minutos a 4°C hasta observar la eclosión de los huevos, luego fueron lavados tres veces con medio RPMI 1640 por centrifugación; las oncosferas obtenidas fueron incubadas en un fluido intestinal artificial (1 g de pancreatina, 200mg de Na_2CO_3 , 1 ml de bilis de cerdo, ajustado a un volumen de 100 ml con el medio RPMI 1640, con pH final de 8.04) a 37°C por una hora para lograr su activación; después de la activación las oncosferas activadas fueron lavadas con medio RPMI 1640, resuspendidas con el mismo medio y contadas al microscopio usando una cámara de Neubauer. Luego fueron lavadas nuevamente y resuspendidas en un volumen de solución salina de manera que en 50 μl se tenga 400 oncosferas activadas que fueron inoculadas por vía intracraneal en ratas de 15 días de edad; las ratas controles fueron inoculadas únicamente con el mismo volumen de solución salina.

Los animales fueron criados en permanente vigilancia y a partir de los 6 meses fueron monitoreados 24 horas durante 3 días mediante video para la observación de convulsiones tónico-clónicas, o ausencia de convulsiones según la escala de Racine y Pinel (42). Finalmente, estas ratas fueron sacrificadas y perfundidas con Buffer Fosfato Salino (PBS) a pH 7.2 más una solución de formaldehído 4% y se extrajo el cerebro para su posterior deshidratación, inclusión en parafina y obtención de cortes de 4 μm de espesor los cuales se usaron para la inmunohistoquímica.

Finalmente, se seleccionaron 16 cerebros de ratas con NCC de los cuales 8 presentaron convulsiones tónico-clónicas y 8 no presentaron convulsiones; y

7 cerebros de ratas no infectadas (Control); de las cuales se usaron los cortes de cerebro con las siguientes características:

- Corresponder a una sección coronal a la altura del bregma (Anexo 1).
- Todas las secciones tenían un área similar de tejido parenquimal.
- El número de quistes por rata fue de 1 a 4 (Anexo 2) y el volumen que ocupaban en el parénquima cerebral fue similar.

IV.3 Inmunohistoquímica

Para evaluar la inmunorreactividad de iNOS y Neurofilamento, SOD1, CD68 y GFAP se ejecutó la técnica de inmunohistoquímica para todos estos marcadores por separado (Anexo 3). Para ello las láminas con secciones de tejido cerebral en parafina fueron calentadas a 56°C y remojadas en xileno con la finalidad de eliminar la parafina del tejido, se rehidrató mediante el pasaje por una batería de alcoholes en orden decreciente; luego se realizó el desenmascaramiento de epítopes en buffer citrato en ebullición por 30 minutos; luego de unos lavados con PBS se añadió una solución de peróxido de hidrógeno al 3% para el bloqueo de la peroxidasa endógena, luego se añadió otra solución de bloqueo de proteínas con 5% de BSA para después ser incubadas las láminas durante una noche con su respectivo anticuerpo primario (anti-iNOS, anti-NFP-fosforilado y anti-SOD1, anti-CD68 y anti-GFAP) (Anexo 3) cuyas diluciones se estandarizaron previamente; después de unos lavados las láminas se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios

conjugados con HRP por 1 hora, después de unos lavados se añadió la solución de revelado del kit DAKO; finalmente se procedió con la tinción de contraste de núcleos celulares con hematoxilina; se deshidrataron y finalmente se montaron con solución de Entelan.

IV.4 Obtención y cuantificación de datos

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

En análisis de imágenes para todos los marcadores se realizó con el software ImageJ con la herramienta cell counter para contar células reactivas a iNOS y CD68, y acúmulos proteicos en forma de esferoides de 10 a 50 μm reactivos para NFP y SOD1.

Para la cuantificación de la inmunoreactividad de GFAP primero se seleccionó un área de interés de 300 μm de grosor del tejido parenquimal que rodea al quiste para cada imagen, luego se usó la función Deconvolución DAB para separar el color correspondiente a la inmunorreacción, se ajustó el valor Threshold a 100 para todas las imágenes y se midió el porcentaje de área reactiva de la región de interés (300 μm alrededor del quiste).

Para descartar la influencia de la variable “número de quistes presentes en el cerebro de ratas” se usaron secciones de tejido con la misma área

parenquimal y correspondiente a un corte a la altura del bregma para todas las láminas.

IV.5 Diseño del Estudio

IV.5.1 Tipo de estudio.

El estudio es de tipo experimental analítico

IV.5.2 Grupos de estudio. -

Se usaron 23 muestras de cerebros de rata incluidos en parafina los cuales fueron clasificados en tres grupos de estudio:

Grupo control: 7 ratas que fueron inyectadas intracranealmente con solución salina y que a lo largo de su vida no han registrado síntomas de convulsiones visibles de ningún nivel de la escala de Racine-Pinel (Velíšková & Velíšek, 2017) mediante video vigilancia.

Grupo experimental 1: 8 ratas que fueron inyectadas intracranealmente con oncosferas activadas y han desarrollado cisticercos en el cerebro sin presentar signos de epilepsia visibles de la escala de Racine-Pinel (Anexo 4) mediante video vigilancia.

Grupo experimental 2: 8 ratas que fueron inyectadas intracranealmente con oncosferas activadas y han desarrollado cisticercos en el cerebro y que

presentaron convulsiones tónico-clónicas recurrentes que corresponden a la escala 6,7 y 8 de la escala de Racine-Pinnel (Velíšková & Velíšek, 2017).

El tamaño de cada grupo, en este caso, dependió del número de especímenes que nos proporcionó el LIEI que es en base al número de ratas que desarrollaron epilepsia y al número de ratas controles que tienen registro videográfico de no haber presentado signos de epilepsia tónico-clónica generalizada además de haber cumplido los criterios de contar con cortes a la altura del bregma y presentar área parenquimal similar en todas la laminas para un análisis homogéneo.

Grupos de ratas	n
Control	7
NCC con convulsión Tónico-clónica	8
NCC-sin convulsiones	8

Se calculó el poder estadístico que proporcionaría comparar los promedios de grupos con 8 muestras en base a los valores y las desviaciones estándar encontrados en estudios previos (DS=2.0 para el caso de iNOS (Kim, 2008)) y (DS=23.90 para el caso de NFP (Mejia Maza et al., 2018)). En ambos casos el poder encontrado fue de 1, por lo que se concluye que grupos de 8 son

suficientes para encontrar diferencias significativas entre los grupos con una probabilidad nula de cometer el error tipo II.

IV.5.3 Operacionalización de Variables

Variables Independientes	Tipo de variable	Valores
Infección	Catagórica dicotómica	Ratas con NCC Ratas sanas (Control)
Epilepsia	Catagórica dicotómica	Ratas con NCC y Epilepsia Ratas con NCC sin epilepsia

Variables Dependientes	Tipo de variable	Indicador	Valore finales
Expresión de iNOS	Cuantitativa discreta.	Número de células reactivas a iNOS	Número.
Expresión de CD68	Cuantitativa discreta.	Número de células reactivas a CD68	Número
Expresión de GFAP	Cuantitativa continua.	Área reactiva a GFAP	Porcentaje

Numero de Esferoides reactivos a NFP.	Cuantitativa discreta	Número de esferoides	Número
Numero de Esferoides reactivos a SOD1.	Cuantitativa discreta	Número de esferoides	Número

IV.5.4 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico STATA14 y se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar y determinar si existe diferencias estadísticamente significativas en el número de células inmunorreactivas para iNOS y CD68, o el número de esferoides reactivos a NFP y SOD1, o el área reactiva a GFAP en el tejido cerebral de ratas de los diferentes grupos: ratas sanas, ratas con NCC sin epilepsia y ratas con NCC con epilepsia. Para determinar si existe asociación entre la expresión de marcadores de estrés oxidativo, gliosis y el número de esferoides se usó la prueba de correlación de Spearman. Además, para descartar la influencia del número de quistes sobre las variables estudiadas se realizó un análisis de correlación de Spearman el cual resultó con un $p > 0.05$ lo que indica que las variables de estudio son independientes de la variable número de quistes por lo que no influye en los resultados.

V. RESULTADOS

V.1 Inmunoreactividad iNOS en el tejido cerebral de ratas con NCC con y sin epilepsia.

Se observó inmunorreactividad a iNOS en cerebros de ratas con NCC mientras que en ratas sanas la inmunorreactividad fue muy leve con un $p=0.05$. La reactividad para iNOS se ve incrementada significativamente en ratas con NCC que presentan Epilepsia (Fig. 1C) respecto a las ratas sanas ($p<0.001$) y respecto a las ratas con NCC sin epilepsia ($p<0.05$) (Fig. 1D).

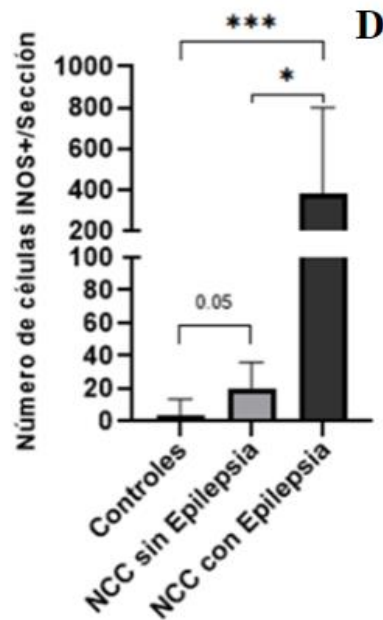
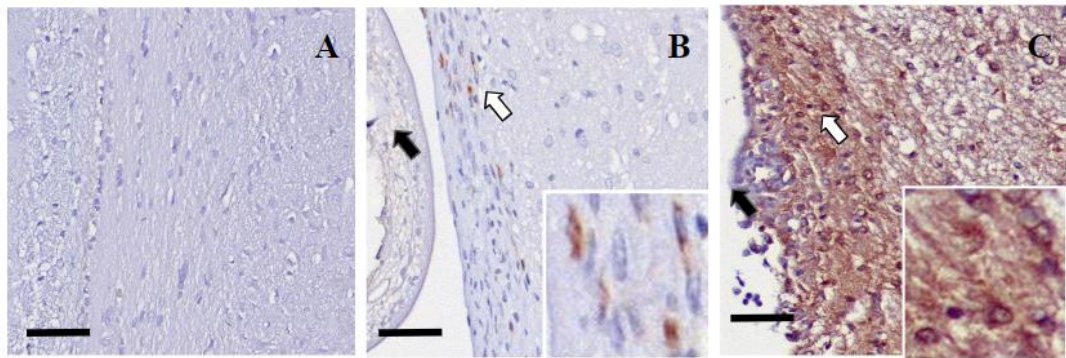


Figura 1. ABC: Inmunorreactividad de iNOS en tejido cerebral de ratas, Control (A), NCC sin Epilepsia (B) y NCC con Epilepsia (C). las flechas negras señalan al cisticerco o lugar donde se encontraba, las flechas blancas señalan la inmunorreactividad de iNOS en el tejido adyacente al cisticerco. Barra de escala = 100 μ m. D: Número de células iNOS+ por sección de tejido, *($p < 0.05$) ***($p < 0.001$).

V.2 Inmunoreactividad de CD68 y GFAP, en el tejido cerebral de ratas con NCC con y sin epilepsia y su asociación a la inmunoreactividad de iNOS.

La inmunoreactividad para CD68, marcador de macrófagos, también fue negativo en cerebros de ratas control (Fig. 2A) mientras que en ratas con NCC se evidencia abundante presencia de macrófagos alrededor del parásito (Fig. 2BC); el número de macrófagos CD68+ alrededor del parásito en ratas

con NCC que presentan epilepsia es mayor al de ratas con NCC sin epilepsia siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Fig. 2D). por otro lado, se observa que existe una asociación positiva entre la inmunorreactividad de CD68 y la inmunorreactividad de iNOS (Fig. 2E) con un rho de Spearman de 0.7505 y un $p < 0.001$ indicando que ambas variables no son mutuamente independientes.

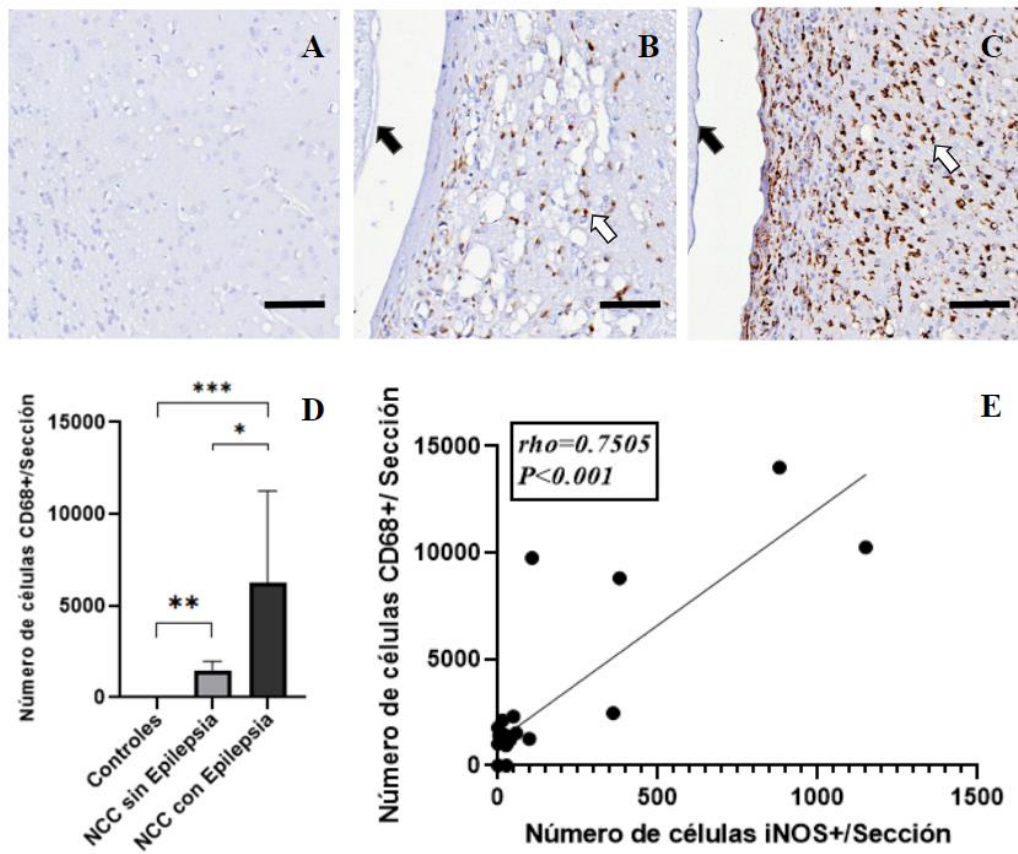


Figura 2. ABC: Inmunorreactividad de CD68 en tejido cerebral de ratas, Control (A), NCC sin Epilepsia (B) y NCC con Epilepsia (C). las flechas negras señalan al cisticerco o lugar donde se encontraba, las flechas blancas señalan la inmunorreactividad de CD68 en el tejido adyacente al cisticerco. Barra de escala = 100 μ m. D: Número de células CD68+ por sección de tejido, *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). E: Asociación entre la inmunorreactividad de iNOS y CD68, rho de Spearman=0.7505.

Por otro lado, hubo expresión basal de astrocitos GFAP+ en cerebros de ratas sanas (Fig. 3 A) mientras que en ratas con NCC (Fig. 3 B, C) se evidencia incremento en la inmunorreactividad con presencia de astrocito reactivos con diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0.05$ entre ratas controles y ratas con NCC sin epilepsia, y un $p < 0.001$ entre ratas controles y ratas con NCC con epilepsia (Fig.3 D); así mismo, se observó que la inmunorreactividad a GFAP en ratas con NCC que desarrollaron epilepsia es mayor que en ratas con NCC sin epilepsia ($p < 0.05$) (Fig. 3 D). Además, se observa que existe una fuerte asociación positiva entre la inmunorreactividad de GFAP y la inmunorreactividad de iNOS (Fig. 2E) con un rho de Spearman de 0.6761 y un $p < 0.001$ indicando que ambas variables no son mutuamente independientes.

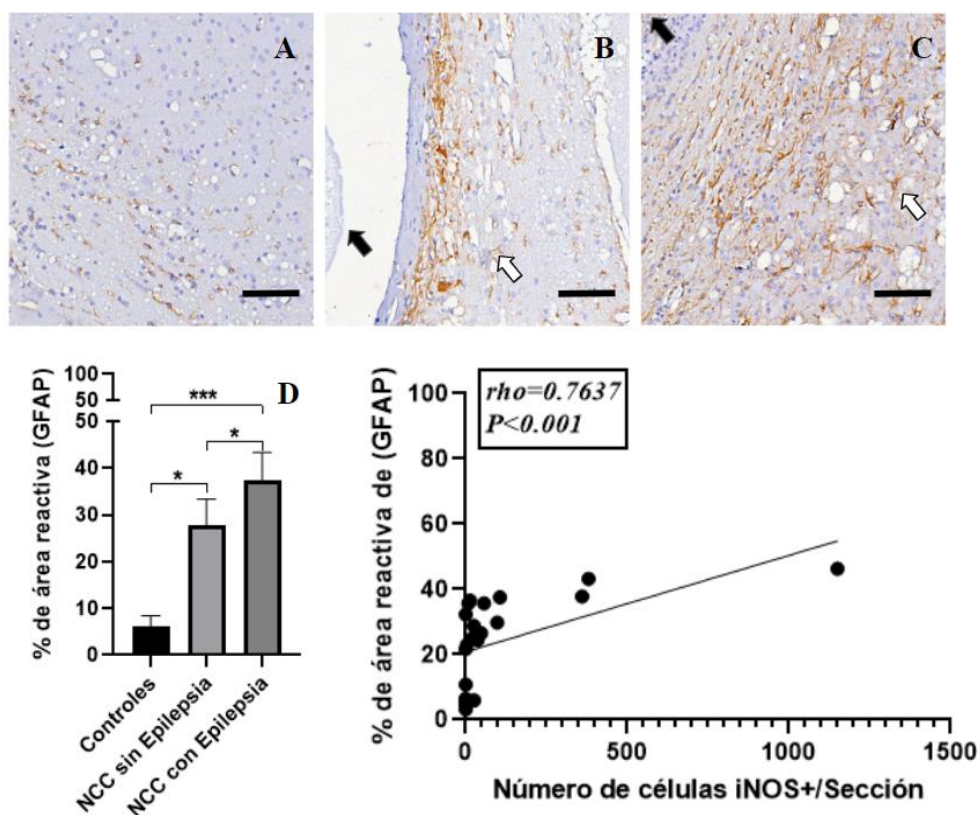


Figura 3. ABC: Inmunorreactividad de GFAP en tejido cerebral de ratas, Control (A), NCC sin Epilepsia (B) y NCC con Epilepsia (C). las flechas negras señalan al cisticerco o lugar donde se encontraba, las flechas blancas señalan la inmunorreactividad de CD68 en el tejido adyacente al cisticerco. Barra de escala = 100 μ m. D: Número de células GFAP+ por sección de tejido, *($p < 0.05$), ***($p < 0.001$). E: Asociación entre la inmunorreactividad de iNOS y GFAP, rho de Spearman=0.7637.

V.3 Evaluación de la presencia de esferoides mediante inmunorreactividad a Neurofilamento (NFP) y Super-Oxido Dismutasa citoplasmático (SOD1) en el tejido cerebral de ratas con NCC con y sin epilepsia.

Se observó una expresión basal de NFP en los cerebros de ratas control donde se logran distinguir los axones en forma de líneas paralelas (Fig. 4 A); a

diferencia de las ratas con NCC donde se observa acúmulos de esta proteína en forma de esferoides en regiones alrededor del cisticerco (Fig. 4 B, C). Sin embargo, en ratas con NCC que presentan epilepsia se encontró mayor abundancia de estos esferoides llegando a existir diferencia significativa con respecto a ratas con NCC que no presentan epilepsia ($p < 0.05$) (Fig. 4 D).

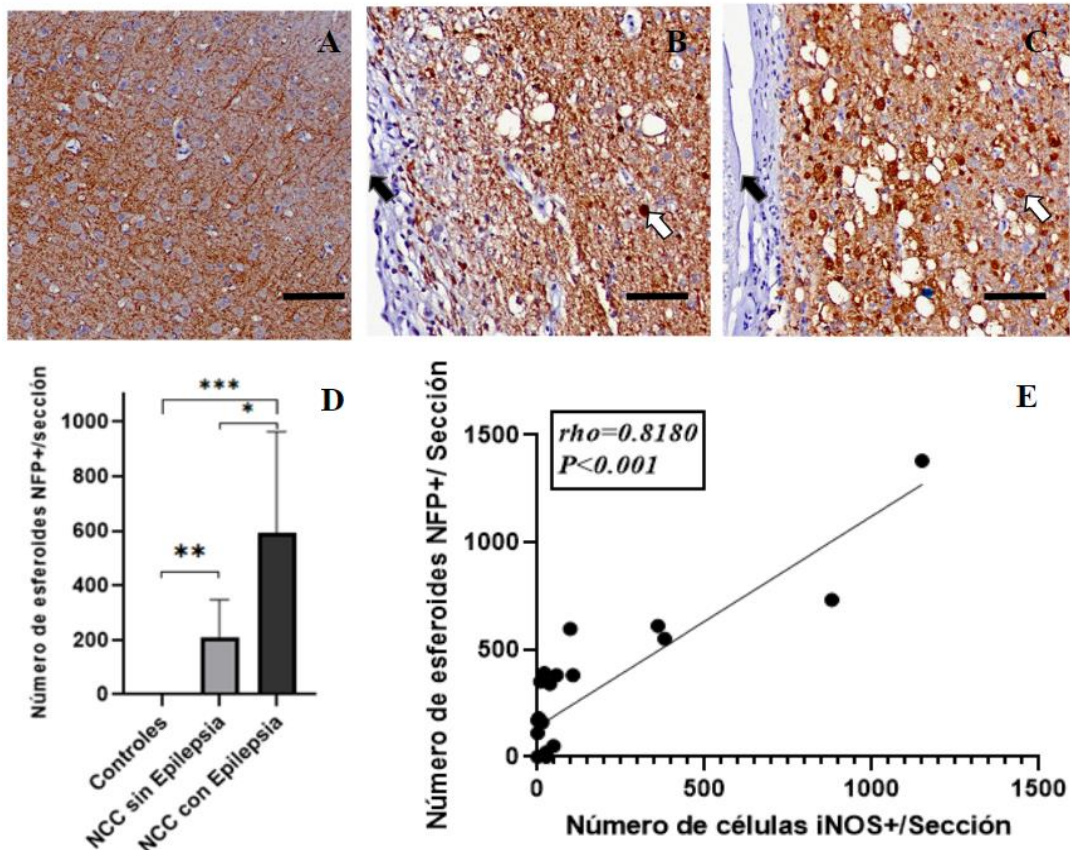


Figura 4. ABC: Inmunorreactividad de NFP en tejido cerebral de ratas, Control (A), NCC sin Epilepsia (B) y NCC con Epilepsia (C). las flechas negras señalan al cisticerco o lugar donde se encontraba, las flechas blancas señalan la presencia de esferoides en el tejido adyacente al cisticerco. Barra de escala = 100 μ m. D: Número de esferoides NFP+ por sección de tejido, *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). E: Asociación entre la inmunorreactividad de iNOS y el número de esferoides NFP+, rho de Spearman=0.8180.

Del mismo modo se observó una expresión basal de SOD1 en los cerebros de ratas control en el soma de las neuronas (Fig. 5 A); a diferencia de las ratas con NCC donde se observa acúmulos de esta proteína en forma de esferoides en regiones alrededor del cisticerco (Fig. 5 B, C). En ratas con NCC que presentan epilepsia se encontró mayor abundancia de estos esferoides reactivos a SOD1 con un $p=0.06$ respecto a ratas que no presentan epilepsia (Fig. 5 D).



Número de esferoides SOD1+ por sección de tejido, $** (p < 0.01)$, $*** (p < 0.001)$.
E: Asociación entre la inmunoreactividad de iNOS y el número de esferoides SOD1+, rho de Spearman=0.7554.

V.4 Asociación entre la inmunoreactividad de marcadores de estrés nitro-oxidativo y la presencia de esferoides en ratas con NCC.

Finalmente se encontró una correlación positiva entre la inmunoreactividad de iNOS y la presencia de esferoides inmunorreactivos para NFP y SOD, con un coeficiente de correlación de Spearman de 0.8180 y 0.7554 respectivamente, (Fig. 4 E) (Fig. 5 E) y con un $p < 0.001$ para ambos casos, indicando así que el número de esferoides positivos tanto para NFP como para SOD1 no son mutuamente independientes de la inmunoreactividad de iNOS.

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó por primera vez mediante inmunohistoquímica la presencia de estrés nitro-oxidativo en el tejido que rodea al parasito mediante la inmunorreactividad a iNOS; y se encontró que las ratas con NCC presentan inmunoreactividad a iNOS en el tejido que rodea al cisticerco; estos resultados coinciden con los resultado de Carmen (10), donde evalúa la expresión de genes relacionados con diferentes vías moleculares implicados en la inflamación y cicatrización en el tejido cerebral de ratas con NCC y encuentra diferencia significativa en la expresión de iNOS en el tejido cerca al parásito en comparación con el tejido contralateral y tejido cerebral de ratas no infectadas; adicionalmente en nuestro estudio encontramos que la reactividad para iNOS se incrementa en ratas que desarrollan epilepsia coincidiendo con el reporte de Chuang (43) donde en un modelo experimental de epilepsia inducida por Ácido Kaínico encuentran que iNOS, además de sobre expresarse, contribuye a la muerte celular por apoptosis en el hipocampo; estos datos refuerzan la hipótesis de que el estrés oxidativo tiene cierta relevancia en la aparición o perpetuación de los síntomas clínicos más graves como las convulsiones en la NCC.

Así mismo encontramos una fuerte inmunoreactividad a CD68 y GFAP al rededor del quiste en ratas con NCC tal como ya se había reportado en el modelo animal de rata (8,9). En este estudio encontramos además que la reactividad para GFAP y CD68 en ratas con NCC con epilepsia y sin epilepsia son estadísticamente diferentes; observándose una fuerte correlación entre iNOS y CD68 e iNOS y GFAP. Este incremento de macrófagos y astrocitos y la correlación con la presencia de iNOS nos

estaría indicando que los macrófagos y astrocitos podrían ser la fuente principal de ON y su consecuente producción excesiva de ROS y RNS que desencadena el estrés nitro-oxidativo; esto coincide con las crecientes evidencias que sugieren que el estrés oxidativo y la inflamación son factores significativos en la promoción de la astrogliosis y la formación de cicatrices gliales (44–46).

Por otro lado, encontramos la presencia de esferoides positivos para NFP y SOD1 en ratas con NCC, tal como lo reporta Mejia (9), y que a su vez estos esferoides se encuentran incrementados en número en ratas con NCC que presentan epilepsia, y dicho incremento correlaciona positivamente con la inmunorreactividad de iNOS lo que sugiere que el estrés oxidativo estaría asociado al daño axonal o la formación de esferoides en el tejido que rodea al parasito el cual podría estar provocando una alteración en el transporte axonal como lo sugieren Fang (47) al demostrar que la exposición de neuronas a ROS inhibe el transporte axonal y que puede contribuir a la degeneración axonal, y Redondo (6) que demuestra que la exposición de neuronas a óxido nítrico causa una interrupción en el transporte axonal y la acumulación anormal de proteínas en los axones; estos hechos en su conjunto podrían estar asociados a la presencia de cuadros clínicos como la epilepsia.

Este estudio se realizó en un modelo experimental usando ratas y al no ser un modelo natural representa una limitación, por lo que sería necesario evaluar la inmunorreactividad de iNOS en secciones de tejido cerebral de humanos o cerdos con NCC; otra limitación de este estudio es el número de animales por cada grupo, el cual se ve condicionado por los diferentes criterios de selección de las muestras; también se

da la posibilidad de que algunas ratas hayan tenido convulsiones asintomáticas o subclínicas las cuales no se lograron diferenciar mediante el monitoreo por video. Por ello, recomendamos evaluar la inmunorreactividad de iNOS en secciones de tejido cerebral de humanos o cerdos con NCC, diseñar experimentos con mayor cantidad de muestras ya que en el proceso estas se ven disminuidas conforme se van filtrando por los criterios del estudio y aspectos técnicos, y finalmente evaluar si la inhibición del estrés oxidativo en ratas con NCC disminuye o atenúa la aparición o perpetuación de la epilepsia.

VII. CONCLUSIONES

Por los resultados expuestos podemos concluir que existe inmunorreactividad a iNOS como marcador de estrés nitro-oxidativo en ratas que desarrollaron NCC. La inmunorreactividad a iNOS fue mayor en ratas con NCC que desarrollaron epilepsia en comparación a ratas con NCC que no desarrollaron epilepsia siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

La presencia de macrófagos (CD68) y astrocitos (GFAP) alrededor del quiste también se ve incrementada en ratas con NCC que presentan epilepsia y está asociada a la inmunorreactividad de iNOS.

La presencia de esferoides fue superior en secciones de tejido cerebral de ratas con NCC que desarrollaron Epilepsia en comparación de ratas con NCC sin epilepsia y también existe asociación entre el número de esferoides (NFP y SOD1) y la inmunorreactividad de iNOS.

En base a los resultados obtenidos planteamos el posible rol del estrés nitro-oxidativo en la epilepsia por NCC (Figura 6).

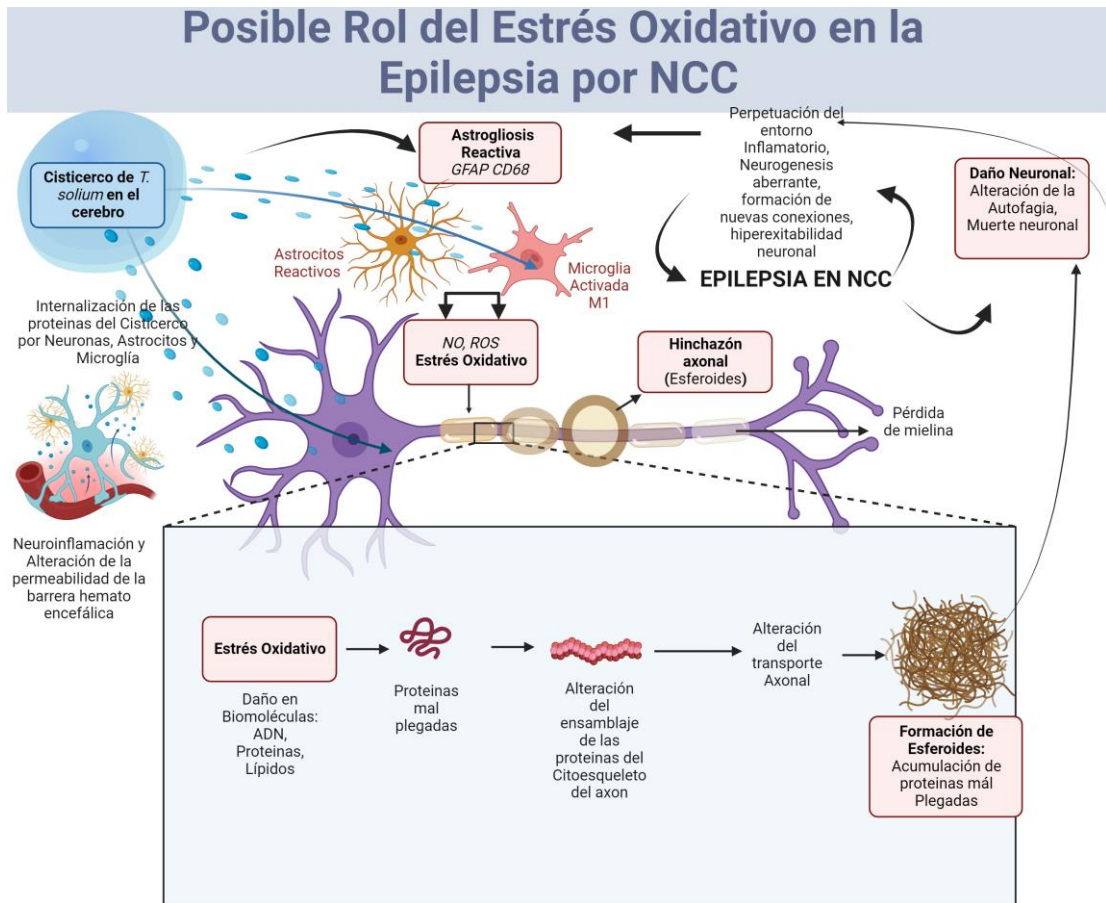


Figura 5. Posible rol del estrés oxidativo en la epilepsia por NCC.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Neurocysticercosis - MeSH - NCBI [Internet]. [citado 25 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=neurocysticercosis>
2. Bustos J, Gonzales I, Saavedra H, Handali S, Garcia HH. Neurocysticercosis. A frequent cause of seizures, epilepsy, and other neurological morbidity in most of the world. *J Neurol Sci.* agosto de 2021;427:117527.
3. Epilepsy - MeSH - NCBI [Internet]. [citado 25 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004827>
4. Sharma S, Puttachary S, Thippeswamy T. Glial Source of Nitric Oxide in Epileptogenesis: A Target for Disease Modification in Epilepsy. *J Neurosci Res.* noviembre de 2019;97(11):1363-77.
5. Aguiar CCT, Almeida AB, Araújo PVP, de Abreu RNDC, Chaves EMC, do Vale OC, et al. Oxidative Stress and Epilepsy: Literature Review. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:795259.
6. Redondo J, Hares K, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Reductions in kinesin expression are associated with nitric oxide-induced axonal damage. *J Neurosci Res.* junio de 2015;93(6):882-92.
7. Dawson TM, Golde TE, Tourenne CL. Animal Models of Neurodegenerative Diseases. *Nat Neurosci.* octubre de 2018;21(10):1370-9.

8. 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*. agosto de 2015;185(8):2259-68.
9. Mejia Maza A, Carmen-Orozco RP, Carter EC, Dávila-Villacorta DG, Castillo G, Morales JD, et al. Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathol*. 11 de diciembre de 2018;29(3):425-36.
10. Carmen-Orozco RP, Dávila DG, Cauna Y, Bernal EG, Bitterfeld L, Sutherland GL, et al. Blood-Brain barrier disruption and angiogenesis in a rat model for neurocysticercosis. *J Neurosci Res*. febrero de 2019;97(2):137-48.
11. Del Brutto OH. Neurocysticercosis: A Review. *Sci World J*. 4 de enero de 2012;2012:159821.
12. Moyano LM, Saito M, Montano SM, Gonzalez G, Olaya S, Ayvar V, et al. Neurocysticercosis as a Cause of Epilepsy and Seizures in Two Community-Based Studies in a Cysticercosis-Endemic Region in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 13 de febrero de 2014;8(2):e2692.
13. Herrick JA, Bustos JA, Clapham P, Garcia HH, Loeb JA. Unique Characteristics of Epilepsy Development in Neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg*. agosto de 2020;103(2):639-45.

14. Mahanty S, Garcia HH, Cysticercosis Working Group in Perú. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. *Prog Neurobiol.* junio de 2010;91(2):172-84.
15. Lesh EJ, Brady MF. Tapeworm. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 18 de julio de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537154/>
16. Hamamoto Filho PT, Fragoso G, Sciutto E, Fleury A. Inflammation in neurocysticercosis: clinical relevance and impact on treatment decisions. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2 de diciembre de 2021;19(12):1503-18.
17. Nikolić S, Stevanović G. [Neurocysticercosis--pathogenesis and clinical aspects]. *Srp Arh Celok Lek.* junio de 2006;134(5-6):246-50.
18. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* abril de 2014;55(4):475-82.
19. *Epilepsia* [Internet]. [citado 11 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
20. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* abril de 2017;58(4):512-21.
21. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* enero de 2004;58(1):39-46.

22. Jones DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 27 de octubre de 2006;163(1-2):38-53.
23. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29 de abril de 2011;35(3):676-92.
24. Tabima DM, Frizzell S, Gladwin MT. REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES IN PULMONARY HYPERTENSION. *Free Radic Biol Med.* 1 de mayo de 2012;52(9):10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.041.
25. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol.* 1 de julio de 1956;11(3):298-300.
26. Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* abril de 1972;20(4):145-7.
27. Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. *Free Radic Biol Med.* 15 de septiembre de 2011;51(6):1155-63.
28. Halliwell B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem Soc Trans.* noviembre de 1996;24(4):1023-7.
29. Kong Q, Lin CLG. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci CMLS.* junio de 2010;67(11):1817-29.

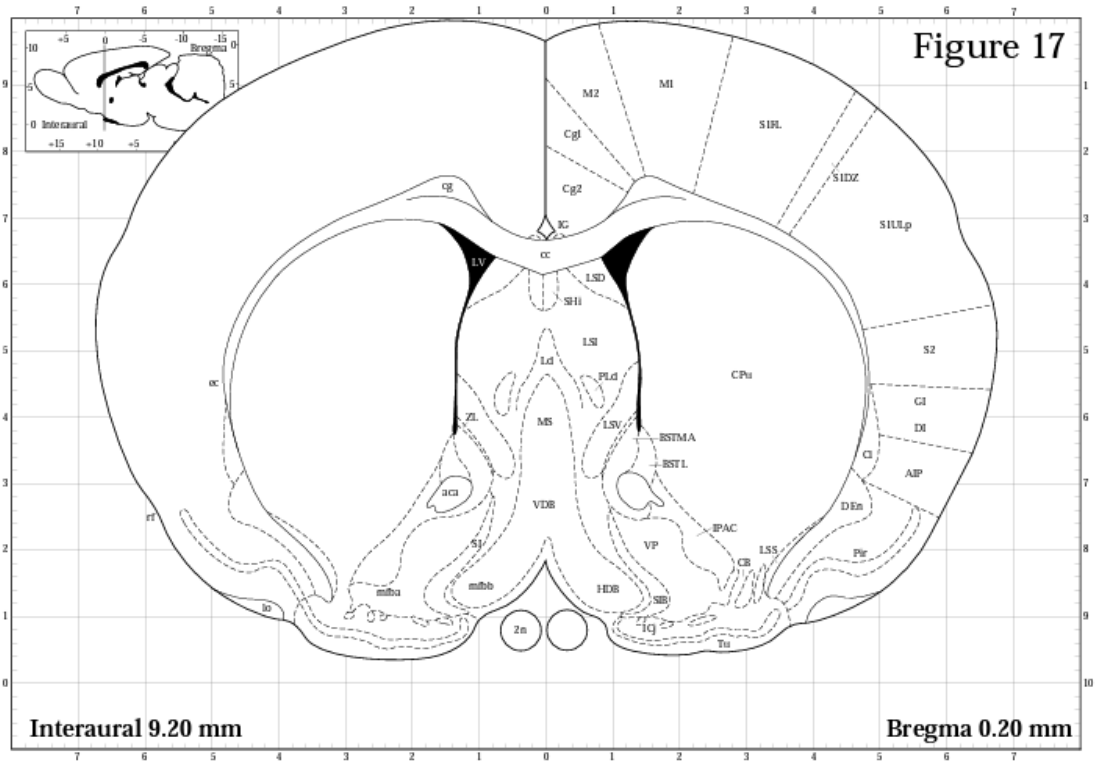
30. Kann O, Kovács R. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* febrero de 2007;292(2):C641-657.
31. Silver I, Erecińska M. Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol.* 1998;454:7-16.
32. Waldbaum S, Liang LP, Patel M. Persistent impairment of mitochondrial and tissue redox status during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. *J Neurochem.* diciembre de 2010;115(5):1172-82.
33. Malinska D, Kulawiak B, Kudin AP, Kovacs R, Huchzermeyer C, Kann O, et al. Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. *Biochim Biophys Acta.* julio de 2010;1797(6-7):1163-70.
34. Beamer E, Otahal J, Sills GJ, Thippeswamy T. N(w) -propyl-L-arginine (L-NPA) reduces status epilepticus and early epileptogenic events in a mouse model of epilepsy: behavioural, EEG and immunohistochemical analyses. *Eur J Neurosci.* noviembre de 2012;36(9):3194-203.
35. Catania MV, Giuffrida R, Seminara G, Barbagallo G, Aronica E, Gorter JA, et al. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in in vitro stellate astrocytes and in vivo reactive astrocytes after electrically induced status epilepticus. *Neurochem Res.* abril de 2003;28(3-4):607-15.

36. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* septiembre de 1994;14(9):5147-59.
37. Zhang HQ, Fast W, Marletta MA, Martasek P, Silverman RB. Potent and selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by N omega-propyl-L-arginine. *J Med Chem.* 21 de noviembre de 1997;40(24):3869-70.
38. Lingor P, Koch JC, Tönges L, Bähr M. Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell Tissue Res.* 2012;349(1):289-311.
39. Salvadores N, Sanhueza M, Manque P, Court FA. Axonal Degeneration during Aging and Its Functional Role in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* [Internet]. 2017 [citado 18 de abril de 2022];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00451>
40. Wang JT, Medress ZA, Barres BA. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol.* 9 de enero de 2012;196(1):7-18.
41. Yong Y, Gamage K, Cushman C, Spano A, Deppmann C. Regulation of degenerative spheroids after injury. *Sci Rep.* 22 de septiembre de 2020;10(1):15472.
42. Velíšková J, Velíšek L. Behavioral Characterization and Scoring of Seizures in Rodents. En: *Models of Seizures and Epilepsy* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 4 de abril de 2022]. p. 111-23. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128040669000092>

43. Chuang YC, Chen SD, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chan SHH, et al. Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat. *Neuropharmacology*. abril de 2007;52(5):1263-73.
44. Chen Y, Qin C, Huang J, Tang X, Liu C, Huang K, et al. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif*. 8 de febrero de 2020;53(3):e12781.
45. Fitch MT, Silver J. CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation. *Exp Neurol*. febrero de 2008;209(2):294-301.
46. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. diciembre de 2009;32(12):638-47.
47. Fang C, Bourdette D, Banker G. Oxidative stress inhibits axonal transport: implications for neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener*. 18 de junio de 2012;7:29.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Coordenadas del corte coronal que se usó en todas las pruebas (Bregma+/- 0.5 mm).



Anexo 2. Tabla de muestras consideradas en el estudio.

Código	Convulsión	Número de quistes
17AB	no	
CONTROL 1	no	
CONTROL 2	no	
J6B	no	
J1BPI	no	
20 CONTROL	no	
J5C CO	no	
J19Acab	no	2
J19a co	no	4
J2ABCAB	no	2
49 + 51 PI	no	1
45CAB	no	1
J2B CABEZA	no	3
J8BCAB	no	2
33 + 34 COLA	no	2
J3bcab	sí	2
J1ACAB	sí	1
14 PD	sí	3
29 PI	sí	2
31 PD	sí	4
42 PI	sí	3
34PI	sí	2
35PD	sí	2

Anexo 3. Protocolos de Inmunohistoquímica

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA OXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE (iNOS)

Anti-iNOS antibody, prediluted (ab15326) Empresa: abcam

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN Y REHIDRATACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla porta láminas.
- Colocar la canastilla con las láminas dentro en una estufa (55-64°C) por 30 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 2 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos
- Colocar las láminas en una batería de alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), por 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar 800ml de solución de desenmascaramiento: Citrato 10mM pH 6 con Tween20 al 0.05%.

- Hervir la solución de desenmascaramiento en un vaso de precipitado de 1 L y sumergir la canastilla conteniendo las láminas por 20 minutos desde que empieza la ebullición.
- Transcurridos los 20 minutos retirar el vaso de precipitado de la fuente de calor y dejar enfriar hasta alcanzar los 37°C.

3. LAVADO

- Retirar las láminas de la solución de desenmascaramiento y sumergirlas en solución taponada PBS pH 7.2 (1.37M de Cloruro de Sodio NaCL, 100mM de Fosfato de Sodio Dibásico NaHPO₄, 27mM Cloruro de Potasio KCL, 18mM Fosfato de Potasio Monobásico KH₂PO₄)
- Enmarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas cuidadosamente con ayuda de una piseta conteniendo PBS por veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

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

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 2.5% de ovoalbumina y 10% 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%, 10% de suero de cabra + Anticuerpo IgG de conejo anti-iNOS en dilución 1/10.
- 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 cabra anti-IgG de Conejo 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 Diaminibenzidina (DAB) + 3 ml de solución tamponada del kit “DAB Substrate Kit (ab64238)” de DAKO.

- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5 min.
- 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 entelan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA CD68

Anti-CD68 antibody (MCA341GA) Empresa: BIO-RAD

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN Y REHIDRATACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar la canastilla con las láminas dentro en una estufa (55-64°C) por 30 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 2 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos
- Colocar las láminas en una batería de alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), por 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar 800ml de solución de desenmascaramiento: Citrato 10mM pH 6 con Tween20 al 0.05%.
- Hervir la solución de desenmascaramiento en un vaso de precipitado de 1 L y sumergir la canastilla conteniendo las láminas por 20 minutos desde que empieza la ebullición.

- Transcurridos los 20 minutos retirar el vaso de precipitado de la fuente de calor y dejar enfriar hasta alcanzar los 37°C.

3. LAVADO

- Retirar las láminas de la solución de desenmascaramiento y sumergirlas en solución taponada PBS pH 7.2 (1.37M de Cloruro de Sodio NaCL, 100mM de Fosfato de Sodio Dibásico NaHPO₄, 27mM Cloruro de Potasio KCL, 18mM Fosfato de Potasio Monobásico KH₂PO₄)
- Enmarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas cuidadosamente con ayuda de una piseta conteniendo PBS por veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

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

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 2.5% de 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 cabra + Anticuerpo IgG de ratón anti-CD68 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 cabra anti-IgG 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 Diaminibenzidina (DAB) + 3 mL de solución tamponada del kit “DAB Substrate Kit (ab64238)” de DAKO.
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5 min.
- 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 entelan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA GFAP

Anti-GFAP antibody (IF03L) Empresa: MERK

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN Y REHIDRATACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar la canastilla con las láminas dentro en una estufa (55-64°C) por 30 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 2 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos
- Colocar las láminas en una batería de alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), por 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar 800ml de solución de desenmascaramiento: Citrato 10mM pH 6 con Tween20 al 0.05%.
- Hervir la solución de desenmascaramiento en un vaso de precipitado de 1 L y sumergir la canastilla conteniendo las láminas por 20 minutos desde que empieza la ebullición.

- Transcurridos los 20 minutos retirar el vaso de precipitado de la fuente de calor y dejar enfriar hasta alcanzar los 37°C.

3. LAVADO

- Retirar las láminas de la solución de desenmascaramiento y sumergirlas en solución taponada PBS pH 7.2 (1.37M de Cloruro de Sodio NaCL, 100mM de Fosfato de Sodio Dibásico NaHPO₄, 27mM Cloruro de Potasio KCL, 18mM Fosfato de Potasio Monobásico KH₂PO₄)
- Enmarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas cuidadosamente con ayuda de una piseta conteniendo PBS por veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

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

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 2.5% de 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 cabra + Anticuerpo IgG de ratón anti-GFAP 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 cabra anti-IgG 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 Diaminibenzidina (DAB) + 3 mL de solución tamponada del kit “DAB Substrate Kit (ab64238)” de DAKO.
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5 min.
- 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 entelan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA NFP

Anti-Anti-Neurofilament 200 kDa Antibody, clone RT97 antibody (MAB5262)

Empresa: Chemicon

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN Y REHIDRATACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar la canastilla con las láminas dentro en una estufa (55-64°C) por 30 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 2 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos
- Colocar las láminas en una batería de alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), por 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar 800ml de solución de desenmascaramiento: Citrato 10mM pH 6 con Tween20 al 0.05%.
- Hervir la solución de desenmascaramiento en un vaso de precipitado de 1 L y sumergir la canastilla conteniendo las láminas por 20 minutos desde que empieza la ebullición.

- Transcurridos los 20 minutos retirar el vaso de precipitado de la fuente de calor y dejar enfriar hasta alcanzar los 37°C.

3. LAVADO

- Retirar las láminas de la solución de desenmascaramiento y sumergirlas en solución taponada PBS pH 7.2 (1.37M de Cloruro de Sodio NaCL, 100mM de Fosfato de Sodio Dibásico NaHPO₄, 27mM Cloruro de Potasio KCL, 18mM Fosfato de Potasio Monobásico KH₂PO₄)
- Enmarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas cuidadosamente con ayuda de una piseta conteniendo PBS por veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

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

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 2.5% de 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 cabra + Anticuerpo IgG de ratón anti-NFP 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 cabra anti-IgG de ratón conjugado 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 Diaminibenzidina (DAB) + 3 mL de solución tamponada del kit “DAB Substrate Kit (ab64238)” de DAKO.
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5 min.
- 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 entelan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA SOD-1

Anti-SOD-1 (FL-154)

Empresa: Santa Cruz Bioecnology

PROCEDIMIENTO

1. DESPARIFINIZACIÓN Y REHIDRATACIÓN

- Seleccionar las láminas y colocarlas en una canastilla portaláminas.
- Colocar la canastilla con las láminas dentro en una estufa (55-64°C) por 30 minutos.
- Sumergir las láminas en Xilol I por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol II por 2 minutos,
- Sumergir las láminas en Xilol III por 2 minutos,
- Colocar las láminas en una estufa (55-64°C) por 2 minutos
- Colocar las láminas en una batería de alcohol de forma graduada en orden descendente (100%, 95%, 90%, 80%), por 2 minutos en cada alcohol.
- Colocar la canastilla con las láminas en un recipiente con agua destilada.

2. DESENMASCARAMIENTO

- Preparar 800ml de solución de desenmascaramiento: Citrato 10mM pH 6 con Tween20 al 0.05%.
- Hervir la solución de desenmascaramiento en un vaso de precipitado de 1 L y sumergir la canastilla conteniendo las láminas por 20 minutos desde que empieza la ebullición.

- Transcurridos los 20 minutos retirar el vaso de precipitado de la fuente de calor y dejar enfriar hasta alcanzar los 37°C.

3. LAVADO

- Retirar las láminas de la solución de desenmascaramiento y sumergirlas en solución taponada PBS pH 7.2 (1.37M de Cloruro de Sodio NaCL, 100mM de Fosfato de Sodio Dibásico NaHPO₄, 27mM Cloruro de Potasio KCL, 18mM Fosfato de Potasio Monobásico KH₂PO₄)
- Enmarcar el área del tejido usando un plumón hidrofóbico.
- Lavar las láminas cuidadosamente con ayuda de una piseta conteniendo PBS por veces cada 5 min.

4. BLOQUEO DE PEROXIDASA ENDÓGENA

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

5. BLOQUEO GENERAL

- Preparar solución de bloqueo: PBS Tritón al 0.05%, 2.5% de ovoalbumina y 10% 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%, 10% de suero de cabra + Anticuerpo IgG de Conejo anti-SOD-1 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 cabra, 10% de suero de rata, + Anticuerpo secundario 1/800 (IgG de cabra anti-IgG de Conejo conjugado 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 Diaminibenzidina (DAB) + 3 mL de solución tamponada del kit “DAB Substrate Kit (ab64238)” de DAKO.
- Agregar solución de revelado sobre los tejidos, dejar incubando por 5 min.
- 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 entelan (MERCK) y laminillas cubre objeto, dejar secar.

Anexo 4. Escala de Racine-Pinel

TABLE 9.1 Scoring System for Focal Seizures With Secondary Generalization I: Kindling: Adult Rats (Pinel and Rovner, 1978; Racine et al., 1973)

Seizure Stage	Behavioral Expression	Righting Reflex	Structures Involved
1	Mouth a facial movement	Preserved	Forebrain
2	Head nodding		
3	Contralateral forelimb clonus		
4	Symmetrical forelimb clonus with rearing		
5	Rearing and falling		
6 ^a	Head nodding, forelimb clonus with multiple rearing and falling	Lost	Brainstem
7 ^a	Wild running in circles, jumping, rolling over, and vocalization		
8 ^a	Tonic posturing and climbing		

^aStages described by Pinel and Rovner (1978) beyond regular kindling stages, when kindling stimulations continue beyond 80 stimulations. Animals who received in average over 200 stimulations had spontaneous seizures.