



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DAÑO NEURONAL POR QUISTES CALCIFICADOS
EN CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON NEUROCISTICERCOSIS

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Miranda Melo, Noemí Paola

Asesores:

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor

(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Baquedano Santana, Laura Estefania

(ORCID: 0000-0002-9947-3371)

Jurado:

Marcelo Rodriguez, Alvaro Julian

Scotto Espinoza, Carlos Jesus

Rodrigo Rojas, María Elena

Lima - Perú

2021

Referencia:

Miranda, N. (2021). *Determinación del grado de daño neuronal por quistes calcificados en cerdos infectados naturalmente con neurocisticercosis* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5524>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE DAÑO NEURONAL POR QUISTES CALCIFICADOS

EN CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON NEUROCISTICERCOSIS

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Tesis para optar el título profesional de Licenciada en Biología

Autora:

Miranda Melo, Noemí Paola

Asesoras:

Gutiérrez Román, Ana Isabel Flor

(ORCID: 0000-0002-7020-7387)

Baquadano Santana, Laura Estefania

(ORCID: 0000-0002-9947-3371)

Jurado:

Marcelo Rodríguez, Alvaro Julian

Scotto Espinoza, Carlos Jesus

Rodrigo Rojas, María Elena

Lima - Perú

2021

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Descripción y formulación del problema.....	3
1.2 Antecedentes	4
1.3 Objetivos	8
- Objetivo General.....	8
- Objetivos Específicos.....	8
1.4 Justificación	8
1.5 Hipótesis	10
II. MARCO TEÓRICO	11
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación	11
2.1.1 Taenia solium.....	11
2.1.2 Neurocisticercosis	12
2.1.3 Presentación clínica de los quistes.....	12
2.1.3.1 Neurocisticercosis parenquimatosa.....	13

	iii
2.1.3.2 Neurocisticercosis extraparenquimatosa.....	14
2.1.4 Tipos de quistes.....	15
2.1.4.1 Quiste viable.. ..	15
2.1.4.2 Quistes degenerados (coloidal).. ..	15
2.1.4.3 Quistes degenerados (granular).....	15
2.1.4.4 Quistes calcificados.. ..	16
2.1.5 Fase inflamatoria.....	16
2.1.6 Daño neuronal.....	17
2.1.6.1 Lesión axonal.	18
2.1.6.2 Neurofilamento.. ..	19
2.1.7 Modelos animales	20
2.1.7.1 Modelo de cerdo.	21
III. MÉTODO	22
3.1 Tipo de investigación.....	22
3.2 Ámbito temporal y espacial	22
3.3 Variables	22

	iv
3.3.1 Independiente.....	22
3.3.2 Dependiente.....	23
3.4 Población y muestra.....	23
3.5 Instrumentos.....	24
3.5.1 Equipos.....	24
3.5.2 Reactivos.....	24
3.6 Procedimiento.....	25
3.6.1 Estudio de diseño y animales.....	25
3.6.2 Colección de especímenes.....	26
3.6.3 Protocolo de tinción hematoxilina-eosina.....	26
3.6.4 Protocolo de tinción Von kossa.....	27
3.6.5 Protocolo de tinción inmunohistoquímica para neurofilamento.....	27
3.7 Análisis de datos.....	28
3.7.1 Análisis neuropatológico.....	29
3.7.2 Análisis del neurofilamento.....	31
3.8 Consideraciones éticas.....	32

IV. RESULTADOS	v 33
4.1 Calcificación	35
4.2 Células infiltradas inflamatorias	36
4.3 Células fibróticas	37
4.4 Células gigantes y reacción granulomatosa	38
4.5 Neurofilamento	39
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	41
VI. CONCLUSIONES	46
VII. RECOMENDACIONES	47
VIII. REFERENCIAS.....	48

RESUMEN

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria causada por el estadio larvario de *Taenia solium* en el sistema nervioso central y es la principal causa de epilepsia adquirida en países endémicos. Las calcificaciones producidas por esta enfermedad se asocian a convulsiones en el 20% de los pacientes. El objetivo de este estudio fue caracterizar y evaluar los hallazgos neuropatológicos de quistes parenquimales en el cerebro de cerdos con NCC. Se utilizaron 15 cerdos infectados naturalmente con *T. solium* y recibieron tratamiento antiparasitario. Luego, se sacrificaron 5 cerdos a los 4, 8 y 12 meses post-tratamiento respectivamente. Se obtuvieron las láminas con el tejido cerebral y se realizó la tinción hematoxilina-eosina para describir la respuesta inflamatoria; para identificar y describir la presencia de depósitos de calcio utilizamos la tinción de Von Kossa y se usó el marcador de neurofilamento (NF) en inmunohistoquímica, para evaluar el daño neuronal mediante la acumulación de NF. Los cerdos con NCC tuvieron una mayor respuesta inflamatoria y mayor presencia de calcio en el grupo de 8 meses. También encontramos mayor acumulación de neurofilamento en el grupo de 12 meses. Estos resultados permitirán comprender la neurocisticercosis calcificada y así ser fuente de información para futuros tratamientos antiparasitarios.

Palabras clave: neurocisticercosis, cerdo, calcificación, daño neuronal, reacción inflamatoria, neurofilamento.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a parasitic disease caused by the larval stage of *Taenia solium* in the central nervous system and is the main cause of acquired epilepsy in endemic countries. The calcifications produced by this disease are associated with seizures in 20% of patients. The objective of this study was to characterize and evaluate the neuropathological findings of calcified cysts in the brain of pigs with NCC. 15 pigs naturally infected with *T. solium* were used and received antiparasitic treatment. Then, 5 pigs were slaughtered at 4, 8 and 12 months post-treatment respectively. Slides were obtained with brain tissue and hematoxylin-eosin staining was performed to describe the inflammatory response; To identify and describe the presence of calcium deposits, we used the Von Kossa stain and the neurofilament marker (NF) was used in immunohistochemistry to evaluate neuronal damage through the accumulation of NF. Pigs with NCC had a greater inflammatory response and greater presence of calcium in the 8-month-old group. We also found a greater accumulation of neurofilament in the 12-month group. These results will allow us to understand calcific neurocysticercosis and thus be a source of information for future antiparasitic treatments.

Key words: neurocysticercosis, pig, calcification, neuronal damage, inflammatory reaction, neurofilament.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción y formulación del problema

La neurocisticercosis (NCC) es la enfermedad parasitaria más frecuente del sistema nervioso central (SNC) causada por la invasión del metacestodo de *Taenia solium* al cerebro, siendo esta parasitosis un importante problema de salud pública, principalmente en lugares donde existe crianza de cerdos en malas condiciones sanitarias e higiénicas. Asimismo, varios autores mencionan que esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en los países de África, Asia y Latinoamérica (Barriga, 2002; García et al., 2003).

En Perú, se ha estimado que aproximadamente 30.000 personas padecen de NCC sintomática, convirtiéndola en una zoonosis de alta prevalencia. Este parásito es la causa principal de epilepsia adquirida en adultos y una de las parasitosis más frecuentes del SNC con alta morbilidad y mortalidad. Sin embargo, la etapa en la que se desencadena esta crisis epiléptica es cuando el quiste comienza el proceso de calcificación (Bern et al.,1999; Nash et al.,2008; Cangalaya et al., 2015).

Así mismo el diagnóstico de esta enfermedad es un reto, pues su identificación involucra convencionalmente compatibilidad en la historia clínica, serología positiva y monitoreo por tomografía computarizada o resonancia magnética y su prevalencia es difícil de determinar, es decir, los datos sobre la distribución real de esta zoonosis son aún fragmentados. Además, no hay especificidad de sus manifestaciones clínicas y falta de recursos para obtener pruebas completamente confiables y seguras. (Leyton, 2007; Mewara et al.,2013; Ndimubanzi et al., 2010).

Es así que, para poder estudiar mejor estas manifestaciones de la NCC, se propuso muchos modelos, los más usados son los ratones y ratas, debido a su facilidad de manejo y la abundancia de reactivos disponibles comercialmente. Con estos modelos se han obtenido resultados muy interesantes para una comprensión profunda de la enfermedad, mas no es posible extrapolarlo con el ser humano (Arora et al., 2017). Actualmente se utiliza el modelo porcino, ya que se toma en cuenta que este animal es el huésped intermediario natural de *T. solium* y es el que tiene más semejanza con el ser humano en cuanto a la respuesta inflamatoria (Sikasunge et al., 2008). Debido a ello muchos estudios están empleando cerdos naturalmente infectados por *T. solium* para describir el daño de la enfermedad y para evaluar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, aún no se ha investigado la caracterización de la inflamación inducida por la droga antihelmíntica en cisticercos calcificados (Alvarez et al., 2002; Londoño et al., 2002). La presente investigación pretende examinar los cambios histopatológicos y el grado de daño neuronal, durante la interacción huésped-parásito causada por los cisticercos en su etapa calcificada en el tejido cerebral porcino. Para ello se ejecutó algunos análisis histológicos e inmunohistoquímicos al tejido cerebral con cisticercosis, de modo que podremos comprender mejor las respuestas inflamatorias de las calcificaciones inducidas por el tratamiento y así servir de base para futuras investigaciones encargadas de diseñar medidas de tratamiento más eficientes contra esta patología.

1.2 Antecedentes

Arora et al. (2017) nos expresaron que es difícil desarrollar un modelo animal que pueda imitar el curso natural de infección de *T. solium* para la enfermedad de neurocisticercosis, sin embargo, en la revisión que realizaron, existen diferentes estudios que evalúan modelos animales

utilizados para estudiar la inmunopatogénesis de la neurocisticercosis, empleando ratones, ratas, cobayas, perros, gatos y cerdos como modelos para esta enfermedad, con diferente grado de éxito. Los modelos de ratones y ratas se han utilizado ampliamente debido a su facilidad de manejo y la abundancia de reactivos disponibles comercialmente para estudiarlos, dando así resultados muy interesantes para una comprensión profunda de la enfermedad. Pero últimamente, el modelo porcino infectado experimental o naturalmente se está convirtiendo en el mejor modelo animal ya que la progresión de la enfermedad es similar a la infección humana, por ser el hospedador natural de la enfermedad. Aunque hay algunas limitaciones, ya que es un animal grande el manejo se hace -un poco costoso, aun así, es el mejor modelo para el estudio de la enfermedad.

Cangalaya et al. (2015) observaron que la ubicación y la extensión de los cisticercos en el cerebro es un factor que determina el grado de la respuesta inmune después del tratamiento con antiparasitario. Ellos evaluaron al modelo de cerdo infectado de forma natural sin tratamiento, donde vieron que las características de la inflamación alrededor de los cisticercos cerebrales, ya sea cisticercos parenquimatosos, meníngeos y/o mixtos, no tuvieron diferencias en la inflamación. Por el contrario, cuando analizaron cisticercos después del tratamiento antiparasitario con praziquantel, observaron que la inflamación alrededor de los cisticercos cerebrales parenquimatosos se incrementó, en comparación con los otros lugares.

Londoño et al. (2002) recomiendan que debiéramos tener en cuenta las ventajas únicas ofrecidas por los cerdos como modelos animales para la cisticercosis, ellos usaron el corazón, músculos esqueléticos y los tejidos cerebrales de cerdos infectados naturalmente con *T. solium*, analizándolo mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas utilizaron anticuerpos como

anti-cerdo SWC3a para monocitos y granulocitos, CD21 antihumano para células B, fibrilar glial antihumana proteína ácida (GFAP) para astrocitos, y CD44 anti-cerdo para adhesina, entre otros, y observaron en los tejidos, que los cisticercos inducen la formación de un granuloma maduro, el cual está constituido por una capa rica en eosinófilos alrededor del parásito, un revestimiento compacto de células gigantes epitelioides y multinucleadas y un infiltrado inflamatorio con fibras de colágeno entremezcladas. Concluyen así, que sus resultados inmunohistoquímicos refuerzan cada vez más las similitudes entre la cisticercosis humana y porcina.

Sikasunge et al. (2009) estudiaron tejidos de cerebro de cerdos sanos y con NCC, mediante técnicas de histología e inmunohistoquímica, donde sus resultados revelaron una extensa astrogliosis, daño neuronal y mayormente axonal en lesiones tempranas tardías, al observarse una mayor expresión de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y de neurofilamento (NF). Con estos resultados demostraron que la NCC porcina está asociada al daño severo del tejido nervioso y que la respuesta del huésped es un esfuerzo de colaboración entre las respuestas inmunes locales y periféricas comparables a las observadas en el NCC humano, comprobando así que el cerdo seguiría siendo un modelo útil para comprender el curso del NCC en humanos.

Así otros estudios sobre NF como de Gómez-Isla et al. (1997) nos señalaron que varios trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, implican la acumulación de proteínas específicas, una de ellas es la acumulación de un grupo de proteínas, conocidas como los neurofilamentos (NF). Ellos analizan el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer y sin Alzheimer donde observa que en pacientes con Alzheimer se perdió más del 50% de neuronas y existen acumulación de ovillos de neurofilamento.

Así concluye en su estudio donde observan que tanto la pérdida neuronal y los ovillos neurofibrilares aumentaron en paralelo con la duración y la gravedad de la enfermedad, pero la cantidad de pérdida neuronal superada por muchas veces la cantidad de ovillos neurofibrilares acumulados.

Igualmente, Smith et al. (1999) nos informa que el trauma cerebral en humanos aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer (EA) y puede inducir la formación aguda de placas similares a EA que contienen β amiloide ($A\beta$). Por ello querían explorar más sobre el posible vínculo entre el trauma cerebral y la neurodegeneración, es así como realizaron estudios neuropatológicos utilizando un modelo porcino de lesión cerebral difusa. Primero sacrificaron los animales a los 1, 3, 7 y 10 días después del trauma, luego realizaron un análisis inmunohistoquímico en secciones del cerebro usando anticuerpos específicos para $A\beta$, proteína precursora de β amiloide (pPP), tau y proteínas de neurofilamento (NF). Detectando así la acumulación de $A\beta$ y tau que se colocalizó con pPP y NF inmunorreactivos en axones dañados en toda la sustancia blanca en todos los animales lesionados. También algunos animales presentaron acumulaciones de inclusiones ricas en tau y NF en el cuerpo neuronal. Concluyendo así, que este modelo porcino de lesión cerebral difusa se caracteriza por la acumulación de proteínas que también forman agregados patológicos en la EA y enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

También Petzold et al. (2005) nos informan que al analizar muestras de líquido céfalo raquídeo (LCR) mediante nuevas técnicas de ELISA, los niveles de NF aumentaron desde el inicio hasta los tres años de muestreo de seguimiento en aproximadamente la mitad de nuestros pacientes con esclerosis múltiple (EM). Ellos interpretan sus hallazgos sobre la hipótesis epidemiológica

donde el daño axonal es un proceso acumulativo gradual durante el curso de la enfermedad. Por lo que deducen que estos valiosos marcadores sustitutos de NF, tienen el potencial de ser utilizado como nuevas medidas de resultado secundarias en ensayos de EM tratamiento.

1.3 Objetivos

- Objetivo General

Determinar el daño neuronal por quistes calcificados en el modelo de cerdo infectado naturalmente con neurocisticercosis en grupos sacrificados en 4, 8 y 12 meses después del tratamiento antihelmíntico.

- Objetivos Específicos

Determinar la ubicación del quiste e identificar la respuesta inflamatoria en el tejido cerebral porcino mediante la tinción hematoxilina-eosina.

Determinar la presencia de calcio en quistes calcificados mediante la tinción Von Kossa.

Cuantificar el daño axonal mediante el uso del marcador de neurofilamento.

1.4 Justificación

La neurocisticercosis ha sido clínicamente bien documentada, pero aún se requiere una mayor comprensión de la compleja relación hospedero-parásito y la inflamación causada , ya que es un factor principal en la severidad de los síntomas.

En este mismo sentido González, et al. (2012) y Garcia et al. (2014) nos señalan que el tratamiento mata al parásito y por ello causa la calcificación, seguidamente de la inflamación y posteriores crisis epilépticas, pero ellos afirman que aún falta profundizar más el tema. Para superar estas limitaciones se han desarrollado varios modelos animales tales como el cerdo ya que se parece más al humano (Londoño et al., 2002; Verastegui et al., 2000; Sikasunge et al., 2009).

En el presente estudio a fin de caracterizar la inflamación inducida por la droga antihelmíntica, se emplearon cerdos naturalmente infectados por *T. solium* en los que se detalla el desarrollo de la enfermedad y se evalúa la eficacia del tratamiento, debido a que existen muy pocos estudios enfocados en describir estos aspectos.

Es así como se pretende examinar los posibles cambios histopatológicos y el grado de afectación o daño neuronal, si lo hubiera, durante la interacción huésped-parásito causada por los cisticercos en su etapa calcificada, en el tejido cerebral porcino. Para ello se ejecuta algunos análisis, como someter al tejido cerebral porcino naturalmente infectado por cisticercosis, a métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos. De modo que podremos comprender mejor las respuestas inflamatorias agudas inducidas por el tratamiento, pudiendo así servir de estudio base para futuras investigaciones y así se diseñen medidas de tratamiento simples, seguras y más efectivas contra esta patología.

1.5 Hipótesis

- Ho: Existe daño neuronal por quistes calcificados en el modelo de cerdo infectado naturalmente con neurocisticercosis en grupos sacrificados en 4, 8 y 12 meses después del tratamiento.
- Ha: No existe daño neuronal por quistes calcificados en el modelo de cerdo infectado naturalmente con neurocisticercosis en grupos sacrificados en 4, 8 y 12 meses después del tratamiento.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1 *Taenia solium*

T. solium es un platelminto de la clase Eucestoda y es una de las tres especies del género *Taenia* que tienen capacidad de parasitar al hombre. El parásito adulto está compuesto por una pseudocabeza (escólex) armada con cuatro ventosas y una doble corona de ganchos en el roseto retráctil, posee un cuello angosto y un cuerpo elongado que consta de varios cientos de proglótidos cada uno con ambos órganos sexuales funcionales (Hoberg, 2006).

2.1.1.1 Ciclo de vida. Presenta un ciclo de vida complejo donde los humanos son los únicos hospederos definitivos, no obstante, tanto los cerdos como los humanos pueden ser hospederos intermediarios (Verster, 1967).

Existen dos tipos de patologías causadas por la infección de *T. solium*, la primera es causada por el parásito adulto únicamente en el intestino del humano denominada teniasis, La teniasis se adquiere por la ingesta de carne de cerdo infectado con larvas de *T. solium*. Los cisticercos ingeridos evaginan en el intestino humano y mediante estructuras de la cabeza (escólex) se pueden adherir a la pared del intestino y desarrollar el estadio adulto del parásito y la segunda, que se refiere a la infección causada por la forma larvaria, denominada cisticercosis (CC), esto ocurre en el cerdo o en el ser humano al ingerir huevos u oncosferas presentes en alimentos o líquidos contaminados con heces. Una vez ingeridos estos, los embriones se liberan por acción de los ácidos estomacales y pasan al intestino delgado; luego de atravesar la mucosa intestinal llegan

a la circulación, mediante la cual potencialmente pueden infectar cualquier tejido y puede desarrollarse en el músculo esquelético, el tejido subcutáneo y también en el sistema nervioso central, en donde provoca un desorden clínico con la capacidad de adquirir distintas formas, conocido como neurocisticercosis (Del Brutto, 2005; Flisser, 1994).

2.1.2 Neurocisticercosis

En la NCC, los quistes tienen una forma de vesículas redondeadas u ovaladas que varían en tamaño desde unos milímetros hasta 1-2 cm de diámetro (García et al., 2014). La localización más común son los hemisferios cerebrales, principalmente entre la unión de la materia gris con la blanca. Además, se pueden hallar quistes en el cerebelo, ventrículos, espacio subaracnoideo, cisternas basales y columna vertebral (García et al., 2003).

La NCC tiene diversas manifestaciones clínicas, llegándose a presentar como otro síntoma neurológico, es así que puede ocurrir aumento de la presión intracraneal, hidrocefalia y crisis epilépticas, esta última es la más frecuente. Asimismo, el tamaño del quiste y el bloqueo de la circulación cerebroespinal influyen en la sintomatología de NCC, sin embargo, la mayoría de los síntomas son resultado directo de la cantidad de quistes, la localización en el cerebro y de la gravedad del proceso inflamatorio del tejido alrededor del parásito. Por otro lado, el diagnóstico de la NCC involucra convencionalmente compatibilidad en la historia clínica, serología positiva y monitoreo por tomografía computarizada o resonancia magnética (Nash et al., 2015; García et al., 2002).

2.1.3 Presentación clínica de los quistes

Las manifestaciones clínicas de NCC pueden ir desde una infección sin síntomas hasta enfermedad grave y muerte. La gravedad de la enfermedad y las manifestaciones clínicas son debido al número, tamaño y ubicación de los quistes e intensidad de la respuesta inmune del huésped. El principal determinante de las características del NCC sintomático se da cuando los parásitos se encuentran en el parénquima cerebral o en los espacios extraparenquimatosos. Sin embargo, la cisticercosis cerebral parenquimatosa es la más frecuente y la que se presenta con convulsiones como la manifestación principal (Estañol et al., 1989; Garcia et al., 2005).

2.1.3.1 Neurocisticercosis parenquimatosa. La cisticercosis parenquimal es la más frecuente ya que constituye el 29-62 % de los casos de NCC, siendo la forma más frecuente. Suelen ser quistes de tipo celuloso, localizados sobre todo en áreas corticales del SNC y ganglios de la base.

Es la que presenta convulsiones como la manifestación principal, también epilepsias, dolores de cabeza y otros síntomas. Las crisis epilépticas se producen principalmente por dos causas, ya sea como crisis sintomáticas agudas en el contexto de quistes activos o formación de granulomas, o como "epilepsia crónica" asociada con lesiones calcificadas en etapa terminal (Carabin et al., 2011). Asimismo, muchos informes de casos y estudios epidemiológicos han establecido una relación entre el NCC y los dolores de cabeza similares a la migraña, con un cociente de probabilidades entre 2.65 y 3.39 similar al de la epilepsia. Dado que los dolores de cabeza recurrentes son más frecuentes que la epilepsia, incluso en regiones donde el NCC es endémico. Sin embargo, no hay evidencia suficiente para recomendar pruebas sistemáticas de

laboratorio o neuroimagen para NCC en pacientes que presentan dolores de cabeza recurrente o crónico (Fogang et al., 2014).

Igualmente, la NCC también pueden mostrar signos neurológicos focales (11.8%), signos de presión intracraneal elevada (16.3%), signos meníngeos (5.6%), anormalidades de la marcha (5.6%) y estado mental / síntomas psiquiátricos alterados (28.1%) y otros síntomas (Carabin et al., 2011).

2.1.3.2 Neurocisticercosis extraparenquimatosa. Los cisticercos pueden ubicarse en el espacio ventricular o subaracnoideo y puede desarrollarse una hipertensión intracraneal aguda que puede llegar a ser mortal. El impedimento del flujo del LCR ocurre con mayor frecuencia cuando los quistes se alojan en el cuarto ventrículo y causan hidrocefalia progresivamente (Fogang et al., 2014; Nash et al., 2011) en su revisión, dividieron el NCC extraparenquimatoso en cuatro subgrupos, que consisten en NCC ventricular, NCC subaracnoideo de la convexidad cerebral, NCC subaracnoideo de la fisura lateral y NCC subaracnoideo basal debido a diferentes ubicaciones, patologías y características clínicas posteriores.

Dentro de este grupo también podemos clasificarlos según la incrustación, ya que algunos pueden encontrarse totalmente incrustados dentro del tejido parenquimatoso o meníngeo o parcialmente adyacentes tanto al parénquima cerebral como a las meninges (corticomeníngeos) (Cangalaya et al., 2016).

2.1.4 Tipos de quistes

El quiste pasa por cuatro fases de desarrollo: fase vesicular, fase granular y la fase calcificada (Escobar, 1983).

2.1.4.1 Quiste viable. Quiste esférico de 4 a 20 mm que rodea el escólex, el que se ve como un nódulo en el interior de 2 a 4 mm. Tiene paredes finas (1 mm de espesor) y contenido líquido y homogéneo, de señal idéntica al líquido cefalorraquídeo. Los quistes viables no presentan una inflamación evidente. Aun no se sabe o como consecuencia del tratamiento, el huésped identifica el quiste viable o en desarrollo y recién empieza con una respuesta inflamatoria intensa y un proceso gradual de cambios degenerativo (García et al., 2003).

2.1.4.2 Quistes degenerados (coloidal). En este estadio el parásito muere, lo cual genera un infiltrado inflamatorio local, con formación de una capa más gruesa de colágeno, formación de tejido de granulación. El fluido o líquido coloidal se transforma en una suspensión coloidal, con solutos proteicos de mayor intensidad y se encuentran rodeados de edema vasogénico (Cuéllar et al., 2011).

2.1.4.3 Quistes degenerados (granular). Según va aumentando la inflamación, el contenido del quiste se vuelve opaco. Así se va formando un granuloma que rodea el quiste, al empezar con un infiltrado celular dentro del quiste y después se forma totalmente con una capa celular epiteloide interna. Según pasa el tiempo, el quiste se desarregla con muchos restos de quiste, corpúsculos calcáreos y diversos grados de reacción inflamatoria. Luego el granuloma

disminuye su tamaño, se transforma en nodular, a veces con edema con inclinación de generar convulsiones (Nash et al., 2004).

2.1.4.4 Quistes calcificados. En esta etapa los quistes se vuelven no visibles y se establecen como granuloma, incluso su contenido puede hialinizarse. La mayoría de ellos se calcifica, lo cual se desconoce cómo ocurre, pero se presume que sea una combinación de la alta accesibilidad del antígeno para el huésped que ocasiona inflamación y/o pérdida de la eliminación de la respuesta celular del huésped por razones que no están claras. También hay desarrollo de gliosis, después de la inflamación en el cerebro lo cual aumenta el riesgo de epilepsia.

El NCC calcificado generalmente se denomina NCC inactivo porque incluye un proceso de cicatrización no clínicamente relevante. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que el NCC calcificado estaría relacionado con el origen y el mantenimiento de las convulsiones en zonas endémicas. De los pacientes sintomáticos con NCC que asisten a centros clínicos, del 20 al 40% de los casos se presentan solo con lesiones calcificadas. Las convulsiones se producen por quistes calcificados, a veces con edema perilesional en el momento de una convulsión y a veces sin ella. (Del Brutto, & Garcia, 2017; Minguetti, & Ferreira, 1983). Existe muy poca información documentada de la patología de las calcificaciones que en su mayoría describen las lesiones hialinizadas y calcificadas con inflamación perilesional variable (Nash et al., 2004; Pradhan, et al., 2000).

2.1.5 Fase inflamatoria

La respuesta inflamatoria desencadenada por el quiste puede separarse en cuatro etapas.

Primera etapa, el edema y el infiltrado inflamatorio rodea los vasos sanguíneos en las proximidades del parásito, el sitio se llena de células defensivas sensible a antígenos y moléculas bioactivas. La segunda etapa, empieza cuando se presenta gliosis cerca del metacestodo. Las células gliales y neuronales juntas apoyan la inflamación circundante. La tercera etapa, se ve que la inflamación provoca que las células del tejido conectivo desarrollen fibrosis (que son ricos en colágeno y fibroblastos) y recluta células inmunológicas para formar granulomas (que están compuestos por células gigantes y células epitelioides) como barreras protectoras para el tejido neural. Y la última etapa, ya solo queda restos de granuloma y fibrosis, además se forman necrosis y depósitos intersticiales en la lesión (el material necrótico puede calcificarse). Se pueden desarrollar cambios vasculares (Álvarez et al., 2002).

Las células involucradas en los procesos defensivos contra los metacestodos, se puede plegar en un subgrupo inmunológico mesenquimal (linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos); otro subgrupo similar a la epidermis mesenquimatosa (células fibroblásticas, gigantes y epitelioides); y un subgrupo neuronal mesenquimal (microglia) (Álvarez et al., 2002; Mahanty, et al., 2015; Dametto, 2016).

2.1.6 Daño neuronal

Es una lesión dentro del sistema nervioso central, que afecta a las neuronas, causada por una fuerza física externa o agente interno, que imposibilita la realización de las funciones normales del cerebro. Puede producir alteraciones motoras, cognitivas, emocionales, conductuales, sensoriales y/o del nivel de conciencia. Por ello es base patológica de la discapacidad permanente

en varias enfermedades neurológicas. La cuantificación confiable y el seguimiento longitudinal de dicho daño son importante para evaluar la actividad de la enfermedad, monitorear las respuestas al tratamiento, facilitar el desarrollo del tratamiento y determinación del pronóstico (Khalil et al., 2018).

Durante la NCC existe este daño neuroaxonal, ya que hay daño no solo en neuronas sino también en su axón, y también astrogliosis total; lo que causa expresión incrementada de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de neurofilamento (NFP) y otras proteínas (Sikasunge et al., 2009).

2.1.6.1 Lesión axonal. La lesión específica de los axones puede ser debida a una tensión sobre las fibras, a una lesión destructiva en el córtex cerebral o bien a fenómenos secundarios del propio trauma (isquemia, edema, etc.). Al principio la tensión no es suficiente para ocasionar daño, después aparece una lesión leve, probablemente debida a cambios reversibles en la membrana y posteriormente al aumentar el arrastre se desarrollan formas más severas con lesiones estructurales, llegando al rompimiento del axón (axotomía) (Lafuente Sánchez, 2005). Esquemáticamente la cronología de los cambios histológicos podría empezar a partir de las 3 horas tras el traumatismo, podemos detectar acúmulo focal de APP-beta, a las 7 h., dilataciones axonales con histología convencional (HE), luego a partir de las 24 h., los esferoides axonales también se ponen de manifiesto mediante impregnaciones argénticas y con inmunohistoquímica podríamos visualizar APP-beta, neurofilamentos y ubiquitina. Después a los 5 días existirían grupos de microglia en las regiones afectadas, en los 2 meses tras la lesión, existiría una degeneración

Walleriana con pérdida de vainas de mielina y de fibras mielinizadas, es así como se incrementa el daño del tejido cerebral (Oehmichen, 1999; Lafuente, 2005).

Muchos autores asumen que la mejor técnica para observar la degeneración axonal era la impregnación argéntica sobre secciones en parafina. Pero las técnicas inmunohistoquímicas mediante anticuerpos frente a neurofilamentos, ubiquitina han simplificado y hecho más reproducibles los hallazgos (Sherriff et al., 1994).

2.1.6.2 Neurofilamento. Los neurofilamentos (NF) están presentes en el citoesqueleto neuronal, especialmente el axón, y son filamentos intermedios de tipo IV con un diámetro de aproximadamente 10 nm. Estas proteínas se encuentran principalmente en neuronas mielinizadas adultas del sistema nervioso central (SNC) y axones mielinizados de gran calibre del sistema nervioso periférico (SNP). El NF humano se compone de cuatro subunidades: una cadena ligera (NF-L), cadena media de neurofilamento (NF-M) y cadena pesada de neurofilamento (NF-H) con pesos moleculares de aproximadamente 68, 160 y 205 kDa, respectivamente; la cuarta subunidad dependerá de la ubicación de la proteína, por lo tanto, la α -internexina (66 kDa), que se encuentra en la médula espinal y el nervio óptico, ubicado en el SNC, mientras que la periferina (58 kDa), presente en las neuronas de los ganglios de la raíz, está ubicado en el SNP (Tsuda et al., 2000; Hoffman et al., 1987).

Una de sus funciones es dar soporte estructural a las neuronas, participar en procesos de maduración y regeneración, involucrándose en crecimiento y calibre axonal, también en procesos de memoria y aprendizaje (Ressler et al., 2002; Tsuda et al., 2000).

Por otro lado, la fosforilación es la principal transformación post-traducciona de neurofilamentos, los cuales intervienen en su polimerización y despolimerización y es responsable de su correcto ensamble, transporte, organización y función en el proceso neuronal (Alberti, 2006).

Es así que Liem y Leung (2003) nos afirma que las acumulaciones anormales de NF y las crecientes inflamaciones axonales, pueden ser una causa o una consecuencia del transporte axonal dañado dentro de las neuronas comprometidas. Esta acumulación anormal o modificaciones de proteínas neurofilamento son encontradas en muchas enfermedades neurodegenerativas, es por ello por lo que es de suma importancia estudiar su relación con la neurocisticercosis. Para ello se hace uso de técnicas inmunohistoquímicas pues así nos permitirán profundizar su estudio y aportar en la investigación.

2.1.7 Modelos animales

La necesidad de un modelo animal confiable que se asemeje de cerca a la patología humana es altamente deseable para estudiar cualquier enfermedad. Existe una mayor necesidad de un modelo animal adecuado para el NCC, ya que la infección del SNC por quistes causa epilepsia solo en humanos y, por lo tanto, es difícil comprender la biología del parásito. Hasta ahora, varios mamíferos han sido evaluados como modelos experimentales de infección por *T. solium* para cisticercosis, pero desarrollar un modelo confiable de NCC sigue siendo un desafío (Arora et al., 2017).

Por lo tanto, los investigadores de todo el mundo han probado ratones, ratas, conejos, cobayas, perros jóvenes, monos, gibones, hámsteres y gatos como modelos animales para la

cisticercosis y para la NCC. Los roedores son los animales más utilizados en los laboratorios dentro de ellos el ratón, lo cual tiene sus propias ventajas, ya que se conoce toda su secuencia del genoma, tiene una vida útil corta y hay abundantes reactivos disponibles para su estudio y análisis (Arora et al., 2017).

2.1.7.1 Modelo de cerdo. El cerdo, hospedero intermediario natural de *T. solium*, se ha utilizado frecuentemente para estudios de NCC, ya que según descripciones histológicas la respuesta alrededor del parásito es muy similar a la respuesta en neurocisticercosis humana (Londoño et al., 2002).

De la misma forma que en el humano, los quistes viables generan una leve o nula respuesta inmune, mientras que la degeneración del quiste por causas naturales o debido al tratamiento con drogas antihelmínticas produce una respuesta inmune elevada (Nash et al., 2014).

Tanto los cerdos infectados experimentalmente como los infectados naturalmente se han utilizado para diversos estudios. Pero el modelo del cerdo con infección natural como modelo de estudio se está volviendo cada vez más usado, ya que este modelo está fácilmente disponible en todas las áreas endémicas y los cerdos infectados pueden identificarse fácilmente en función de los signos clínicos, junto con exámenes musculares de lengua o cuello (González et al., 1990) (Prasad et al., 2006).

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

- Investigación Cuantitativa: Por el número de láminas con tejido cerebral infectado con quistes.
- Investigación descriptiva: Los componentes celulares presentes en la inflamación causada por el quiste.
- Investigación experimental: Realizada en el laboratorio.
- Investigación comparativa: Al determinar qué grupo después del tratamiento tienen mayor daño neuronal.

3.2 Ámbito temporal y espacial

Se empezó el proyecto el mes de febrero del 2019; Los experimentos con animales se realizaron en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú y los análisis de histología e inmunohistoquímica de los tejidos se realizaron en el Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Cayetano Heredia.

3.3 Variables

3.3.1 Independiente.

Variable politómica: Tiempos después del tratamiento.

3.3.2 Dependiente.

- Variable cuantitativa discreta: Grados de inflamación, fibrosis, calcificación mediante tinción HE
- Variable cuantitativa continua: Presencia del grado de daño neuronal mediante conteo de NF.
- Variable cualitativa dicotómica: Presencia de calcificación mediante Von kossa.

3.4 Población y muestra

Se obtuvo un total de 17 cerdos, de los cuales 16 cerdos están infectados naturalmente por *T. solium* en aldeas endémicas de la región Huancayo y 1 cerdo no infectado, estos animales se transportaron a nuestras instalaciones en Lima. De los 16 cerdos infectados se dividieron al azar en dos grupos: con tratamiento de antihelmínticos (15 cerdos) y un grupo sin tratamiento (1 cerdo) que es el control positivo; y por otro lado el grupo no infectado (1 cerdo) el cual fue el control negativo; de los tratados con antihelmínticos (15 cerdos) se sacrificaron a los: cuatro meses (n = 5), ocho meses (n = 5) y doce meses (n = 5) después del tratamiento. De cada grupo con tratamiento o sin tratamiento, se obtuvo todas las láminas posibles de tejido con alguna lesión (quiste o fibrosis) y del grupo control negativo se obtuvo 5 láminas por cerdo.

Se utilizó solo un control de un cerdo infectado naturalmente con neurocisticercosis sin tratamiento y no a los tres tiempos, porque se contaba con información de estudios previos que los cerdos evaluados de diferentes edades (2 a 4 años) con neurocisticercosis infectados naturalmente existen falta de inflamación alrededor de quistes no tratados (Cangalaya et al., 2015; Cangalaya et

al., 2016; Mahanty et al., 2015). Lo cual en nuestro estudio se centra más en cuanto a la presencia de calcificación, inflamación y daño neuronal que ocasiona los quistes que fueron tratados con antihelmíntico.

Dado así que, desde la obtención de láminas con tejido cerebral es donde se empezó el proyecto.

3.5 Instrumentos

- Muestra biológica: Tejidos de cerebro con quiste y sin quiste.
- Materiales: Gradillas, láminas, laminillas, pipetas de plástico de 3 ml, coplins jars de plástico, coplins jars de vidrio, ollas, cocina pequeña, ice pad, termómetro, cámara húmeda, pizetas, frascos de vidrio de 250 ml, 500 ml y 1 litro.

3.5.1 Equipos.

Estufa marca VWR año 2005; microscopio con cámara AxionCam ICc marca ZEISS año 2016; cabina de limpieza con luz UV marca KYNTEL año 2018; refrigeradora marca Oster año 2018; checker Plus pH Tester marca HANNA Instruments año 2016 y micropipetas de 10 μ l, 200 μ l y 1 ml marca Axygen año 2018.

3.5.2 Reactivos.

Solución de hematoxilina de Harris marca MERCK; solución de Eosina Y marca Sigma Aldrich; kit de tinción de calcio (Von Kossa modificado) marca ScyTek Laboratories; solución recuperadora de antígenos marca EnVision™ FLEX (Tris/EDTA, pH 9); buffer de lavado marca

EnVision™ FLEX (Solución salina tamponada con Tris que contiene Tween 20, PH 7.6); reactivo de bloqueo de peroxidasa marca FLEX EnVision™ (Buffer de fosfato que contiene peróxido de hidrógeno, 15 mmol / L de NaN₃ y detergente); anticuerpo primario de ratón anti-Neurofilamento monoclonal marca Dako; EnVision™ FLEX / HRP, Polimero/peroxidasa (Dextrano con moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario de cabra, moléculas contra inmunoglobulinas de conejo y ratón, en solución tamponada); diaminobencidina (DAB) Cromógeno marca Thermo scientific; agua destilada; alcohol de 96°, 70° marca Jenfarma; etanol absoluto para análisis EMSURE marca Merck; Neo-Clear (sustituto de xileno) marca Merck; entellan marca Merck; solución Poly-L-lysina marca Sigma Aldrich y plumón hidrofóbico ImmEdge.

3.6 Procedimiento

3.6.1 Estudio de diseño y animales.

Se obtuvieron cerdos de aldeas endémicas de Huancayo, Perú. Fueron determinados por un examen positivo de lengua a cisticercosis y transportados a las instalaciones de Lima. Las muestras de suero se evaluaron con prueba serológica, ensayo de Western blot (WB), examen en legua y confirmado por resonancia magnética basal, para revalidar la presencia de cisticercos en el cerebro.

El protocolo de tratamiento parasitario consistió en una terapia combinada con albendazol (Sanibendazol 10%, Montana SA, Perú) administrado por cinco días a 15 mg / kg / día, dividido en dos dosis de 7.5 mg por la mañana y 7.5 mg por la tarde, y praziquantel (Saniquantel 10%,

Montana SA, Perú) administrado durante dos días a 75 mg / kg / día, dividido en tres dosis de 25 mg / kg administradas cada dos horas (Gonzales et al, 2012). Luego, el tratamiento de los cerdos se mantuvo en instalaciones para administrar bajo supervisión veterinaria. La comida y el agua fueron reguladas y manipuladas bajo condiciones éticas

3.6.2 Colección de especímenes.

Después del sacrificio de los animales, los cerebros de los cerdos se colocarán en placas de hielo seco y se cortaron en secciones de 1 cm. Las muestras de los hemisferios se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, luego se incluyeron en tacos de parafina y se realizaron cortes coronales a un espesor de 4 μm .

Una vez obtenidas las láminas con tejido, se empezó este trabajo, realizando las tinciones de: Hematoxilina-eosina y Von kossa, posterior ello se realizó la inmunohistoquímica para detectar neurofilamento, para cada muestra y se examinarán las secciones con microscopía óptica convencional.

3.6.3 Protocolo de tinción hematoxilina-eosina

Se desparafinaron e hidrataron las láminas con tejido (dos cambios de Neo-cleaner, degradación de alcoholes de 96°, 80°, 70° y terminar en agua destilada), luego se retiró las láminas del agua destilada y colocamos en un soporte, para pasar a teñirlas con 6-8 gotas de Hematoxilina por 3 minutos, después lavamos las secciones en agua corriente (2 veces) y agua destilada (2 veces), agregar alcohol ácido al 1% durante 10 segundos. Lavar 2 min con agua, posteriormente se coloca 6-8 gotas de eosina por 2 minutos. Enjuagaremos las secciones con agua destilada (2

veces) y finalmente se deshidrato las secciones en alcohol de 70°,80°, 96°, tres cambios de alcohol absoluto y tres cambios de Neo-Clear, todos por espacio de 1 minuto y por último se hace el montaje con entellan. El protocolo fue basado de (Bancroft & Gamble, 2008), aunque se modificó los tiempos y los lavados era solo con agua destilada.

3.6.4 Protocolo de tinción Von kossa

Primero se desparafino e hidratará las láminas con tejido, seguidamente se cubrirá con 6 a 8 gotas de solución de nitrato de plata (5%) durante 45 minutos mientras se expone a luz ultravioleta. Luego de este tiempo se enjuago en tres cambios de agua destilada, después se incubo las láminas en 5-8 gotas de solución de tiosulfato de sodio (5%) durante 2 minutos. Enjuagamos durante 2 minutos en agua corriente del grifo y luego dos cambios de agua destilada y posteriormente se tiño la sección de tejido con 6-8 gotas de Solución Nuclear Fast Red durante 5 minutos. Enjuagamos durante 2 minutos en agua corriente del grifo y luego dos cambios de agua destilada y finalmente se deshidrato muy rápidamente en tres cambios de alcohol absoluto, tres cambios de Neo-Clear y se montó con entellan. El protocolo fue basado de (Bancroft. & Gamble, 2008), aunque se modificó los tiempos y los lavados, ya que se realizó solo con agua destilada.

3.6.5 Protocolo de tinción inmunohistoquímica para neurofilamento.

Se colocó en la estufa por 30 minutos a 60°C para desparafinar y después se hidratarán las láminas. Para ello se colocó en solución recuperadora de antígeno Tris / EDTA, pH 9 (3 en 1) dentro de coplins jars de plástico. Luego se incubo en baño maría por 20 minutos a 95° C,

posteriormente se retira y dejar enfriar hasta 65° C, se lavaron dos veces con tampón Tris y Tween pH 7.6

Se añadió peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por 5 min a temperatura ambiente, se lavó dos veces con tampón Tris. Luego, las secciones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con el siguiente anticuerpo primario anti-neurofilamento de ratón (NF) (anticuerpo monoclonal, clon 2F11, CCIS607). Se usó como cromógeno el 3,3 'diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB) (DakoCytomation), revelamos por 30 segundos y se detiene la reacción con agua destilada 2 veces por 5 minutos c/u. Para contrastar las láminas, se realizó una breve inmersión en hematoxilina por 1 segundo, posteriormente se lavó con agua destilada. Finalmente se pasó el rack por una serie creciente de alcoholes (70, 80, 96°) hasta alcohol absoluto II, donde se colocó en la estufa a 37 °C por 3-5 minutos hasta que se sequen. Luego se sumergió en Neo-cleaner por 5 minutos, se retiró y se dejó secar para luego montar con Entellan. El sistema de detección IHC fue un método basado en polímero de dextrano (EnVision®System, DakoCytomation) y se aplicó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.7 Análisis de datos

Se evaluó todos los quistes según donde se ubicaban en el cerebro (parenquimal, corticomeningial o extraparenquimal), pero para los datos de clasificación solo se tomó en cuenta solo quistes parenquimales.

Se tomó fotos con Microscopio con cámara AxionCam ICc (Carl Zeiss) para ver la presencia de calcio del tejido teñido con Tinción Von Kossa y reconocer las células inflamatorias

presentes en el tejido y alrededor de los quistes en la tinción de Hematoxilina-Eosina. Para determinar el grado de daño ocasionado por el quiste se realizará la lectura en campos de 40x con la ayuda de un especialista en patologías.

Los análisis del proceso de inflamación, de fibrosis y de calcificación serán comparadas entre los tres grupos con tratamiento antiparasitarios, tomando como grupo control al grupo de 4 meses. En cambio, el análisis de neurofilamento se tomará como grupo control a un tejido sin quistes y sin tratamiento antiparasitario.

3.7.1 Análisis neuropatológico

La inflamación alrededor de la lesión se determinó en función del daño del tejido y la presencia de calcificación. Se tomó en cuenta dos características que son la intensidad

y distribución las cuales tienen una puntuación dividida en 4 grados (Tabla 1). El análisis semicuantitativo de las células inflamatorias infiltrantes se realizó mediante una evaluación manual de toda el área que rodea el quiste en la sección coronal, bajo un microscopio óptico con un objetivo de 40X. Las células infiltrantes se identificaron como plasmocitos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos.

Para determinar grosor de la capa de células fibróticas se calculó promediando el ancho en 4 puntos al azar alrededor del quiste, para ello de acuerdo con la medida se dividió en 4 grados. En cuanto a las células gigantes y reacción granulomatosa solo se evaluó la presencia o ausencia de este alrededor de la lesión.

El proceso de calcificación se evaluó con una puntuación dividida en 4 grados para evaluar la deposición de cristales de calcio (tabla 1). El análisis semicuantitativo de la calcificación, identificado con corpúsculos calcáreos y depósitos de sales de calcio, se realizó mediante una evaluación manual de toda el área del quiste bajo un microscopio óptico con un objetivo de 40X. La calcificación se expresó como el área calcificada sobre el área del quiste.

Tabla 1

Ubicación y número de quistes en cada cerdo de los tres grupos con tratamiento

CARACTERÍSTICAS		GRADO	DESCRIPCIÓN
Inflamación	Intensidad	0	No existe inflamación
		1	Leve presencia de células inflamatorias (plasmocitos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos)
		2	Moderada presencia de células inflamatorias (plasmocitos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos)
		3	Alta presencia de células inflamatorias (plasmocitos, macrófagos, linfocitos, eosinófilos y neutrófilos)
	Distribución	0	No existe inflamación
		1	Presencia focalizada con un porcentaje inferior al 25 % del área del quiste.
		2	Presencia dispersa con un porcentaje entre 25% a 50% del área del quiste.
Fibrosis	Intensidad	0	Ausencia de fibrosis
		1	Capa delgada de células fibroblásticas alineadas en un grosor < 0.02 mm
		2	Capa mediana de células fibroblásticas alineadas en un grosor 0.02 mm a 0.5 mm
		3	Capa gruesa de células fibroblásticas alineadas en un grosor > 0.5 mm

	3	Capa gruesa de células fibroblásticas alineadas en un grosor > 0.05 mm o solamente fibrosis.
Distribución	0	Ausencia de fibrosis
	1	Presencia focalizada alrededor del quiste, con un porcentaje inferior al 25 % del área del quiste.
	2	Presencia incompleta alrededor del quiste, con un porcentaje que se encuentre entre 25% a 75% de fibrosis en comparación con el área del quiste.
	3	Presencia completa alrededor del quiste, con un porcentaje que se encuentre entre 75% a 100% de fibrosis en comparación con el área del quiste.
Calcificación	0	Ausencia de calcificación.
	1	Presencia solo de corpúsculos calcáreos.
	2	Porcentaje inferior al 50 % del área del quiste
	3	Porcentaje entre el 50 % al 100% del área del quiste
Células gigantes	No	Ausencia de células gigantes.
	Sí	Células gigantes en la pared inflamatoria, fuera de la lesión.
Reacción granulomatosa	No	Ausencia de reacción inflamatoria.
	Sí	Presencia de patrón de inflamación crónica caracterizada por la agregación nodular de células inflamatorias, predominantemente macrófagos activados, que a menudo se transforman en células similares al epitelio (epitelioide) alrededor de la lesión.

3.7.2 Análisis del neurofilamento

El número total de NF en un plano (coronal) se contó manualmente en las áreas de análisis incluidas corteza, hipocampo, putamen caudado y tálamo. Se tomará en cuenta solo los quistes parenquimales ya que se evaluará alrededor de 1000 μm alrededor de la pared inflamatoria de la lesión, las otras ubicaciones no reúnen esta característica por ello no se les evaluó, luego se evaluará 4 puntos alrededor del quiste y se promediará los valores.

3.8 Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional para el Uso de Animales en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (R-036-12-18).

IV. RESULTADOS

Se analizaron las secciones histológicas de tejido cerebral de todos los cerdos, del grupo con tratamiento antihelmíntico se encontró 137 muestras con alguna lesión causada por el cisticerco. Se identificaron un total de 62 quistes y 75 que poseían solo fibrosis. De todos ellos ninguno era viable, pero el grupo de 8 meses es el que presento más quistes, luego le sigue el grupo de 12 meses y por último el de 4 meses. En cuanto a la presencia de fibrosis, el grupo que más muestras tiene es el de 12 meses (tabla 2).

Tabla 1

Ubicación y numero de quistes en cada cerdo de los tres grupos con post-tratamiento

Cerdos	Quistes	Fibrosis	Total
4 meses (n=5)	13	17	30
8 meses (n=5)	35	28	63
12 meses (n=5)	14	30	44
Total	62	75	137

La tabla 3, nos muestra que, en todos los grupos post-tratados, la ubicación de los quistes es variada, pero la mayoría se ubica en la zona parenquimal. Por ello estos quistes se tomarán en cuenta para nuestros análisis.

Tabla 2

Número de quistes por ubicación en el cerebro de cada grupo post-tratamiento

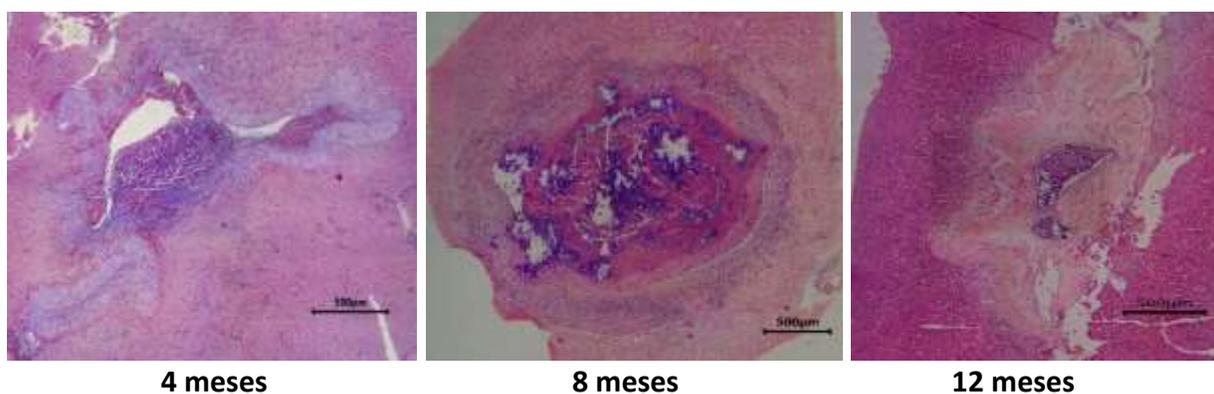
Cerdos	P	CM	M
4 meses (n=5)	10 (1, 2, 1, 3, 3)	3 (1, 0, 0, 0, 2)	0
8 meses (n=5)	23 (14, 1, 8, 0, 0)	9 (1, 0, 8, 0, 0)	3 (0, 0, 3, 0, 0)
12 meses (n=5)	8 (3, 2, 0, 3, 0)	6 (3, 0, 3, 0, 0)	0
Total	62	75	137

Nota. Parenquimal (P), corticomeningial (CM) y meningeal (M)

En la figura 1 se realizó la tinción de hematoxilina-eosina a los tejidos con quistes, podemos observar a un representante de los quistes de cada grupo, es así como se pudo notar que en el grupo de 8 meses es el que tiene quistes más grandes, conteniendo mucha calcificación y poca fibrosis alrededor.

Figura 1

Tinción de Hematoxilina-eosina en cerebros de cerdo a los 4, 8 y 12 meses después del tratamiento.



Nota. Aumento de 100x, barra=500 μ m.

4.1 Calcificación

Con la tinción de Von Kossa se evidenció depósitos densos de agregados de calcio, en los quistes de los grupos post-tratamiento (4, 8 y 12 meses). En la figura 1 se observa que la mayoría de los quistes del grupo de 8 meses son de grado 2 o 3. La clasificación de grados es según la tabla 1. De la figura 2 podemos destacar la mayor presencia de calcio que existe en el grupo de 8 meses.

Figura 2

Comparación de los tres grupos post-tratamiento que poseen quistes parenquimales con calcio

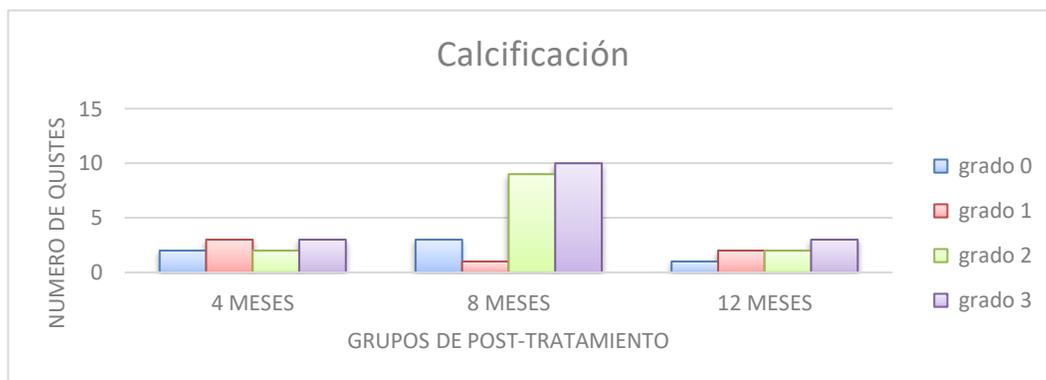
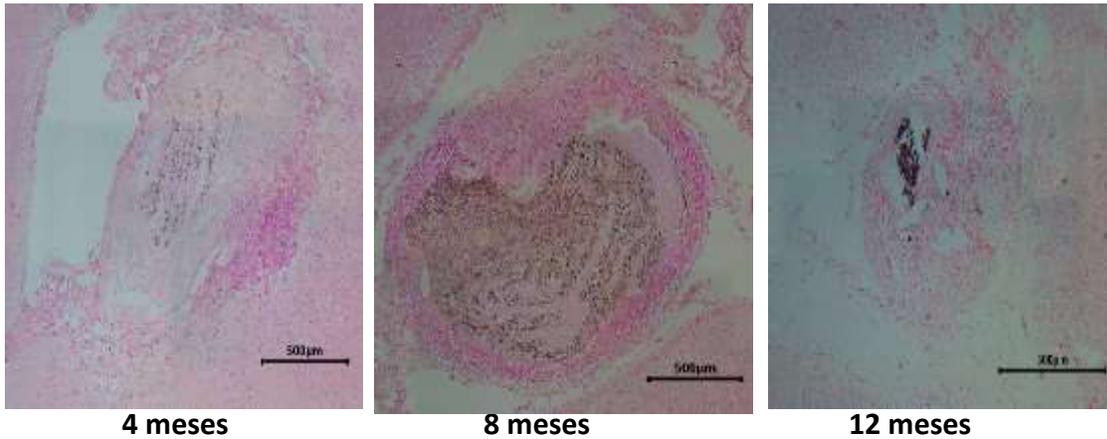


Figura 3

Imágenes de tinción de von kossa del cerebro de cerdos con neurocisticercosis en tres grupos post-tratamiento



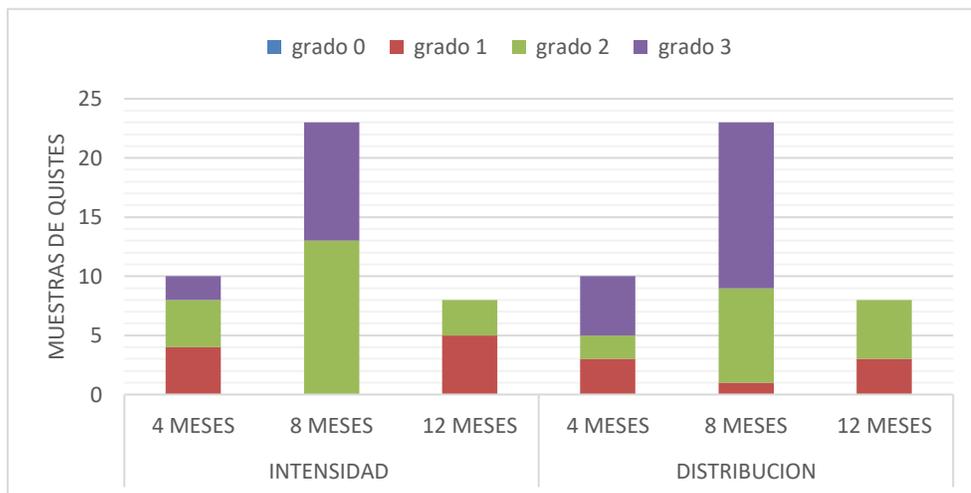
Nota. Aumento 100x, barra=500 µm.

4.2 Células infiltradas inflamatorias

En la figura 4, se puede ver que el que más sobresale es el grupo de 8 meses ya que tiene una intensidad moderada de células inflamatorias (grado 2) y una distribución abundante de células inflamatorias entre el 50% a 100% en comparación del área del quiste (grado 3).

Figura 4

Grupos post-tratamiento que poseen quistes parenquimales con presencia de células inflamatorias

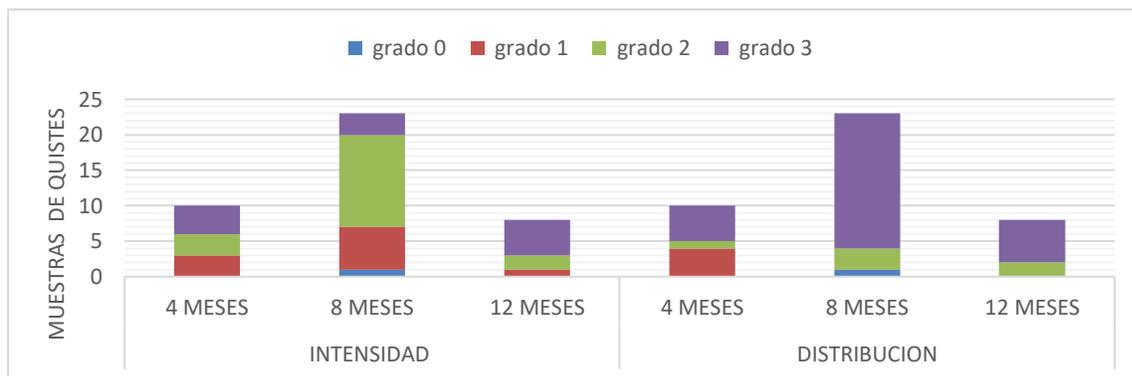


4.3 Células fibróticas

La figura 5 nos muestra, que el grupo de 8 meses en cuanto a intensidad posee una capa mediana con células fibróticas de un grosor que va desde 0.2 a 0.5 mm alrededor del quiste (grado 2) y una distribución completa alrededor del quiste que va del 75% a 100% en comparación con el área del quiste (grado3).

Figura 5

Grupos post-tratamiento que poseen quistes parenquimales con presencia de células fibróticas

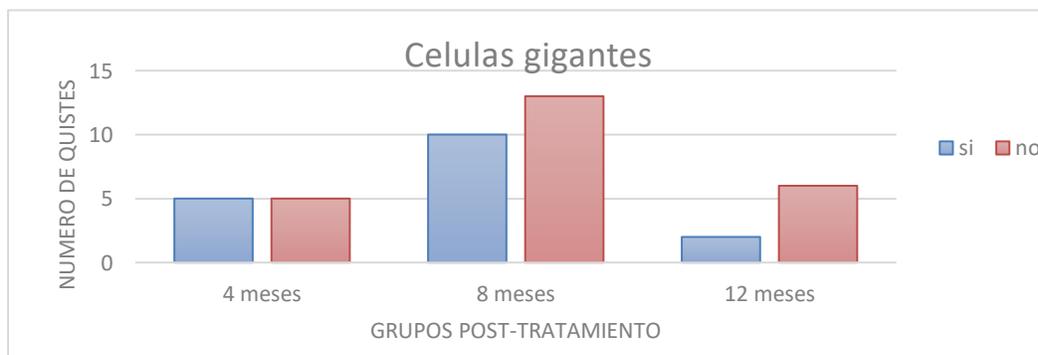


4.4 Células gigantes y reacción granulomatosa

En la figura 6, comparando los tres grupos vemos que existe alta presencia de células gigantes en los quistes del grupo de 8 meses.

Figura 6

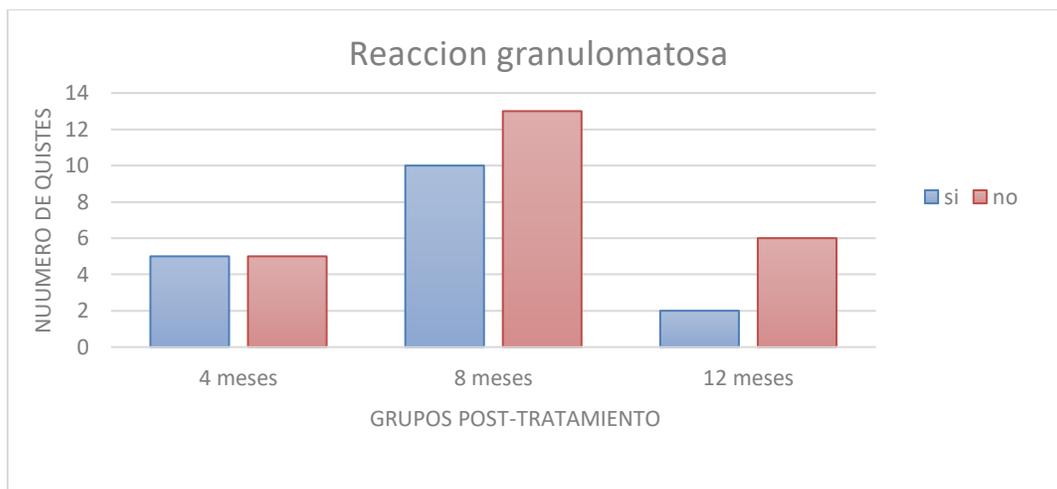
Comparación de los tres grupos post-tratamiento que poseen quistes parenquimales con presencia de células gigantes



En cuanto a la reacción inflamatoria, la muestra de cada grupo con quistes del grupo de 8 meses posee reacción granulomatosa en gran cantidad.

Figura 7

Comparación de los tres grupos post-tratamiento que poseen quistes parenquimales con presencia de reacción granulomatosa



4.5 Neurofilamento

La tabla 4 muestra el número de ovillos en el cerebro de cerdo a los 4, 8 y 12 meses post-tratamiento antiparasitario en cerdos infectados naturalmente con neurocisticercosis. Se puede observar un promedio mayor de ovillos en el grupo de 12 meses a diferencia del grupo de 8 y 4 meses. Solo se analizó algunas láminas de los quistes parenquimales por cuestiones donde se observaban una buena tinción o el tejido en buen estado.

Igualmente, en la figura 8 se puede ver un ejemplo de cada grupo con post-tratamiento, donde se ve que el grupo de 12 meses tienen más neurofilamentos (forma de ovillos de color marrón) presentes en un área del tejido alrededor del quiste.

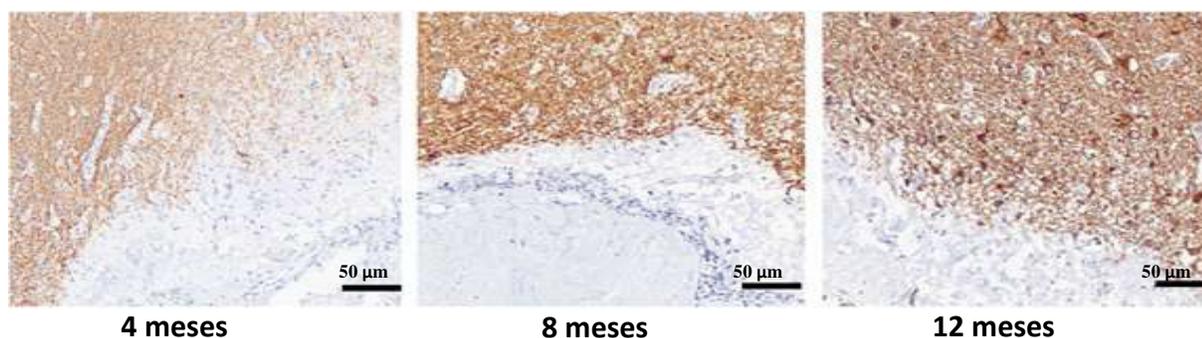
Tabla 3

Cuantificación de neurofilamento en quistes parenquimales de cerdos con neurocisticercosis, en cada grupo con post-tratamiento antihelmíntico.

Grupo	Cerdos (N)	Quistes (n)	Ovillo Total	Promedio
4 meses	5	6	33	5.50
8 meses	5	12	75	6.25
12 meses	5	4	53	13.25

Figura 8

Comparación de los tres grupos post-tratamiento que poseen quistes parenquimales con aglomeración de neurofilamento en un área.



Nota. Aumento 400x, barra=50 µm.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En nuestro estudio realizado en cerdos infectados naturalmente con NCC, se tomó en cuenta el análisis de los quistes que se encontraban en el parénquima, ya que ocupaban la mayor parte de lesiones observadas. También, por que se podía observar mejor el grado de inflamación, calcificación, fibrosis y daño neuronal alrededor del quiste (ya que están rodeados de tejido).

Al comparar los tres grupos post-tratamiento antihelmíntico. Hemos visto que la mayoría de los quistes del grupo de 8 meses sobresale: en poseer mayor reacción inflamatoria con presencia moderada (grado 2) y ocupando > 50% con respecto al área del quiste (grado 3); células fibróticas con un grosor que va entre 0.2 mm - 0.5 mm (grado 2) y rodeando completamente al quiste (grado 3); calcificación con depósitos de calcio entre 50%-100% dentro del quiste (grado 3) y por último si existe presencia de reacción granulomatosa y células gigantes. Al observar los quistes sin tratamiento antihelmíntico, no se observa ninguna reacción inflamatoria, ni fibrosis, ni calcificación. Igualmente pasa con el tejido sano sin quistes.

Lo que si observamos es que, al ir disminuyendo la reacción inflamatoria y las otras características es porque los quistes se están desintegrando por completo, esto lo visualizamos en el grupo de 12 meses post- tratamiento donde tenía estas características (inflamación, fibrosis, calcificación, etc.) en grados menores de clasificación. Otro aspecto que observamos es que, en algunos quistes del grupo de 4 meses, solo tenían presencia de corpúsculos calcáreos esto puede ser por que recién se estaban degenerando.

En cuanto a la acumulación de neurofilamentos alrededor de los quistes, se podría decir que es debido a la presencia de la reacción inflamatoria que se incrementa al estar el quiste degradándose y también por el daño que causa el quiste en el tejido, por lo tanto, existiría daño neuronal en el tejido cerebral del cerdo, ya que se observa acumulación de neurofilamento. Esta mayor acumulación se dio en el grupo de 12 meses post-tratamiento, lo cual se podría inferir que sería porque esta proteína se va acumulando según pase el tiempo de la enfermedad. Por otro lado, la presencia de neurofilamento en quistes sin tratamiento antihelmíntico fue escasa y en tejido sano no se encontró presencia de neurofilamento.

Así Cangalaya et al. (2016) quienes manifestaron que la ubicación parenquimal tiene una vascularización más densa y más microvascularización. Pues visualizaron que la respuesta inflamatoria alrededor del cisticerco localizado en meninges es menor a la respuesta de los cisticercos parenquimales. También esta mayor vascularización permite que el medicamento antihelmíntico llegue mejor a estas ubicaciones parenquimales, dando paso a la desintegración del parásito y al inicio de la reacción inflamatoria.

En cuanto a la reacción inflamatoria Restrepo et al. (2001) nos dio a conocer, al analizar tejido cerebral de varios pacientes con NCC mediante histología e inmunohistoquímica, que los quistes degenerados y calcificados están rodeados por un granuloma maduro, compuesta por células gigantes multinucleadas rodeadas por una capa fibrosa densa, una región con gran cantidad de leucocitos, con macrófagos infiltrantes que están cerca de la capa fibrosa, linfocitos T y B, células plasmáticas, neutrófilos, mastocitos, eosinófilos y microglía cerebral. Nos dicen que el granuloma asociado con abundante fibrosis parece ser que protege el tejido adyacente de una

lesión, debido a la respuesta inflamatoria del hospedero, pero daña irreversiblemente el tejido nervioso que rodea al cisticerco. Es por ello que estos pacientes con estas lesiones graves presentaron síntomas fuertes que incluían convulsiones, alteraciones mentales y aumento de la presión intracraneal.

Igualmente, (Agapejev, 1996) nos menciona que cuando la respuesta inflamatoria del huésped se hace más intensa, el parásito comienza a sufrir un proceso de destrucción que resulta en su muerte. Esta reacción inflamatoria ira disminuyendo cuando más se desintegre completamente el parásito, pero aún existirá presencia de células gigantes, rodeando al parásito también seguirá la capa de fibrosis, la gliosis y el edema.

González et al. (2012) nos demuestran que al evaluar el modelo cerdo con diversos tratamientos antihelmínticos y haciendo uso de la tinción de hematoxilina-eosina y la tinción Von kossa. Observan que la presencia de calcio fue más evidente en quistes degenerados en cerebro y músculos, que en quistes viables. En los quistes viables solo se encontró corpúsculos calcáreos. Sin embargo, en los quistes degenerados los depósitos de calcio aumentaron según el grado de degeneración. Concluyeron que la mejor combinación vendría a ser albendazol más prazicuantel, lo cual puede proporcionar un tratamiento antiparasitario más eficaz para la cisticercosis humana.

También (Varga-Parada et al., 1999), nos informa que la calcificación encontrada en los quistes viables puede explicarse como los corpúsculos calcáreos producidos por el parásito y depositados en la luz de los conductos protonefridiales.

Para neurofilamento Sikasunge et al. (2009) confirmo que la proteína del neurofilamento aumenta su expresión durante la lesión cerebral y/o inflamación. Este aumento en neuronas y axones es indicativo de que se produce daño neuronal y principalmente axonal durante la NCC porcina, también nos informa que existió la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que hace más permeable la barrera hematoencefálica y permite el ingreso de muchas células inmunes a destruir al parasito. Igualmente, Mejía Maza et al. (2019) coinciden al ver inflamaciones axonales extensas, en forma de esferoides (neurofilamentos) en ratas con NCC. Los esferoides demostraron un aumento de la inmunorreactividad a la proteína precursora amiloide y al neurofilamento, lo que indica una posible alteración del transporte axonal. Ellos dicen que esto sería por el tamaño relativamente grande de los cisticercos y la compresión física del axón en el cerebro, también porque existe una respuesta inflamatoria significativa alrededor de los cisticercos, todo ello contribuye al deterioro del transporte axonal y la formación de esferoides axonales.

Gómez et al. (1997) también coincide con nuestro estudio ya que, ellos evaluaron la cantidad de neuronas y neurofilamentos en pacientes con Alzheimer y concluyen que tanto la pérdida neuronal y los ovillos neurofibrilares aumentaron en paralelo con la duración y la gravedad de la enfermedad. Aunque la pérdida neuronal (más del 50% de neuronas) era mucho más que la acumulación de neurofilamentos. Otro estudio de Petzold et al. (2005) analizaron muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple, mediante la técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y notan que la presencia de los niveles de NF se incrementaron desde el inicio del muestreo hasta el final (seguimiento de tres años) en aproximadamente la mitad de los pacientes. Ellos interpretan sus hallazgos sobre la hipótesis

epidemiológica donde el daño axonal es un proceso acumulativo gradual durante el curso de la enfermedad.

Finalmente se tuvo limitaciones en nuestro estudio, ya que fue bajo el número de muestras para el análisis, ya que no todas las lesiones fueron quistes y de estos quistes no todos eran calcificados, los cuales se requerían para el análisis de cuantificación de neurofilamento.

VI. CONCLUSIONES

En la cuantificación de neurofilamento el grupo que obtuvo el mayor acumulación fue el grupo de 12 meses, lo que evidenciaría daño neuronal.

La ubicación que la mayoría de los quistes presento fue la zona parenquimal y son las que se analizaron en nuestro estudio.

El grupo de 8 meses posee mayor respuesta inflamatoria ya que se encontraron alta presencia de células inflamatorias, células fibróticas, células gigantes y reacción granulomatosa alrededor de los quistes parenquimales.

En la mayoría de los quistes se visualiza la presencia de calcio, pero el que mayor grado de calcificación (grado 2 y 3) obtuvo fue el grupo de 8 meses post-tratamiento.

Así determinamos que si existe daño neuronal ocasionado por quistes calcificados en los tres grupos postratamiento (4, 8 y 12 meses) a diferente grado, utilizando el modelo de cerdo infectado naturalmente con neurocisticercosis.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar otros marcadores para identificar daño neuronal y para describir mejor que otras células aparecen por el daño. También se recomienda aumentar el número de muestras, a las cuales se le realice diferentes tipos de tinciones histológicas e inmunohistoquímicas, ya que así se podrá describir con más detalle que células están presentes a causa del daño que ocasiona el quiste en el cerebro del cerdo infectado naturalmente con neurocisticercosis.

VIII. REFERENCIAS

- Agapejev, S. (1996). Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38(3), 207-216. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000300008>
- Alberti Chesta, C. A. (2006). *Aislamiento y análisis del grado de fosforilación de los neurofilamentos de líquido cefalorraquídeo de pacientes con paraparesia espástica tropical* (Tesis de pregrado). Universidad de Chile: Chile. http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2006/alberti_c/sources/alberti_c.pdf
- Alvarez, J. I., Londoño, D. P., Alvarez, A. L., Trujillo, J., Jaramillo, M. M., & Restrepo, B. I. (2002). Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cysticercosis: comparison with human neurocysticercosis. *Journal of Comparative Pathology*, 127(2-3), 186-193. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0579>
- Arora, N., Tripathi, S., Kumar, P., Mondal, P., Mishra, A., & Prasad, A. (2017). Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite immunology*, 39(7). <https://doi.org/10.1111/pim.12439>
- Bancroft, J. D. & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques*. USA: Churchill Livingstone Elsevier. [https://books.google.com.pe/books?id=Dhn2KispfdQC&printsec=frontcover&dq=Bancroft,+J.+D.+%26+Gamble,+M.+\(2008\).+Theory+and+practice+of+histological+techniques.&hl=es-](https://books.google.com.pe/books?id=Dhn2KispfdQC&printsec=frontcover&dq=Bancroft,+J.+D.+%26+Gamble,+M.+(2008).+Theory+and+practice+of+histological+techniques.&hl=es-)

[419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Bancroft%2C%20J.%20D.%20%26%20Gambler%2C%20M.%20\(2008\).%20Theory%20and%20practice%20of%20histological%20techniques.&f=false](https://doi.org/10.1186/14752875-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Bancroft%2C%20J.%20D.%20%26%20Gambler%2C%20M.%20(2008).%20Theory%20and%20practice%20of%20histological%20techniques.&f=false)

- Barriga, O. O. (2002). *Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina*. España: Germinal. <https://www.worldcat.org/title/enfermedades-parasitarias-de-los-animales-domesticos-en-la-america-latina/oclc/503316785>
- Bern, C., Garcia, H. H., Evans, C., Gonzalez, A. E., Verastegui, M., Tsang, V. C., & Gilman, R. H. (1999). Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clinical Infectious Diseases*, 5, 1203-1209. <https://doi.org/10.1086/313470>
- Cangalaya, C., Bustos, J. A., Calcina, J., Vargas-Calla, A., Suarez, D., Gonzalez, A. E., ... & García, H. H. (2016). Perilesional inflammation in neurocysticercosis-relationship between contrast-enhanced magnetic resonance imaging, Evans blue staining and histopathology in the pig model. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(7), e0004869. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004869>
- Cangalaya, C., Zimic, M., Marzal, M., González, A. E., Guerra-Giraldez, C., Mahanty, S., ... & Cysticercosis Working Group in Peru. (2015). Inflammation caused by praziquantel treatment depends on the location of the *Taenia solium* cysticercus in porcine neurocysticercosis. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12), e0004207. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004207>

- Carabin, H., Ndimubanzi, P. C., Budke, C. M., Nguyen, H., Qian, Y., Cowan, L. D., ... & Dickey, M. (2011). Clinical manifestations associated with neurocysticercosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e1152. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001152>
- Cuéllar, R. A. B., Páez, I. P., de los Ríos, C. B., Arias, T. T. M., & Mezo, R. C. . (2011). Neurocysticercosis, diagnosis, and imaging. A case presentation. *Medicina Interna de México*, 27(6), 603-608. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDREVISTA=83&IDARTICULO=32624&IDPUBLICACION=3532>
- Dametto, E. (2016). Histopathology of the human brain in neurocysticercosis. *J Mol Histol Med Physiol*, 1(1), 106. <https://www.hilarispublisher.com/open-access/histopathology-of-the-human-brain-in-neurocysticercosis-.pdf>
- Del Brutto, O. H. (2005). Neurocysticercosis: up-dating in diagnosis and treatment. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 20(8), 412-418. <https://europepmc.org/article/med/16217690>
- Del Brutto, O. H., & Garcia, H. H. (2017). Antiparasitic treatment of neurocysticercosis-The effect of cyst destruction in seizure evolution. *Elsevier*, 76, 158-162. <http://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.03.013>
- Escobar, A. (1983). The pathology of neurocysticercosis. *Cysticercosis of the central nervous system*, 27-54. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10011559770/>

- Estañol, B., Corona-Vázquez, T., & Abad-Herrera, P. (1989). Prognostic classification of cerebral cysticercosis. Therapeutic implications. *Gaceta medica de Mexico*, *125*(3-4), 105-111. <https://europepmc.org/article/med/2633948>
- Flisser, A. (1994). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. Progress in clinical parasitology, *4*, 77. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7948938/>
- Fogang, Y. F., Camara, M., Diop, A. G., & Ndiaye, M. M. (2014). Cerebral neurocysticercosis mimicking or comorbid with episodic migraine? *BMC neurology*, *14*(1), 138. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-14-138>
- Garcia, H. H., Del Brutto, O. H., & Cysticercosis Working Group in Perú. (2005). Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *The Lancet Neurology*, *4*(10), 653-661. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70194-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70194-0)
- García, H. H., Evans, C. A., Nash, T. E., Takayanagui, O. M., White, A. C., Botero, D., ... & Flisser, A. (2002). Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(4), 747-756. <https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.15.4.747-756.2002>
- García, H. H., Gonzalez, A. E., Evans, C. A., Gilman, R. H., & Cysticercosis Working Group in Peru. (2003). *Taenia solium* cysticercosis. *The lancet*, *362*(9383), 547-556. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14117-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14117-7)

- Garcia, H. H., Nash, T. E., & Del Brutto, O. H. (2014). Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *The Lancet Neurology*, *13*(12), 1202-1215. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8)
- Gómez- Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R. C., ... & Hyman, B. T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, *41*(1), 17-24. <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>
- González, A. E., Bustos, J. A., Jiménez, J. A., Rodríguez, M. L., Ramírez, M. G., Gilman, R. H. y García, H. H. (2012). Efficacy of diverse antiparasitic treatments for cysticercosis in the pig model. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *87*(2), 292-296. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0371>
- Gonzalez, A. E., Cama, V., Gilman, R. H., Tsang, V. C., Pilcher, J. B., Chavera, A., ... & Bazalar, H. (1990). Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Perú. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *43*(2), 194-199. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.194>
- Hoberg, E. P. (2006). Phylogeny of Taenia: species definitions and origins of human parasites. *Parasitology international*, *55*(S23-S30), S23-S30. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.11.049>
- Hoffman, P. N., Cleveland, D. W., Griffin, J. W., Landes, P. W., Cowan, N. J., & Price, D. L. (1987). Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences, 84(10), 3472-3476.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.10.3472>
- Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gattringer, T., ... & Petzold, A. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews Neurology*, 14(10), 577-589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>
- Lafuente Sánchez, J. V. (2005). Daño axonal difuso: Importancia de su diagnóstico en neuropatología forense. *Cuadernos de Medicina Forense* (41), 173-182.
<http://scielo.isciii.es/pdf/cmfn41/revision.pdf>
- Leyton Valencia, D. L. (2007). *Características clínicas, imagenológicas e inmunológica de la cisticercosis cerebral-Hospital Central de la Policía Nacional del Perú, 1992-2000*. [Tesis para segunda especialidad, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. Repositorio Institucional UNMSM.
<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2487?show=full>
- Liem, R. K., & Leung, C. L. (2003). Neuronal intermediate filament overexpression and neurodegeneration in transgenic mice. *Experimental neurology*, 184(1), 3.
[https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(03\)00291-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00291-7)
- Londoño, D. P., Alvarez, J. I., Trujillo, J., Jaramillo, M. M., & Restrepo, B. I. (2002). The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Veterinary Parasitology*, 109(3-4), 249-259.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00290-X)

- Mahanty, S., Orrego, M. A., Mayta, H., Marzal, M., Cangalaya, C., Paredes, A., ... & García, H. H. (2015). Post-treatment vascular leakage and inflammatory responses around brain cysts in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(3), e0003577. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003577>
- Mejia Maza, A., Carmen- Orozco, R. P., Carter, E. C., Dávila- Villacorta, D. G., Castillo, G., Morales, J. D., ... & Gonzalez, A. E. (2019). Axonal swellings and spheroids: a new insight into the pathology of neurocysticercosis. *Brain Pathology*, 29(3), 317-462. <https://doi.org/10.1111/bpa.12669>
- Mewara, A., Goyal, K., & Sehgal, R. (2013). Neurocysticercosis: A disease of neglect. *Tropical parasitology*, 3(2), 106. <https://dx.doi.org/10.4103%2F2229-5070.122111>
- Minguetti, G., & Ferreira, M. V. (1983). Computed tomography in neurocysticercosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 46(10), 936-942. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.46.10.936>
- Nash, T. E., & Garcia, H. H. (2011). Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. *Nature Reviews Neurology*, 7(10), 584. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2011.135>
- Nash, T. E., Bartelt, L. A., Korpe, P. S., Lopes, B., & Houpt, E. R. (2014). Calcified neurocysticercus, perilesional edema, and histologic inflammation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 318-321. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0589>

- Nash, T. E., Del Brutto, O. H., Butman, J. A., Corona, T., Delgado-Escueta, A., Duron, R. M., ... & Medina, M. T. (2004). Calcific neurocysticercosis and epileptogenesis. *Neurology*, 62(11), 1934-1938. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000129481.12067.06>
- Nash, T. E., Mahanty, S., Loeb, J. A., Theodore, W. H., Friedman, A., Sander, J. W., ... & Fleury, A. (2015). Neurocysticercosis: a natural human model of epileptogenesis. *Epilepsia*, 56(2), 177-183. <https://doi.org/10.1111/epi.12849>
- Nash, T. E., Pretell, E. J., Lescano, A. G., Bustos, J. A., Gilman, R. H., Gonzalez, ... & Cysticercosis Working Group in Peru. (2008). Perilesional brain oedema and seizure activity in patients with calcified neurocysticercosis: a prospective cohort and nested case-control study. *The Lancet Neurology*, 7(12), 1099-1105. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70243-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70243-6)
- Ndimubanzi, P. C., Carabin, H., Budke, C. M., Nguyen, H., Qian, Y. J., Rainwater, E., ... & Stoner, J. A. (2010). A systematic review of the frequency of neurocyticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000870>
- Oehmichen, M., Theuerkauf, I., & Meissner, C. (1999). Is traumatic axonal injury (AI) associated with an early microglial activation? Application of a double-labeling technique for simultaneous detection of microglia and AI. *Acta neuropathologica*, 97(5), 491-494. <https://doi.org/10.1007/s004010051018>

- Petzold, A., Eikelenboom, M. J., Keir, G., Grant, D., Lazeron, R. H. C., Polman, C. H., ... & Giovannoni, G. (2005). Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(2), 206-211. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2004.043315>
- Pradhan, S., Kathuria, M. K., & Gupta, R. K. (2000). Perilesional gliosis and seizure outcome: a study based on magnetization transfer magnetic resonance imaging in patients with neurocysticercosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 48(2), 181-187. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200008\)48:2%3C181::AID-ANA7%3E3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200008)48:2%3C181::AID-ANA7%3E3.0.CO;2-C)
- Prasad, K. N., Chawla, S., Prasad, A., Tripathi, M., Husain, N., & Gupta, R. K. (2006). Clinical signs for identification of neurocysticercosis in swine naturally infected with *Taenia solium*. *Parasitology International*, 55(2), 151-154. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.01.002>
- Ressler, K. J., Paschall, G., Zhou, X. L., & Davis, M. (2002). Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 7892-7902. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-07892.2002>
- Restrepo, B. I., Alvarez, J. I., Castaño, J. A., Arias, L. F., Restrepo, M., Trujillo, J., ... & Teale, J. M. (2001). Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infection and Immunity*, 69(7), 4554-4560. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001>

- Sherriff, F. E., Bridges, L. R., & Sivaloganathan, S. (1994). Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for β -amyloid precursor protein. *Acta neuropathologica*, 87(1), 55-62. <https://doi.org/10.1007/BF00386254>
- Sikasunge, C. S., Johansen, M. V., Phiri, I. K., Willingham III, A. L., & Leifsson, P. S. (2009). The immune response in *Taenia solium* neurocysticercosis in pigs is associated with astrogliosis, axonal degeneration and altered blood–brain barrier permeability. *Veterinary parasitology*, 160(3-4), 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.015>
- Sikasunge, C. S., Johansen, M. V., Willingham Iii, A. L., Leifsson, P. S., & Phiri, I. K. (2008). *Taenia solium* porcine cysticercosis: viability of cysticerci and persistency of antibodies and cysticercal antigens after treatment with oxfendazole. *Veterinary parasitology*, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.014>
- Smith, D. H., Chen, X. H., Nonaka, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. Y., Saatman, K. E., ... & Meaney, D. F. (1999). Accumulation of amyloid β and tau and the formation of neurofilament inclusions following diffuse brain injury in the pig. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58(9), 982-992. <https://doi.org/10.1097/00005072-199909000-00008>
- Tsuda, M., Tashiro, T., & Komiya, Y. (2000). Selective solubilization of high- molecular- mass neurofilament subunit during nerve regeneration. *Journal of neurochemistry*, 74(2), 860-868. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740860.x>

- Varga-Parada, L., Merchant, M. T., Willms, K., & Laclette, J. P. (1999). Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitology research*, 85(2), 88-92. <https://doi.org/10.1007/s004360050514>
- Verástegui, M., González, A., Gilman, R. H., Gavidia, C., Falcón, N., Bernal, T., & Garcia, H. H. (2000). Experimental infection model for *Taenia solium* cysticercosis in swine. *Veterinary parasitology*, 94(1-2), 33-44. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00369-1)
- Verster, A. (1967). Redescription of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 29(4), 313-328. <https://doi.org/10.1007/BF00259983>