



# Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

## Facultad de Ciencias Químicas

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Departamento de Farmacia

Laboratorio de Neuroquímica

### Tesis profesional

*Evaluación de la respuesta proinflamatoria inducida por el lipopolisacárido o la 6-hidroxiopamina en ratas*

Abril 2019

**Tesis presentada para obtener el grado de:**

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

### Presenta

Irving Manuel Parra Becerra

### Directoras de tesis

D. C. Liliana Martínez Mendieta    D. C. María Isabel Martínez García

### Asesores de tesis

D. C. Samuel Treviño Mora

D. C. Lourdes Millán Pérez Peña

D. C. Gabriel Ramírez García



## Lineamientos Éticos y de Conducta

«Padecemos muchas dolencias, pero aspiramos a ser aquellos pueblos que redimen su dolor con la decisión inalterable de usar sus potencias en el logro de los grandes anhelos que iluminan la conciencia y ponen la conducta al servicio de la justicia, la libertad y el bien»  
(Vasconcelos, 1950).

Lo expuesto aquí es creación del autor del presente *Manifiesto* motivado, en primer lugar, por la necesidad absoluta y urgente de actuar bajo lineamientos *Éticos* y *Estéticos*. Así mismo, quien escribe, fue inspirado por el primer código de ética que conoció, a saber: el del laboratorio de la asignatura de *Fisiología II* a cargo de la Doctora María Isabel Martínez García. Así, pues, justifico a continuación:

Existe un amplio margen de diferenciación entre el *Derecho*, ejercido por el Estado y sus Instituciones y la *Ética*, a saber: las sanciones de orden público, de lo primero, y privado, de lo segundo. Así mismo, actuar bajo los principios legales de una institución, por ejemplo, los Estatutos de nuestra Universidad o las leyes todas que emanan de la Carta Magna es sumamente fácil y estamos habituados a vivir bajo estas normas jurídicas; no ocurre lo mismo cuando hablamos acerca de los principios de la *Moral*. Queda claro que, en este momento, no debo elucubrar, por el extenso espacio y esfuerzo que requeriría, sobre mis contrariedades existenciales, ni tratar teorías que poco entiendo, mas me propuse abordar el asunto de las necesidades morales del México del tiempo en que esto fue escrito: en que se ha puesto al frente al hombre como individuo y no al hombre como colectividad y que, a la sazón, hubimos de adoptar al capitalismo artero y al materialismo vulgar, acaso, por mera adaptación, pues quien no lo hiciera estaría, ya, condenado. Los modelos aludidos, por proferir el bien material, privado e individual y el consumismo voraz y aun al hombre le han calificado de objeto, han desechado *de facto* todos los elementos de la alta conciencia y, en su lugar, han colocado al capital y a la soberbia. La crueldad y la ignominia: fatalidad de los hombres de la historia reciente del mundo y malditos nosotros a fuer de nuestra propia desgracia; que hubimos de rechazar las primicias del espíritu (que trataremos de ensalzar aquí, con la búsqueda, o bien, en el retorno a la *Estética*) y poner al conducta al servicio de la tiranía. Entiendo, sin embargo, lo osado que significa implicarse en la soberanía individual, mas, como veremos, corresponde a todos los individuos rehacer la moral, rehacer la historia y rehacer a la sociedad reforzando cada palabra con la norma que la ennoblece y con la acción que la consuma.

Propongo, entonces, un *Utilitarismo Estético*. Lo explico, primero, diremos que la *Estética*, por sí misma, tiene un ritmo compuesto, no por vibraciones estériles, sino por ondas que relacionan lo material y lo espiritual, lo humano y lo constructo. Su métrica es el *amor* y su representación física, macroscópica, la *belleza*. La *Estética*, por tanto, tal y como la expongo ha de transfigurar la realidad, hacerla bella, volverla sustancia, acaso, debe ser el motivo primero y el fin último. De esta no diremos que es una mera abstracción estéril o desinterés totalitario en la acción, sino, una *Realidad*, en la que nos movemos libremente y de la que somos enteramente partícipes, incluso, responsables. *Estética* como proyección de la imagen cruda, primero, y elevada, después, de nuestro presente. Lo dicho obliga a los

hombres responsables, conscientes y consecuentes de su realidad, de la realidad mexicana, a colaborar en las tareas superiores de nuestra época. ¡Menesterosidad urgente, por implantar en las conciencias todas el *Ideal del Deber!* El deber equivale a redimir dinámica y constantemente a la sociedad. El deber exige hallar, primero, y, luego, conservar la justicia, la paz, la libertad y el progreso para todos. El deber, pues, requiere abordar dos cuestiones fundamentales: la del patriotismo, que no puede existir sin derroche de generoso esfuerzo y laboriosidad y la de la luz del alma que, con amor en el diario quehacer, transmutará la realidad y alcanzará la gloria. Con esto afirmamos que el trabajo requiere de libertad, que garantiza la acción, y que la paz, necesita justicia, que viene de la sustitución del encono en amor, pues, solo el amor entiende y transforma en belleza.

Así mismo, como cara de la misma moneda propongo actuar bajo lo que se ha logrado llamar la *Moral Utilitaria*, no para aportarles algo a los terrenales modelos, sino para derruirlas desde su base, hacerla funcionar. Bajo esta premisa diré que, tal moral, contendrá a la *Moral de Servicio* y a la *Moral de Función*. Veamos, la primera será la que dicte el servicio a la nación; a su vez, servicio, será todo aquel plasma: material o constructo, que exceda al trabajo y que ha de compartirse. Con esto, en seguida se reconoce que son inútiles quienes tienen la oportunidad de aportar algo y, por no hacer, son equivalentes a los que destruyen; señalará, por tanto, a aquel que sirve y al que estorba. Para no dar torcidas interpretaciones por lo que sigue sobre el valor humano, he de aclarar que no sirven aquellos que pueden transformar su entorno social y no revolucionan; enseñar al que no sabe y no comparten la luz propia a la conciencia oscura; hacer y no hacen; crear y derrumban. La segunda, la más complicada, dirá si un sujeto dado, cumple o no con su *Función Social*, con el papel que le corresponde, no bajo el hado irrevocable, como se calendarizaba antaño, sino el que se ha designado cada uno al elegir su realidad, incluso aceptando irresponsablemente las investiduras indeseadas. Aunque debería quedar implícito, pero deseando evitar vilezas, habré de afirmar que también es inmoral aquel que todo lo tiene, ofrece migajas y se ufana de magnánimo. Según lo dicho, un estudiante deberá 'estudiar', pero no solo eso, sino procurar descansar y alimentarse bien para rendir los periodos de exigencia como los exámenes o las exposiciones; deberá preparar temas, abordarlos; mejorar en sus métodos de estudio; deberá exigir al profesor, en caso de que este no cumpla con su función de maestro, con su *Función Moral*. Si dicho estudiante es un niño, también deberá jugar, hacer deporte, leer, aprender alguna actividad artística, en fin, todas las actividades que promuevan el desarrollo íntegro de las capacidades del hombre, su naturaleza entera. En el momento, pues, que algún integrante de la sociedad no cumpla con sus Funciones Morales, al mismo ritmo que estas cesan, las injusticias crecerán; dicho de otro modo: algún tipo de las injusticias nacen cuando los sujetos dejan de cumplir con su función y, por eso mismo, entorpecen las funciones del resto de los individuos. Digamos: si el Estado no da los recursos, no digo suficientes, siquiera necesarios, para que cualquier escuela tenga condiciones óptimas, o bien, salarios dignos para los Maestros, estos no podrán cumplir con las exigencias que la nación demanda y la nación exige que los niños todos aprendan. Por ello, no parece descabellado afirmar que «una vez que el maestro cumpla con su Función Moral, México empezará a civilizarse». El abandono político nacional en torno a la Educación, a la Ciencia y a la Libertad es un claro ejemplo de faltas a la Moral que propongo, pues entorpece las funciones de todos los individuos que están involucrados con los senderos referidos.

Como vemos, para cumplir con el *Ideal del Deber*, se proyecta una infinita variedad de posibilidades, mas mi famélica capacidad me hizo apto apenas para proponer este minúsculo manifiesto con miras al derroche de esfuerzo y generosidad en virtud de la apreciación propia de la realidad en que me he

desarrollado. El fin, como he señalado en verbo, es disminuir el oprobio histórico de la patria en que nos ha tocado nacer, vivir o desarrollarnos; de convertir el interés individual al colectivo; el anhelo de justicia y libertad; de proponer obras útiles: pensar y obrar en belleza; actuar movido por el propio esfuerzo, esfuerzo que pareciera que nace condenado al fracaso, y el amor a lo que se hace, esto, a través de la *Ética en la acción*: lucha cuasieterna contra las vicisitudes temporales. –Actúa con desinterés –afirma la estética tradicional–, por lo mismo, propongo una *Estética Útil* porque, en patrias como la nuestra, no hacer es equivalente a destruir y es preciso el trabajo por el triunfo de la acción libre y de la locura generosa.

Según lo dicho, aunque el *Código de Conducta* presente enmarca el comportamiento dentro del *Laboratorio de Neuroquímica* durante la trayectoria de realización de tesis, servicio social o prácticas profesionales, el actuante deberá esforzarse por extrapolarlo a las situaciones todas que se presenten a lo largo de su vida y legado. Por ello, se expide:

**Primero:** el portador de este código debe concebir a la *Ética* como una *Estética de la Conducta*.

**Segundo:** el *Código de Conducta* tiene la finalidad de crear o fortalecer una conducta ética, responsable y tolerante en el actuante.

**Tercero:** los principios o valores que regirán al portador del *Código de Conducta*, en orden alfabético, son: autocrítica, compasión, compromiso, crítica, equidad, esfuerzo, estética, ética, honestidad, justicia, mejora continua, patriotismo, pulcritud, respeto, responsabilidad, solidaridad y tolerancia.

**Cuarto:**

i. *El único compromiso inherente al investigador no es más que su encuentro desinteresado con la verdad; por tanto, el alumno, no deberá cometer fraudes de naturaleza alguna y no modificará los datos obtenidos. Toda vez que se modifique algún dato en la bitácora de experimentos, deberá escribirse el dato correcto con el nombre y la firma de quien autorizó dicho cambio. De ser necesario, deberá escribirse una breve justificación. El único permitido para autorizar los cambios es el dueño de la bitácora. De no hacerlo, se estará faltando al presente Código.*

ii. *Vivir bajo los principios morales es complicado, mas desarrollarlos o perfeccionarlos, impulsa el desarrollo cabal de las capacidades del actuante y la transformación de las realidades sociales. En este sentido, el portador de este código ha de tener, mínimo, las siguientes funciones, a saber: de estudiante, de aprendiz y, a largo plazo, de joven investigador. El portador debe cumplir con sus funciones. Tales como: estudiar, aprender a aprender, investigar, enseñar, preguntar, proponer, participar en actividades de difusión, asistir activamente a los seminarios, y lo que se trata en adelante.*

iii. *En esta realidad, la verdad y la perfección son inalcanzables; sin embargo, el estudiante deberá esforzarse por estar, cada día, más cerca de estos mejorando continuamente: pasando de lo eficiente a lo eficaz, tanto en el desarrollo de las técnicas, el rendimiento de los reactivos utilizados y en los métodos de estudio y trabajo.*

iv. *La crítica solo es justificable cuando se basa en los más nobles sentimientos de amor y compasión (o lo que es lo mismo, de justicia, con que se auxilia a los demás, a fin, de que cumplan su función), así como en el deseo de superar aquello que se señala.* Por esta razón deberán tolerarse las recomendaciones hechas por los estudiantes y profesores; se asumirán las *responsabilidades* necesarias y se actuará con el fin de *mejorar* lo indicado. También deberá tolerarse, si, en el transcurso de la *mejora continua*, existen dudas; de hecho, se desea que existan muchas y puedan resolverse colectiva o individualmente.

v. *El respeto y la dignidad subyacen la convivencia en entre individuos.* Así, el estudiante deberá reservarse de ocupar espacios en horarios apartados por otros estudiantes, a reserva de que exista mutuo acuerdo. Deberá mantener su área de trabajo *limpia y ordenada*. Deberá dejar el material utilizado limpio y disponible para otros usuarios. Deberá acomodar el material seco que se encuentre en el escurridor o estufa de secado. Deberá acomodar las toallas y jergas del cuarto de lavado. Solicitar aserrín y agua cuando sea necesario. El alumno debe evitar tomar las cosas que no son suyas ni moverlas de su lugar habitual sin previa autorización. No deberá entrometerse en los experimentos de otros (“meter mano por creer que conoce un método mejor”); solo será permitido si el otro experimentador está de acuerdo. Basados en el hecho de que todos aspiran a alcanzar la perfección en su campo de estudio y todos tienen vastas limitaciones, bajo ninguna circunstancia habrá comparaciones categóricas o clasistas entre los estudiantes, esto es: todos los estudiantes tendrán el mismo valor humano. De más aplicables que contribuyan al desarrollo de las actividades normales en el laboratorio.

vi. *Los sujetos experimentales, tal como las revoluciones sociales, son un mal necesario.* Ambas acciones, aunque deleznable, debido a los miles de millones de sacrificios, siempre que tengan un fin noble y eterno favorecen al progreso de las naciones. Por esta razón, los sujetos de experimentación no tendrán otra función más que fungir como lo señalado; no por mezquindad, pues la investigación, basada en principios como los que, quien escribe, propone; busca la verdad, así como el desarrollo de las patrias y de la humanidad y el mantenimiento de sus recursos. En este sentido: los sujetos experimentales jamás deberán ser tratados como mascotas, tampoco con crueldad o desprecio; por ello deberán ser atendidos como sujetos con una de las funciones más puras aun fundamentales en el proceso investigativo y la obtención de datos. Estos no conocen los calendarios humanos, así, si existe una festividad humana que se traslape con el aseo o tratamiento del sujeto experimental, deberá, en todo momento, dar prioridad a las necesidades del animal. Jamás deberán eludirse los tratamientos y cuidados. Cada día, antes de abandonar el vivario, el alumno deberá dirigirse al vivario y revisar, uno a uno, la cantidad de bebida y alimento que tengan; si alguno, sin importar si es suyo o no, deberá servirles lo que necesiten (a reserva que el protocolo de investigación lo restrinja). Deberá evitarse hacer sufrir o estresar innecesariamente a estos sujetos. Aun, al sacrificarlos, sus cuerpos deberán ser tratados dignamente.

**Irving Parra**

Octubre 2017

Reformado: Diciembre 2018

## Contenido

Abreviaturas	5
I. Prolegómenos	6
Inmunología	6
El sistema inmune innato	7
La respuesta inmune innata en el sistema nervioso central	14
La microglía	14
El metabolismo de las células cerebrales	17
II. Introducción	21
La Enfermedad de Parkinson	21
Los modelos experimentales en animales para estudiar la EP	21
El modelo Parkinsoniano inducido con 6-OHDA	23
El modelo Parkinsoniano inducido con LPS	28
III. Justificación	33
IV. Hipótesis	34
V. Objetivos	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
VI. Diagrama de trabajo	35
VII. Metodología	36
Sujetos experimentales	36
Cirugía estereotáxica	37
Modelo del cilindro	38
Procesamiento histológico	39
Inmunohistoquímica	39
Tinciones histológicas	40
Procesamiento de imagen	40
Morfometría de subtipos microgliales	40

Análisis citológico	41
Procesamiento estadístico	45
VIII. Resultados	46
Sitio de lesión	46
El LPS y la 6-OHDA degeneran las neuronas dopaminérgicas de la SNpc 14 días después de la inyección de los tóxicos referidos.	47
El LPS y la 6-OHDA causan microgliosis en el núcleo estriado 7 y 14 días después de la inyección de los tóxicos.	50
El LPS causa microgliosis en la SNpc 14 días después de su inyección.	52
El LPS produce un modelo experimental de activación microglial persistente en el estriado dorsolateral.	54
El LPS amplía la señal inflamatoria desde el núcleo estriado hasta la SNpc desde el día 7 posterior a la administración del inflamógeno.	59
El LPS causa primordialmente la aparición de cuerpos necróticos mientras que la 6-OHDA corpúsculos apoptóticos.	64
IX. Discusión de resultados	67
X. Conclusiones	76
XI. Referencias	77

## Abreviaturas

6-OHDA: 6-hidroxidopamina	LPS: lipopolisacárido
AGM: aorta, gónadas y mesonefros	MFB: haz del cerebro anterior
AP: anteroposterior	ML: mediolateral
BBB: barrera hematoencefálica	MPTP/MPP':
CD: grupo denominativo	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina y su metabolito
CLR: los receptores similares a la lectina del tipo C	NGS: suero de cabra normalizado
CSF-1: factor estimulante de colonia	NLR: los receptores tipo NOD
DA: dopamina	OxPhos: fosforilación oxidativa
DAB: diaminobencidina	PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos
DAérgico: dopaminérgico	PBS: buffer de fosfato sódico
DAMP: patrones moleculares asociados a daño	PFA: paraformaldehído
DAT: transportador de dopamina	PPP: vía de las pentosas fosfato
DHA: ácido deshidroascórbico	PRR: receptores con patrones de reconocimiento
Dpi: día posterior a la inyección	RLR: los receptores tipo RIG
Dp: día posterior	RNS: especies reactivas de nitrógeno
DV: dorsoventral	ROS: especies reactivas de oxígeno
E: día embrionario	SE: sujeto (s) experimental (es)
EMP: progenitores eritromieloides	SN: <i>substantia nigra</i>
EP: Enfermedad de Parkinson	SNC: sistema nervioso central
FL: hígado fetal	SNpc: <i>substantia nigra pars compacta</i>
GM-CSF: factor estimulante de colonia granulocito macrófago	SNpr: <i>substantia nigra pars reticulata</i>
HLA: antígeno leucocitario humano	TAM: macrófagos asociados a tumores
HSC: células madre hematopoyéticas inmaduras	TCAc: ciclo del ácido tricarbóxico
IBA-1: molécula adaptadora de unión a calcio ionizado-1	TGF: factor estimulante de crecimiento
IL: interleucina	TH: tirosina hidroxilasa
INF- $\gamma$ : interferón- $\gamma$	TLR: receptores tipo toll
LBP: las proteínas de unión a LPS	TNF: factor de necrosis tumoral
	Tx: Tritón-100x

Wpc: semana posterior a la fertilización

YS: saco vitelino

# I. Prolegómenos

## Inmunología

La inmunología es una rama de las ciencias biológicas que se ocupa del estudio del conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas que tienen como función reconocer elementos propios y ajenos a los organismos y defenderlos de infecciones, es decir, se encarga del estudio del *sistema inmune*.

El sistema inmune provee de protección contra aquellos agentes químicos, físicos y biológicos pertenecientes, o no, al organismo portador, mediante un par de acciones intervincladas: el *reconocimiento* y la *reacción*. A partir de este punto, es posible caracterizar y, al tiempo, clasificar al sistema inmune en sistema inmune *innato* y sistema inmune *adquirido* (o *adaptativo*). Por un lado, de acuerdo a la antigüedad de la aparición en la evolución de los organismos vivos, se piensa que el segundo es más reciente, debido a que, solo algunos invertebrados y todos los vertebrados son portadores de este y, por el contrario, el sistema inmune innato lo utilizan una variedad de organismos; de acuerdo a la sutileza de la capacidad del reconocimiento, bien, puede ser tan fino —como el sistema adaptativo— que puede ser capaz de reconocer patrones moleculares que pertenezcan a un organismo, o bien, tan tosco —como el sistema innato— que, por detectar una estructura evolutivamente conservada entre organismos, es capaz de reconocer a una amplia gama de los mismos. Según esto, no es de extrañar que el sistema inmune innato sea portado por muchos más organismos; que, sea funcional en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario y que sea la primera línea de defensa; que reaccione velozmente ante un primer enfrentamiento al daño celular —según la idea de las actividades intervincladas mencionadas arriba—. En este orden de ideas, se dice que el sistema inmune adquirido tiene memoria, ya que, luego de un primer contacto con alguna estructura química, aunque lenta en la acción, capacita al organismo para ‘recordar’ dicha disposición molecular para, luego, durante un duelo ulterior, reaccione más rápida, intensa y eficazmente que en el primer caso. La inmunidad, pues, tal y como la hemos venido tratando, es el estado de protección contra un el daño celular.

La intención de ofrecer este tan diminuto panorama es la de distinguir que en la literatura existe esta clasificación, sin embargo, el trabajo conjunto de ambos brazos del sistema inmune contribuye a mantener la homeostasis de los organismos que los portan, así mismo, únicamente, se detallará al sistema inmune innato que es el que tiene más estreches con el presente trabajo.

## El sistema inmune innato

Como ya se dijo previamente, la participación de la respuesta inmune es crítica para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, además, es la primera línea de defensa frente a agentes que causan daño celular. El ala innata del sistema inmune consta de tres componentes: el físico, el celular y el humoral. El primero mecanismo de evasión patológica es la obstaculización del avance de los agentes nocivos. La piel constituye una barrera física formada por queratinocitos, mas si las verjas epiteliales externas del organismo son superadas, al interior del organismo existen mecanismos especializados para afrontar al daño celular, a saber: epitelios, membranas mucosas —principalmente en los sistemas digestivo, respiratorio y nervioso central— y células especializadas que son capaces de producir sustancias —como glicolípidos, ácidos, enzimas bactericidas, etc.— que limitan el crecimiento y reproducción de los agentes que generan el daño para, ulteriormente, eliminarlos (Kindt *et al.*, 2007a; Abbas *et al.*, 2015). Según lo dicho, más tarde en el tiempo o simultáneamente a la evasión de las barreras, se puede activar la respuesta *inmune innata celular* que consiste en un par de reacciones: *la inflamación* y la defensa antivírica (Kindt *et al.*, 2007a; Abbas *et al.*, 2015; Huber-Lang *et al.*, 2018).

La inflamación, por tanto, es una respuesta biológica compleja que hace frente a daños celulares causados por agentes químicos, físicos o biológicos. En este proceso se ven involucradas diferentes proteínas solubles y ancladas a las células de la respuesta inmune innata y células del microambiente celular en el que se han desarrollado los procesos de daño. La activación de la inflamación lleva a modificaciones del microambiente tisular; por ejemplo, modificaciones en la expresión genética de células que son reprimidas en un estado fisiológico, pero que se exacerban en un estado patológico, así como durante la diferenciación celular y el reclutamiento de células inmunitarias periféricas. Si bien, una respuesta organizada y llevada a cabo de forma sincronizada facilitará la reparación, adaptación y sobrevivencia de los tejidos dañados; el mantenimiento prolongado de la respuesta inflamatoria puede ser tóxico para las células involucradas (Kindt *et al.*, 2007b; Abbas *et al.*, 2015; Headland & Norling, 2015; Sochocka *et al.*, 2017; Huber-Lang *et al.*, 2018). Siguiendo esta misma línea de pensamiento, las células inmunitarias que se desempeñan como la primera línea de defensa del sistema inmune innato y que, consecuentemente, producen señales de auxilio y reclutamiento son los macrófagos tisulares especializados. En este sentido, para adentrarse al estudio de la respuesta celular del sistema inmune innato es conveniente hablar

sobre la ontogenia de los macrófagos y, con ello, determinar su versatilidad en cuanto a la función que desempeñan y la diferenciación celular de la que son característicos.

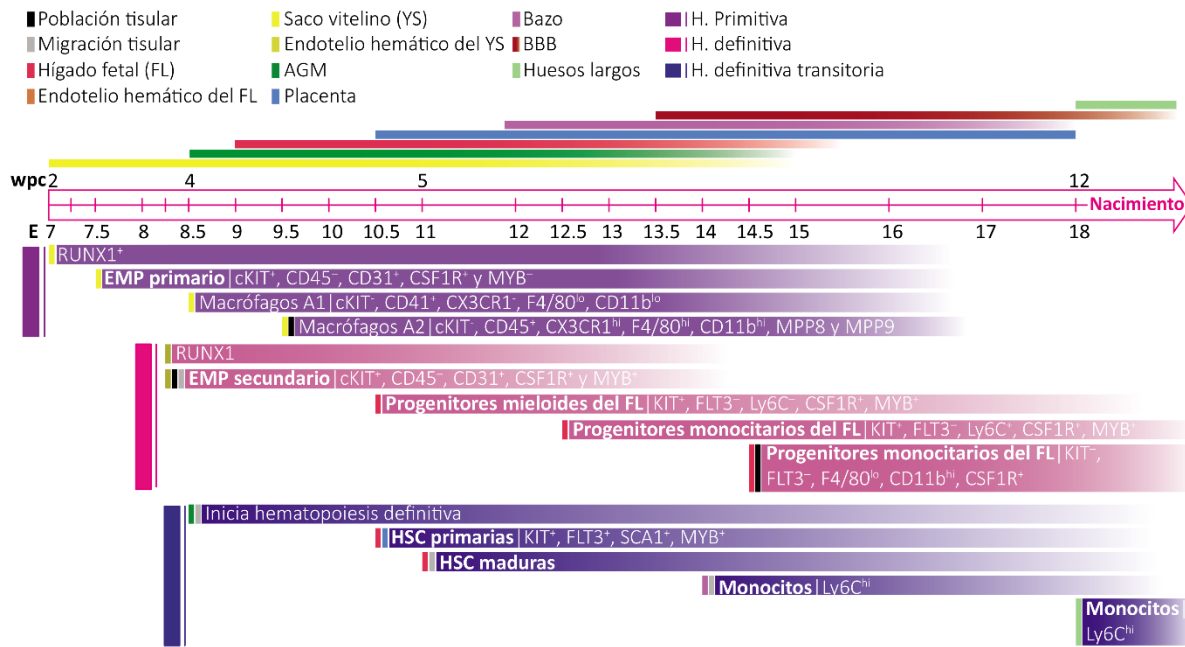
### ***Monocitos y macrófagos***

#### **Ontogenia**

El desarrollo, migración, diferenciación, capacitación y comportamiento de los macrófagos/monocitos —y del resto de las células— está determinado por el microambiente celular, o bien, por el nicho en el que se lleva a cabo algún evento tisular. Esto implica que un conjunto de células, un sitio anatómico específico, factores proteicos y condiciones de potencial químico, temperatura y tensión oxigénica, sean expuestos de manera sincronizada con tal de que se lleve a cabo una interacción precisa de los componentes celulares todos (Wang & Wagers, 2011).

Durante el desarrollo embrionario de roedores se producen (**Figura 1**), al menos, tres fases —temporalmente traslapadas— de surgimiento hematopoyético. La primera —denominada: *hematopoyesis primitiva*— comienza, durante el día embrionario número 7 (E7; en humanos, alrededor de 3 semanas posfertilización [3wpc, del inglés: *weeks post-conception*]), en la placa posterior del mesodermo: en las islas sanguíneas del saco vitelino, en donde surgen células identificadas como RUNX1<sup>+</sup>; y en E7.5 comienzan a surgir los progenitores eritromieloides (EMP, del inglés: *erythromyeloid precursors*). Estos progenitores se diferencian en células eritroides nucleadas y macrófagos denominados *derivados del saco vitelino* (YS, del inglés: *yolk sac*), que originan el estadio A1, que ya expresan el grupo denominativo 45 (CD45, del inglés: *cluster designation*), pero no marcadores mieloides; más adelante en el tiempo, se originan células en el estadio A2, que, entre otras proteínas empiezan a producir las metaloproteasas MPP8 y MPP9, lo cual, está íntimamente relacionado con la migración de estas células, por ello, se piensa que estos macrófagos son aquellos que pueblan todos los tejidos del organismo. La segunda fase hematopoyética —llamada: *transitoria definitiva*— iniciada hacia E8.25, comienza en el *endotelio homogénico del YS* que genera EMP secundarios. Estas, a diferencia de las EMP primarias, sí dependen del factor MYB, lo que implicaría que tiene capacidades de diferenciación o de función distintas a las generadas en la hematopoyesis primitiva, por otro lado, bien, unas células generan macrófagos del YS, que se pueden distribuir por el organismo, o bien, durante E9, pueden migrar al hígado fetal (FL, del inglés: *liver fetal*) en donde se establecen y aumentan la expresión del receptor al factor estimulante de colonia 1 (CSF1R, del inglés: *colony stimulating factor 1 receptor*) y hacia E10.5 se convierten en progenitores mieloides. En E12.5, los progenitores mieloides se

diferencian en *monocitos del FL*: F4/80<sup>lo</sup>CD11b<sup>hi</sup> y tienen una alta capacidad proliferativa. En E14.5, una gran cantidad de monocitos del FL migran hacia todos los tejidos excepto al cerebro, en donde, hacia el E13.5, la barrera hematoencefálica (BBB, del inglés: *blood-brain barrier*) comienza a formarse, esto es: los monocitos del FL se convierten en macrófagos tisulares, y se mezclan entre los macrófagos derivados del YS al punto que es imposible distinguirlos en la etapa adulta. Al mismo tiempo, durante E8.5, inicia la tercera fase hematopoyética —designada como: *hematopoyesis definitiva*—. En esta, se generan células madre hematopoyéticas inmaduras (HSC, del inglés: *haematopoietic stem cells*) del endotelio hemogénico en la región esplenopleural parahortica y en E10.5 (en humanos 4wpc), de dichas zonas, se forman las regiones: aorta, gónadas y mesonefros (AGM, del inglés: *aorta-gonad-mesonephros*), las cuales, durante E11-E12 (en humanos 5wpc), bien, se unen a la producción de monocitos del FL y placenta, o bien, generan HSC maduras. Una propuesta alterna sobre el origen de los macrófagos y monocitos, refiere que únicamente, los descendientes de los EMP y macrófagos del YS, pueblan los tejidos del organismo y no los macrófagos del FL (Wang & Wagers, 2011; Epelman *et al.*, 2014; Prinz & Priller, 2014; Li & Barres, 2017; Prinz *et al.*, 2017). La hematopoyesis, posteriormente, se desplaza al bazo hacia E14 y luego en dirección a la médula ósea durante E18 (en humanos 12wpc). En humanos, al nacer, los huesos largos, soportan la gran mayoría de la formación de células hemáticas y la hematopoyesis extramedular multilínea es insignificante, excepto en casos de patología. Por el contrario, en ratones, la hematopoyesis esplénica persiste durante varias semanas después de nacidos. Finalmente, en los peces, el riñón es el sitio predominante de la hematopoyesis en la vida adulta (Wang & Wagers, 2011).



**Figura 1. Ontogénesis de los macrófagos de ratones y humanos.** La hematopoyesis se inicia en diversos momentos y lugares durante el desarrollo de los mamíferos. Esta figura representa las ubicaciones anatómicas de los que emergen las células hematopoyéticas primitivas y su transición a diversos órganos hematopoyéticos. Sobre la línea del tiempo se muestra el momento del surgimiento de órganos hematopoyéticos y la BBB; las barras representan la duración de la hematopoyesis en ese tejido u órgano. Debajo de la línea del tiempo se indican las días hematopoyéticas de novo; las señalizaciones superiores indican el sitio de origen hematopoyético y, en especial, la barra negra indica la distribución a todos los tejidos embrionarios y la barra gris migración hacia tejidos hematopoyéticos específicos. AGM: aorta-gónada-mesonefros; dpc: días posconcepción; E: día embrionario; wpc: semanas post-concepción; BBB: barrera hematoencefálica; HSC: células madre hematopoyéticas. Tomado y modificado de ADON EN-CITE ADON EN-CITE.DATA [Wang & Wagers, 2011; Li & Barnes, 2017; Prinz et al., 2017].

## Polarización: el fenotipo y la función de los macrófagos

Los macrófagos forman parte del *sistema fagocito-mononuclear*, a este grupo pertenece la amplísima variedad de macrófagos tisulares especializados —los osteoclastos (en los huesos), los macrófagos alveolares (en pulmones), los histiocitos (en tejido conectivo intersticial), las células de Kupffer (en el hígado), la microglía (en el parénquima cerebral), los macrófagos perivasculares (en la periferia del endotelio) etc.— provenientes del proceso embrionario descrito en el apartado anterior, los monocitos circundantes en la sangre y las células dendríticas. Los macrófagos contribuyen al desarrollo, al mantenimiento de la homeostasis y a la reparación del daño —si es que el órgano ha sido enfrentado a algún agente nocivo— mediante la fagocitosis; la endocitosis; la producción y secreción de partículas reclutadoras (quimiocinas), activadoras de otras células (citocinas), de adhesión celular (ICAM), tróficas y de destrucción microbiana; en ese sentido, los monocitos mantienen el mismo dinamismo mencionado y la alta capacidad de diferenciación, ya que, pueden ser reclutados desde los sitios hematopoyéticos definitivos, conforme sean requeridos. Según esto, puede asumirse la enorme capacidad adaptativa y funcional de estas células.

Los macrófagos, desde su origen hasta la etapa adulta, representan un espectro de poblaciones inmunofenotípicamente distintas, que varían la forma del citoesqueleto, la expresión génica y, con ello, la producción de proteínas solubles y ancladas a la membrana, según el microambiente en el que se encuentren y el estado fisiológico que este represente —de salud o enfermedad—. Sin embargo, debido a que, múltiples proteínas que son expresadas en las membranas de los macrófagos se traslapan entre los distintos estados de activación, se han formulado diversos mapeos genéticos y proteicos posteriores a la estimulación con microorganismos, fracciones de estos, citocinas, factores de crecimiento, glucocorticoides, interferones, en fin, todos aquellos moduladores de los macrófagos y, según su reacción, se han clasificado de distintas maneras. En la literatura, se encuentran, por lo menos, cuatro formas de nombrar a la polarización o activación de los macrófagos, a saber: activación clásica o alternativa; macrófagos reguladores; macrófagos asociados a tumores (TAM); macrófagos en estado M1 o M2; macrófago —derivado de la nomenclatura anterior— M1, M2a, M2b, M2c o M3; macrófagos derivados de CSF-1 o macrófagos derivados del factor estimulante de colonia granulocito macrófago (GM-CSF del inglés: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) y macrófagos según el escenario de estímulo: uso del activador macrofágico, marcadores de membrana y marcadores genéticos expresados y no expresados, v. g., M(IL-10), M(LPS), *ex vivo* M(LPS)<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>IL-10<sup>lo</sup> (Mantovani *et al.*, 2004; Martínez & Gordon, 2014; Murray *et al.*, 2014). Las nomenclaturas ofrecidas intentan responder netamente a la caracterización, es decir: a la forma, a la función y a la participación de los macrófagos en una situación específica, lo cual, implica *per se* un esfuerzo inmenso por describir a un espectro de amplias posibilidades, empero, este contexto microambiental está íntimamente ligado a dos funciones: la *promoción* de la respuesta inflamatoria o la *supresión* de la respuesta inflamatoria (acciones *proinflamatorias* o *antiinflamatorias*, respectivamente). Los macrófagos que fueron definidos como activados clásicamente, M1 y las formas adoptadas mediante la estimulación de macrófagos en estado basal como: interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés: *tumor necrosis factor*), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ligantes de los receptores tipo toll (TLR, del inglés: *toll like receptor*), GM-CSF, etc., están relacionadas con la defensa del hospedero ante una gran variedad de bacterias, protozoos y virus, en general, son células que promueven la activación de la respuesta inflamatoria. Por su parte, aquellos macrófagos que fueron determinados como macrófagos activados alternativamente, M2, M2a, M2b, M2c, TAM, las células estimuladas con IL-4, IL-13, IL-10, CSF-1, etc. cuentan con propiedades supresoras de la inflamación y de reparación del daño

(Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Gordon & Taylor, 2005; Murray & Wynn, 2011; Martinez & Gordon, 2014).

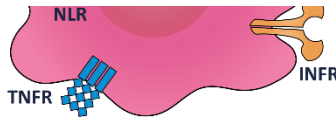
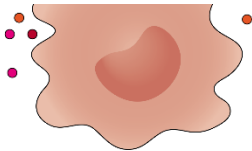
A pesar de la clasificación previa, es sumamente importante comprender que la nomenclatura mostrada aquí y retomada por muchos investigadores surgió de estudios *in vitro* en condiciones en las que el investigador puede controlar los escenarios de reacción y respuesta —las citocinas a estudiar, el conjunto celular y las respuestas ejercidas por el mismo sistema— y, de este modo, puede definirse el estado de polarización de los macrófagos. En ese sentido, *in vivo*, el estudio es mucho más complejo debido a la vasta variedad, no solo de proteínas en el evento fisiológico o patológico, sino de las células que las producen y, durante el daño tisular, *in vivo*, coexiste una población heterogénea de células del parénquima, así como células del sistema inmune innato y adaptativo, en estado activado, o no, y que, los macrófagos, no necesariamente están polarizadas en un solo estado, sino que, más bien, por su dinamismo, cambian respecto al tiempo y adquieren perfiles basados en los estímulos microambientales. La **Figura 2** muestra un panorama general acerca de lo descrito aquí.

## Macrófago en estado fisiológico

Inflamación crónica  
Daño tisular  
Disfunción celular

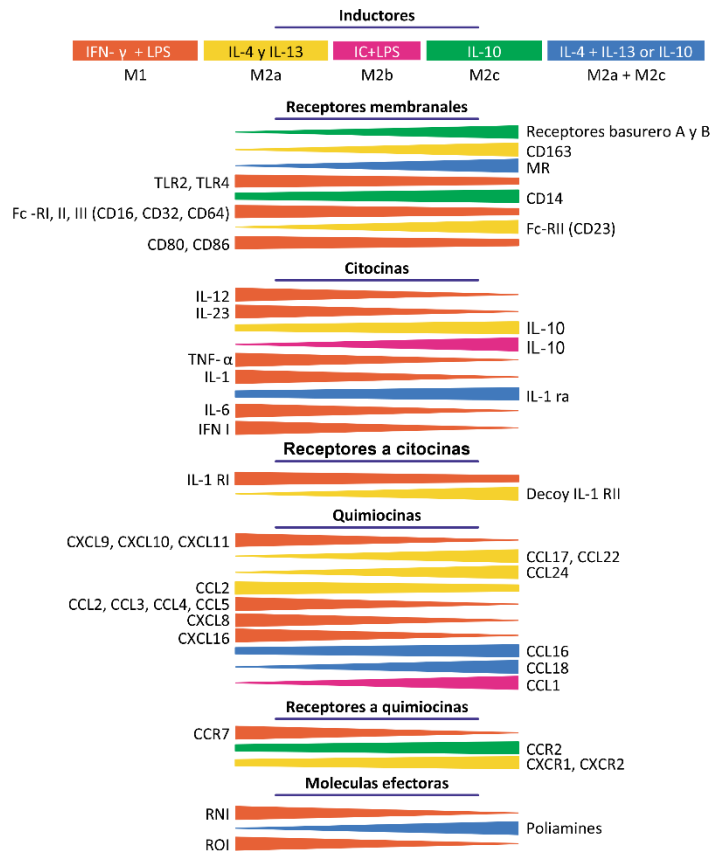


Resolución de la inflamación  
Reparación del daño  
Fagocitosis incrementada



### Espectro de macrófagos M1

### Espectro de macrófagos M2



**Figura 2. Espectro de activación macrofágica.** La activación de los macrófagos está íntimamente relacionada con el cambio en la expresión genética y, al mismo tiempo, se expresan en un diverso perfil de fenotipos caracterizados por la producción de proteínas solubles como citocinas, quimiocinas y receptores de membrana. En la parte superior se muestran los receptores de membrana en un macrófago en estado fisiológico y la polarización típicamente reportada (M1 y M2). En la parte inferior se muestra el perfil fenotípico de los macrófagos activados. TLR: receptores tipo toll; NLR receptores tipo NOD; CLR: receptores similares a la lectina del tipo C; RLR: receptores tipo RIG; INFR: receptores de Interferón; TNFR: receptores a TNF. Tomado y modificado de: ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA (Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Martinez & Gordon, 2014)

## Activación y resolución de la respuesta inmune innata

El trauma provoca una serie de respuestas inmunitarias innatas rápidas en un intento por limpiar los tejidos dañados y esto es secundado por la activación de mecanismos de reparación, con el objetivo final de restaurar las células y los tejidos a su estado previo a la lesión. Las lesiones graves se pueden asociar a la presencia *no propia* de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*) provenientes de agentes infecciosos (bacterias, virus y hongos), así como de la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP, del inglés: *damage-associated molecular patterns*) *propios*, tales como ATP, HMGB-1, histonas, ADN mitocondrial, etc. Las señales de peligro molecular señaladas anteriormente pueden detectarse mediante vías inflamatorias en fase fluida (humoral) que contienen proteínas o lípidos y participan en la llamada *primera línea de defensa*. Esta primera respuesta está regulada por compuestos de la cascada de coagulación y complemento, y se activa rápidamente después del trauma, reforzando la activación en medios ácidos, esto es: hipóxicos. Tanto directamente como a través de dichos sistemas activados, los DAMP y los PAMP, pueden transmitir sus señales a los leucocitos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, del inglés: *pattern-recognition receptors*) como los TLR, los receptores tipo NOD (NLR, del inglés: *NOD like-receptor*), los receptores similares a la lectina del tipo C (CLR, del inglés: *C-type lectin receptors*), los receptores tipo RIG (RLR, del inglés: *RIG-I-like receptor*), los receptores purinérgicos, los receptores complementarios (**Figura 2**), etc. En general, la acción celular da como resultado efectos protectores: inflamatorios y antiinflamatorios que, en gran medida, son mediados por la quimiotaxis dirigida, la liberación de citoquinas como: IL-6, IL-8, IL-1Ra e IL-10, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *reactive oxygen species*) y nitrógeno (RNS, del inglés: *reactive nitrogen species*), la fagocitosis, la formación de trampas extracelulares de neutrófilos y la destrucción de los agentes nocivos. La liberación de vesículas de los leucocitos también puede mejorar la adhesión de los leucocitos y la inflamación sistémica y promover la activación del sistema de coagulación como una estrategia para contener la hemorragia. Es relevante mencionar que la respuesta inflamatoria sistémica comprende no solo múltiples características activadoras del sistema inmunológico, sino también características supresoras. Esta respuesta inflamatoria sistémica equilibrada está diseñada para eliminar el peligro molecular y reparar el tejido mediante la reprogramación de macrófagos —como hemos tratado, en los espectros celulares M1 y M2—. Es necesario mencionar que la intensidad de la lesión inicial es fundamental para

determinar si la inflamación se resolverá se desregulará (Headland & Norling, 2015; Huber-Lang *et al.*, 2018).

## **La respuesta inmune innata en el sistema nervioso central**

La mayoría de los animales cuentan con un sistema nervioso que recibe las señales del medio y las traduce a señales eléctricas y químicas con el fin de responder a un estímulo externo. El sistema nervioso no está formado únicamente por neuronas, sino por una población celular diversa. En este conjunto de células se encuentran la macroglía —que tiene un origen embrionario común al neuronal— y la microglía —que procede del mesodermo—.

Durante mucho tiempo se pensó que el sistema nervioso central (SNC) era un sistema inmunológicamente privilegiado debido a que la BBB impide la extravasación de los componentes sanguíneos al SNC, además, se creía que las células distintas a las neuronas, eran células con escasa participación en el mantenimiento de la homeostasis (Heneka *et al.*, 2014; Becher *et al.*, 2017; Li & Barres, 2017). Esta concepción ha cambiado con los avances científicos del último siglo. Actualmente es bien sabido que múltiples células del SNC expresan receptores con patrones de reconocimiento tales como los asociados patógenos y los asociados a daño los cuales participan en la señalización del proceso inflamatorio.

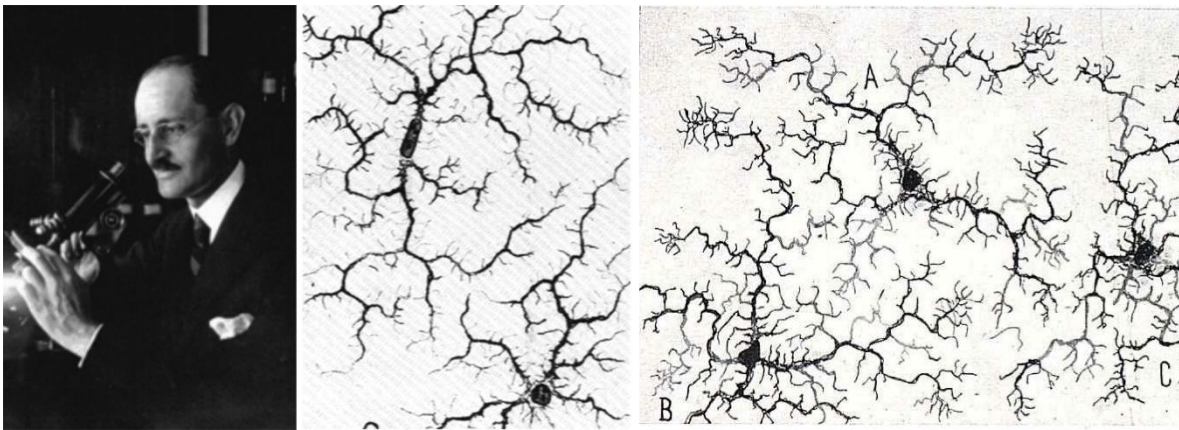
Se definió previamente a la inflamación como una de las respuestas del sistema inmune innato que hace frente a agentes nocivos gracias al auxilio de componentes diversos. En esta línea de pensamiento, la *neuroinflamación*, hace referencia al desarrollo de un proceso inflamatorio, propiamente dicho, localizado en SNC en la que están implicadas células neurogliales y microgliales. La principal célula implicada en la respuesta del sistema inmune innato es la microglía (Headland & Norling, 2015; Sochocka *et al.*, 2017).

## **La microglía**

Del Río Hortega describió por primera vez a las células microgliales que forman parte de la respuesta inmune innata en el SNC (**Figura 3**). De forma general, postuló las siguientes características: (1) la microglía entra al cerebro durante el desarrollo temprano, (2) tiene una morfología ameboide y es de origen mesodérmico; (3) utiliza los vasos sanguíneos y linfáticos como guía para la migración y entra a todas las regiones del cerebro, (4) se transforman en un fenotipo morfológicamente ramificado en el cerebro maduro, (5) y ahí se encuentra dispersa en todo el SNC, por lo que, (6) cada célula parece ocupar un territorio definido, sin embargo, (7)

después de un evento patológico, estas células experimentan una transformación (8) adquiriendo una morfología ameboidea similar a la observada durante su desarrollo temprano. Además, (9) estas células tienen la capacidad de migrar, proliferar y fagocitar (Río-Hortega, 1921; Kettenmann *et al.*, 2011).

La microglía constituye del 5–20% de las células gliales en roedores. Pertenece al grupo de células fagocíticas-mononucleares y, por tanto, a los macrófagos residentes del SNC, de hecho, es el único macrófago residente que está en contacto con el parénquima cerebral, así mismo, expresan marcadores específicos, como: CD116, CD11b y CSF-1. Esto es, son las células del sistema inmune innato del SNC. Además, y, como lo postuló Del Río Hortega, está distribuida homogéneamente a través de todo el SNC (Kettenmann *et al.*, 2013; Li & Barres, 2017).

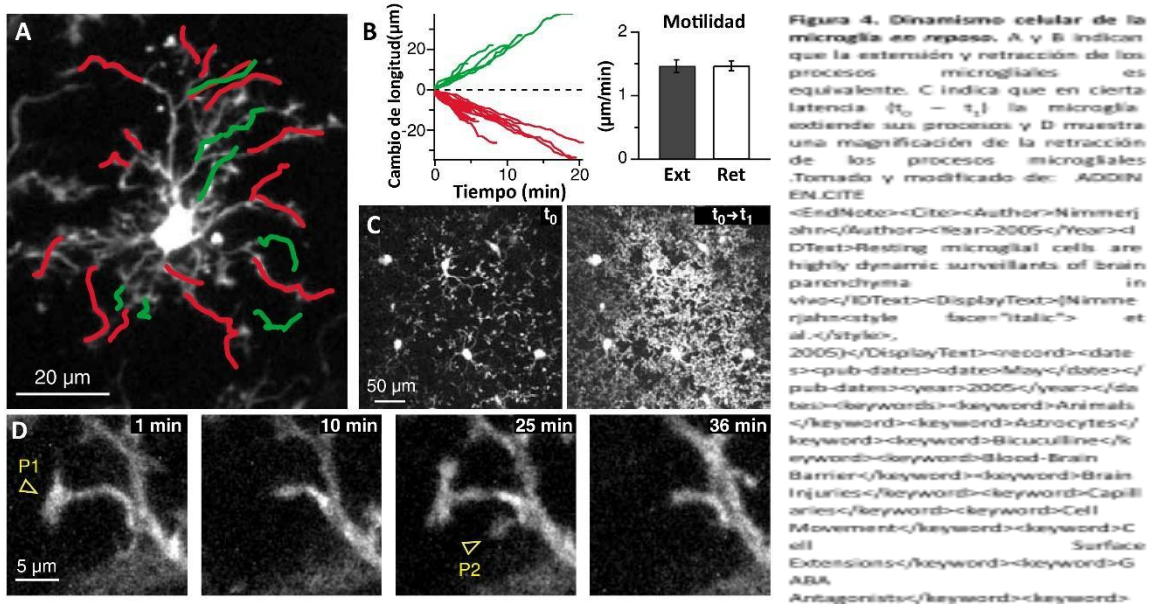


**Figura 3. Pío del Río-Hortega (1882-1945).** Del Río-Hortega describió por primera vez la morfología y las funciones de la microglía. ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA (Río-Hortega, 1921; Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann *et al.*, 2013).

### ***La polarización microglial***

La microglía es una célula versátil y altamente especializada; puede modificar el citoesqueleto con el fin de adaptarse a una situación presentada. Como ocurre con todas las células del organismo, la morfología está ligada directamente a la función que desempeñan, por lo que se han identificado algunas formas y, con ello, funciones distintas para cada una (Torres-Platas *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2018). Por un lado, ya es bien sabido que la microglía no es una célula inmune quiescente que solo entra en acción cuando existe el estrés celular; en este sentido, aunque se dice que la microglía está *en reposo*, realmente está supervisando dinámicamente el parénquima cerebral. El estadio fisiológico microglial es denominado en reposo o M0. Su forma es altamente ramificada, sus procesos se contraen y alargan equivalentemente (**Figura 4**). Tiene un

cuerpo celular, más bien, pequeño. Participa en procesos fundamentales en el desarrollo y homeostasis del SNC fetal y adulto sano. Cumple un papel importante en el control de proliferación y diferenciación neuronal, en la formación o poda (eliminación) de conexiones sinápticas y en la remodelación neuronal mediante la remoción de neuronas apoptóticas. Además, como se mencionó arriba, sus procesos están en movimiento, por lo que, monitorean constantemente el largo y ancho del SNC (Nimmerjahn *et al.*, 2005; Prinz & Priller, 2014).



Por otro lado, la activación microglial involucra cambios fenotípicos y genotípicos. La microglía activada clásicamente (M1), en contraste con la microglía en reposo, se caracteriza por los cambios en la membrana plasmática, un incremento en la capacidad de adherirse a sustratos inertes, fagocítica y pinocítica y, por tanto, por un alto número de fagolisosomas y vesículas endocíticas. Así como, activación del complejo inflamósoma, la producción de citocinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, producto del estallido respiratorio, y factor de necrosis tumoral, que es un potente estimulador proinflamatorio de la mayoría de las células inmunes. La microglía activada alternativamente (M2), por su lado, muestra propiedades antiinflamatorias: inhibe la producción de interferón- $\gamma$ , antagoniza las respuestas de este (incluida la activación de M1) y es inducida por diferentes mediadores. Tiene capacidad fagocítica incrementada y produce factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF, del inglés: *transformant growth factor*), así como, interleucinas antiinflamatorias como la IL-10 y pueden promover la reparación celular, tiene la

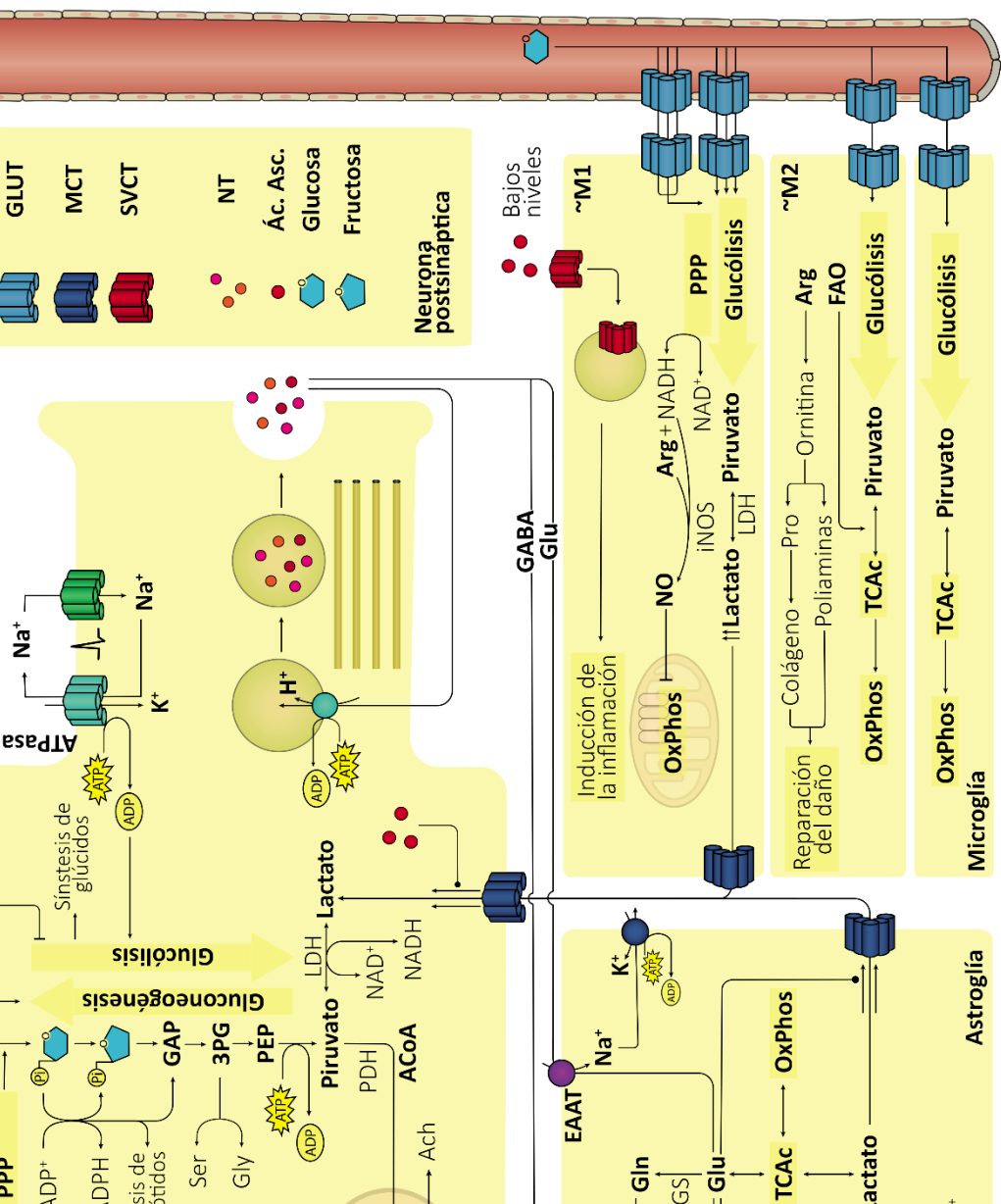
capacidad de modular la apoptosis, de retirar células apoptóticas y regenerar los tejidos. Existen diferentes estados de M2 que pueden ser identificados por marcadores exclusivos de estos inmunofenotipos, sin embargo, no serán detallados en este escrito (Dutta *et al.*, 2008; Saijo & Glass, 2011; Gordon *et al.*, 2014; Martinez & Gordon, 2014; Walker & Lue, 2015; Orihuela *et al.*, 2016; Joers *et al.*, 2017).

## **El metabolismo de las células cerebrales**

El cerebro constituye el ~2% del peso de una persona. Aun cuando un sujeto está en reposo, el cerebro consume el 25% de la energía del cuerpo. Las células del cerebro —como las del resto de los organismos vivos—, para mantener el estado fisiológico, esto es: la generación y restauración del gradiente de membranas; el reciclaje de neurotransmisores; la señalización intracelular; el transporte dendrítico y axonal; la motilidad celular (en reposo y de desplazamiento); la activación de la inflamación y la producción de mielina, en fin, todos los procesos que son traducidos en la generación de un esfuerzo y, por tanto, en la ejecución de trabajo, requieren generar energía y esta, a su vez, es obtenida de los nutrientes que provee el microambiente y las capacidades celulares (Beltrán *et al.*, 2012).

La glucosa constituye la fuente metabólica obligatoria para las células cerebrales (Dienel, 2019); se oxida casi por completo a través de la glucólisis aerobia y el ciclo tricarboxílico (TCA, del inglés: *tricarboxylic acid*) asociado con la fosforilación oxidativa (OxPhos, del inglés: *oxidative phosphorylation*), o bien, a través de la vía de las pentosas fosfato (PPP, del inglés: *pentose phosphate pathway*), es decir: además de ser una fuente rica de energía potencial, también lo es de precursores de intermediarios metabólicos y estructurales. Así mismo, en el cerebro, específicamente en las células astrocitarias (Brown & Ransom, 2007) la glucosa puede almacenarse en su forma polimérica: el glucógeno. Sin embargo, en situaciones particulares, el cerebro puede utilizar otros sustratos distintos de la glucosa como el hidroxibutirato, el acetoacetato y la acetona —que son cuerpos cetónicos producidos en el hígado a partir del acetil-CoA— y, especialmente los oligodendrocitos están especializados para en el uso de lípidos para la formación de mielina. Por otro lado, se ha propuesto que gran parte de la energía generada por las neuronas proviene de la conversión de glucosa en lactato que es proveído, principalmente, en periodos de demanda energética, por las células astrogliales y microgliales (**Figura 5**) (Beltrán *et al.*, 2012; Orihuela *et al.*, 2016; Borst *et al.*, 2018).

En un estado fisiológicamente sano, la recuperación del potencial de membrana neuronal es el proceso que demanda más energía (~80% de requerimiento total del cerebro), así como el reciclaje de neurotransmisores y la motilidad de las extensiones protoplasmáticas gliales; procesos habituales que cumplen, de forma general, el cerebro, y que cubren el 20% restante



requerimiento energético en el cerebro. Sin embargo, en algunas circunstancias, el requerimiento energético puede aumentar, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, donde la inflamación y la remodelación del citoesqueleto, el transporte vesicular, el reciclaje de neurotransmisores, la polarización, repolarización y recuperación del potencial de membrana neuronal y la promoción de intermediarios metabólicos de las neuronas, los astrocitos y la microglía y algunos mecanismos que requieren energía en el cerebro. Sin embargo, en algunas circunstancias, el requerimiento energético puede aumentar, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, donde la inflamación y la remodelación del citoesqueleto, el transporte vesicular, el reciclaje de neurotransmisores, la polarización, repolarización y recuperación del potencial de membrana neuronal y la promoción de intermediarios metabólicos de las neuronas, los astrocitos y la microglía y algunos mecanismos que requieren energía en el cerebro.

**Abreviaturas:** Se muestran las principales vías metabólicas de las neuronas, los astrocitos y la microglía y algunos mecanismos que requieren energía en el cerebro. Sin embargo, en algunas circunstancias, el requerimiento energético puede aumentar, como en el caso de la enfermedad de Alzheimer, donde la inflamación y la remodelación del citoesqueleto, el transporte vesicular, el reciclaje de neurotransmisores, la polarización, repolarización y recuperación del potencial de membrana neuronal y la promoción de intermediarios metabólicos de las neuronas, los astrocitos y la microglía y algunos mecanismos que requieren energía en el cerebro.

metabólicos y el desplazamiento celular; procesos que, de hecho, son acelerados respecto al estado basal—. Así mismo, se ha demostrado que el ácido ascórbico tiene un papel crucial en la modulación de la glucólisis y la gluconeogénesis, así como en la limitación de las ROS y la regulación del proceso inflamatorio, al mismo tiempo, el ácido ascórbico intracelular es capaz de estimular el transporte de lactato hacia las neuronas (Castro *et al.*, 2009).

La mayoría de los datos publicados sobre los requerimientos energéticos del espectro de activación inflamatoria se ha generado en células inmunes periféricas y solo unos pocos estudios examinan a la microglía (Orihuela *et al.*, 2016; Caputa *et al.*, 2019). Se ha afirmado que existe una reprogramación metabólica que está ligada a la regulación de la respuesta inflamatoria. Esta reprogramación metabólica refleja la respuesta de los macrófagos a los cambios en su entorno, y es fundamental para apoyar los distintos requisitos funcionales de los macrófagos activados.

Como lo hacen los macrófagos, es probable que la microglía en el estado de vigilancia dependa del metabolismo de la fosforilación oxidativa, esto es: en condiciones normales de oxígeno, la glucosa se convierte en piruvato a través de la glucólisis, entrando en el TCA para producir ATP a través de la OxPhos. Asimismo, se ha mostrado tanto en macrófagos de la periferia como en células microgliales *in vitro*, que, la estimulación con LPS, es decir, la inducción del perfil proinflamatorio, causa que los macrófagos cambien su actividad metabólica de la OxPhos. El aumento de la glucólisis permite desencadenar rápidamente la actividad microbicida y permite que las células sobrevivan en un ambiente hipóxico. Además, aumenta la demanda de glucosa del medio y la producción de lactato, la activación de la PPP y la disminución del consumo de oxígeno mitocondrial. La activación de los macrófagos también depende de la producción de NO que, a través del metabolismo de la arginina, puede inhibir reversiblemente la cadena transportadora de electrones y con ello desviar la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia. Además, se ha propuesto que la que la disminución de ácido ascórbico del medio extracelular causa la internalización de los receptores SVCT2 y esto, a su vez, en el desencadenamiento de las vías de activación proinflamatoria.

En comparación con lo dicho, la estimulación con IL-4 causa que los macrófagos y las células microgliales reduzcan el consumo de glucosa y la producción de lactato. En ese sentido, contrariamente a los inducidos con LPS, los macrófagos asociados al perfil M2, utilizan la oxidación de FA y la OxPhos para la producción de energía; muestran un alto consumo de oxígeno mitocondrial y una gran capacidad respiratoria de reserva. Se sugiere que este cambio está asociado con las acciones fagocíticas de las células y la reducción en la necesidad de reacciones anabólicas, así como con las funciones a largo plazo como la reparación de tejidos y la curación de

heridas. El perfil sesgado a lo antiinflamatorio y reparativo promueve la proliferación celular, la reparación y remodelación de tejidos a través de la síntesis de poliaminas y colágeno. Esto sugiere que el destino metabólico de la arginina está intrínsecamente relacionado con la activación de macrófagos, con vías divergentes que compiten para producir NO a través de iNOS en M(LPS), o para producir prolina y poliaminas a través de arg-1 en M (IL-4). Además, este estado metabólico contribuye a realizar la fagocitosis al regular las demandas de energía y la fluidez de la membrana.

## **II. Introducción**

### **La Enfermedad de Parkinson**

La Enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por alteraciones de tipo motor y de tipo no motor, como: bradicinesia, dificultad para iniciar la marcha, rigidez muscular, temblor en reposo; así como ansiedad, depresión y alteraciones cognitivas, respectivamente. Esta, es consecuencia de la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DAérgicas) de la Sustancia *Nigra pars compacta* (SNpc) (Duty & Jenner, 2011; Segura-Aguilar *et al.*, 2014) que lleva, consecuentemente, a la disminución de dopamina (DA) en el espacio intersináptico de la vía nigro-estriatal. Se estima que la EP se presenta entre el 0.3 y 2% de la población mayor de 60 años (Salama *et al.*, 2015). En 2015, el 10.4% de la población mexicana

(127.017 millones) estaba dentro del rango de edad (UN, 2017), por lo que, la recurrencia aproximada de personas con EP en México sería entre 39,629 y 132,097. Además reportes de la Secretaría de Salud en México reportan que podrían presentarse 44 casos nuevos por cada 100 mil habitantes (SSA, 2002; 2010).

Los mecanismos moleculares que conciernen a la génesis o a la progresión de la EP continúan siendo desconocidos; sin embargo, el estrés oxidativo y el nitrosativo; la disfunción mitocondrial y proteosomal; la agregación proteica; la neuroinflamación y otros procesos bioquímicos y neuroanatómicos han sido postulados como los principales factores involucrados en esta enfermedad neurodegenerativa (Stern *et al.*, 2000; Pintado *et al.*, 2011; Hoban *et al.*, 2013; Figueiredo-Pereira *et al.*, 2016).

### **Los modelos experimentales en animales para estudiar la EP**

Durante décadas, los investigadores han usado los modelos experimentales para estudiar y comprender la vida, la conducta, la salud y la enfermedad. Un modelo ideal para estudiar la falta del estado de salud debería reproducir las características patológicas y clínicas que presentan los pacientes, involucrar a las conexiones neuronales pertinentes y los síntomas motores y no motores. Además, deberían reflejar el inicio y la naturaleza progresiva o abrupta de degeneración, así como, la activación de las respuestas inmune, la disfunción de organelos y todos aquellos patrones de tal o cual enfermedad. Sin embargo, ninguno de los modelos actuales muestra todas estas características sino, más bien, solo un grupo de ellas. A pesar de estas bastas limitaciones, los modelos animales han contribuido significativamente a la comprensión actual de los procesos de enfermedad y las posibles dianas terapéuticas en todas las enfermedades. El objetivo primordial de los modelos experimentales —como se deduce— es el de reproducir los cambios fisiopatológicos y conductuales de la enfermedad humana —generalmente roedores y primates no humanos— mediante el uso de agentes farmacológicos (neurotóxicos) —naturales o sintéticos— o la modificación de secuencias genéticas conocidas que induzcan la pérdida de función fisiológica (Tieu, 2011; Blandini & Armentero, 2012; Phillips & Roth, 2019).

En el campo que concierne a este trabajo, los modelos tóxicos representan los modelos experimentales más antiguos y, por tanto, los más utilizados. Estas toxinas pueden administrarse sistémica o localmente, dependiendo del tipo de agente utilizado, la especie involucrada y las respuestas a inducir. Los modelos más ampliamente usados entre la comunidad científica han sido, en primer lugar, el de la 6-hidroxiopamina (6-OHDA) y el

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina y su metabolito (MPTP/MPP<sup>+</sup>), que están relacionados con la inhibición de los complejos mitocondriales, producción de especies reactivas de ROS y RNS, así como, con las consecuencias que estos producen como la activación glial, la lipoperoxidación y la nitración proteica, entre otros (Singer & Ramsay, 1990; Deumens *et al.*, 2002; Dutta *et al.*, 2008; Duty & Jenner, 2011). La rotenona es otro modelo que ha sido empleado para la mimetización de los efectos conductuales y bioquímicos hallados en la EP, uno de los más atractivos es la agregación proteica, especialmente la de la  $\alpha$ -sinucleína, que es el principal componente de los cuerpos de Lewy, encontrados en las neuronas DAérgicas de la SNpc de los cerebros de pacientes que tuvieron esta enfermedad (Duty & Jenner, 2011). En el mismo sentido, la neuroinflamación se caracteriza por la activación de las células gliales del cerebro, principalmente microglía y astrocitos que liberan diversos factores solubles, ROS y NRS y citocinas. La mayoría de estos factores provienen de la microglía, son proinflamatorios, neurotóxicos y perjudiciales para las neuronas DAérgicas vulnerables al daño oxidativo. Por ello, la utilización de endotoxinas bacterianas para el estudio de la EP (Stern *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2007a; Hunter *et al.*, 2007b; Hunter *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Hunter *et al.*, 2017) ha dejado importantes bases en el modelamiento o caracterización de la neurodegeneración de la vía nigroestriatal. Como prueba de esto, la endotoxina bacteriana, lipopolisacárido (LPS), ha sido el activador glial más ampliamente utilizado para la inducción de la neurodegeneración de las neuronas DAérgicas (Dutta *et al.*, 2008; Liu & Bing, 2011; Tufekci *et al.*, 2011).

## **El modelo Parkinsoniano inducido con 6-OHDA**

### ***La 6-hidroxi dopamina***

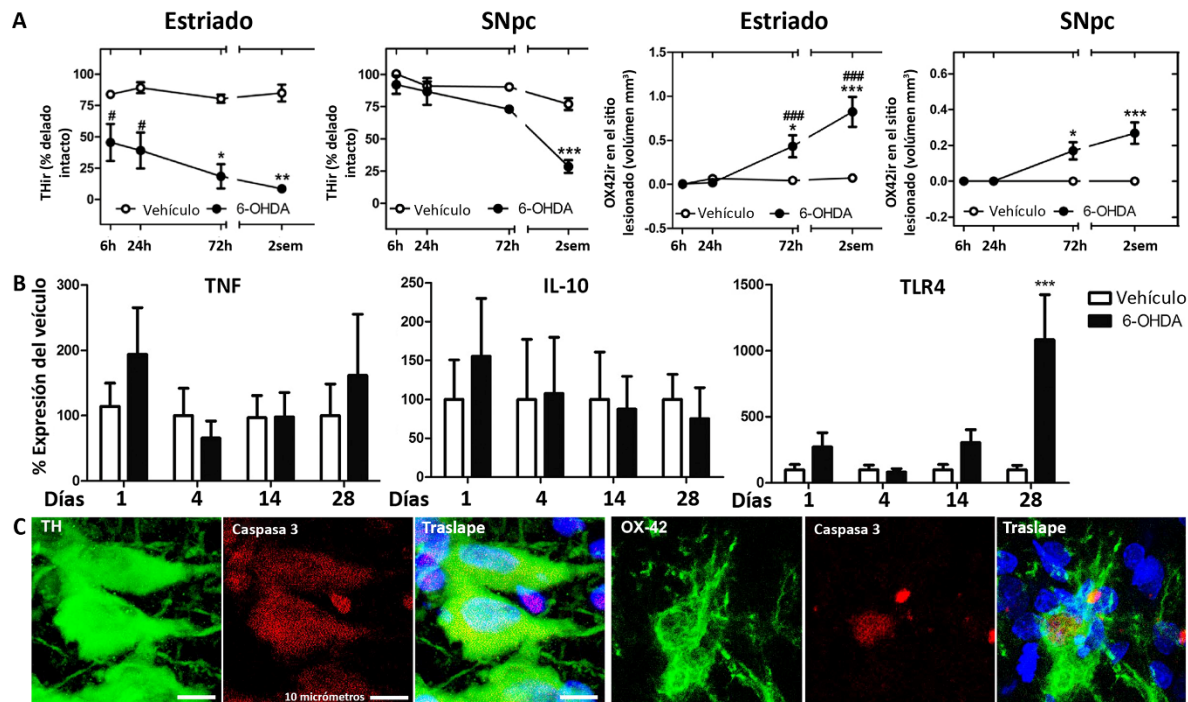
La 6-OHDA es un análogo hidroxilado de la DA. Este neurotóxico fue aislado por Senoh en 1959 (citado por Duty & Jenner, 2011) y sus efectos biológicos fueron demostrados hasta 1963 en el sistema nervioso autónomo del corazón. Sin embargo, debido a que la 6-OHDA es incapaz de cruzar la BBB, los investigadores de la época debieron encontrar un método para hacerla llegar hasta el cerebro. Fue entonces cuando Ungerstedt, en 1968 (*ibidem*), administró intraventricularmente la 6-OHDA mostrando, de este modo, la degeneración catecolaminérgica. Posteriormente, fueron generándose diferentes modelos de lesión, especialmente, en modelos experimentales para la EP.

El análogo hidroxilado de la DA se administra, con mayor frecuencia en la SNpc, en el haz ascendente del cerebro medio (MFB, del inglés: *medial forebrain bundle*) o en el cuerpo estriado.

Cuando la 6-OHDA se inyecta en la SNpc, produce una lesión completa —aproximadamente del 99%— y rápida —de 2 a 3 días posteriores a la inyección y 12 horas previas a la pérdida de las terminales nerviosas; el agotamiento de dopamina estriatal en 2 a 3 días— (Jeon *et al.*, 1995; Blum *et al.*, 2001; Tieu, 2011; Francardo, 2018). Cuando se inyecta en el haz del cerebro anterior, la 6-OHDA induce la degeneración en las terminales del cuerpo estriado antes de que ocurra la muerte de las células DAérgicas. En contraste con los previamente descritos, cuando la 6-OHDA se administra en el núcleo estriado, se inducen daños lentos, parciales y retrógrados a durante 3 semanas —la pérdida de las terminales nerviosa es del 99% en el estriado dorsolateral, del 55% en el estriado medial, además, general una pérdida entre 40 - 90% de los cuerpos celulares, dependiendo de la dosis administrada—. La administración intraestriatal, asimismo, ofrece algunas ventajas: primero, la lesión progresiva y menos extensa es más relevante para el estudio de la EP. En segundo lugar, se ha demostrado que este régimen produce síntomas no motores de la EP, que incluyen disfunción cognitiva y psiquiátrica (Branchi *et al.*, 2008; Tadaiesky *et al.*, 2008). En tercer lugar, en un modelo experimental en ratones, es mucho más fácil administrar el tóxico en el núcleo estriado —que es un cuerpo más grande— que en la SN y, por tanto, aumenta la probabilidad de número de sujetos experimentales incluidos en el experimento. Por otro lado, la comunidad científica ha preferido que la 6-OHDA sea administrada unilateralmente (modelo hemiparkinsoniano) debido a que, la degeneración DAérgica causada por una administración bilateral, resulta en adipsia y afagia y, por tanto, en un elevado índice de mortalidad de los sujetos experimentales, así como, que el hemisferio no lesionado (contralateral a la lesión) puede ser usado como un control interno (Duty & Jenner, 2011; Tieu, 2011; Francardo, 2018).

El estudio de la EP basada en la administración de la 6-OHDA ha dejado bases importantes sobre la neuroinflamación y su relación con la degeneración progresiva de las neuronas DAérgicas de la SNpc (**Figura 6**). Estudios como los de Walsh (2011) demostraron una disminución DAérgica en el núcleo estriado de rata 6 horas posteriores a la administración estriatal de 6-OHDA. En el mismo estudio, se demostró que podía activarse a la microglía luego de 3 días a la administración del neurotóxico y mantenerse en ese estado por dos semanas, además, mostró que la activación microglial ocurre antes que la disminución de células DAérgicas en la SNpc. Datos que, por cierto, coinciden con lo reportado por Stott y Barker (2014) en un modelo paralelo en ratón. Así mismo, Marinova-Mutafchieva *et al.* (2009) demostraron la participación de la microglía en la disminución del número de neuronas DAérgicas de la SNpc mediante la administración de 6-OHDA en el haz ascendente de las neuronas DAérgicas. Así mismo, Aono *et al* (2017) sugieren que la microglía

juega un papel importante en la compensación glutamatérgica emanadas de las terminales nerviosas enviadas desde el núcleo subtalámico, en la vía directa de la circuitería de los ganglios basales. Por el contrario, en un modelo de lesión nigral, McCabe *et al* (2017), mostraron que, bien, la administración de 6-OHDA no causa una participación relevante de la microglía en los primeros días, o bien, que su protagonismo en este modelo es retardado, ya que, evidenció que el aumento en la expresión de ARN que traduciría TLR4, IL6, e IL-10, TNF $\alpha$  es muy bajo y solo incrementa significativamente hasta 28 días posteriores a la cirugía, todo esto, respecto a la expresión de los mismo elementos en un modelo de idéntica lesión pero con LPS.

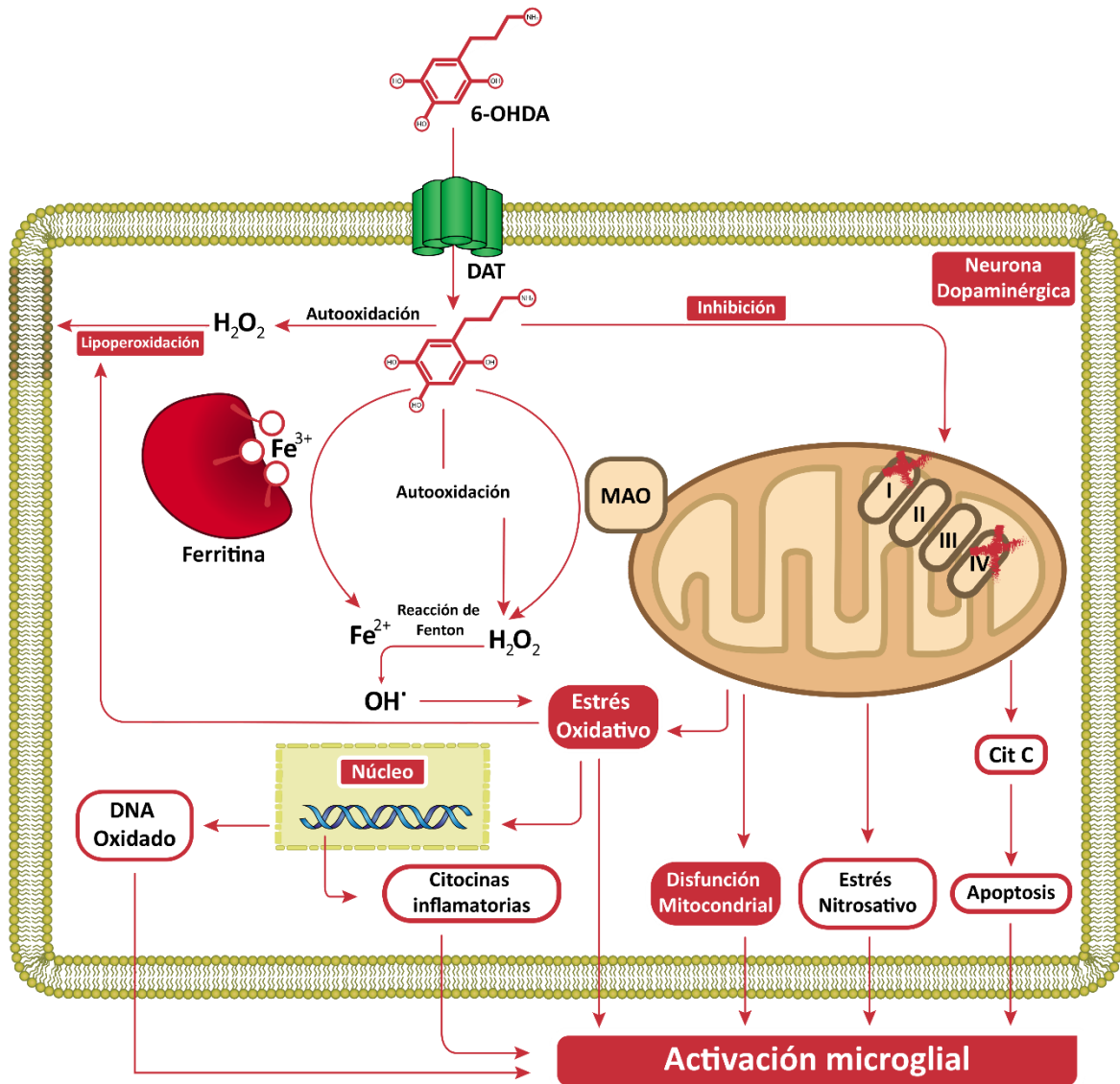


**Figura 6. La administración de 6-OHDA produce microgliosis y muerte celular por apoptosis.** A, muestra que la administración de 6-OHDA causa una disminución progresiva de las terminales nerviosas y una disminución severa 14 días posteriores a su administración, así como que la microgliosis precede a la degeneración celular. B, indica que la lesión dopaminérgica no causa un aumento relevante de citocinas inflamatorias. C, señala que la caspasa 3, marcador de muerte por apoptosis, se expresa en neuronas y microglía. Tomado y modificado de: ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA (Walsh *et al.*, 2011; Hernandez-Baltazar *et al.*, 2013; McCabe *et al.*, 2017)

### Mecanismo de toxicidad

Evidencias han demostrado que la 6-OHDA (*Figura 7*) puede producirse endógenamente mediante la oxidación de la DA a través de una reacción no enzimática que involucra altas

concentraciones del neurotransmisor, niveles elevados del ion hierro y peróxido de hidrógeno. Sea este el caso o luego de la administración del neurotóxico, la 6-OHDA, se introduce a las neuronas DAérgicas a través del transportador de dopamina (DAT). Aunque el mecanismo exacto de toxicidad continúa en investigación, el consenso general indica que la combinación de la disfunción mitocondrial mediante la inhibición del complejo I y IV de la cadena transportadora de electrones y el estrés oxidativo, pueden inducir toxicidad y muerte celular por apoptosis. La generación de ROS, además, presumiblemente, es producto de la inhibición de la función mitocondrial y la autooxidación de la 6-OHDA. Así mismo, puede ser amplificada por: la reacción de Fenton; la disminución del sistema antioxidante y la disminución de la proteína ferritina. (Blum *et al.*, 2001; Duty & Jenner, 2011; Segura-Aguilar & Kostrzewa, 2015). La extensa producción de ROS, puede llevar, no solo a la disfunción mitocondrial por inhibición de sus complejos, sino, además, a la ruptura de sus membranas y la consecuente liberación del ADN contenido en este organelo. Cualquiera de los factores mencionados son un fuerte estímulo de activación de la microglía y de sus receptores sensoriales membranales y citosólicos (TLR y NLR) que llevan a la amplificación de la activación microglial y la producción de citocinas proinflamatorias (Broz & Dixit, 2016; Mao *et al.*, 2017).



**Figura 21. Neurotoxicidad de 6-OHDA en la dopamina.** La 6-OHDA entra a la célula dopaminérgica a través del transportador de dopamina (DAT) y se autooxida a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que genera lipoperoxidación. La 6-OHDA también es metabolizada por la MAO (monoaminoxidasa) a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción de Fenton, que involucra Fe<sup>2+</sup> liberado de la ferritina, convierte el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en radicales hidroxilo (OH<sup>•</sup>), generando estrés oxidativo. Este estrés oxidativo daña el DNA en el núcleo, induce la liberación de citocinas inflamatorias y la disfunción mitocondrial. Además, la 6-OHDA inhibe la neurona dopaminérgica y genera estrés nitrosativo y apoptosis a través de la citocina C. Estos eventos conducen a la activación microglial.

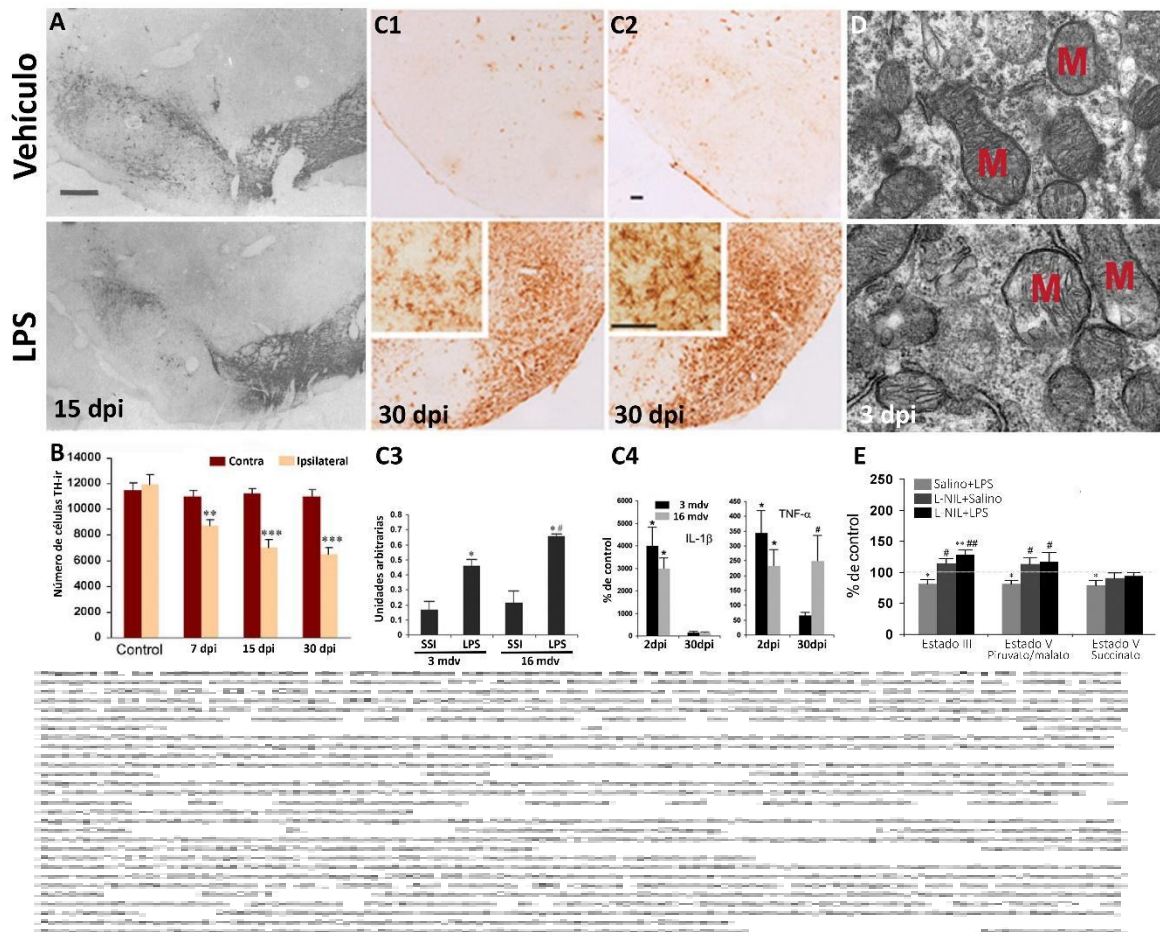
## El modelo Parkinsoniano inducido con LPS

### *El lipopolisacárido*

McGeer (1988) demostró la presencia de células positivas al antígeno de leucocito humano (HLA-DR, del inglés: *human leukocyte antigen - DR isotype*) en cerebros *postmortem* de pacientes que tuvieron la EP, específicamente, en la SN. En aquel contexto histórico, McGeer y su grupo de trabajo solo podrían estar parcialmente seguros de que, su hallazgo, se trataba de la microglía debido a la morfología de las células marcadas. Al año siguiente, Akiyama y McGeer (1989), administraron 6-OHDA en el hipotálamo de ratas, demostrando, de este modo, la presumible extravasación de monocitos/macrófagos y la activación microglial en la SN (y otros núcleos). Si bien el efecto inflamatorio del LPS ya había sido estudiado por investigadores como Bourdiol (1991) y Anderson (1992), los resultados no fueron contundentes, o bien, no estaban planteados en el contexto de la EP. Castaño y colaboradores (1998), basados en lo planteado, por los antes referidos, estudiaron, por primera vez, el efecto inflamógeno del LPS administrándolo en la SN de ratas, del cual, consideraban, podría ser un modelo interesante para estudiar la EP.

Por tres décadas, la utilización de endotoxinas bacterianas —*in vivo*— para el estudio de la EP (Stern *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2007a; Hunter *et al.*, 2007b; Hunter *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010; Hunter *et al.*, 2017) han dejado importantes bases en el modelamiento o caracterización de la neurodegeneración DAérgica de la vía nigrostriatal, así mismo, han demostrado que la inflamación inducida por LPS puede replicar algunas de las características de la EP (**Figura 8**), incluyendo la extensa activación de la microglía y la disminución selectiva y progresiva de las neuronas DAérgicas de la SNpc, la agregación proteica, la disfunción mitocondrial, entre otras. En este orden de ideas, el modelo parkinsoniano inducido con LPS, además, cuenta con algunas características, como son: (1) se basa, de modo exclusivo en la inflamación, por estimulación de los receptores TLR-4; (2) los factores liberados por la microglía, son suficientes para iniciar y propagar el proceso neurodegenerativo; (3) mimetiza de forma retardada, progresiva y particular la degeneración de las neuronas de la SNpc y (4) es una herramienta importante para delinear la contribución del proceso inflamatorio en la degeneración DAérgica (Dutta *et al.*, 2008; Liu & Bing, 2011), aunque, Francardo (2018), por su parte, afirma que el modelo de LPS es un modelo poco robusto.

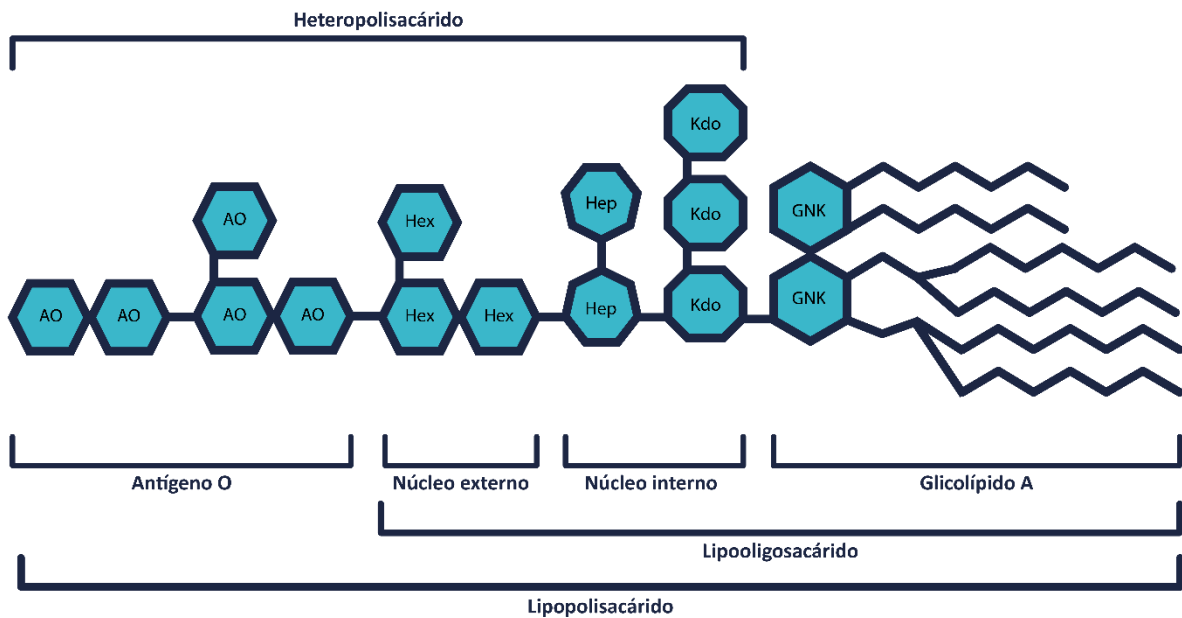
Por otro lado, el LPS de distintas bacterias tiene características arquitectónicas comunes como se trata en seguida.



## Estructura

El LPS (**Figura 9**) es una endotoxina que se encuentra en la membrana de las bacterias Gram negativas (Akira *et al.*, 2006; Dutta *et al.*, 2008). La molécula tiene dos fracciones principales: el glucolípido A y el heteropolisacárido, también llamado núcleo (*core*); ambas partes se encuentran unidas entre sí por una hexosa rara: la 2-ceto-3-desoxioctano (KDO) (Romero-Hurtado & Iregui, 2010). El glucolípido A, que es la parte evolutivamente más conservada entre las bacterias y es, además, la responsable de producir la respuesta proinflamatoria (Akira *et al.*, 2006; Płóciennikowska *et al.*, 2015a; Płóciennikowska *et al.*, 2015b), está compuesta por un disacárido: la glucosamina; y esta está unida a distintos ácidos grasos propios de la membrana de las bacterias, como: los ácidos caproico, láurico, mirístico, palmítico y esteárico. El núcleo tiene dos partes bien definidas: el núcleo externo y el núcleo interno; el primero está formado por hexosas y el segundo por heptosas. En algunos microorganismos, existe una fracción formada por unidades glucosídicas repetidas (de 1 a 8 residuos) y es altamente variable entre las bacterias, el cual es denominado Antígeno O. Por tanto, se denomina LPS a la exotoxina formada por el Lípido A unido al núcleo

que, a su vez, está unido a un Antígeno O; mientras que se nombra lipooligosacárido (LOS) a la fracción bacteriana formada, únicamente, por el glicolípido A y el núcleo (Romero-Hurtado & Iregui, 2010).



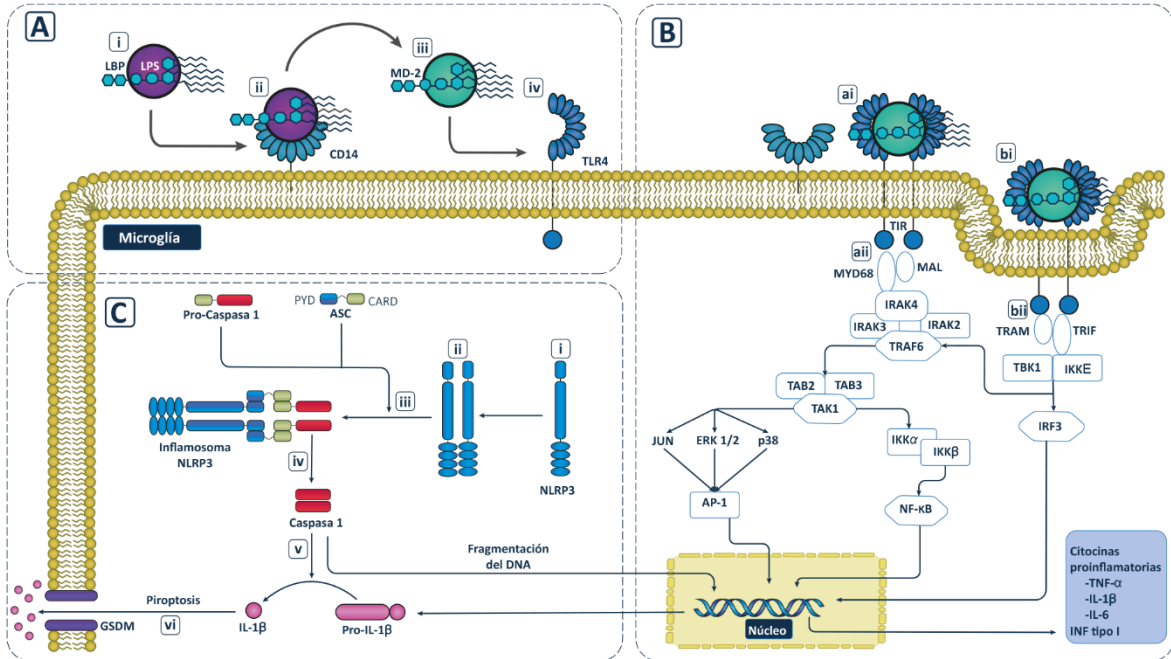
**Figura 9. Estructura del lipopolisacárido.** La molécula tiene dos fracciones principales: el glicolípido A y el heteropolisacárido. Ambas fracciones están unidas por una octosa: la KDO. El glicolípido A está compuesto por un disacárido: la glucosamina que, a su vez, está unida a distintos ácidos grasos propios de la membrana de las bacterias. El núcleo tiene dos partes: el núcleo externo y el núcleo interno; el primero está formado por hexosas y el segundo por heptosas. En algunos microorganismos, existe una fracción formada por unidades glucosídicas repetidas (de 1 a 8 residuos) y es altamente variable entre las bacterias, el cual, se denomina: Antígeno O. En ese sentido, el lipopolisacárido está formado por el glicolípido A unido al núcleo que y por el Antígeno O; mientras que el lipooligosacárido a la fracción bacteriana formada, únicamente, por el glicolípido A y el núcleo. ADDIN EN.CITE <EndNote><Cite><Author>Romero-Hurtado</Author><Year>2010</Year><IDText>El lipopolisacárido</IDText><DisplayText>[Romero-Hurtado & Iregui, 2010]</DisplayText><record><title><title>El lipopolisacárido</title><secondary-title>Revista de medicina Veterinaria</secondary-title></title><pages>37-45</pages><number>19</number><contributors><authors><author or>Romero-Hurtado, S.</author><author>Iregui, C. A.</author></authors></contributors><added-date format="utc">1516480092</added-date><ref-type name="Journal Article">17</ref-type><dates><year>2010</year></dates><rec-number>105</rec-number><last-updated-date format="utc">1516480136</last-updated-date></record></Cite></EndNote>(Romero-Hurtado & Iregui, 2010). GNK: glucosamina; KDO: 2-ceto-3-desooctano; Hep: heptosa; Hex: hexosa; AO: antígeno O.

### **Mecanismo de toxicidad**

Cuando el LPS es liberado de la membrana bacteriana como consecuencia de la multiplicación o de la lisis celular, o bien, cuando es administrado (**Figura 10**), entra en contacto con varias proteínas del hospedero, entre las que destacan, las proteínas de unión a LPS (LBP, del inglés: *lipopolysaccharide binding protein*), los receptores CD14, TLR-4 y MD-2. Debido a las características hidrofóbicas de este componente de las membranas bacterianas, en el medio extra o intracelular acuoso, se encuentra aglomerado en micelas. La LBP, es la proteína encargada de extraer una fracción monomérica de las micelas formadas con LPS, unirse a esta y facilitar la unión del LPS con CD14. En el sitio de unión, el LPS, se ensambla en una bolsa (*pocket*) localizada en el extremo N-terminal. El receptor CD14 facilita la unión del LPS a la proteína MD-2. Dicha proteína tiene una porción lipofílica en la que se acomodan los ácidos grasos del LPS, sin embargo, no todas las cadenas aciladas están en contacto con la proteína, sino que, una de estas, al quedar fuera de la bolsa lipofílica, interactúa con el TLR4. De este modo, se ha formado el complejo TLR4/MD2/LPS, que —se dice— tiene forma de M (Romero-Hurtado & Iregui, 2010).

El complejo, tras ser formado, sufre un cambio estructural, por medio del cual, proteínas adaptadoras, que contienen dominios del receptor tipo Toll/IL-1 (TIR), son atraídas y unidas a la fracción intracelular del TLR4. Dichas proteínas involucran dos vías de transducción de señales intracelulares que se describen en la figura 9 y que finalizan con la transcripción de interferones de tipo 1, promovido por el factor AP-1 y de la IL-1 $\beta$  y de distintos sensores citosólicos como los receptores NLRP, NLRC y AIM.

Un estímulo secundario como: las ROS y el ADN mitocondrial oxidado producto de la disfunción mitocondrial; el flujo, del citosol al espacio extracelular, de potasio; la estimulación de algunos receptores membranales como los TNFR, los IL-1R, los receptores a purinas, o bien, la estimulación de PRRs; así como los cristales inertes, y agregados proteicos, son capaces de activar a los sensores citosólicos referidos. Dicha activación se ve evidenciada con la formación del complejo inflamosoma. El cual, es un complejo multiproteico proteolítico citosólico capaz de activar a la pro-IL-1 $\beta$ , para que, al final, sea liberada al espacio extracelular e inicie una nueva cascada de señales inflamatorias (Latz *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2014; Broz & Dixit, 2016; Kovacs & Miao, 2017).



**Figura 10. Mecanismo de toxicidad del lipopolisacárido. (A)** El LPS es liberado al medio celular (i) y se liga a la LBP, que, a su vez, (ii) se une con el receptor CD14. Este, (iii) facilita su unión a MD-2 y así (iv) el LPS entre en contacto con el TLR-4. **(B)** La unión del MD-2 y el TLR4 produce la adhesión de un TLR más, (ai) pudiendo formar un heterodimero, o bien un homodimero, formando, de este modo, el complejo TLR4/MD2/LPS, que tiene forma de M. La cascada de señalizaciones está determinada por (bi) la endocitación del LPS o (aii) su permanencia en la superficie celular. La primera (bii) resulta en la producción de INF de tipo I y (aii) la segunda, a través NF-κB, **(C)** en la traducción de pro-IL-1β y NLRP3. Diversos estímulos (i) activan al NLRP3, este, se (iii) homo-oligomeriza, (iiii) recluta a la pro-caspasa 1 y se une a esta a través del adaptador ASC. En este punto, está formado el complejo inflammosoma, el cual, (iv) escinde a la pro-caspasa 1 que tiene actividad proteolítica. (v) La caspasa 1 proteolisa a la pro-IL-1β y (vi) es liberada por los poros celulares creados por las proteínas GSDM. ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA (Akira et al., 2006; Latz et al., 2013; Walsh et al., 2014; Broz & Dixit, 2016). LPS: lipopolisacárido; LBP: proteína de unión a LPS; TLR: receptor tipo toll; NF-κB: factor nuclear kappa B; IL: interleucina; INF: interferón.

### III. Justificación

La neuroinflamación ha sido crecientemente estudiada debido a las incógnitas acerca del papel que juega respecto de la degeneración dopaminérgica y, con ello, ha sido relacionada al

desarrollo de la EP. La primera evidencia que asoció el proceso inflamatorio con la EP fue la propuesta por McGeer et al. (1988), quien demostró la presencia de la microglía/macrófago activada en la SN de pacientes *post-mortem*. Desde entonces, son numerosos los estudios en modelos animales (Hunter et al., 2007b; Dutta et al., 2008; Hunter et al., 2008; Hunter et al., 2009; Liu & Bing, 2011; Pisanu et al., 2014; Stott & Barker, 2014; Hunter et al., 2017; Flores-Martinez et al., 2018) que relacionan a la inflamación con esta enfermedad neurodegenerativa. Dichos estudios han ofrecido evidencia suficiente para sustentar el papel de la neuroinflamación en la génesis o en el desarrollo la EP. Por ello, la idea de identificar un perfil neuroinflamatorio en esta enfermedad puede coadyuvar a comprender mejor la progresión de la fisiopatología, la disponibilidad de biomarcadores de diagnóstico en etapas tempranas y la identificación de factores causales específicos de la EP (Dutta et al., 2008; Joers et al., 2017). Actualmente, los modelos inducidos por LPS y 6-OHDA son los dos modelos animales frecuentemente utilizados para mimetizar a la EP. Estos modelos muestran similitudes con la EP humana en muchas funciones patológicas y bioquímicas, como degeneración y muerte de neuronas DAérgicas de la SNpc, proliferación y activación de células gliales (Mao et al., 2017).

Además, el hecho que existan exiguos estudios que relacionan una evaluación profunda de la neuroinflamación en modelos parkinsonianos desarrollados a partir de la administración estriatal de la 6-OHDA o del LPS en roedor, pretendemos: contribuir al entendimiento de la relación que existe entre la respuesta inflamatoria del sistema inmune innato celular y la neurodegeneración dopaminérgica de la vía nigrostriatal.

Teniendo en mente lo que se ha expuesto previamente, podemos suponer que, si bien, la administración de los tóxicos causa una degeneración dopaminérgica, lo hacen en puntos temporales distintos debido a que la microglía se polariza, mayoritariamente, a un sentido inflamatorio tóxico en momentos diversos.

Por ello, con el presente proyecto pretendemos comprender la evolución del proceso inflamatorio a través de los cambios morfológicos microgliales, la descripción del microambiente celular y la intensidad del daño, durante un curso temporal, causado por la administración de los tóxicos referidos en el núcleo estriado de ratas.

## **IV. Hipótesis**

La administración intraestriatal de la 6-hidroxidopamina o el lipopolisacárido causa neurodegeneración dopaminérgica progresiva e induce una activación microglial tóxica y sostenida en el tiempo.

## **V. Objetivos**

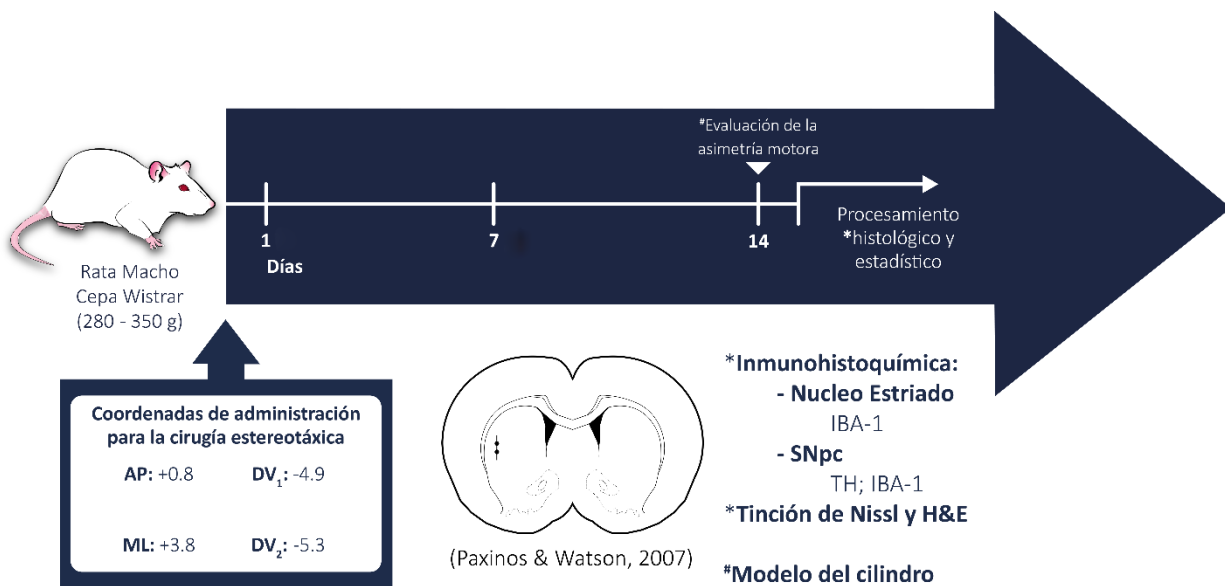
### **Objetivo general**

Realizar un estudio del curso temporal de la respuesta microglial y su efecto neurotóxico en la vía nigrostriatal posterior a la infusión del lipopolisacárido o de la 6-OHDA en el estriado.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar el efecto neurotóxico la 6-OHDA y el LPS a través del estudio histopatológico en la región de la SNpc los días 1, 7 y 14 posteriores a la infusión de los tóxicos.
2. Determinar las modificaciones morfológicas de la microglía, en el núcleo estriado y la SNpc, los días 1, 7 y 14 posteriores a la infusión de los tóxicos.

## VI. Diagrama de trabajo



Volumen	-	2 $\mu$ L										
Concentración	-	0.01%			[8 $\mu$ g/ $\mu$ L]			0.9 %	[16 $\mu$ g/ $\mu$ L]			
Grupo	Intact o	Ác. Ascórbico			6-OHDA			SSI	LPS			$n_T$
Eutanasia (días)	-	1	7	14	1	7	14	14	1	7	14	
$n$	6	6	6	6	6	5	5	4	6	5	4	5 9

AP: Antero-Posterior; DV: Dorsal-Ventral; ML: Medial-Lateral; SNpc: *Substantia Nigra pars compacta*.

## VII. Metodología

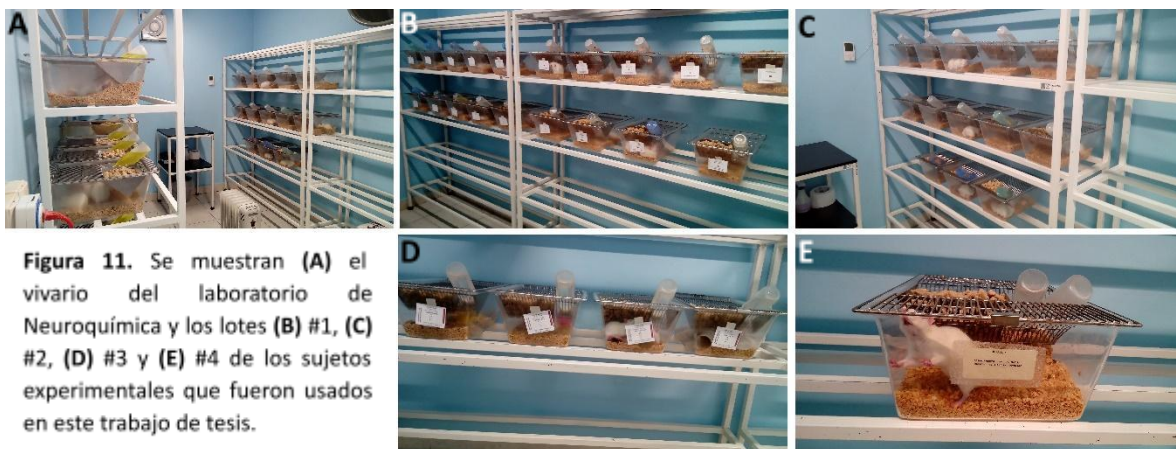
### Sujetos experimentales

Se trabajó con ratas macho de la cepa Wistar (280 – 350 g; n = 59) las cuales fueron alojadas en el vivario del Laboratorio de Neuroquímica en cajas de acrílico transparente, con acceso libre a alimento y a agua; ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas; temperatura de  $24 \pm 2$  °C y  $45 \pm 10\%$  de humedad. Los mismos, fueron proporcionados por el Bioterio “*Claude Bernard*” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla dirigido por el MVZ Francisco Ramos Collazo con No. de cedula profesional 6519572, quien es el responsable veterinario del proyecto. Los animales fueron tratados de acuerdo a la norma NOM-062-ZOO-1999.

Los sujetos experimentales fueron manipulados todos los días, por 2 minutos, durante 20 días para su habituación al estudiante y disminución del estrés.

Se formaron los siguientes grupos:

- intacto (n = 6),
- vehículo: ácido ascórbico (n = 18),
- vehículo: Solución Salina Isotónica (SSI) (n = 4),
- lesionado: LPS (n = 15) y
- lesionado: 6-OHDA (n = 16)

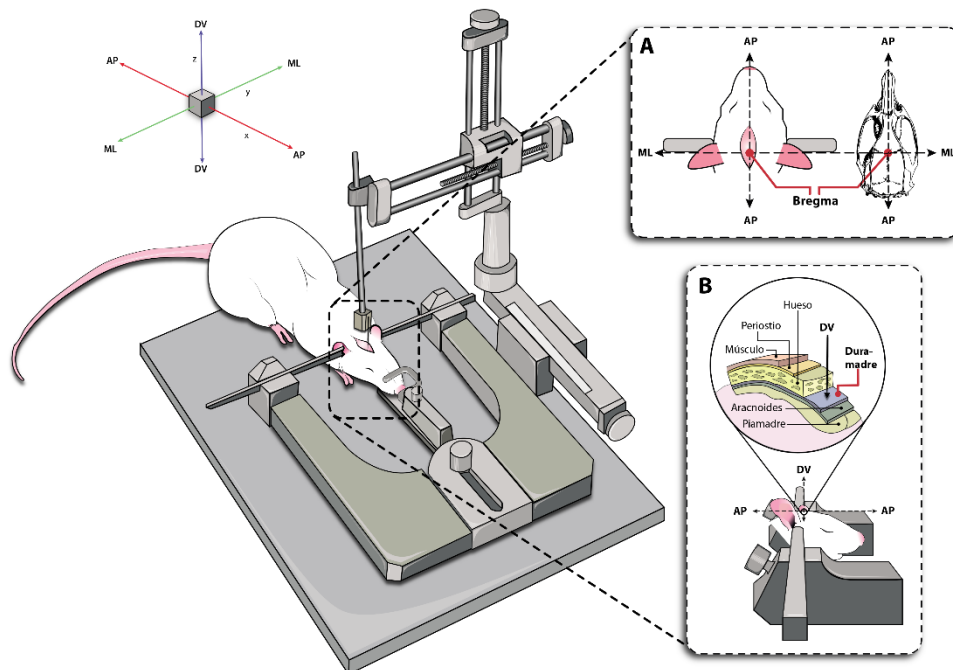


## Cirugía estereotáxica

Los animales fueron anestesiados con la mezcla ketamina/xilacina (75:10 mg/kg; i p; proporcionado por el Bioterio) antes de instalarlos en el dispositivo estereotáxico. Se tomaron coordenadas para el estriado dorsolateral (AP: +0.8 mm; ML: +3.8 mm; DV<sub>1</sub>: -4.9 mm y DV<sub>2</sub>: -5.3 mm) previo al experimento para revisar la localización de la cánula (Paxinos & Watson, 2007). Los animales fueron sometidos a la cirugía estereotáxica para inducir el modelo parkinsoniano mediante la inyección unilateral e intrastriatal de 2  $\mu\text{L}$  de 6-OHDA [8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] o LPS [16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ] (de *Escherichia coli*, serotipo O26:B6; Sigma), además, como grupos controles se administraron, en las mismas condiciones, los vehículos respectivos: ácido ascórbico [0.01%]; o de SSI [0.9%]. Todas las sustancias fueron administradas a una velocidad de infusión de 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Los sujetos experimentales tuvieron los cuidados postoperatorios requeridos, como mantenerlos en un lugar cálido y no dejarlos solos hasta su recuperación ambulatoria, así como, el aseo de la herida con solución salina y yodo hasta la cicatrización de la misma. Asimismo, se realizó la administración de enrofloxacina (7.5 mg/kg; s c) como antibiótico para prevenir infecciones y ketoprofeno (5 mg/kg; i p) como analgésico los 3 días siguientes a la cirugía.

El alumno de licenciatura Irving Manuel Parra Becerra, fue evaluado y aprobado satisfactoriamente por el bioterio “Claude Bernard” para el trabajo con animales de laboratorio, en este caso, rata.



**Figura 12. Cirugía estereotáxica.** Se muestra un sujeto experimental, anestesiado, instalado en el aparato estereotáxico. De acuerdo con el plano cartesiano de tres dimensiones (A) en el plano x, z (o bien, ML, AP) se sitúa a Bregma como la coordenada de origen y habiendo localizado el sitio de inyección en ese plano, (B) se procede a trepanar hasta exponer la duramadre, que es la coordenada ‘cero’ del eje y (o DV), de esta manera, mediante el uso del atlas de coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2007), es posible localizar espacialmente el núcleo deseado. **ML:** Medial-Lateral; **AP:** Antero-Posterior; **DV:** Dorsal-Ventral.

## Modelo del cilindro

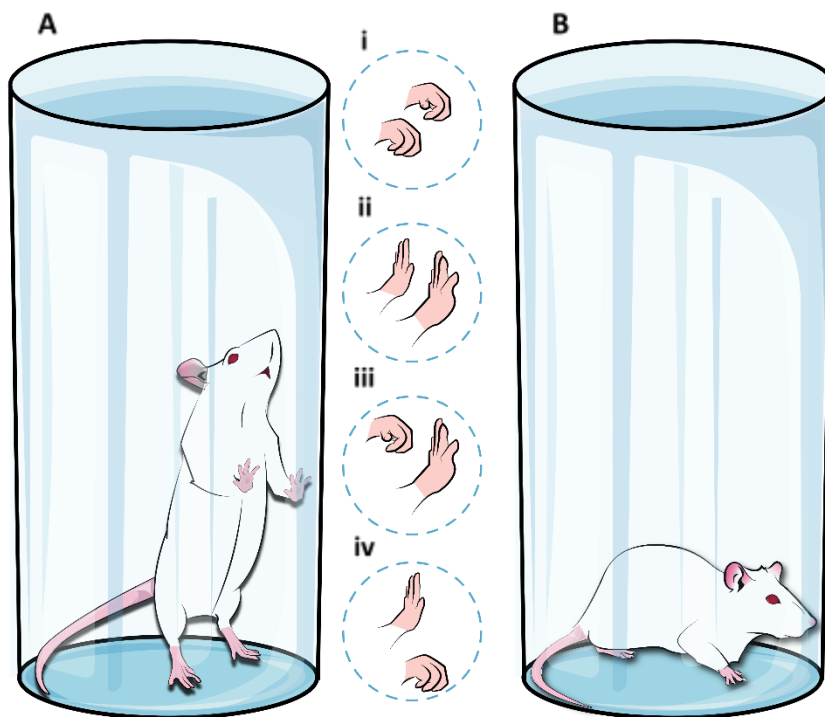
La asimetría motora fue evaluada mediante el modelo del cilindro, con del cual se pueden cuantificar, individualmente, las extremidades anteriores que los sujetos experimentales más frecuentemente usan en un contexto de exploración vertical innata (Schallert *et al.*, 2000; Tillerson *et al.*, 2001). Los sujetos experimentales que serían sacrificados 14 días posteriores a la infusión del tóxico, fueron evaluados previamente al sacrificio.

Los animales de experimentación referidos fueron colocados, individualmente, en un cilindro de acrílico transparente *durante 5 minutos*, en ese lapso, fueron videograbados para cuantificar el número de veces en que apoya la palma de la *extremidad ipsilateral*, *contralateral* a la lesión o *ambas* extremidades sobre las paredes del cilindro. Los datos fueron obtenidos mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Uso de la } \textit{extremidad ipsilateral} = \left( \frac{\textit{extremidad ipsilateral}}{\textit{ambas extremidades} + \textit{extremidad ipsilateral} + \textit{extremidad contralateral}} \right) 100$$

$$\% \text{ Uso de la } \textit{extremidad contralateral} = \left( \frac{\textit{extremidad contralateral}}{\textit{ambas extremidades} + \textit{extremidad ipsilateral} + \textit{extremidad contralateral}} \right) 100$$

$$\% \text{ Uso de } \textit{ambas extremidades} = \left( \frac{\textit{ambas extremidades}}{\textit{ambas extremidades} + \textit{extremidad ipsilateral} + \textit{extremidad contralateral}} \right) 100$$



**Figura 13. Modelo del cilindro.** (A) En un contexto de exploración innata, los animales de experimentación erguen el dorso (i) sin tocar el cilindro, o bien, reposan sobre las paredes del mismo (ii) con ambas extremidades, (iii) únicamente con la extremidad derecha (en nuestro caso, contralateral a la lesión) o (iv) solo con la izquierda (ipsilateral a la lesión). Los incisos ii, iii y iv, como indican las fórmulas, son los únicos casos de cuantificación. (B) Asimismo, es habitual que los sujetos experimentales se coloquen en posición ventral para descansar, acicalarse, porque ha pasado tiempo en exceso dentro del cilindro o no es la primera vez que se encuentra en ese lugar. En esta situación, no se cuantifica nada en absoluto.

### Procesamiento histológico

Los sujetos experimentales a los que se les practicó la cirugía estereotáxica fueron eutanasiados los días 1, 7 y 14 posteriores a la inyección (dpi) del neurotóxico, del inflamógeno o del vehículo respectivo con pentobarbital sódico (65 mg/kg; i.p.) (Figura 17.1). El primer paso del proceso histoquímico fue realizado mediante perfusión intracardiaca (Figura 17.2b) con SSI, durante 10 minutos y paraformaldehído (PFA) al 4% disuelto en buffer de fosfato sódico (PBS; pH 7.4) por 15 minutos. Los cerebros fueron extraídos (Figura 17.2c) y colocados en un recipiente que contenía solución fijadora (5 veces más al volumen del órgano) por 10 días para someterlo a fijación post-perfusión y, cumplidos los días referidos, se almacenaron en un recipiente con PBS hasta la fecha de su procesamiento. Posteriormente, los cerebros fueron seccionados coronalmente (60  $\mu$ m de grosor) con un microtomo (LEICA SM 2010R) mediante la técnica de congelación con anhídrido carbónico sólido (CO<sub>2(s)</sub>; hielo seco) (Figura 17.3). Los cortes obtenidos fueron colocados en pocillos con PBS para su traslado (o conservación) y luego fueron sometidos a una técnica inmunohistoquímica. Se montaron en portaobjetos gelatinizados con gretina al 3%; se deshidrataron con un tren de alcoholes y xilol; se secaron a temperatura ambiente durante 24 horas; se agregó resina de montaje y se cubrieron con un cubreobjetos. Finalmente, las

estructuras fueron observadas en un microscopio óptico, se capturaron las micrografías y se procesaron estadísticamente.

### **Inmunohistoquímica**

Secciones representativas de la SNpc (-4.8 - -5.5 mm, respecto a Bregma) y el núcleo estriado (1.0 - 0.4 mm, respecto a Bregma) fueron inmunoteñidas (**Figura 17.4**), por el método de peroxidasa, con anticuerpos primarios para localizar a las proteínas tirosina hidroxilasa (TH; Merck, 1:1000); y la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (IBA-1; Wako, 1:500). En flotación, los cortes del tejido cerebral fueron lavados con el surfactante Tritón-100x (Tx-100 [0.2%]) disuelto en PBS (Tx/PBS) tras cada proceso. Se limitó la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [3%] disuelta en Tx/PBS; se bloquearon los antígenos inespecíficos con suero de cabra normalizado (NGS; 10%) e incubó con el anticuerpo primario durante tres noches. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado apropiado, del orden anterior, anti-ratón (vector: BA-9200, 1:500), y anti-conejo (vector: BA-1000, 1:500), luego, con estreptavidina por 1 hora y se reveló con diaminobencidina (DAB; [1 mg/2 ml]). Los tejidos inmunoteñidos fueron montados en portaobjetos gelatinizados, deshidratados en un tren de alcoholes (70%, 96%, 100%, 100%) y xilol y cubiertos con resina y cubreobjetos para el procesamiento de imagen.

### **Tinciones histológicas**

Las laminillas que contienen los cortes de las secciones representativas de la SNpc y fueron inmunoteñidas con los anticuerpos anti-TH y anti-IBA-1 se colocaron en xilol por 5 días con el fin de retirar la resina de montaje, posteriormente, sobre las muestras referidas, se realizaron las tinciones de Nissl o de Hematoxilina & Eosina, respectivamente. Al finalizar las tinciones se agregó, nuevamente, resina de montaje sobre los cortes coronales fijados en las laminillas y finalmente, fueron cubiertos con un cubreobjetos para el posterior análisis neuropatológico (**Figura 17.7 y 17.8**).

### **Procesamiento de imagen**

Una vez que los tejidos fueron procesados inmunohistoquímicamente, se tomaron fotomicrografías del núcleo estriado ipsilateral a la lesión (20x) y en la SNpc ipsilateral a la lesión (20x) con un microscopio de campo claro (Leica® DM1000). Con el *software* IMAGEJ®, se cuantificó el número de células positivas al anticuerpo primario respectivo (TH<sup>+</sup>, IBA-1<sup>+</sup>) (**Figura 17.5**), estos,

dados por la inmunoreactividad específica del anticuerpo primario y evidenciada por la capacidad cromogénica de la DAB. Los datos obtenidos fueron graficados y analizados estadísticamente con el software GraphPad Prim 6®.

### Morfometría de subtipos microgliales

En la región dorsolateral del núcleo estriado (2 campos a 20x) y la SNpc (2 campos a 20x) por sujeto experimental, la microglía fue cuantificada y clasificada manualmente en cuatro subtipos que relacionan el estado de activación de estas con la morfología que adquieren (**Figura 14**), según lo descrito por Torres-Platas *et al* (2014) y Lee *et al* (2018), así como en células tipo macrófago, en concordancia con lo mostrado por McGeer *et al* (1988):

i. la microglía *ramificada*: dispone de un cuerpo celular pequeño y redondeado ( $\sim 20\text{-}25\ \mu\text{m}^2$ ). Los procesos (expansiones membranales en forma de ramas arborizadas) primarios (que surgen del cuerpo celular), secundarios (que emanan de los procesos primarios), terciarios (que nacen de los procesos secundarios), cuaternarios y quinarios son largos y delgados y tienen un alto número de nodos (puntos de bifurcación de los procesos),

ii. la microglía *preparada*: presenta un cuerpo celular alargado ( $\sim 50\text{-}70\ \mu\text{m}^2$ ), más grande que el fenotipo ramificado. Los procesos primarios son más gruesos y cortos si se compara con el fenotipo en ramificado, pero mantiene el patrón de ramificación,

iii. la microglía *activada*: muestra un cuerpo celular grande u oval o forma de huso ( $\sim 50\text{-}70\ \mu\text{m}^2$ ). Muestra algunos procesos primarios no tan extensos y gruesos.

iv. la microglía *ameboide*: el cuerpo celular se aprecia sin expansiones de la membrana celular, pero no totalmente redondeado, sino con patrones ondulados o puntiagudos no ramificados. Presenta dos o menos procesos.

v. las células tipo *macrófago* no microglial: se muestran casi totalmente redondeadas y sin expansiones protoplasmáticas.

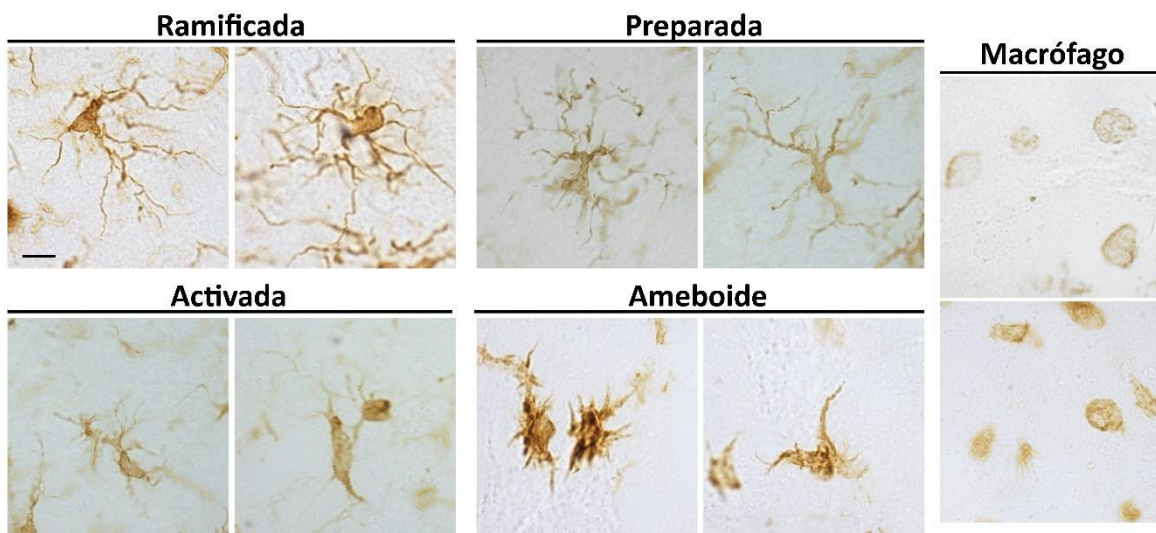
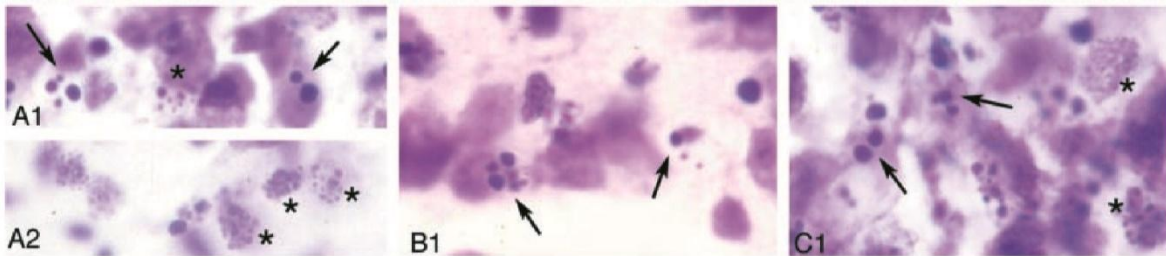


Figura 14. Morfología microglial. Se muestran los cinco tipos de poblaciones celulares (IBA-1<sup>+</sup>) presentes en el

## Análisis citológico

Se realizó un análisis cualitativo en cada punto temporal para averiguar si existía un grado de lesión celular apoptótico/necrótica en la región de la SNpc. En las secciones teñidas con Hematoxilina y Eosina o Nissl, se identificaron las fases definidas de la muerte celular de según las descripciones realizadas por Li *et al* (1995); por Nakajima *et al* (2000) y por Wyllie (1980), a saber:

- i. la fase inicial, cuando la cromatina se encuentra teñida uniformemente (*piknosis*), también llamada, fase de contracción nuclear y condensación de la cromatina;
- ii. la fase secundaria en que, debido a la ruptura de su membrana nuclear, las masas de cromatina marginadas se ven como pequeñas masas discretas (*karyorrhexis*), halladas como corpúsculos púrpuras o azules redondos u ovalados, es decir: cuerpos apoptóticos;



- iii. la fase final, definida como la pérdida de la integridad de la membrana (*karyolisis*).

Asimismo, pudieron identificarse, según lo dicho, las *células apoptóticas* que fueron identificadas como aquellas que contenían dos o más aglomeraciones de cromatina y las *células necróticas* que fueron identificadas por una intensa eosinofilia citoplasmática mediante de la tinción de H&E.

Así mismo, se realizó una revisión cualitativa de las células que componen el entorno celular (**Figura 16**) evaluado según dictan las descripciones morfológicas de (Korbo, 1999; Hamidi *et al.*, 2004; Pelvig *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2014), a saber:

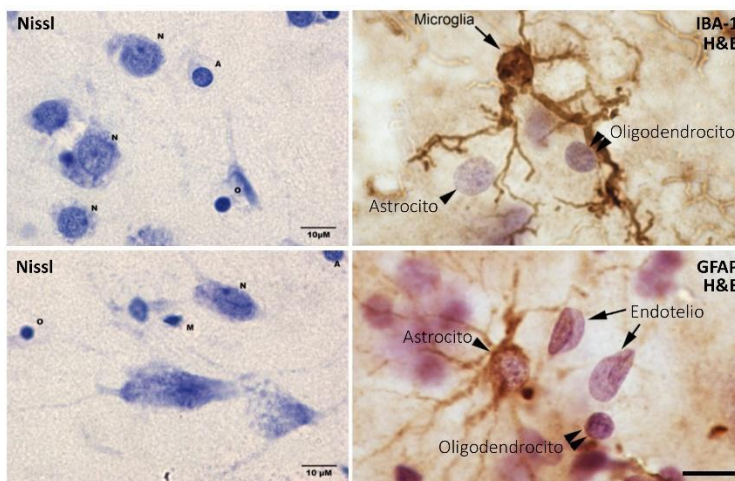
- i. se identificaron como *neuronas*, aquellas células a las que se les aprecia un núcleo grande (~12-15  $\mu\text{m}$  sobre el eje mayor del núcleo) y triangular redondeado eucromático y, al centro, un puntillero basófilo que podría ser identificado como el nucléolo,
- ii. se distinguieron como núcleos *endoteliales* aquellos núcleos (~5-7.5  $\mu\text{m}$ ) que tienen forma de paraboloide hiperbólico. Típicamente se encuentran alineados con otros núcleos

endoteliales. Únicamente contienen gránulos pequeños y claros de cromatina levemente basófila y bien distribuida por el núcleo,

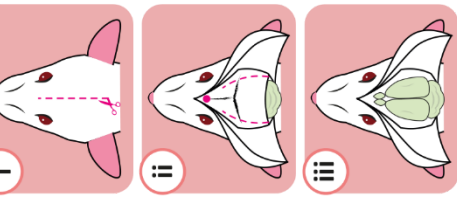
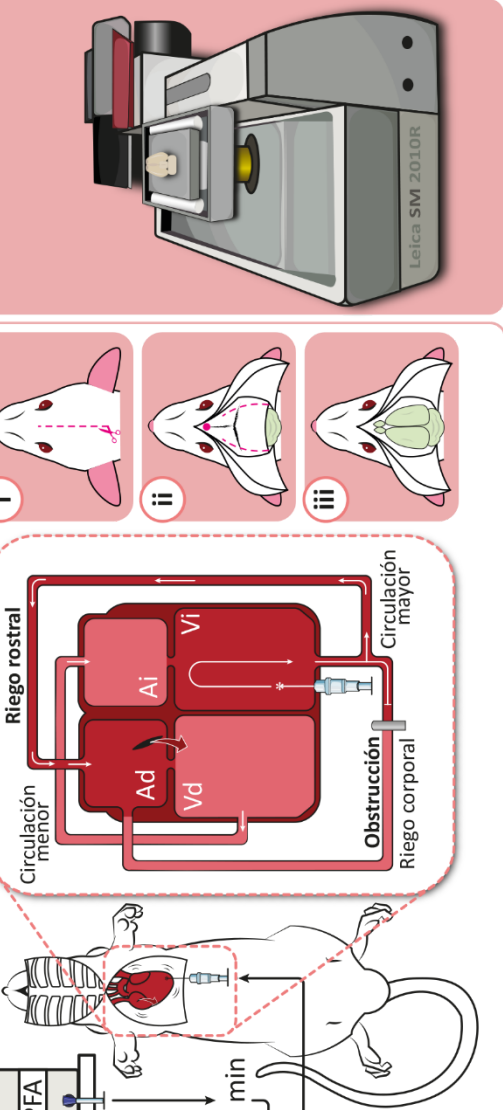
iii. fueron referidos como núcleos de los *oligodendrocitos* los núcleos más compactos, pequeños (~5-6  $\mu\text{m}$ ), esféroides y heterocromáticos: poseen una alta densidad de gránulos grandes y baja densidad de gránulos pequeños, en comparación con los del resto de las células, lo que causa que se tiñan intensamente, además, se encuentran muy próximos, algunas veces, a los somas neuronales y, otras, a vasos sanguíneos,

iv. se determinaron como *astrocitos* aquellos núcleos redondos u ovalados con cromatina homogéneamente distribuida, con una alta densidad de gránulos pequeños y claros, pero no más de 4 puntos grandes y oscuros de cromatina. Son ligeramente basófilos en comparación con otros núcleos de células gliales y son de forma elíptica o esférica. Suelen ser más grandes que los oligodendrocitos y más pequeños que las neuronas (~6-10  $\mu\text{m}$ ), finalmente,

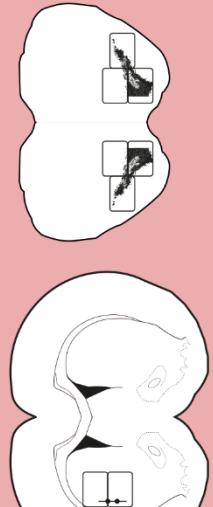
v. los núcleos *microgliales* suele ser moderadamente heterocromáticos, y contienen aproximadamente 3 - 6 gránulos grandes oscuros de cromatina y una densidad moderada de gránulos más pequeños y de basofilia semejante a la de los astrocitos. La intensidad de tinción es relativamente intermedia entre la intensidad de color de los oligodendrocitos y los astrocitos, así como, la intensidad de tinción. La forma nuclear microglial es muy variable, debido al estado de activación: son núcleos esféricos, elípticos, irregulares, triangulares o en forma de coma y su volumen se encuentra entre los volúmenes de los oligodendrocitos y los astrocitos (~6-10  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 16. Descripción gráfica de los núcleos que conforman el parénquima neuronal.** A la izquierda se aprecian núcleos teñidos con la tinción de Nissl. A la derecha se muestran núcleos teñidos con la contratinción de H&E en IHC contra IBA-1 o GFAP. Tomado y modificado de: ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA (Pelvig *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2014). A: astrocito; M: microglía; N: neurona; O: oligodendrocito.



**5 Capturar micrografías**

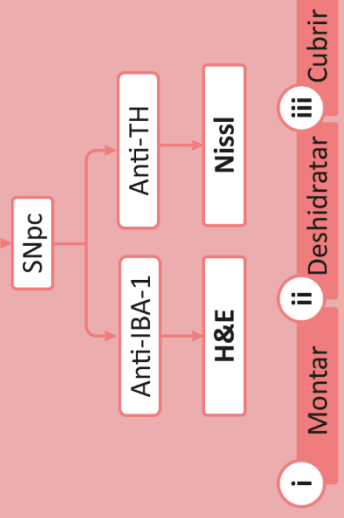


**6 Conteo de células**



**7 Desmontar**

**8 Teñir muestras inmunoteñidas**



Blank lined area for notes.

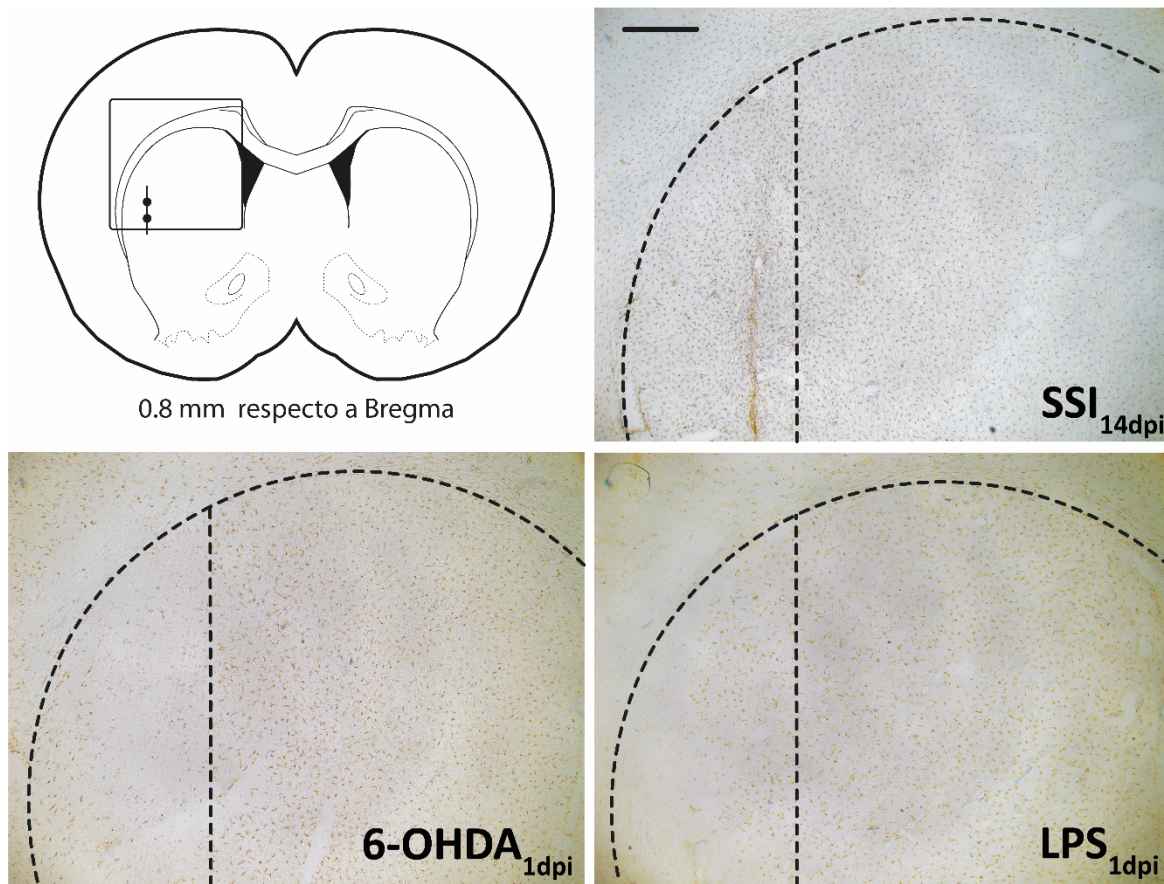
## **Procesamiento estadístico**

Los grupos experimentales lesionados fueron formados con una  $n = 5 - 6$ , esto ha sido establecido de acuerdo con el método de análisis estadístico ANOVA de una vía, con una  $p < 0.05$ , posteriormente se estableció el análisis post-ANOVA para la comparación entre grupos de acuerdo con el análisis proponiendo la prueba de comparaciones múltiples de Tukey partiendo de la idea que los datos son normales. \*\*Además se considerará que existe variabilidad en el número de animales que se obtienen con una lesión dopaminérgica de un 80 - 90%, por lo que, podría obtenerse, al final, un número menor de animales con lesión dopaminérgica  $n = 5^{**}$ .

## VIII. Resultados

### Sitio de lesión

El panel fotográfico muestra la región dorsolateral del núcleo estriado, según el atlas de coordenadas cerebrales de Paxinos y Watson (2007) y las fotomicrográficas representativas de que la inyección se realizó en el sitio que indica la metodología.

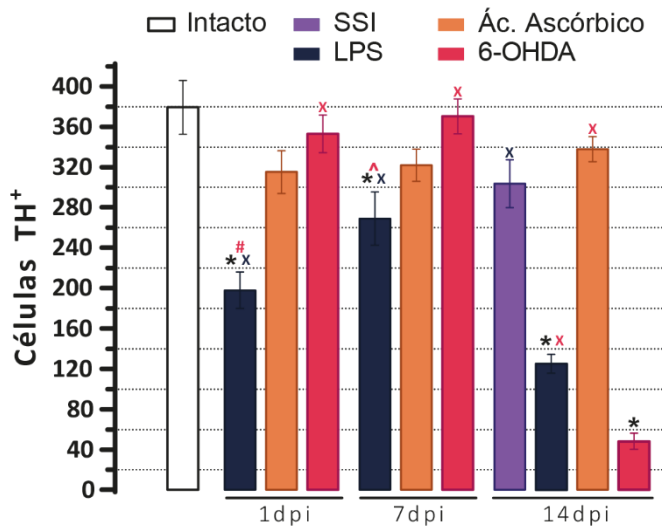
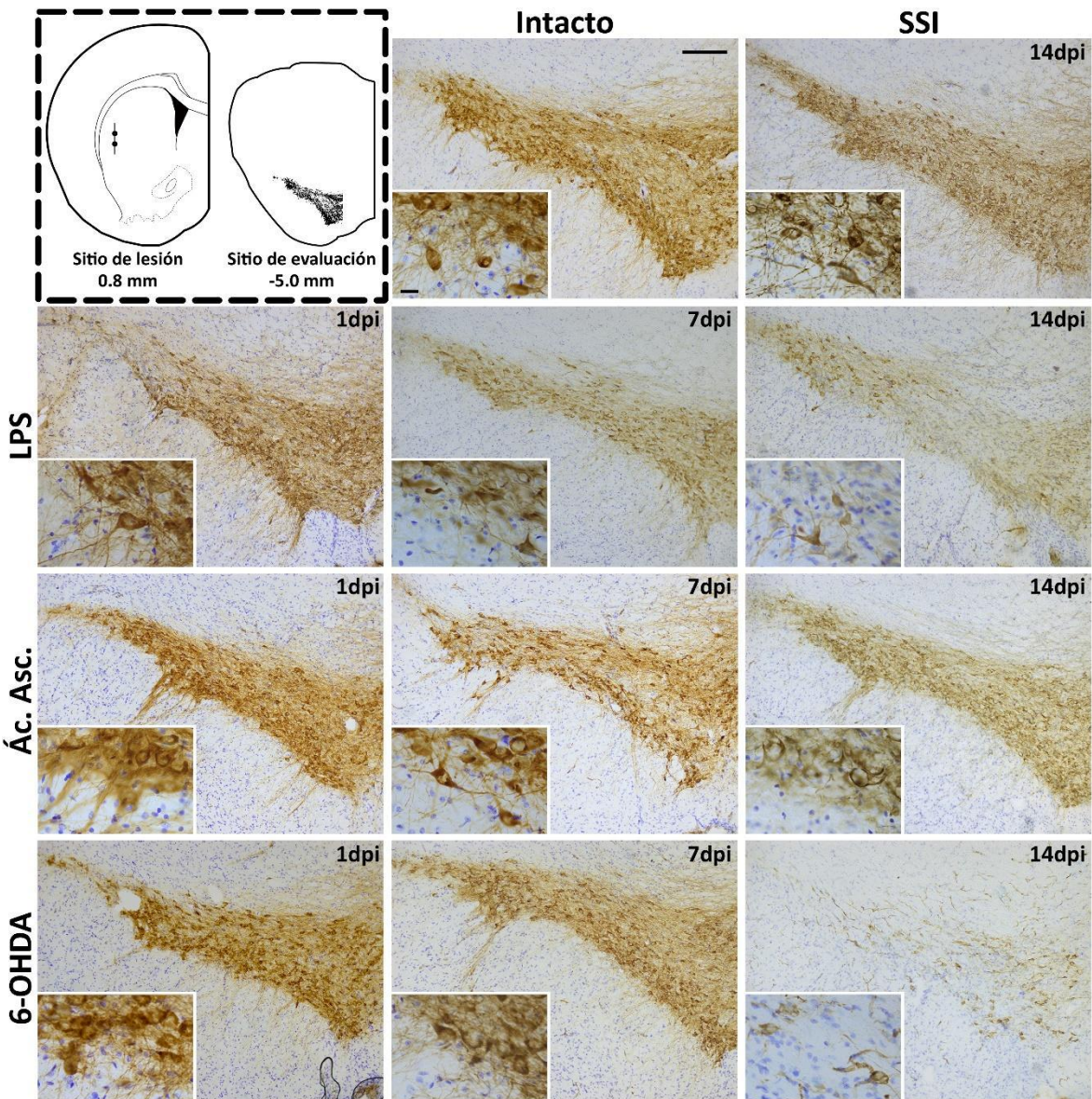


**Figura 18.** Se muestran imágenes representativas del estriado dorsolateral y el sitio de inyección de los grupos experimentales SSI<sub>14dpi</sub>, LPS<sub>1dpi</sub> y 6-OHDA<sub>1dpi</sub>. La barra indica una escala de 500  $\mu$ m.

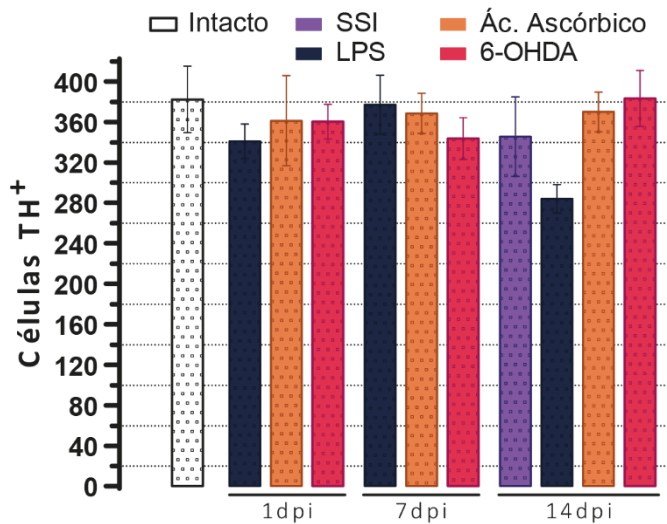
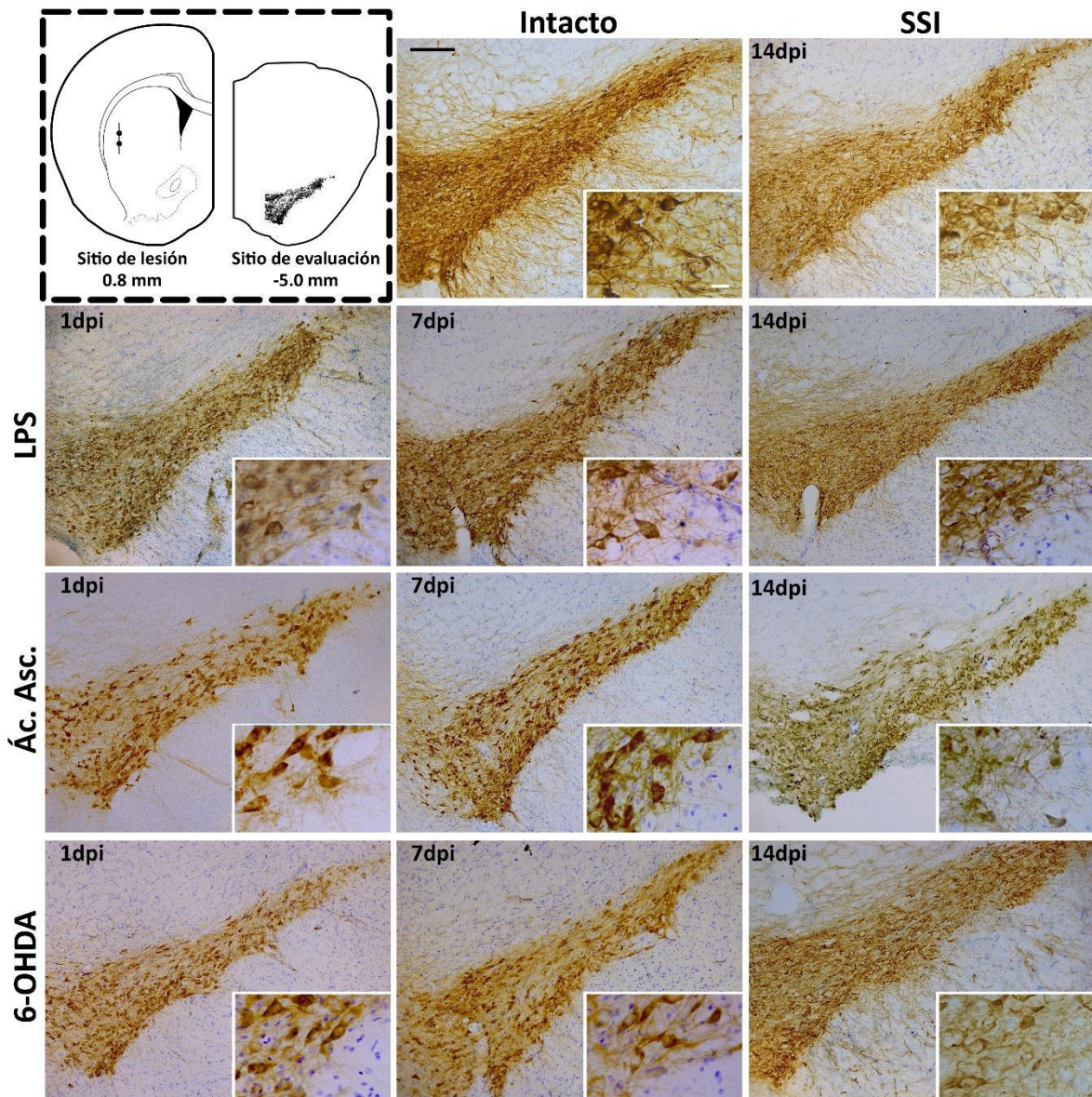
## El LPS y la 6-OHDA degeneran las neuronas dopaminérgicas de la SNpc 14 días después de la inyección de lo tóxicos referidos.

El grado de denervación de las neuronas dopaminérgicas, causado por la administración estriatal del LPS o de la 6-OHDA, fue evaluado mediante la cuantificación del número de células positivas a TH en la SNpc (-4.8 – 5.0 mm respecto a Bregma). El panel de micrografías y la gráfica muestran que el LPS causa la disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) del 48% del número de células TH<sup>+</sup> a partir del día 1pi respecto al grupo intacto. Además, aunque en el grupo LPS<sub>7dpi</sub> pareciera que incrementa el número de células positivas a TH, en realidad no hay un incremento significativo respecto al grupo LPS<sub>1dpi</sub>. En ese sentido, el LPS causa la disminución del 77% de las neuronas DAérgicas 14dpi respecto el grupo intacto y del 60% respecto al grupo SSI<sub>14dpi</sub>. Así mismo, la 6-OHDA, 14dpi, induce la disminución del 86% de las células TH<sup>+</sup> respecto a los grupos intacto, Ác. Ascórbico<sub>14dpi</sub>, 6-OHDA<sub>1dpi</sub> y 6-OHDA<sub>7dpi</sub>. Por otra parte, durante los dos primeros puntos temporales de evaluación, la administración del LPS incita la disminución de, al menos, el 55% de las células TH<sup>+</sup> respecto a los grupos lesionados con 6-OHDA en los mismos días de evaluación. Interesantemente, el número de células TH<sup>+</sup> del grupo 6-OHDA<sub>14dpi</sub> representan el 38% de las células TH<sup>+</sup> del grupo LPS<sub>14dpi</sub>, es decir: aunque el LPS disminuye el número de células DAérgicas a partir del primer día de evaluación, se mantiene relativamente el número de células hasta el día 7 y continúa disminuyendo hasta los 14dpi, la 6-OHDA induce una reducción más severa del número de células TH<sup>+</sup> evidenciada 14dpi en este estudio (**Figura 20**). Por otra parte, la administración de los tóxicos no causó la disminución de las células de la SNpc contralateral a la lesión. Sin embargo, parece existir una tendencia a disminuirse el número de neuronas TH<sup>+</sup> del grupo LPS<sub>14dpi</sub> en el hemisferio contralateral, empero, la disminución no es estadísticamente significativa respecto a los grupos SSI<sub>14dpi</sub> e intactos de las regiones ipsi- o contralaterales a la lesión (**Figura 21**).





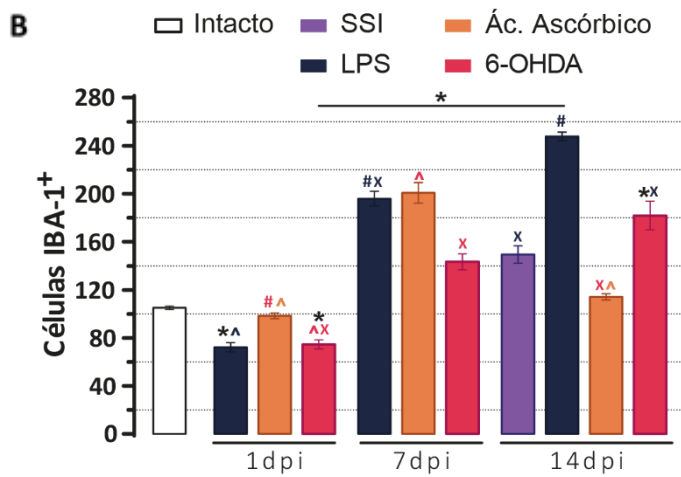
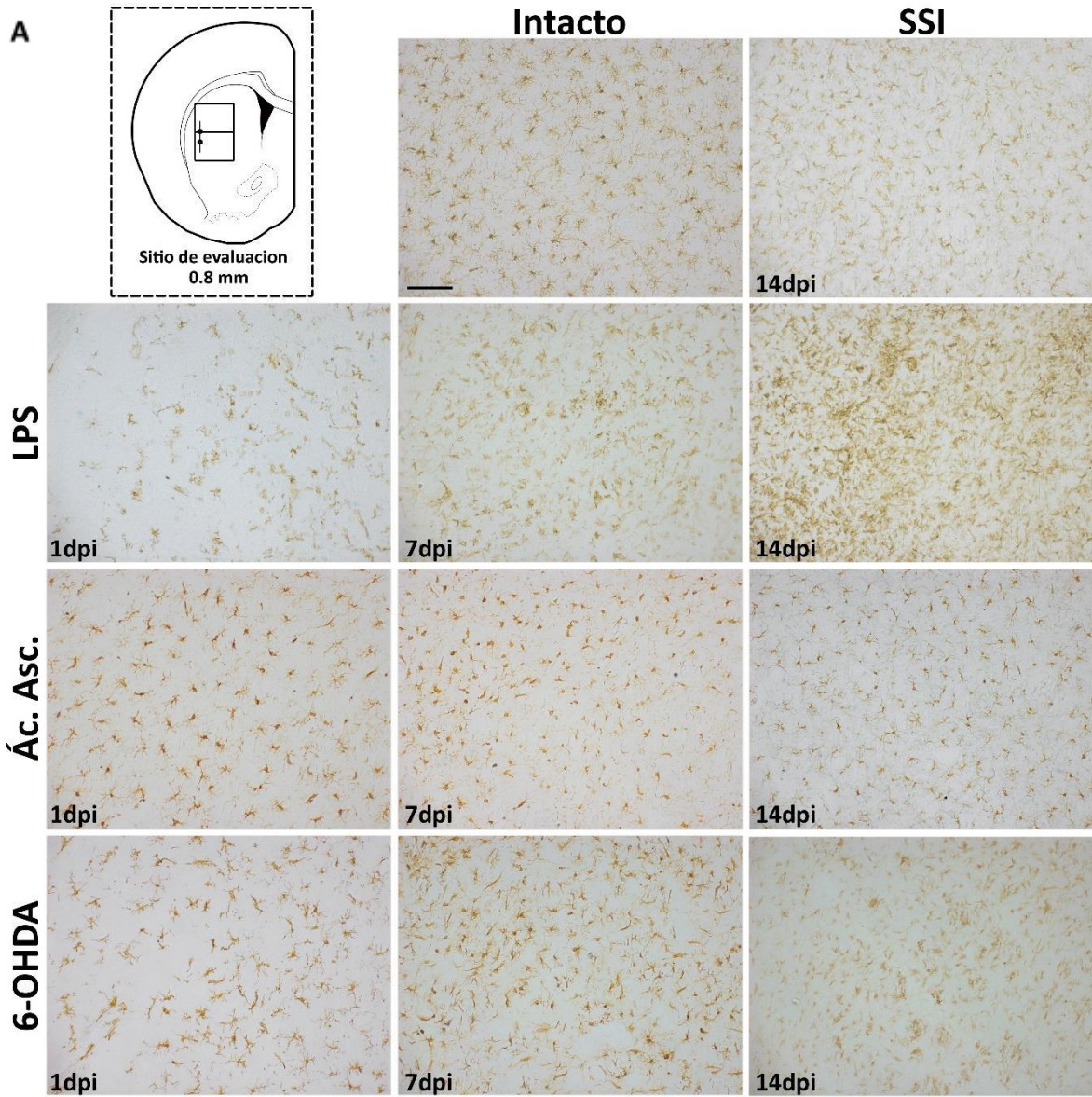
**Figura 20. A. IHC para la TH. B. Número de células positivas a TH en la SNpc ipsilateral a la lesión.** Se muestran (A) fotografías representativas de la SNpc (10x; -5.0 mm, respecto a Bregma) y (B) la cantidad de células positivas a la TH. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \*, #, ^, x =  $p < 0.05$ . \* vs intacto; # vs Grupo<sub>1dpi</sub>; ^ vs Grupo<sub>7dpi</sub>; x vs Grupo<sub>14dpi</sub>; el color del señalador indica el grupo contra el que se compara. La barra superior indica una escala de 100  $\mu$ m. La barra en la magnificación indica una escala de 20  $\mu$ m.



**Figura 21. A.** IHC para la TH. **B.** Número de células positivas a TH en la SNpc ipsilateral a la lesión. Se muestran (A) fotografías representativas de la SNpc (10x; -5.0 mm, respecto a Bregma) y (B) la cantidad de células positivas a la TH. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey. La barra superior indica una escala de 100  $\mu$ m. La barra en la magnificación indica una escala de 20  $\mu$ m.

## **El LPS y la 6-OHDA causan microgliosis en el núcleo estriado 7 y 14 días después de la inyección de los tóxicos.**

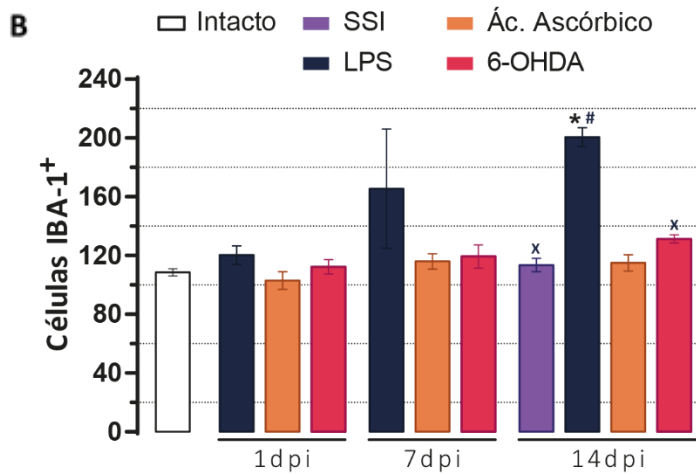
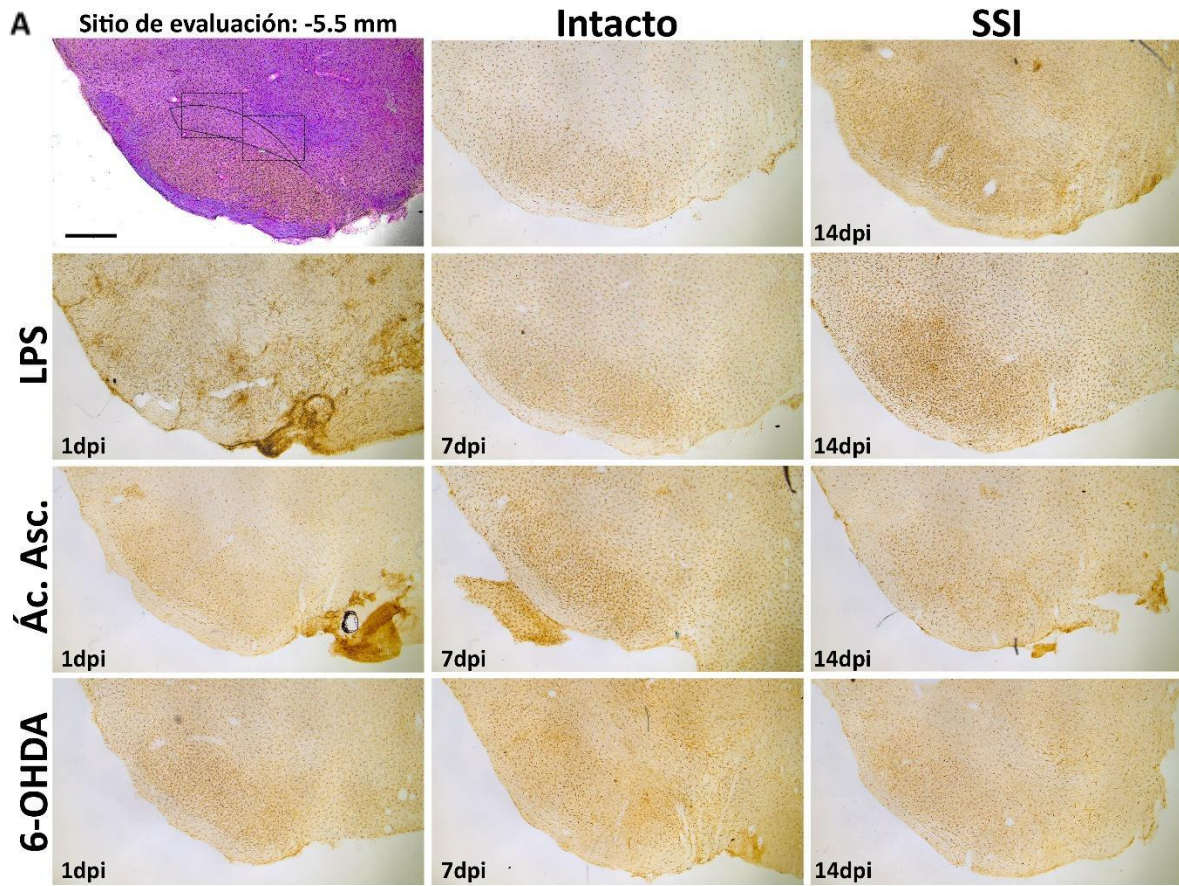
La microgliosis causada por la administración estriatal de LPS o 6-OHDA, fue evaluada mediante la cuantificación del número de células positivas a IBA-1 en la región dorsolateral del núcleo estriado (1.0 - 0.4 mm, respecto a Bregma). La **Figura 22** muestra que la administración de LPS o 6-OHDA inducen, 1dpi, la reducción significativa ( $p < 0.05$ ) de un tercio de las células IBA-1<sup>+</sup> respecto a los grupos intacto y Ác. Ascórbico en el mismo día de evaluación. Asimismo, se aprecia que los tóxicos administrados generan, de manera disímil, la microgliosis, esto es: el LPS, 7dpi, causa el aumento de 0.86 veces en el número de células IBA-1<sup>+</sup> respecto al grupo intacto y de 1.71 veces respecto al grupo LPS<sub>1dpi</sub> y, 7 días más tarde: durante el día 14pi, incrementa hasta 1.35 veces respecto al grupo intacto y 0.26 en proporción al grupo LPS<sub>7dpi</sub>. Por su parte, 7dpi de la 6-OHDA incrementaron 0.36 veces el número de células IBA-1<sup>+</sup> con referencia al grupo intacto y 0.21 veces respecto al grupo 6-OHDA<sub>1dpi</sub>, y 14dp de la cirugía incrementaron hasta 0.72 veces el número de células IBA-1<sup>+</sup> respecto al grupo intacto y 0.21 veces respecto al día previo de evaluación. Es decir: el LPS causa una microgliosis más intensa que la que causa la 6-OHDA. Interesantemente, los grupos vehículos Ác. Ascórbico<sub>7dpi</sub> y SSI<sub>14dpi</sub> causaron que se incrementaran 0.9 y 0.42 veces en el número de células IBA-1<sup>+</sup>, respectivamente, en relación al grupo control intacto.



**Figura 22. A. IHC para IBA-1. B. Número de células positivas a IBA-1.** Se muestran (A) fotografías representativas del núcleo estriado (20x; 0.8 mm, respecto a bregma) y (B) la cantidad de células positivas a IBA-1. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \*, #, ^, x =  $p < 0.05$ . \* vs intacto; # vs Grupo<sub>1dpi</sub>; ^ vs Grupo<sub>7dpi</sub>; x vs Grupo<sub>14dpi</sub>; el color del señalador indica el grupo contra el que se compara. La barra indica 100  $\mu$ m.

## El LPS causa microgliosis en la SNpc 14 días después de su inyección.

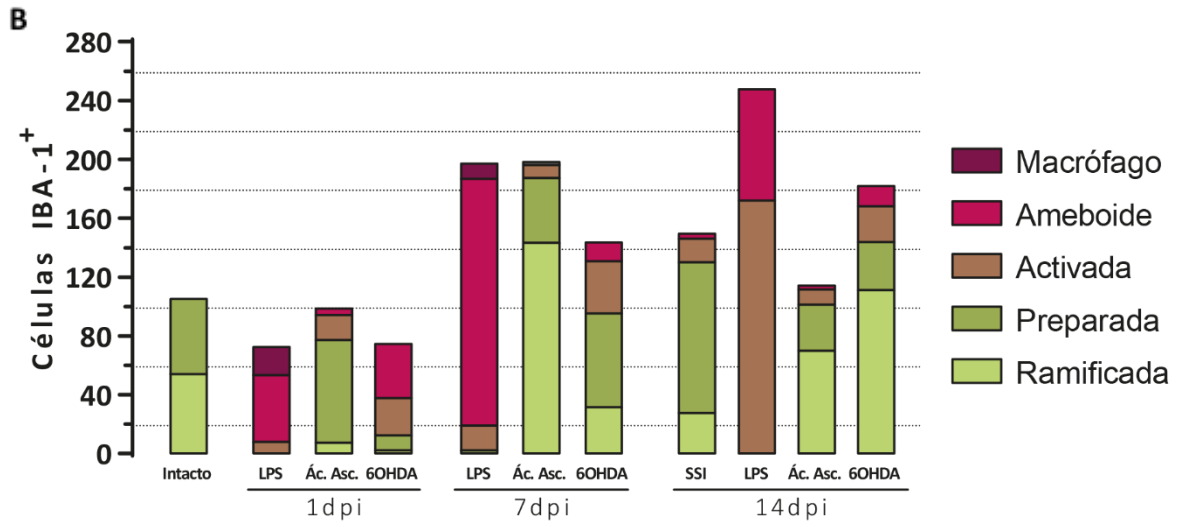
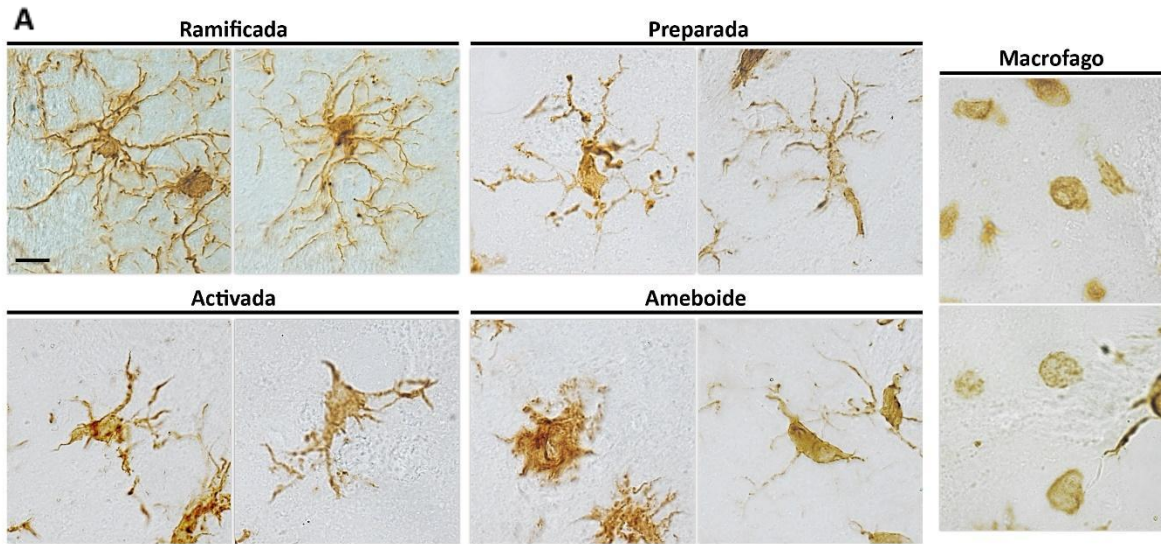
La evaluación de probable microgliosis causada por la administración estriatal de LPS o 6-OHDA, fue evaluada mediante el conteo del número de células positivas a IBA-1 en la SNpc. El panel de micrografías y la gráfica (**Figura 23**) muestran que, 14 días posteriores a la administración estriatal de LPS, el número de células IBA-1<sup>+</sup> aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) respecto a los grupos control intacto (0.83 veces), LPS<sub>1dpi</sub> (0.67 veces), SSI<sub>14dpi</sub> (0.76 veces), 6-OHDA<sub>14dpi</sub> (0.5 veces) y Ác. Ascórbico<sub>14dpi</sub> (0.73 veces). Además, en el grupo LPS<sub>7dpi</sub> se aprecia una tendencia a incrementarse el número de células macrófago/microgliales, aunque no se encontraron diferencias significativas respecto a los grupos intacto, LPS<sub>1dpi</sub> y LPS<sub>14dpi</sub>, sí existe esta diferencia comparándolo contra los grupos 6-OHDA<sub>1dpi</sub>, Ác. Asc.<sub>1dpi</sub> y Ác. Asc.<sub>7dpi</sub>. Los grupos 6-OHDA<sub>1dpi</sub> y 6-OHDA<sub>7dpi</sub> no incrementaron el número de células IBA-1<sup>+</sup> comparándolos contra el control vehículo ni contra el control intacto. Asimismo, en el grupo 6-OHDA<sub>14dpi</sub> existe una tendencia a incrementarse (0.2 veces) el número de células en relación al grupo control intacto, sin embargo, esta tendencia es menos evidente que la del grupo LPS<sub>7dpi</sub>.



**Figura 23. A. IHC para IBA-1. B. Número de células positivas a IBA-1.** (A) muestra fotografías representativas de la SNpc (4x; -5.5 mm, respecto a bregma). La fotografía de referencia muestra una tinción de H&E. (B) Indica la cantidad de células positivas a IBA-1. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \*, #, ^, x =  $p < 0.05$ . \* vs intacto; # vs Grupo<sub>1dpi</sub>; ^ vs Grupo<sub>7dpi</sub>; x vs Grupo<sub>14dpi</sub>; el color del señalador indica el grupo contra el que se compara. Barra: 500  $\mu$ m.

## El LPS produce un modelo experimental de activación microglial persistente en el estriado dorsolateral.

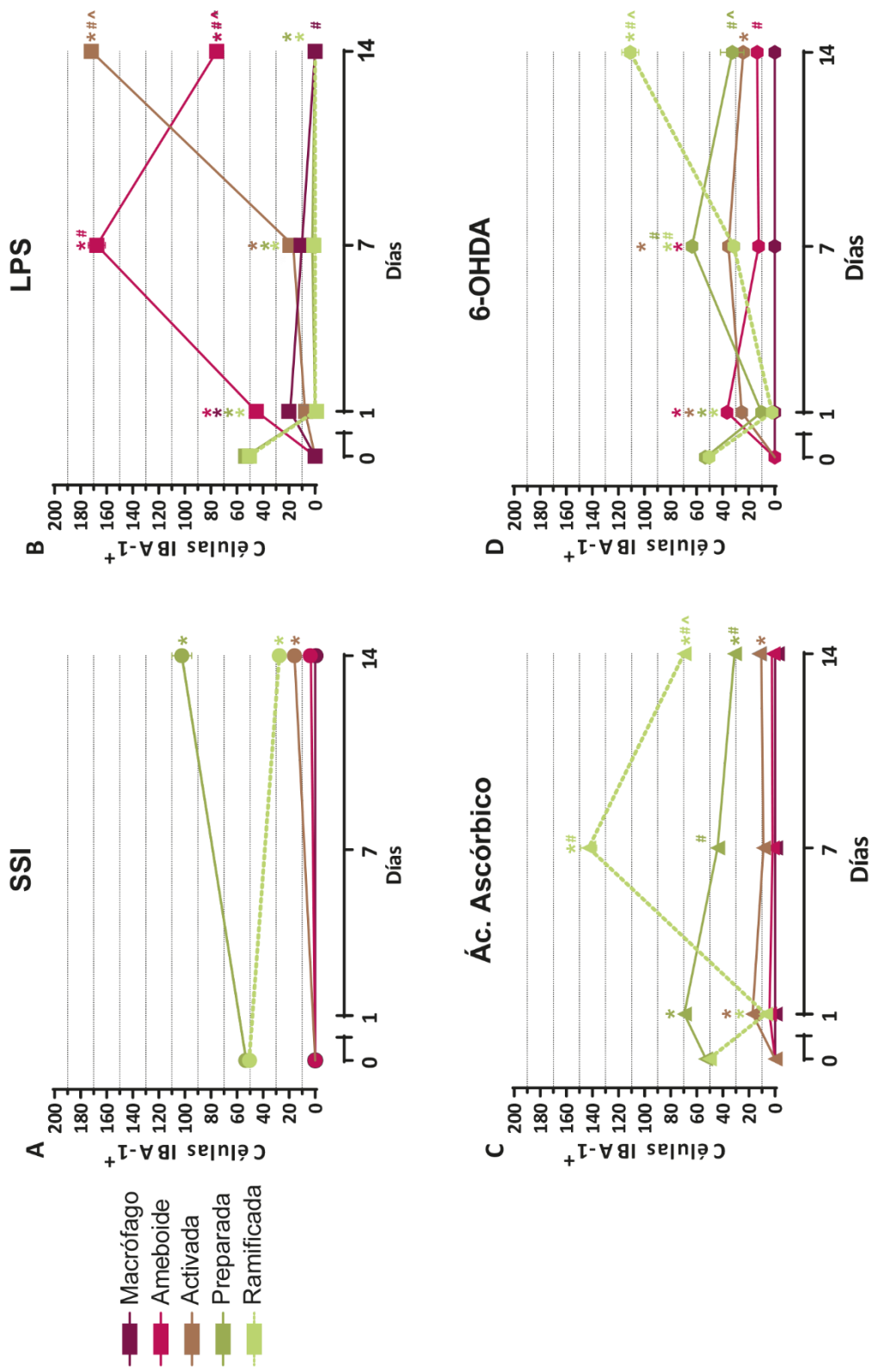
La clasificación morfológica celular fue evaluada mediante el número de células positivas a IBA-1 en la región dorsolateral del núcleo estriado (1.0 - 0.4 mm, respecto a Bregma) según lo indicado con antelación en el apartado sobre *Metodología*, a saber: microglía ramificada, preparada, activada, ameboidea y macrófago no microglial (**Figura 24A**). En las gráficas de frecuencias acumuladas (**Figura 24B**) y de pasteles (**Figura 25**) se aprecia que las formas más frecuentemente encontradas en los cerebros de los sujetos experimentales del grupo Intacto son la microglía *ramificada* y *preparada* (49 y 51% del total de células, respectivamente; **Figura 24B**, **Figura 25**), que desaparecen completamente en la temporalidad del estudio en los grupos a los que se les administró LPS (**Figura 26B**, **Figura 27**). Si bien, a semejanza con el LPS<sub>1dpi</sub>, en el grupo 6-OHDA<sub>1dpi</sub> disminuyen las células ramificadas (**Figura 27A**), el día 7 posterior a la inyección de 6-OHDA reaparecen células con el patrón arborizado, sin embargo, el número de células *ramificadas* son significativamente menores comparándolo contra el número de células *ramificadas* del grupo intacto; en ese sentido, las células con morfología *preparada* del grupo que estamos tratando, incrementan en número, 7dpi, al punto en que no hay diferencia estadísticamente significativa en relación al número de células con forma preparada en el grupo control intacto. 14dpi de 6-OHDA, incrementan significativamente el número de células ramificadas respecto a los días previos de evaluación y contra el grupo intacto, mientras que las *preparadas* disminuyen respecto al día 7pi, pero se mantienen numéricamente en relación con el grupo intacto (**Figura 26D**). Además, es interesante notar que las células *ramificadas* o *preparadas* o ambas son las formas microgliales más cuantiosas en los grupos a los que se les administró alguno de los vehículos (**Figura 25**, **26A**, **26B**) y en el último punto temporal de evaluación de este estudio del grupo lesionado con 6-OHDA (**Figuras 24**, **25**, **26D**). Por otra parte, las células tipo *ameboide* son las más abundantes en los grupos LPS<sub>1dpi</sub>, LPS<sub>7dpi</sub> y 6-OHDA<sub>1dpi</sub> (63, 86 y 56%, respectivamente, del total de células **Figuras 25**, **27D**), las cuales, tienen una disminución estadísticamente significativa en los grupos LPS<sub>14dpi</sub> y 6-OHDA<sub>7dpi</sub> (**Figura 26B**, **26D**, **27D**). Por su parte, únicamente en el grupo lesionado con LPS, al primer día posterior a la administración hay células tipo *macrófago* que representan un cuarto del total de células por campo de estudio (**Figura 25**, **Figura 26B**, **Figura 27E**).



**Figura 24.** Se muestran los (A) cinco tipos de fenotipos que representan la población IBA-1<sup>+</sup>. La barra indica 10  $\mu$ m. Además, (B) la morfometría representada como la frecuencia de datos acumulados.

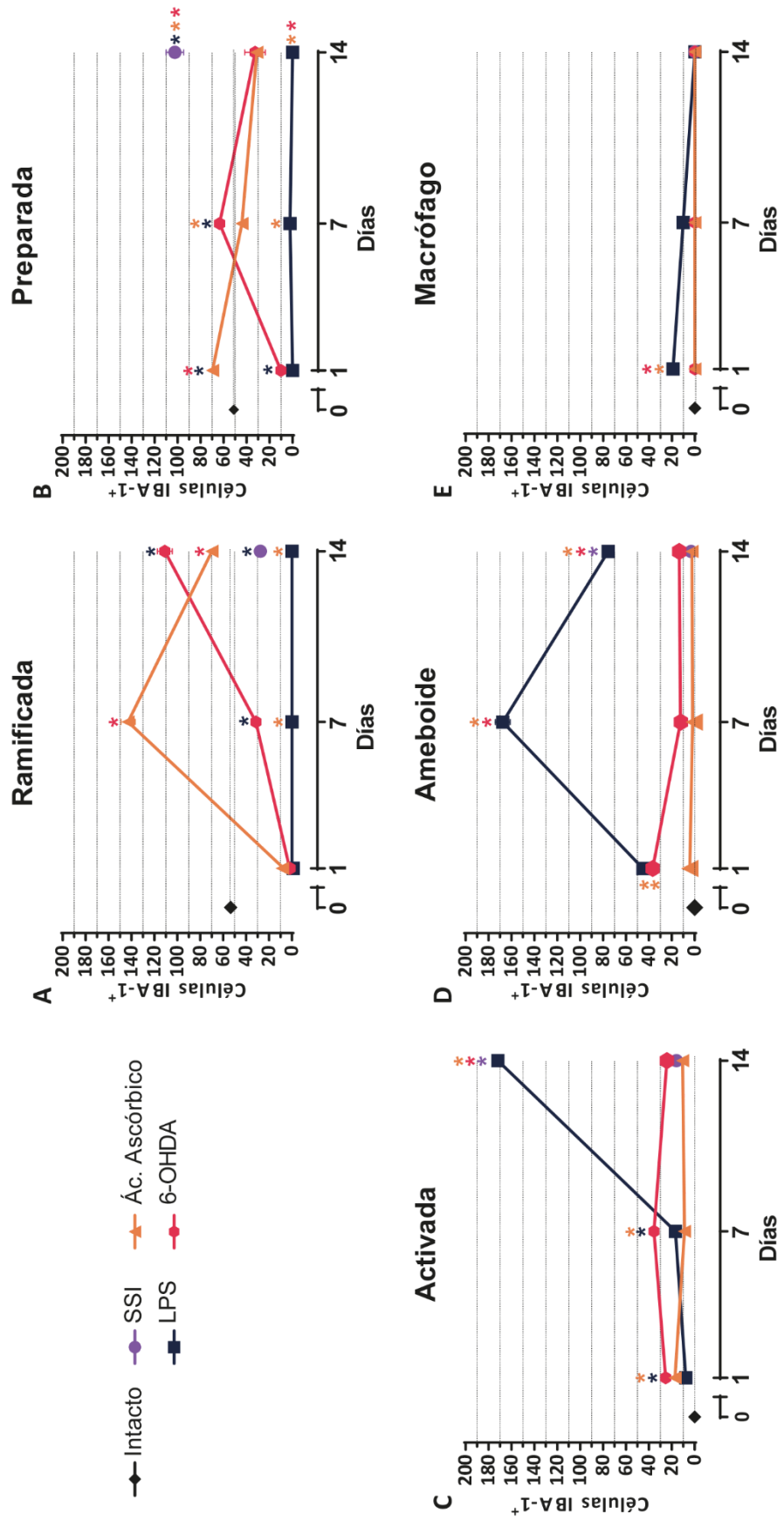


Figura 25. Se muestran las gráficas de fracciones porcentuales de los fenotipos de la microglía.



**Figura 26.** Se muestran las gráficas del curso temporal de 14 días en las que se compara la media de determinada morfología microglial de un mismo grupo respecto a las formas de los puntos temporales anteriores. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías y una post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \*, #, ^ p < 0.05. \* vs Grupo<sub>0dpt</sub>; ^ vs Grupo<sub>1dpt</sub>; # vs Grupo<sub>7dpt</sub>; el color del señalador está relacionado la morfología de la microglía.

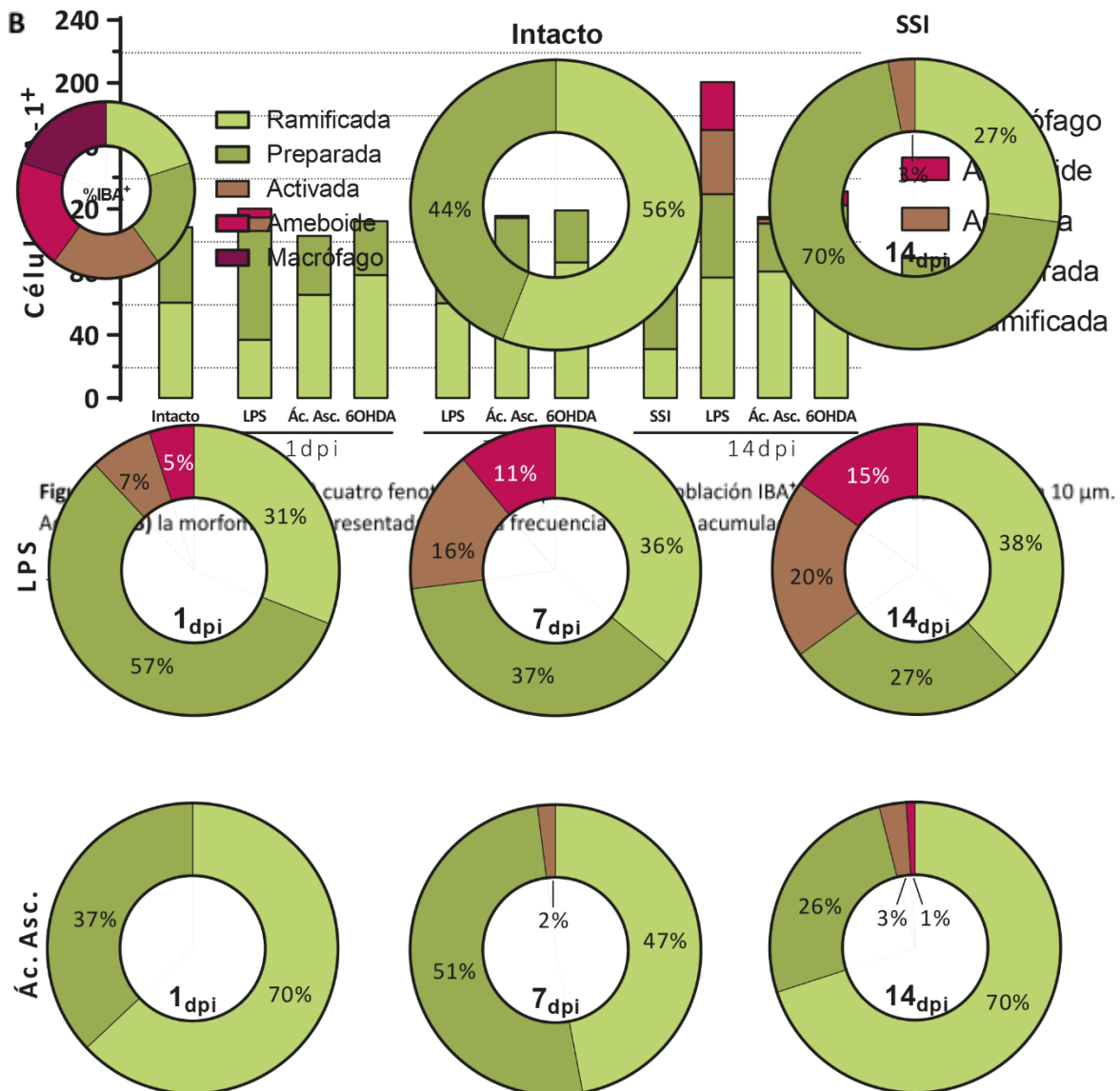
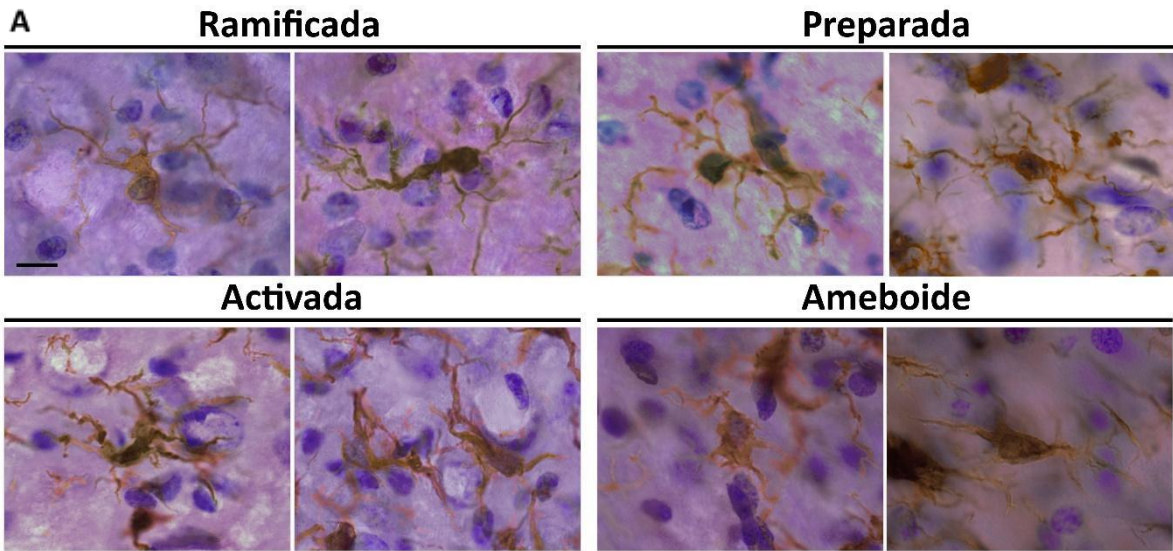


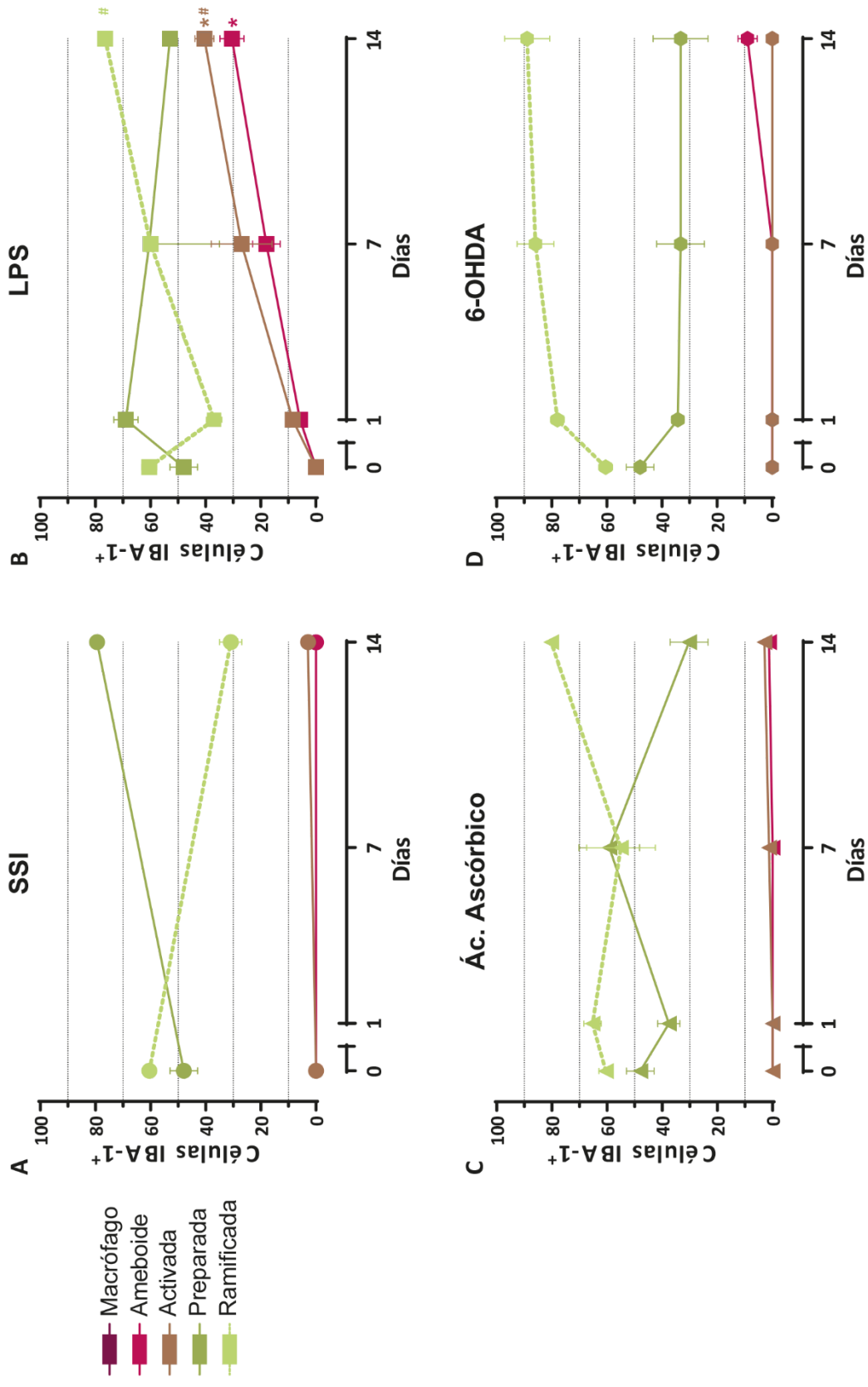


**Fig. 27.** Se muestran las gráficas del curso temporal de 14 días en las que se compara la media de determinada morfología microglial de un grupo respecto a las formas libres de los otros grupos tratados. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías y una post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \* = p < \* vs Grupo; el color del señalador está relacionado indica el grupo contra el que se compara.

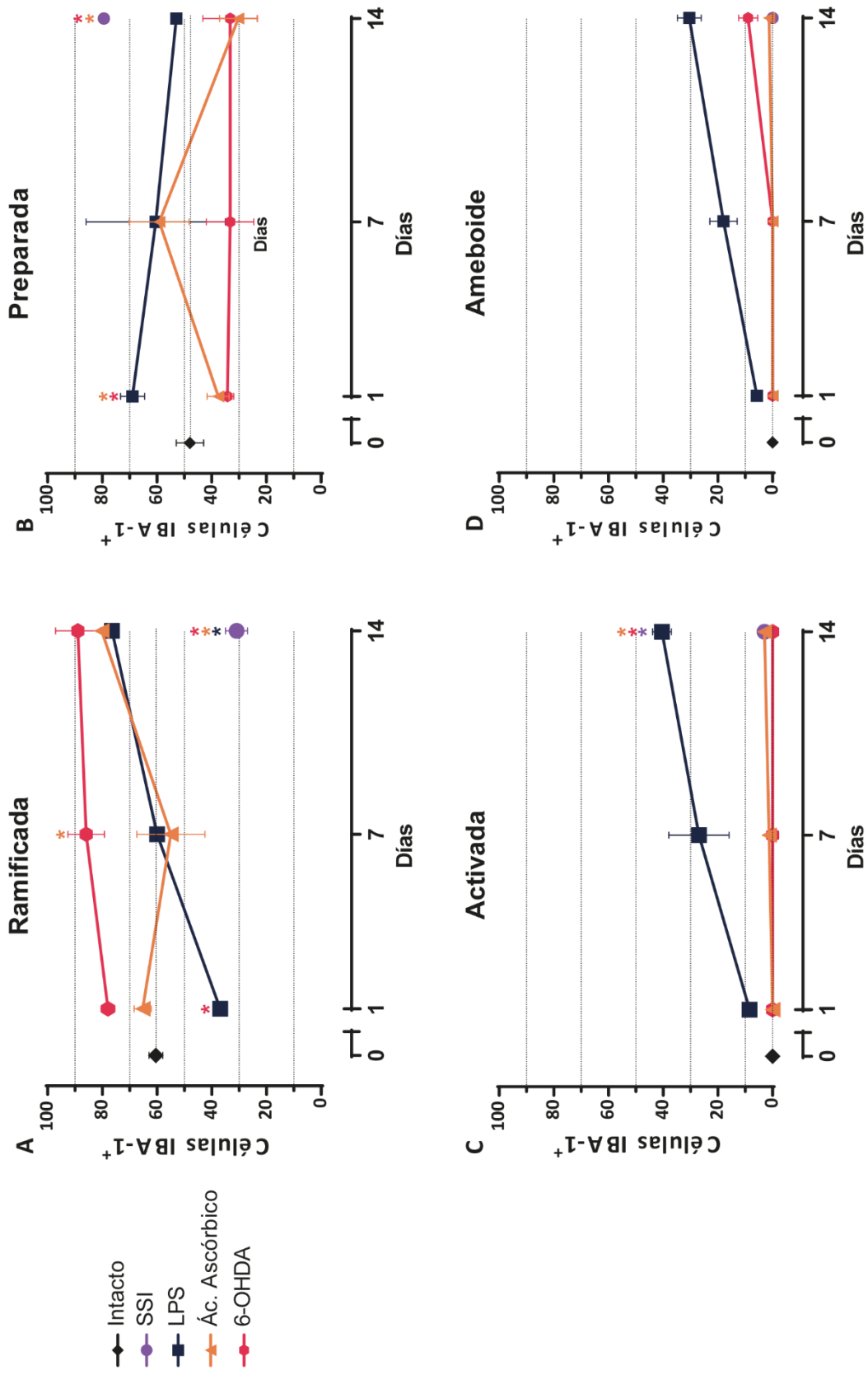
## **El LPS amplía la señal inflamatoria desde el núcleo estriado hasta la SNpc desde el día 7 posterior a la administración del inflamógeno.**

La clasificación morfológica celular fue evaluada mediante el número de células positivas a IBA-1 en la SNpc (5.2 - -5.5 mm, respecto a Bregma) según lo indicado con antelación en el apartado *Metodología*, a saber: microglía ramificada, preparada, activada y ameboidea y en concordancia con el panel de la **Figura 28A**. En las gráficas de frecuencias acumuladas (**Figura 28B**) y de pasteles (**Figura 29**) se aprecia que las formas más frecuentemente encontradas en un estado fisiológicamente sano, de manera análoga como en la región del núcleo estriado, son las *ramificadas* y *preparadas* (44 y 56%, respectivamente; **Figura 29**), además, todos los grupos: lesionados y vehículos, mantienen, sin variación significativa, el número de células *ramificadas* respecto al grupo intacto (**Figuras 28 y 30**). Sin embargo, el número de células positivas a IBA-1 del grupo 6-OHDA<sub>7dpi</sub> difiere significativamente del número de microgliocitos en el grupo Ác. Ascórbico<sub>14dpi</sub>, debido al aparente incremento del número de células (en 6-OHDA<sub>7dpi</sub>) y la disminución aparente (en Ác. Ascórbico<sub>7dpi</sub>) (**Figuras 31A**). Por otro lado, aunque, los grupos experimentales LPS<sub>1dpi</sub>, LPS<sub>7dpi</sub>, LPS<sub>14dpi</sub> y 6OHDA<sub>14dpi</sub>, muestran células en los estados *activado* y *ameboide* (**Figura 28B**), únicamente, el número de células con morfología *activada* del grupo LPS<sub>14dpi</sub>, incrementaron significativamente, en relación con los grupos intactos y LPS<sub>1dpi</sub> en ese mismo estado y las que muestran una forma *ameboide* incrementan respecto al número de células IBA-1<sup>+</sup> del grupo intacto (**Figura 30B, 31C, 31D**).





**Figura 30.** Se muestran las gráficas del curso temporal de 14 días en las que se compara la media de determinada morfología microglial de un grupo respecto a las formas celulares de los otros grupos tratados. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vías y una post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ . \* vs Grupo; # el color del señalador está relacionado con el grupo contra el que se compara.



**Figura 31.** Se muestran las gráficas del curso temporal de 14 días en las que se compara la frecuencia de la morfología celular de dos grupos experimentales en un único punto temporal. \*  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía & post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. \* vs SSI; \* vs LPS; \* vs Ác. Asc. \* vs 6OHDA; \* vs Ác. Asc. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía & post-Tukey. Los datos representan la media  $\pm$  SEM.

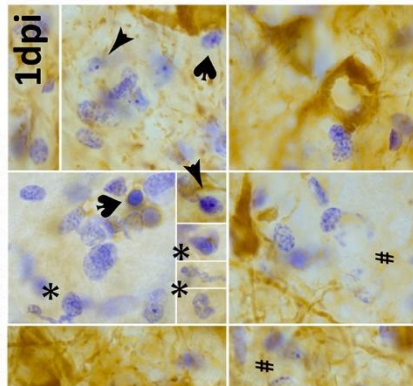
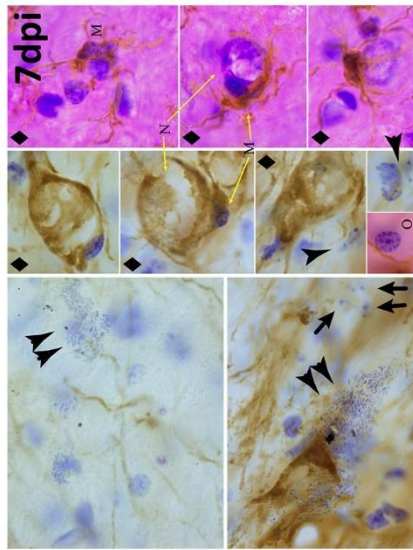
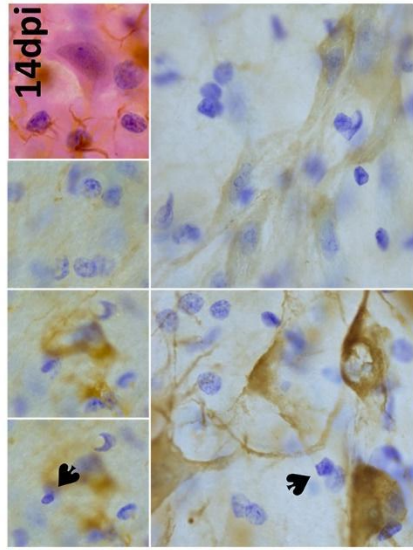
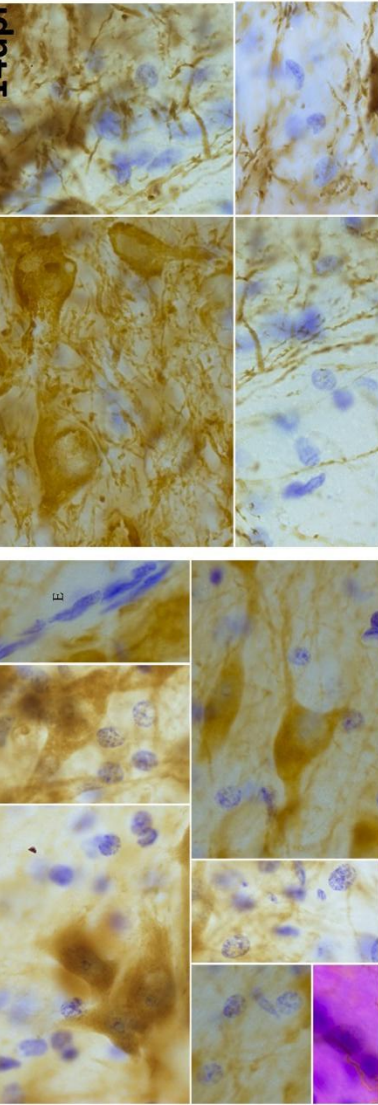
## **El LPS causa primordialmente la aparición de cuerpos necróticos mientras que la 6-OHDA corpúsculos apoptóticos.**

El análisis neuropatológico fue evaluado mediante la determinación de la estructura celular en el área de la SNpc (-4.8 – 5.0 mm respecto a Bregma), según lo indicado en el apartado: *Metodología*. En el panel fotográfico (**Figura 32**) se observa que, en el grupo intacto, las células TH<sup>+</sup> se ven íntegras. Tienen, además, un color marrón causado por la polimerización de la DAB contenido principalmente en el citoplasma y, en el interior de algunas neuronas, se aprecia un núcleo grande y redondo con un patrón característico de cromatina y, al centro, un punto azul que podría ser identificado como el nucléolo; esta misma característica, de integridad neuronal, se observó en los grupos SSI<sub>14dpi</sub>, LPS<sub>1dpi</sub>, Ácido Ascórbico<sub>1dpi, 7dpi y 14dpi</sub> y 6-OHDA<sub>1dpi y 7dpi</sub>. Contrario a lo dicho, los grupos LPS<sub>7dpi y 14dpi</sub> y 6-OHDA<sub>14dpi</sub>, muestran una coloración marrón pálida con axones fragmentados y cuerpos celulares porosos y deformes.

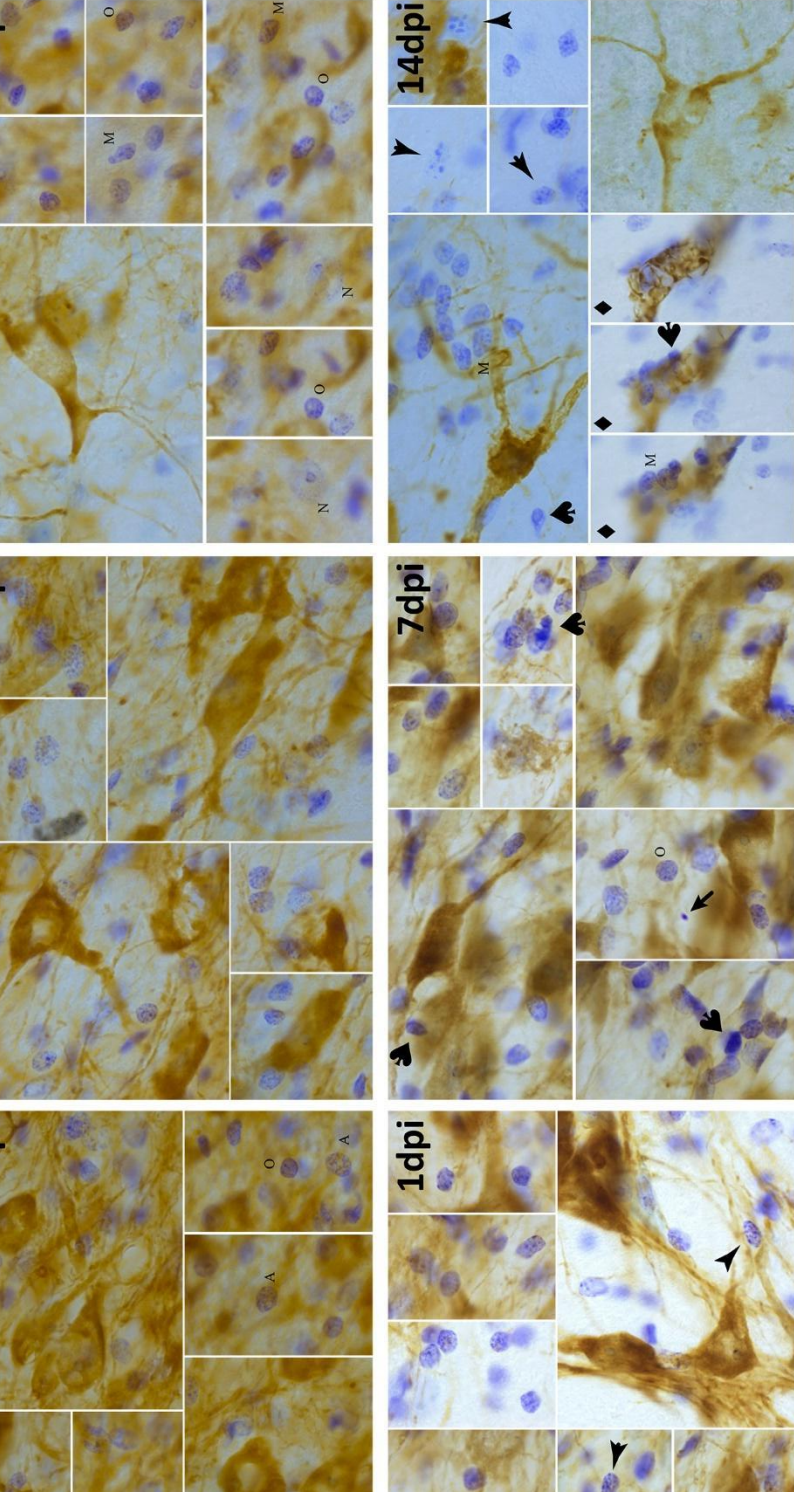
En todos los grupos experimentales existen núcleos semejantes a los expuestos en el apartado de *Metodología*, en el panel fotográfico solo se muestran algunos indicados del siguiente modo: *endotelio: E; oligodendrocito: O; astrocito: A; microglía: M y neurona: N*. Así mismo, en los grupos experimentales lesionados, aunque escasos, se encontraron núcleos con pertenencia desconocida, es decir, la apariencia de éstos no se relaciona con ninguna de las descritas: en el panel del grupo LPS<sub>1dpi</sub> se muestran un par de núcleos (indicado con #) con un volumen aparentemente mayor al de los astrocitos, pero menor al de las neuronas, con escasa coloración y puntos de cromatina aislados, así mismo, se hallaron grupos con aparente multilobulación (indicados con \*). En otro sentido, se encontraron núcleos muy cercanos a los cuerpos neuronales (aludidos con ♦) como los que se muestran en el grupo LPS<sub>7dpi</sub> y 6-OHDA<sub>14dpi</sub> que, por la morfología romboide y multigranulada, se podría sugerir que pertenecen a células microgliales, de hecho, en la parte derecha del panel de LPS<sub>7dpi</sub> se pudieron detectar células IBA-1<sup>+</sup> en supuesto envolvimiento de grandes núcleos con características similares a los neuronales (marcados con flechas amarillas).

Por otra parte, en los tres puntos temporales de estudio de los dos grupos lesionados se encontró algún grado de lesión apoptótica/necrótica, esto es: en el grupo LPS<sub>1dpi y 14dpi</sub> y 6-OHDA<sub>1dpi y 7dpi</sub> se aprecian núcleos hiperteñidos, crispados y rugosos, esto es: en la fase inicial de la muerte celular, según lo descrito en la *metodología* (señalados con ♠). En los grupos LPS<sub>7dpi</sub> y 6-OHDA<sub>7dpi</sub> se encontraron cuerpos apoptóticos (indicados con →) y en los grupos LPS<sub>1dpi y LPS<sub>7dpi</sub> y 6-OHDA<sub>1dpi y 6-OHDA<sub>14dpi</sub></sub> células apoptóticas (aludidas con una ►). Por otro lado, únicamente en el grupo</sub>

LPS<sub>7dpi</sub> se hallaron formas cariolticas (marcados con ▲▲). Finalmente, en el grupo LPS<sub>14dpi</sub> se observó una célula eosinofílica como la que se aprecia en la esquina superior derecha del panel.



**gura 32.** Se muestran las células TH<sup>+</sup> de la SNpc ipsilateral a la lesión y los núcleos, teñidos con la tinción de Nissl, que conforman el microambiente fisiológicamente normal. **A:** astrocito; **E:** endotelio; **M:** microglia; **N:** neurona; **O:** oligodendrocito; **#:** núcleo multilobulados; **\***: células apoptóticas; **o**: núcleos picnóticos; **o**: células apoptóticas; **o**: células apoptóticas. [La figura continúa en la siguiente página].



**gura 32.** Se muestran las células TH<sup>+</sup> de la SNpc ipsilateral a la lesión y los núcleos, teñidos con la tinción de Nissl, que conforman el microambiente fisiológicamente normal o tóxico. **A:** astrocito; **E:** endotelio; **M:** microglía; **N:** neurona; **O:** oligodendrocito; **#:** cuerpos oncóticos; **\***: núcleo multilobulados; : células aparentemente apoptóticas; : núcleos picnóticos; : cuerpos apoptóticos; : célula apoptótica; : cuerpos cariolíticos.

## IX. Discusión de resultados

La idea de caracterizar un perfil neuroinflamatorio en dos modelos experimentales, para el estudio de la EP atrae sobremanera debido a las dudas que existen entre la comunidad científica acerca del papel que juegan la microglía y las otras células involucradas en la promoción de la respuesta inflamatoria, de las enfermedades neurodegenerativas y sobre el desencadenador inicial de la muerte de las neuronas DAérgicas. Ambos modelos podrían ser incluyentes, ya que, abordan la degeneración celular desde dos puntos diferentes. La 6-OHDA involucra la inhibición de los complejos mitocondriales I y IV, la producción excesiva de ROS, la apoptosis y la activación glial. Por su parte, el LPS polariza a la microglía al espectro de los M1 y, a su vez, amplía la respuesta inflamatoria. Por lo que, habrá dos discusiones fundamentales, la de los modelos experimentales y la de los eventos bioquímicos y fisiológicos tras la administración de estos agentes. En este estudio, se pretendió realizar un análisis sobre las consecuencias de administrar, de manera independiente, los neurotóxicos y, estas, fueron evidenciadas el análisis inmunohistoquímico en células TH<sup>+</sup> e IBA-1<sup>+</sup>, así como de las modificaciones estructurales de las células del núcleo estriado y de la SNpc y las pruebas conductuales ya descritas.

Se administraron las sustancias en la región dorsolateral del núcleo estriado debido a que, la administración en este núcleo causa una denervación primitiva y degeneración retrógrada del sistema DAérgico como han sugerido Imbriani *et al* (2018) y Francardo (2018); además, es menos abrupta que los modelos en que se administra en la SN o en MFB, así mismo, a semejanza del grado de degeneración DAérgica que los pacientes que padecen la EP y que, a su vez, expresan síntomas motores, el modelo de lesión dopaminérgica estriatal reduce las neuronas DAérgicas en un ~80% (**Figura 20**). Expuesto lo anterior, 14 días posteriores a la administración se logró causar una franca asimetría motora (**Figura 19**) a los sujetos experimentales administrados con alguno de los tóxicos. Sorprendentemente, a pesar de que ambas sustancias causaron una severa disminución en el uso de ambas extremidades, aunque no exista una diferencia estadísticamente significativa, la 6-OHDA causó que los sujetos experimentales usaran en menor medida la extremidad contralateral a la lesión o, dicho de otro modo: los sujetos experimentales lesionados con LPS, 14dp a la cirugía, aún fueron capaces de utilizar la extremidad contralateral a la lesión, así pues, se deduce que el análogo hidroxilado de la DA causó un daño mayor respecto al administrado con LPS.

La asimetría motora ha sido relacionada con la disminución de los niveles de DA y de células DAérgicas. Uno de los métodos para evidenciar esto es mediante la inmunotinción de las neuronas

positivas a la proteína TH, esto es: a un menor número de neuronas TH<sup>+</sup>, existe mayor degeneración de estas células, una consecuente desregulación en los ganglios basales y la manifestación de la pérdida parcial de la función de las extremidades contralaterales a la lesión. Si bien, se ha afirmado que la disminución de la enzima TH no se equipara con la degeneración de estructuras neuronales propiamente dichas, ya que, reflejan la expresión fenotípica de las células TH<sup>+</sup> y no su viabilidad fundamental (Jeon *et al.*, 1995), trabajos previos han mostrado que la administración de 6-OHDA causa la disminución del uso de ambas extremidades anteriores y de la pata contralateral a la lesión que inicia a los 7 días y se mantiene hasta por 30 días posteriores a la cirugía (Mendieta *et al.*, 2012; Sánchez-González *et al.*, 2014; Patricio *et al.*, 2019), lo cual, sugiere la pérdida de la función de las neuronas DAérgicas. Así, Jeon *et al.* (1995) lo demostraron en un modelo de lesión nigral. Así, pues, el modelo de la 6-OHDA es el modelo tóxico clásico para el estudio de la EP, además, este modelo de lesión, ha sido probado en las condiciones del laboratorio en el que se desarrolló el presente trabajo. Con lo descrito, se puede afirmar que recreamos el modelo hemiparkinsoniano con la 6-OHDA.

En contraste con lo dicho, se ha afirmado que el modelo de LPS es un modelo de baja reproducibilidad (Tieu, 2011; Francardo, 2018) ya que, que requiere administrarse, en el núcleo estriado, más de 10 µg para causar la degeneración de las neuronas DAérgicas (Castaño *et al.*, 1998; Hoban *et al.*, 2013) y realizar de 4 a 8 inyecciones dispersas en todo el núcleo estriado (Hunter *et al.*, 2007a; Hunter *et al.*, 2007b; Hunter *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2009) para generar un modelo Parkinsoniano. Para el estudio del modelo inducido con LPS se decidió administrarlo en las mismas coordenadas espaciales usadas al administrar la 6-OHDA y tener un punto de comparación entre los modelos. Con este régimen de administración se logró causar una asimetría motora (**Figura 19**), que está relacionada con la relevante disminución de células TH<sup>+</sup> (**Figura 20**). Un hecho semejante se reportó por el grupo de trabajo dirigido por Bing (**Figura 7**) (Hunter *et al.*, 2007a; Hunter *et al.*, 2007b; Choi *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 2009; Hunter *et al.*, 2017), en que la administración de LPS causa una disminución progresiva del número de células TH<sup>+</sup> desde el séptimo día posterior a la inyección de tóxico, datos que son consistentes con lo descrito aquí al encontrar cambios en las células TH<sup>+</sup> desde el primer día de evaluación. Los datos de ese mismo grupo de trabajo muestran que la asimetría motora se manifiesta a partir de la primera semana posterior a la cirugía y se prolonga en el tiempo hacia la cuarta semana posterior a la lesión. Además, Choi, *et al.* (2009) encontró, en las muestras que analizó, *argirofilia*, es decir, que el LPS degenera a las células DAérgicas de la SNpc y a las terminales nerviosas en el núcleo estriado. Así pues, de acuerdo con los resultados obtenidos es factible afirmar que en las condiciones que bajo

las condiciones experimentales en que se realizó este proyecto se generó un modelo parkinsoniano inducido por LPS.

A pesar de las afirmaciones hechas por otros autores, es cierto que tres décadas de diferencia entre un modelo y otro abre muchísimas posibilidades de investigación, pero también es cierto que cada modelo, aunque pretenda responder a la misma pregunta, lo hace por mecanismos disímiles.

Por otra parte, es común encontrar en la literatura diversos artículos que afirman que la neurodegeneración es la consecuencia directa causada por la microgliosis cerebral, es decir: que la microgliosis es tóxica y, por tanto, es un factor determinante para causar la muerte de las células neuronales (Gao & Hong, 2008). Pues bien, de acuerdo con los resultados obtenidos, prestando especial atención a los grupos a los que se les administró alguno de los vehículos, se determinó lo siguiente: el grupo Ác. Ascórbico<sub>7dpi</sub> y el grupo SSI<sub>14dpi</sub> aumentaron, al menos, 1 y 0.5 veces el número de células positivas a IBA-1 respecto al grupo intacto (**Figura 22**), es decir: la administración de esas sustancias causó la microgliosis en el núcleo estriado, pero no en la SNpc o en la SNpr (**Figura 23**), además, las células TH<sup>+</sup>, de estos grupos, son semejantes en forma y número a las del grupo intacto (**Figura 20**) y a las de sus respectivos núcleos contralaterales (**Figura 21**). Es probable que la administración de ácido ascórbico causara, por una lado, que se inhibiera el transporte de glucosa (**Figura 5**) al interior de las neuronas y, al mismo tiempo, que incrementaran el consumo de ácido láctico —producto metabólico de los astrocitos— (Castro *et al.*, 2009). Es posible, además, que el daño que *per se* causa la cirugía: la introducción de la aguja y la infusión de la solución, aunado a las ROS producidas por el catabolismo de ácido láctico, haya activado a la microglía —vista como el incremento de células *preparadas* y *activadas* 1dpi de Ác. Ascórbico— provocando, a su vez, un nuevo incremento en la producción de ROS y la consecuente oxidación del ácido ascórbico al DHA. Este último, fungiría como intermediario metabólico, entraría a las rutas de generación energética para contribuir a cubrir las demandas catabólicas del momento (Braun *et al.*, 1996). Así pues, la aceleración del índice metabólico neuronal, inducido por los astrocitos y el propio daño celular provocado por la cirugía, causaron la activación y reclutamiento microglial —que se evidenció a los 7dp a la cirugía— y, se resolvió durante los 7 días siguientes, cuando la microglía restauró la homeostasis tisular y, las células gliales y neuronales, retornaron al metabolismo basal cuando hubieron consumídose, mediante las diversas rutas metabólicas, al ácido ascórbico —mostrando una disminución en el número de células IBA-1<sup>+</sup> y el retorno a las formas ramificadas 14dpi del Ác. Asc.—. Además, es probable que, cursados los 14

posteriores a la inyección de SSI, la microglía estaría resolviendo el daño causado por la cirugía y que, quizá, al no contar con el interruptor metabólico, trabaja de una manera no acelerada.

Continuando en este mismo sentido, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la microgliosis causada en el núcleo estriado por la administración de ácido ascórbico y por la microgliosis causada por la administración del LPS 7dpi. Sin embargo, en los grupos Ác. Ascórbico<sub>7dpi</sub> y Ác. Ascórbico<sub>14dpi</sub>, la cantidad de células TH<sup>+</sup> continúa siendo semejante al del grupo intacto, las células no se ven morfológicamente distintas (**Figura 20**), además, entre estos mismos grupos, en la SNpc, no varía el número de células IBA-1<sup>+</sup>. Por su parte, en la SNpc del grupo LPS<sub>7dpi</sub> existe una tendencia a incrementarse el número de células IBA-1<sup>+</sup>; a la vez que disminuyeron, por lo menos, el 50% de las células DAérgicas y las sobrevivientes se aprecian severamente lastimadas y en destrucción. Este mismo ejemplo puede retomarse, v. gr., con la microgliosis causada, 14dpi de SSI, LPS o 6-OHDA, mas resulta redundante ya que la situación parece ser semejante a la descrita arriba, con la salvedad de que el número de células TH<sup>+</sup>, en los grupos lesionados con los tóxicos, disminuyen respecto a sus controles, con los puntos temporales previos de evaluación ni con el grupo intacto; no obstante, es probable que la muerte de estas células no es causada por la microgliosis generada el mismo día de evaluación en el núcleo estriado y la SN, sino por el estímulo anterior, como se discutirá un poco más adelante.

Siguiendo el orden de ideas anterior, se pueden reafirmar los planteamientos hechos por investigadores como Karperien *et al* (2013), Morgan *et al* (2014), Penfield *et al* (1925), del Río-Hortega (1921) y Torres-Platas (2014), cuando aseveraban que las modificaciones estructurales de la microglía están íntimamente relacionadas con la función que desempeñan. Como se describió en el apartado *microglía*, las células de Hortega, están distribuidas homogéneamente en todo el encéfalo, están repartidas con cierta regularidad; no faltan en ningún punto, ni sus procesos se entremezclan. Así mismo, resulta interesante saber que, durante la maduración embrionaria de la microglía, esta, está casi exenta de expansiones protoplásmicas y que, conforme el cerebro termina de madurar, las células adquieren las formas ramificadas descritas con antelación. Además, que, al romper el estado de salud, la microglía vuelve a adquirir una forma pseudopódica, ameboide o redondeada. En ambos casos, en la génesis y en el daño, la microglía requiere trasladarse, motivados —también en ambos casos— por señales químicas para llegar al sitio específico, —en un caso de insulto tisular— llegar al sitio de lesión, repararlo y reestablecer la homeostasis del tejido dañado, o bien, degenerarlo crónicamente.

En un estado fisiológico, las formas habitualmente encontradas son las formas *ramificada* y *preparada* (**Figura 24, 25, 28 y 29**) para explorar más eficientemente, aumentar la superficie de contacto sobre el largo y el ancho del parénquima cerebral como lo describió Nimmerjahn *et al* (2005) y para que estén en contacto, las membranas de los microglíocitos llenos de receptores sensibles a daño, con el medio celular. En el tenor de lo anterior, parece no ser casual que en el curso temporal de las células *ramificadas* de los sujetos experimentales a los que se les administró ácido ascórbico, de tener ~50 células en estado fisiológico, el primer día posterior a la cirugía, disminuyeran a ~5 células por campo de estudio (**Figura 26c**) y, al mismo tiempo, las células *activadas* y *preparadas* aumentarían de ~50 células a ~70 células; más adelante en el tiempo, vuelven a aumentar las células *ramificadas* y al final del curso temporal estudiado, se reestablezcan las formas previas a la lesión (**Figura 25, 26C y 27A, B**). Especialmente en este grupo, al no aumentar el número de células IBA-1<sup>+</sup>, en el núcleo estriado, podemos sugerir que, tras la lesión causada por la cirugía y la administración del ácido ascórbico, las células *ramificadas* previas a la lesión, retrajeran los procesos más extensos y finos, por ello, disminuyó el número de células *ramificadas* y aumentó el de las *preparadas*, es posible, además, que las células *preparadas* preexistentes se hayan transformado, a su vez, en células *activadas* y *ameboides*. A lo largo de 7 días, repararon el daño —que bien pudo durar los 6 días siguientes que no estudiamos— y en el día 14pi casi reestablecerse el estado fisiológico, a tal punto que el proceso inflamatorio no se expandió en gran medida y no afectó a las células de la SN: ni microgliales, ni DAérgicas (**Figura 20 y 23**). Estos datos concuerdan con el argumento anterior sobre que la lesión causada por la cirugía y el ácido ascórbico, causaron el aumento del requerimiento energético celular, la integración del DHA a las vías metabólicas, su consecuente disminución en el medio extracelular y esto, a su vez, promovió la inflamación y migración microglial; sin embargo, ya que el daño no fue grave en exceso, el proceso inflamatorio se resolvió entre el primer y segundo punto temporal de evaluación y se reestableció la homeostasis tisular —mostrada como la recuperación de las formas con patrones ramificados semejantes a los vistos previos a la cirugía y con la restitución en el número de células IBA-1<sup>+</sup> durante el tercer punto temporal evaluado—. Asimismo, con estos datos puede, nuevamente, afirmarse que la neurodegeneración no está acompañada por la microgliosis cerebral, o más bien, que la microgliosis —que es una consecuencia de la inflamación y la inflamación, a su vez, está en función de la intensidad del estímulo inicial— puede ser tóxica o reparativa; mostrando lo dicho mediante la nula modificación numérica y morfológica de las células TH<sup>+</sup> de la SNpc ipsilateral a la lesión y, por tanto, con la ausencia de asimetría motora evidenciada por los resultados encontrados en el modelo del cilindro.

Por otra parte, según los datos indican, el caso más severo de inflamación, en el núcleo estriado, lo mostró la administración del LPS. Un día posterior a la cirugía, las células IBA-1<sup>+</sup> disminuyeron. Es plausible sugerir, de acuerdo con la **Figura 10**: sobre el mecanismo de toxicidad del LPS, que esta reducción pudiera deberse a que los microglíocitos hayan muerto, durante la fase aguda de la inflamación, por *piroptosis*, es decir: la activación del TLR, la subsecuente cascada de señalización que culmina en la traducción de pro-IL-1 $\beta$  y NLRP3, la ulterior activación de ambas proteínas y liberación de las citocinas proinflamatorias (Walsh *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2016; Jorgensen *et al.*, 2016; Galluzzi *et al.*, 2018) causaron la disminución de células IBA-1<sup>+</sup> vistas en la **Figura 22**. Es posible, además, que haya existido un recambio celular completo en el sitio de inyección y que, durante un día, las células adyacentes y distantes hayan migrado al sitio de lesión. Además, se evidencia la presencia de células monocito/macrófago no microgliales y células ameboides, las cuales, al ser las que se muestran mayoritariamente en estados inflamatorios crónico-tóxicos, quizá, desencadenaran una onda de reacción inflamatoria, reclutamiento y diferenciación. Esta onda de activación, aunque aparentemente irrelevante para las células microgliales de la SN —pues, apenas se aprecian algunas células activadas— no lo es así para el resto de las células del microambiente, ya que, como indica la **Figura 32**, se evidencian posibles cuerpos apoptóticos, células oncóticas (**Fig. 32 #**), picnóticas (**Fig. 32 ♠**) y núcleos multilobulados (**Fig. 32 \***), todos ellos, con las técnicas de tinción usadas, de imposible determinación ontológica. Durante los 6 días ulteriores, en el estriado, las células IBA-1<sup>+</sup> mantuvieron el elevado estado de polarización, acaso proinflamatorio, quimioatrayente y tóxico, evidenciado en este estudio, a 7 días de la infusión del inflamógeno —incluso es plausible afirmar que este es el punto más alto de la respuesta inflamatoria próximo al sitio de lesión—; ya que, primero: se duplicó el número de células IBA-1<sup>+</sup> respecto al grupo control; segundo: el número de células ameboides es mayor respecto a todos los grupos (~3 veces mayor a las células ameboides del grupo LPS<sub>1dpi</sub>, dos ~2 veces mayor al grupo LPS<sub>14dpi</sub> y ~17 veces respecto al grupo 6-OHDA<sub>7dpi</sub> **Figura 226B y 27D**) y, aunque sin significancia estadística, aún hay presencia de células macrófago/monocíticas; tercero: aunque no mostramos los datos, la corteza motora ipsilateral está poblada por células en estado preparado y activado, aun, en la región del cuerpo calloso y en una parte de la corteza contralateral se muestran células IBA-1<sup>+</sup> en estado preparado. A partir de estas observaciones, es posible sugerir que, en este punto temporal, existe fragilidad de la BBB y que, en el microambiente tisular, aún se están enviando señales quimiotácticas captadas por las células de la periferia y las células aledañas. Además, la promoción de la inflamación continúa expandiéndose. En contraste con los otros grupos eutanasiados 7dpi que, aunque muestran un microgliosis cerebral, no muestran el mismo número

de células con formas relacionadas con la promoción de la inflamación y, con ello, en ese punto temporal, no hay degeneración. Así mismo, en la región de la SN —como se describió arriba— las células TH<sup>+</sup> están francamente dañadas, se encontraron núcleos deformes, células apoptóticas (**Fig. 32** →), cuerpos carioplásmicos (**Fig. 32** ▲▲) y microglía que aparentemente se encuentra sobre núcleos neuronales o núcleos presuntamente microgliales muy próximos a células TH<sup>+</sup> (**Fig. 32** ◆). Las células de Hortega, 14dpi del inflamógeno, incrementan en número total, pero las células *ameboides* se redujeron casi a la mitad y las *activadas* aumentaron casi ~8 veces, lo cual, implicaría, por el número de células, que las células ameboides se transformaron en su forma menos reactiva más próxima: la *activada* (**Figura 26B**). En este sentido, no obstante que el número de células microgliales es mayor en este punto temporal que en el anterior, o, dicho de otro modo: la microgliosis (14dpi) es significativamente mayor que en el día de evaluación anterior (7dpi), las células microgliales tienen menor capacidad de inducción de la inflamación y, por tanto, seguramente, más allá de los 14 días posteriores a la cirugía, la inflamación en el núcleo estriado empezaría a resolverse. Siguiendo la descripción como en el caso anterior, en la SN se generó una microgliosis y un mayor número de células *ameboides* y *activadas*, es decir, en esta región, pasados 14 días luego de una administración intraestriatal, se alcanza el punto más alto del estado inflamatorio, bien tóxico, o bien, de reparación porque, como se describió previamente, desde el séptimo día ulterior a la administración de LPS, las células TH<sup>+</sup> ya estaban inexorablemente dañadas y, según se aprecia en el mismo panel y en el conteo celular, múltiples células ya murieron y otras están en proceso de muerte (**Figura 32**). Esta ola de procesos promovidos por la inflamación a partir de la administración de LPS en el núcleo estriado como la producción de proteínas proinflamatorias, la promoción de ROS, un alto requerimiento energético, hipoxia tisular e inhibición de las funciones normales de la mitocondria (Hunter *et al.*, 2017) y su rápida propagación podrían ser los factores causantes del ambiente tóxico observado en la SNpc desde el primer día de evaluación, además, el sostenimiento de estos factores tóxicos por, al menos, 7 días, sería la causa de la disminución de las células TH<sup>+</sup> y, por tanto, la causa de la asimetría motora observada 14dpi de LPS. Sin embargo, es posible que a partir del día 8pi los procesos de inflamación tóxica empezara a resolverse y la microglía empezara a tornarse, bien, reparativa y compensadora de los sistemas que modulan los ganglios basales fagocitando las vías de entrada, hiperactivas, del núcleo subtalámico (SNT) (Aono *et al.*, 2017) y, por ello, los sujetos experimentales administrados con LPS, 14dpi, muestran un mayor uso de la extremidad contralateral a la lesión.

Del mismo modo que lo anteriormente descrito, —quizá, debido al propio mecanismo de toxicidad— el análogo tóxico de la DA, causa una inflamación severa al inicio, mas de pronta resolución. Esto es: es probable que la producción excesiva de ROS sea la principal fuente de los cambios morfológicos microgliales y de la muerte celular inducida un 1dpi del tóxico (**Figura 22**) y, en ningún caso, la estimulación de TLRs es relevante para la inducción de la inflamación (McCabe *et al.*, 2017). Así mismo, es muy probable que las capacidades antioxidantes del ácido ascórbico se vean rebasadas (Patricio *et al.*, 2019) por la capacidad prooxidante de la 6-OHDA, por lo que no habría forma para que contribuyera al flujo de lactato al medio, pero su metabolito, DHA, sí participaría como intermediario metabólico para formar glucosa y coadyubar a cumplir los requerimientos energéticos del momento (**Figura 5**), así mismo, la disminución del sistema antioxidante causaría que no fuera posible el reciclamiento del ascorbato, su consecuente, disminución del medio y la promoción de la inflamación, mostrada como una disminución estadísticamente significativa en el número de células IBA-1<sup>+</sup> con formas que disminuyen el patrón de *ramificación* y un aumento significativo en el número de células *redondeadas* respecto al grupo control intacto (Portugal *et al.*, 2017a; Portugal *et al.*, 2017b). Además, en los sujetos del grupo 6-OHDA<sub>7dpi</sub> hubo un incremento de, al menos, 0.2 veces en el número de células IBA-1<sup>+</sup> respecto al control intacto, esto es: se manifestó una microgliosis respecto al grupo intacto, 0.3 veces menor respecto al grupo Ác. Ascorbico<sub>7dpi</sub> y LPS<sub>7dpi</sub>, la deferencia entre estos tres grupos, como ya se indicó, radica en que en el grupo LPS<sub>7dpi</sub> las células están más sesgadas a las formas *redondeadas* y las del grupo 6-OHDA<sub>7dpi</sub> y Ác. Ascorbico<sub>7dpi</sub> hacia las *ramificadas*, de acuerdo con el análisis morfológico mostrado en las **figuras 26 y 27**. Es plausible, asimismo, intuir que la disminución en el número de células microgliales vistas 1dpi de la 6-OHDA haya sido causada por la muerte de las células IBA-1<sup>+</sup> mediante un proceso apoptótico —inducido por el exceso de ROS— y que es asociada a una respuesta inflamatoria robusta con señales de sobrevivencia o algún otro tipo de muerte celular regulada inducida por los efectos tóxicos propios de la 6-OHDA (Galluzzi *et al.*, 2018). Quizá esto explique por qué, 7dpi de 6-OHDA, hay un menor número de células IBA-1<sup>+</sup> que 7dpi de LPS y, en ese sentido, un mayor número de células *ramificadas* y *preparadas* y un menor número de células con formas que promueven la inflamación. Es sorprendente, asimismo, que el curso de cambios morfológicos que causa la 6-OHDA en el núcleo estriado es semejante a los vistos en el grupo Ác. Ascórbico, es decir, que, al inicio, disminuyen las células *ramificadas* y aumentan las *ameboides* y, conforme avanza el tiempo, se recuperan e incrementan las células de estados fisiológicos previos a la lesión y disminuyen las formas relacionadas con los procesos tóxicos (**Figuras 27A y B**). Además, aunando la información obtenida con las tinciones, se halló que

las neuronas DAérgicas y otros tipos celulares afectados, murieron factiblemente por apoptosis, que se manifiesta mediante núcleos picnóticos (**Fig. 32 ♠**) que se observaron, desde el primero hasta el séptimo día posterior a la infusión de la 6-OHDA, y la aparición de múltiples células apoptóticas 14dpi del tóxico (**Fig. 32 ►**) y por la nula disminución y deformación de las células TH<sup>+</sup> en el grupo lesionado con 6-OHDA. Con esto se infiere lo que se mencionó arriba: que la participación de la microglía en el proceso de daño o muerte celular en el modelo de la 6-OHDA es exiguo, por no decir nulo, por ello, no habría un elevado número de células IBA-1<sup>+</sup> ni en el estriado (**Figura 22B**) ni en la SN (**Figura 23B**) ni en un estado altamente reactivo, y, debido a esto, del primer estado inclinado a lo tóxico (durante 6-OHDA<sub>1dpi</sub>), prontamente retornan a los estados menos dañinos (durante 6-OHDA<sub>7dpi</sub>), posiblemente, antiinflamatorios, y hasta fagocíticos, como podría sugerirnos la fracción inferior izquierda de la **Figura 32 (♦)** (durante 6-OHDA<sub>14dpi</sub>).

El modelo parkinsoniano inducido con LPS, quizá, debido a la propia naturaleza inflamógena de la endotoxina y fina sensibilidad de la microglía, parece causar una muerte pronta, progresiva y constante de las neuronas DAérgicas (y probablemente de otros núcleos cerebrales), así como una respuesta inflamatoria más potente y sostenida. Además, que la causa de la muerte de las células DAérgicas puede deberse a distintos procesos como la pérdida de la comunicación microglia-neurona, producción de citocinas proinflamatorias, proteínas del complemento y quimiocinas, polarización de astrocitos a un estado A1 neurotóxico y, fagocitosis de cuerpos, axones y dendritas. En contraste con lo dicho, el modelo de lesión inducido con la 6-OHDA produce un modelo parkinsoniano fino, ya que se introduce selectivamente a las neuronas catecolaminérgicas y, degenera a las neuronas DAérgicas mediante la activación de las vías apoptótica, la oxidación de proteínas y DNA, así mismo, reproduce un modelo de inflamación, quizá, con escasa participación tóxica, ya que, como lo mostró McCabe *et al* (2017), el aumento en la expresión de RNA que traduciría TLR4, IL6, TNF $\alpha$ , en un modelo de lesión nigral con 6-OHDA es exiguo, respecto a los expresados en un modelo de idéntica lesión pero con LPS. Simultáneamente, en ninguna de las dos propuestas de lesión se ha podido crear un modelo de inflamación continua, puesto que en todos los casos, en el núcleo estriado, se muestran una curva cóncava de activación-desactivación ameboide y una curva convexa de desactivación-reactivación ramificada con una —digamos— amplitud proporcional a la intensidad del estímulo microglial (en la zona cercana al sitio de lesión [**Figura 26**] se evidencia de mejor modo), mientras que la cronicidad de la inflamación se vería manifiesta como un sostenimiento prolongado de células microgliales, macrófago y monocíticas, primero cercanas al sitio de lesión

y, luego, por ampliación, a las regiones aledañas, distantes y sensibles como se sugiere que es la naturaleza de las neuronas DAérgicas.

Finalmente, se podría proponer que un elevado número de células microgliales, no significa categóricamente neurodegeneración, tampoco la protección celular o la regeneración; más bien, es posible sugerir que el concepto que es usado para referirse a la descripción del incremento del número de células microgliales: microgliosis, es ambiguo y que, hacer converger tal proceso con el deterioro tisular, aunque es una práctica frecuente, apunta ser una relación equívoca y poco determinante. Aunado a esta línea de pensamiento, generar un perfil morfométrico parece aproximarse un poco más a la diversa naturaleza celular coexistente en un proceso que rompe el balance homeostático. Ahora bien, polarizar a la microglía de acuerdo con los cambios fenotípicos puede ser un segundo paso para la descripción cabal del proceso inflamatorio en los modelos que generamos, en dónde, el primer paso, bien puede ser la microgliosis y, el último, la descripción genotípica.

## **X. Conclusiones**

La administración intraestriatal de la 6-OHDA produce un modelo hemi-Parkinsoniano que provoca un microambiente celular tóxico, induce la formación de cuerpos apoptóticos y degenera a las células TH<sup>+</sup> de la SNpc retardadamente; así como un modelo inflamatorio moderado, caracterizado por un aumento en el número de células IBA-1<sup>+</sup> y la modificación en la estructura celular de la microglía de las formas ramificadas-basales, hacia las formas redondeadas-proinflamatorias y retornando a las células con patrones ramificados.

La administración intraestriatal del lipopolisacárido genera un modelo hemi-Parkinsoniano que induce un microambiente celular tóxico, causa la formación de cuerpos necróticos y degenera a las células TH<sup>+</sup> de la SNpc rápida y progresivamente; así como un modelo inflamatorio robusto, caracterizado por un aumento en el número de células IBA-1<sup>+</sup> y la modificación en la estructura celular de la microglía de las formas ramificadas-basales hacia las formas redondeadas-relacionadas con la promoción de la inflamación, el mantenimiento de estas formas durante los tres puntos temporales y la ampliación espacial del proceso inflamatorio desde el sitio de lesión hasta la SNpc.

## XI. Referencias

- Abbas, A., K., Lichtman, A., H. & Pillai, S. (2015) *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier, Barcelona, España.
- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- Akiyama, H. & McGeer, P.L. (1989) Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. *Brain Res*, **489**, 247-253.
- Andersson, P.B., Perry, V.H. & Gordon, S. (1992) The acute inflammatory response to lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neuroscience*, **48**, 169-186.
- Aono, H., Choudhury, M.E., Higaki, H., Miyanishi, K., Kigami, Y., Fujita, K., Akiyama, J.I., Takahashi, H., Yano, H., Kubo, M., Nishikawa, N., Nomoto, M. & Tanaka, J. (2017) Microglia may compensate for dopaminergic neuron loss in experimental Parkinsonism through selective elimination of glutamatergic synapses from the subthalamic nucleus. *Glia*, **65**, 1833-1847.
- Becher, B., Spath, S. & Goverman, J. (2017) Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol*, **17**, 49-59.
- Beltrán, F.A., Acuña, A.I., Miró, M.P. & Castro, M.A. (2012) Brain Energy Metabolism in Health and Disease. In Contreras, C.M. (ed) *Neuroscience - Dealing With Frontiers*,.
- Blandini, F. & Armentero, M.T. (2012) Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, **279**, 1156-1166

- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R. & Verna, J.M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, **65**, 135-172.
- Borst, K., Schwabenland, M. & Prinz, M. (2018) Microglia metabolism in health and disease. *Neurochem Int.*
- Bourdiol, F., Toulmond, S., Serrano, A., Benavides, J. & Scatton, B. (1991) Increase in omega 3 (peripheral type benzodiazepine) binding sites in the rat cortex and striatum after local injection of interleukin-1, tumour necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *Brain Res*, **543**, 194-200.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Armida, M., Cassano, T., Pèzzola, A., Potenza, R.L., Morgese, M.G., Popoli, P. & Alleva, E. (2008) Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J Neurosci Res*, **86**, 2050-2061.
- Braun, L., Puskás, F., Csala, M., Gyórfy, E., Garzó, T., Mandl, J. & Bánhegyi, G. (1996) Gluconeogenesis from ascorbic acid: ascorbate recycling in isolated murine hepatocytes. *FEBS Lett*, **390**, 183-186.
- Brown, A.M. & Ransom, B.R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, **55**, 1263-1271.
- Broz, P. & Dixit, V.M. (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*, **16**, 407-420.
- Caputa, G., Flachsmann, L.J. & Cameron, A.M. (2019) Macrophage metabolism: a wound-healing perspective. *Immunol Cell Biol.*
- Castaño, A., Herrera, A.J., Cano, J. & Machado, A. (1998) Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurochem*, **70**, 1584-1592.
- Castro, M.A., Beltrán, F.A., Brauchi, S. & Concha, I.I. (2009) A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *J Neurochem*, **110**, 423-440.
- Choi, D.Y., Liu, M., Hunter, R.L., Cass, W.A., Pandya, J.D., Sullivan, P.G., Shin, E.J., Kim, H.C., Gash, D.M. & Bing, G. (2009) Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One*, **4**, e5482.
- Choi, D.Y., Zhang, J. & Bing, G. (2010) Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. *Neurobiol Aging*, **31**, 1649-1653.
- Deumens, R., Blokland, A. & Prickaerts, J. (2002) Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, **175**, 303-317.
- Dienel, G.A. (2019) Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiol Rev*, **99**, 949-1045.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.C. & Shao, F. (2016) Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, **535**, 111-116.
- Dutta, G., Zhang, P. & Liu, B. (2008) The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol*, **22**, 453-464.
- Duty, S. & Jenner, P. (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol*, **164**, 1357-1391.
- Epelman, S., Lavine, K.J. & Randolph, G.J. (2014) Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, **41**, 21-35.
- Figueiredo-Pereira, M.E., Corwin, C. & Babich, J. (2016) Prostaglandin J2: a potential target for halting inflammation-induced neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, **1363**, 125-137.
- Flores-Martinez, Y.M., Fernandez-Parrilla, M.A., Ayala-Davila, J., Reyes-Corona, D., Blanco-Alvarez, V.M., Soto-Rojas, L.O., Luna-Herrera, C., Gonzalez-Barrios, J.A., Leon-Chavez, B.A., Gutierrez-Castillo, M.E., Martínez-Dávila, I.A. & Martinez-Fong, D. (2018) Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide. *J Immunol Res*, **2018**, 1838921.

- Francardo, V. (2018) Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options. *Behav Brain Res*, **352**, 142-150.
- Gage, G.J., Kipke, D.R. & Shain, W. (2012) Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*.
- Galluzzi, L. & Vitale, I. & Aaronson, S.A. & Abrams, J.M. & Adam, D. & Agostinis, P. & Alnemri, E.S. & Altucci, L. & Amelio, I. & Andrews, D.W. & Annicchiarico-Petruzzelli, M. & Antonov, A.V. & Arama, E. & Baehrecke, E.H. & Barlev, N.A. & Bazan, N.G. & Bernassola, F. & Bertrand, M.J.M. & Bianchi, K. & Blagosklonny, M.V. & Blomgren, K. & Borner, C. & Boya, P. & Brenner, C. & Campanella, M. & Candi, E. & Carmona-Gutierrez, D. & Cecconi, F. & Chan, F.K. & Chandel, N.S. & Cheng, E.H. & Chipuk, J.E. & Cidlowski, J.A. & Ciechanover, A. & Cohen, G.M. & Conrad, M. & Cubillos-Ruiz, J.R. & Czabotar, P.E. & D'Angiolella, V. & Dawson, T.M. & Dawson, V.L. & De Laurenzi, V. & De Maria, R. & Debatin, K.M. & DeBerardinis, R.J. & Deshmukh, M. & Di Daniele, N. & Di Virgilio, F. & Dixit, V.M. & Dixon, S.J. & Duckett, C.S. & Dynlacht, B.D. & El-Deiry, W.S. & Elrod, J.W. & Fimia, G.M. & Fulda, S. & García-Sáez, A.J. & Garg, A.D. & Garrido, C. & Gavathiotis, E. & Golstein, P. & Gottlieb, E. & Green, D.R. & Greene, L.A. & Gronemeyer, H. & Gross, A. & Hajnoczky, G. & Hardwick, J.M. & Harris, I.S. & Hengartner, M.O. & Hetz, C. & Ichijo, H. & Jäättelä, M. & Joseph, B. & Jost, P.J. & Juin, P.P. & Kaiser, W.J. & Karin, M. & Kaufmann, T. & Kepp, O. & Kimchi, A. & Kitsis, R.N. & Klionsky, D.J. & Knight, R.A. & Kumar, S. & Lee, S.W. & Lemasters, J.J. & Levine, B. & Linkermann, A. & Lipton, S.A. & Lockshin, R.A. & López-Otín, C. & Lowe, S.W. & Luedde, T. & Lugli, E. & MacFarlane, M. & Madeo, F. & Malewicz, M. & Malorni, W. & Manic, G. & Marine, J.C. & Martin, S.J. & Martinou, J.C. & Medema, J.P. & Mehlen, P. & Meier, P. & Melino, S. & Miao, E.A. & Molkentin, J.D. & Moll, U.M. & Muñoz-Pinedo, C. & Nagata, S. & Nuñez, G. & Oberst, A. & Oren, M. & Overholtzer, M. & Pagano, M. & Panaretakis, T. & Pasparakis, M. & Penninger, J.M. & Pereira, D.M. & Pervaiz, S. & Peter, M.E. & Piacentini, M. & Pinton, P. & Prehn, J.H.M. & Puthalakath, H. & Rabinovich, G.A. & Rehm, M. & Rizzuto, R. & Rodrigues, C.M.P. & Rubinsztein, D.C. & Rudel, T. & Ryan, K.M. & Sayan, E. & Scorrano, L. & Shao, F. & Shi, Y. & Silke, J. & Simon, H.U. & Sistigu, A. & Stockwell, B.R. & Strasser, A. & Szabadkai, G. & Tait, S.W.G. & Tang, D. & Tavernarakis, N. & Thorburn, A. & Tsujimoto, Y. & Turk, B. & Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. & Vander Heiden, M.G. & Villunger, A. & Virgin, H.W. & Vousden, K.H. & Vucic, D. & Wagner, E.F. & Walczak, H. & Wallach, D. & Wang, Y. & Wells, J.A. & Wood, W. & Yuan, J. & Zakeri, Z. & Zhivotovsky, B. & Zitvogel, L. & Melino, G. & Kroemer, G. (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, **25**, 486-541.
- Gao, H.M. & Hong, J.S. (2008) Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol*, **29**, 357-365.
- Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, **3**, 23-35.
- Gordon, S., Plüddemann, A. & Martinez Estrada, F. (2014) Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev*, **262**, 36-55.
- Gordon, S. & Taylor, P.R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, **5**, 953-964.
- Hamidi, M., Drevets, W.C. & Price, J.L. (2004) Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry*, **55**, 563-569.
- Headland, S.E. & Norling, L.V. (2015) The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*, **27**, 149-160.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P. & Latz, E. (2014) Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, **14**, 463-477.
- Hernandez-Baltazar, D., Mendoza-Garrido, M.E. & Martinez-Fong, D. (2013) Activation of GSK-3 $\beta$  and caspase-3 occurs in Nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine. *PLoS One*, **8**, e70951.
- Hoban, D.B., Connaughton, E., Connaughton, C., Hogan, G., Thornton, C., Mulcahy, P., Moloney, T.C. & Dowd, E. (2013) Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of

- intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. *Brain Behav Immun*, **27**, 91-100.
- Huber-Lang, M., Lambris, J.D. & Ward, P.A. (2018) Innate immune responses to trauma. *Nat Immunol*, **19**, 327-341.
- Hunter, R., Ojha, U., Bhurtel, S., Bing, G. & Choi, D.Y. (2017) Lipopolysaccharide-induced functional and structural injury of the mitochondria in the nigrostriatal pathway. *Neurosci Res*, **114**, 62-69.
- Hunter, R.L., Cheng, B., Choi, D.Y., Liu, M., Liu, S., Cass, W.A. & Bing, G. (2009) Intra-striatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res*, **87**, 1913-1921.
- Hunter, R.L., Choi, D.Y., Kincer, J.F., Cass, W.A., Bing, G. & Gash, D.M. (2007a) Fenbendazole treatment may influence lipopolysaccharide effects in rat brain. *Comp Med*, **57**, 487-492.
- Hunter, R.L., Choi, D.Y., Ross, S.A. & Bing, G. (2008) Protective properties afforded by pioglitazone against intra-striatal LPS in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett*, **432**, 198-201.
- Hunter, R.L., Dragicevic, N., Seifert, K., Choi, D.Y., Liu, M., Kim, H.C., Cass, W.A., Sullivan, P.G. & Bing, G. (2007b) Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem*, **100**, 1375-1386.
- Imbriani, P., Sciamanna, G., Santoro, M., Schirinzi, T. & Pisani, A. (2018) Promising rodent models in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, **46 Suppl 1**, S10-S14.
- Jeon, B.S., Jackson-Lewis, V. & Burke, R.E. (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration*, **4**, 131-137.
- Joers, V., Tansey, M.G., Mulas, G. & Carta, A.R. (2017) Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol*, **155**, 57-75.
- Jorgensen, I., Zhang, Y., Krantz, B.A. & Miao, E.A. (2016) Pyroptosis triggers pore-induced intracellular traps (PITs) that capture bacteria and lead to their clearance by efferocytosis. *J Exp Med*, **213**, 2113-2128.
- Karperien, A., Ahammer, H. & Jelinek, H.F. (2013) Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*, **7**, 3.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M. & Verkhratsky, A. (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev*, **91**, 461-553.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A. (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, **77**, 10-18.
- Kindt, t., J., Goldsby, r., A. & Osborne, B., A. (2007a) *Inmunología de Kuby*. Mc Graw Hill, D. F., México.
- Korbo, L. (1999) Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, **23**, 164-168.
- Kovacs, S.B. & Miao, E.A. (2017) Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Trends Cell Biol*, **27**, 673-684.
- Latz, E., Xiao, T.S. & Stutz, A. (2013) Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, **13**, 397-411.
- Lee, S.W., Gajavelli, S., Spurlock, M.S., Andreoni, C., de Rivero Vaccari, J.P., Bullock, M.R., Keane, R.W. & Dietrich, W.D. (2018) Microglial Inflammasome Activation in Penetrating Ballistic-Like Brain Injury. *J Neurotrauma*.
- Li, Q. & Barres, B.A. (2017) Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*.
- Liu, M. & Bing, G. (2011) Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, **2011**, 327089.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, **25**, 677-686.
- Mao, Z., Liu, C., Ji, S., Yang, Q., Ye, H., Han, H. & Xue, Z. (2017) The NLRP3 Inflammasome is Involved in the Pathogenesis of Parkinson's Disease in Rats. *Neurochem Res*, **42**, 1104-1115.

- Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J.B., Medhurst, A.D. & Dexter, D.T. (2009) Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem*, **110**, 966-975.
- Martinez, F.O. & Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, **6**, 13.
- McCabe, K., Concannon, R.M., McKernan, D.P. & Dowd, E. (2017) Time-course of striatal Toll-like receptor expression in neurotoxic, environmental and inflammatory rat models of Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*, **310**, 103-106.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E. & McGeer, E.G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, **38**, 1285-1291.
- Mendieta, L., Bautista, E., Sánchez, A., Guevara, J., Herrando-Grabulosa, M., Moran, J., Martínez, R., Aguilera, J. & Limón, I.D. (2012) The C-terminal domain of the heavy chain of tetanus toxin given by intramuscular injection causes neuroprotection and improves the motor behavior in rats treated with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Res*, **74**, 156-167.
- Morgan, J.T., Barger, N., Amaral, D.G. & Schumann, C.M. (2014) Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. *PLoS One*, **9**, e110356.
- Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N. & Wynn, T.A. (2014) Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, **41**, 14-20.
- Murray, P.J. & Wynn, T.A. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, **11**, 723-737.
- Nakajima, W., Ishida, A., Lange, M.S., Gabrielson, K.L., Wilson, M.A., Martin, L.J., Blue, M.E. & Johnston, M.V. (2000) Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat. *J Neurosci*, **20**, 7994-8004.
- Nations, U. (2017) World Population Prospects: Total Population - Both Sexes. De facto population in a country, area or region as of 1 July of the year indicated. Figures are presented in thousands.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, **308**, 1314-1318.
- Orihuela, R., McPherson, C.A. & Harry, G.J. (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, **173**, 649-665.
- Patricio, F., Parra, I., Martínez, I., Pérez-Severiano, F., Montes, S., Aguilera, J., Limón, I.D., Tizabi, Y. & Mendieta, L. (2019) Effectiveness of Fragment C Domain of Tetanus Toxin and Pramipexole in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res*.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007) *The Rat Brain. In stereotaxic coordinates*. Press, San Diego, California, U. S. A.
- Pelvig, D.P., Pakkenberg, H., Stark, A.K. & Pakkenberg, B. (2008) Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol Aging*, **29**, 1754-1762.
- Penfield, W. (1925) Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas. *Am J Pathol*, **1**, 77-90.15.
- Phillips, N.L.H. & Roth, T.L. (2019) Animal Models and Their Contribution to Our Understanding of the Relationship Between Environments, Epigenetic Modifications, and Behavior. *Genes (Basel)*, **10**.
- Pintado, C., Revilla, E., Vizuete, M.L., Jiménez, S., García-Cuervo, L., Vitorica, J., Ruano, D. & Castaño, A. (2011) Regional difference in inflammatory response to LPS-injection in the brain: role of microglia cell density. *J Neuroimmunol*, **238**, 44-51.

- Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S. & Carta, A.R. (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- $\gamma$  agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **71**, 280-291.
- Portugal, C.C., Socodato, R., Canedo, T., Silva, C.M., Martins, T., Coreixas, V.S., Loiola, E.C., Gess, B., Röhr, D., Santiago, A.R., Young, P., Minshall, R.D., Paes-de-Carvalho, R., Ambrósio, A.F. & Relvas, J.B. (2017a) Caveolin-1-mediated internalization of the vitamin C transporter SVCT2 in microglia triggers an inflammatory phenotype. *Sci Signal*, **10**.
- Portugal, C.C., Socodato, R. & Relvas, J.B. (2017b) The ascorbate transporter SVCT2 to target microglia-dependent inflammation. *Oncotarget*, **8**, 99217-99218.
- Prinz, M., Erny, D. & Hagemeyer, N. (2017) Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol*, **18**, 385-392.
- Prinz, M. & Priller, J. (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 300-312.
- Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. & Kwiatkowska, K. (2015a) Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*, **72**, 557-581.
- Płóciennikowska, A., Zdioruk, M.I., Traczyk, G., Świątkowska, A. & Kwiatkowska, K. (2015b) LPS-induced clustering of CD14 triggers generation of PI(4,5)P2. *J Cell Sci*, **128**, 4096-4111.
- Romero-Hurtado, S. & Iregui, C.A. (2010) El lipopolisacárido. *Revista de medicina Veterinaria*, 37-45.
- Río-Hortega, P.d. (1921) Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglía. *Memorias de la Real Sociedad Española de Historia Natural*, **11**, 213 - 268.
- Saijo, K. & Glass, C.K. (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, **11**, 775-787.
- Salama, A., Ibrahim, W., Tousson, E., Sakr, S., Masoud, M., Akela, M. & M., E.-R. (2015) Epigenetic study of Parkinson's Disease in experimental animal model. *International journal of clinical and experimental neurology*, **3**, 11-20.
- Salud, S.d. (2002) Programa de Acción en Salud Mental. In Salud, S.d. (ed).
- Salud, S.d. (2010) Diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Parkinson inicial y avanzada en el tercer nivel de atención. In Salud, S.d. (ed), México.
- Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L. & Bland, S.T. (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, **39**, 777-787.
- Segura-Aguilar, J. & Kostrzewa, R.M. (2015) Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: an update. *Neurotox Res*, **27**, 328-354.
- Segura-Aguilar, J., Paris, I., Muñoz, P., Ferrari, E., Zecca, L. & Zucca, F.A. (2014) Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*, **129**, 898-915.
- Singer, T.P. & Ramsay, R.R. (1990) Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update. *FEBS Lett*, **274**, 1-8.
- Sochocka, M., Diniz, B.S. & Leszek, J. (2017) Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*, **54**, 8071-8089.
- Stern, E.L., Quan, N., Proescholdt, M.G. & Herkenham, M. (2000) Spatiotemporal induction patterns of cytokine and related immune signal molecule mRNAs in response to intrastriatal injection of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, **109**, 245-260.
- Stott, S.R. & Barker, R.A. (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, **39**, 1042-1056.
- Sánchez-González, A., Mendieta, L., Palafox, V., Candalija, A., Luna, F., Aguilera, J. & Limón, I.D. (2014) The restorative effect of intramuscular injection of tetanus toxin C-fragment in hemiparkinsonian rats. *Neurosci Res*, **84**, 1-9.

- Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C. & Takahashi, R.N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **156**, 830-840.
- Tieu, K. (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **1**, a009316.
- Tillerson, J.L., Cohen, A.D., Philhower, J., Miller, G.W., Zigmond, M.J. & Schallert, T. (2001) Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J Neurosci*, **21**, 4427-4435.
- Torres-Platas, S.G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G.D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B. & Mechawar, N. (2014) Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation*, **11**, 12.
- Tufekci, K.U., Genc, S. & Genc, K. (2011) The endotoxin-induced neuroinflammation model of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*, **2011**, 487450.
- Walker, D.G. & Lue, L.F. (2015) Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther*, **7**, 56.
- Walsh, J.G., Muruve, D.A. & Power, C. (2014) Inflammasomes in the CNS. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 84-97.
- Walsh, S., Finn, D.P. & Dowd, E. (2011) Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. *Neuroscience*, **175**, 251-261.
- Wang, L.D. & Wagers, A.J. (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 643-655.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.