



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**SEDE SUR**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**Estudio de la participación de las células cebadas en un  
modelo experimental de la enfermedad de Huntington**

**TESIS QUE PRESENTA**

Q.F.B. Pablo Eliasib Martínez Gopar

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN**

**NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

**Directores de Tesis**

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Francisca Pérez Severiano

**El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Sede Sur y en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. La tesis fue realizada bajo la co-tutoría de las Dras. Claudia González Espinosa y Francisca Pérez Severiano.**

**El desarrollo del presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto CB-1122 (CGE) y Beca 422820 (PEMG).**

**DEDICADO A MIS PADRES MARÍA SOLEDAD Y PABLO MIS DOS GRANDES  
EJEMPLOS DE VIDA**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutoras dos grandes ejemplos de dedicación y pasión por la investigación:

Dra. Francisca Pérez Severiano, por sus enseñanzas y buenos consejos durante la realización de esta tesis, por haberme guiado desde la licenciatura donde inicie el gusto por el saber y la investigación y por su apoyo tanto en lo académico como en lo personal, ha llegado a ser una persona muy importante dentro de mi vida.

Dra. Claudia Gonzales Espinosa, por la oportunidad que me brindó de formar parte de su laboratorio, sus buenas observaciones y su gran capacidad para encaminar a los alumnos a llevar a cabo proyectos de buena calidad, agradezco su paciencia y su buena disposición en la realización de este trabajo.

A mis sínodos:

Dra. Carolina López Ruvalcaba, por sus buenas observaciones en la realización de esta tesis por sus aportes en cada avance y en la escritura de esta tesis.

Dr. Juan Carlos Martínez Lascano, por su buena disposición y sus observaciones detalladas de lo que se llevaba a cabo en este proyecto, por sus preguntas muy acertadas con respecto al proyecto y lo que llevó a aumentar mis perspectivas de este, así como en centrarlo en lo que se estaba realizando.

A mi familia:

A mis padres, María Soledad Gopar Jarquín y Pablo Martínez Vásquez, los cuales son un ejemplo de vida, por los valores que me inculcaron, por su paciencia y su apoyo incondicional en este viaje que decidí emprender y que, aunque en un principio no parecían tan de acuerdo su confianza en mí y su gran amor les permitió ayudarme a llevar a cabo este trabajo.

A mis hermanos, Luis Jeshuandi y Adrian, los cuales conocen el valor de una buena preparación y que hemos sabido aprovechar el gran regalo que nos han brindado nuestros padres de seguir nuestros sueños.

A toda mi familia, a mis abuelos, a mis tíos, a mis primos. Gracias por hacerme sentir parte de esta gran familia y por todos los buenos momentos.

A mis amigos:

A Rodrigo mi gran amigo del alma que me ha apoyado y ha soportado los momentos más estresantes que he vivido, por sus buenos consejos y por siempre guiarme a ser una mejor persona, de igual manera agradezco a su familia la cual me ha recibido con aprecio en cada visita que realizo.

A mis amigos de la licenciatura, Oscar, Alfredo, Israel, Aliz y JP que creyeron en mí para llevar a cabo este trabajo y que estuvieron apoyándome desde la licenciatura con sus buenos consejos.

A mis amigos que hice durante la maestría, David, Mariana, Isabel, Yarim, Aby, Abraham, Fany y Shadow, los cuales hemos vivido juntos este nuevo reto y con los cuales he pasado una nueva experiencia de vida.

A mis compañeros y amigos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Alfredo, Daniela, Paco y en especial a la Dra. Adriana Morales Martínez quien me ha enseñado tanto desde que inicié mi interés en la investigación y con quien he aprendido mucho y he vivido muy buenos momentos.

A mis compañeros del laboratorio 11 del departamento de Farmacobiología, Mariam, Carlita, Faby, Zyan, Itzel, Deysi, Dulce, Jorge y Jonathan que con ellos he visto lo que es la dedicación y gusto por la investigación.

A la comunidad CINVESTAV Sede – Sur:

Al auxiliar del laboratorio 11 Alfredo Ibarra por su apoyo y enseñanzas dentro del laboratorio y a Rodolfo por ayudarnos en el laboratorio para mantener todo en orden

A todos los profesores del departamento de Farmacobiología los cuales ayudaron a mi formación en la maestría.

Un agradecimiento especial a todo el personal del bioterio, de limpieza, de vigilancia y de administración del departamento de Farmacobiología del CINVESTAV Sede-Sur.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	I
RESUMEN.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
1. Introducción .....	1
1.1. Células cebadas .....	2
1.1.1. Distribución de las CC en el Sistema Nervioso Central (SNC) .....	2
1.1.2. Activación.....	3
1.1.3. Principales mediadores liberados por la Células cebadas con acción en el SNC .....	4
1.1.4. Función de las células cebadas en el SNC.....	7
1.1.5. Patologías cerebrales y células cebadas .....	9
1.1.6. Modelo de estudio de las eélulas cebadas in vivo.....	11
1.2. Enfermedades neurodegenerativas.....	13
1.2.1. Enfermedad de Huntington .....	13
2. Justificación .....	18
3. Hipótesis General.....	19
4. Objetivo general .....	19
4.1. Objetivos específicos.....	19
5. Metodología .....	20
5.1. Material biológico .....	20
5.2. Modelo neuroquímico inducido por la lesión estereotáxica con ácido quinolínico .....	21
5.3. Disección del tejido cerebral .....	21
5.4. Conducta.....	22
5.4.1. Evaluación conductual.....	22

5.4.2.	Medición de los niveles de GABA .....	22
5.5.	Medición del daño oxidante .....	23
5.5.1.	Cuantificación de la peroxidación de lípidos .....	23
5.5.2.	Cuantificación de la formación de especies reactivas a oxígeno .....	23
5.6.	Cuantificación de proteínas por BCA .....	24
5.7.	Reconstitución con Células cebadas .....	24
5.7.1.	Obtención de BMMC .....	24
5.7.2.	Reconstitución intraperitoneal .....	24
5.7.3.	Reconstitución intracerebroventricular .....	25
5.8.	Administración intracerebroventricular de Histamina .....	25
5.9.	Histología .....	25
5.9.1.	Tinción azul de toluidina .....	25
5.10.	Estadística .....	26
6.	Resultados .....	27
7.	Discusión .....	39
7.1.	Conducta de giro .....	40
7.2.	Contenido de GABA .....	42
7.3.	Daño oxidante .....	44
7.4.	Daño inflamatorio .....	45
7.5.	Reconstitución ICV de CC .....	48
8.	Conclusiones .....	51
9.	Perspectivas .....	51
10.	Referencias .....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1 Activación de las Células Cebadas y liberación de productos .....	4
Figura. 2 Relación entre el número de repetidos de CAG y la edad de inicio de la enfermedad de Huntington.....	14
Figura. 3 Los ganglios basales en la enfermedad de Huntington.....	16
Figura. 4 Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ ratones <i>W-sh</i> .....	27
Figura. 5 Contenido de GABA después de la lesión con AQ ratones <i>W-sh</i> ..	28
Figura. 6 Producción de EROs después de la lesión con AQ ratones <i>W-sh</i> ..	29
Figura. 7 Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ ratones <i>W-sh</i> .....	29
Figura. 8 Imágenes representativas del estriado de los diferentes grupos analizados posterior a la reconstitución ICV con BMMC.....	31
Figura. 9 Promedio del coteo de CC en el estriado.....	32
Figura. 10 Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ reconstitución IP .....	33
Figura. 11 Producción de EROs después de la lesión con AQ reconstitución IP .....	34
Figura. 12 Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ reconstitución IP .....	34
Figura. 13 Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ reconstitución ICV.....	35
Figura. 14 Niveles de GABA estriatal después de la lesión con AQ reconstitución ICV.....	36
Figura. 15 Producción de EROs después de la lesión con AQ reconstitución ICV .....	36
Figura. 16 Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ reconstitución ICV.....	36
Figura. 17 Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ administración de Hist.....	37
Figura. 18 Niveles de GABA estriatal después de la lesión con AQ administración de Hist.....	38
Figura. 19 Producción de EROs después de la lesión con AQ administración de Hist.....	38
Figura. 20 Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ administración de Hist.....	39
Figura. 21. Esquema propuesto de los posibles mecanismos de daño que se llevan a cabo en el modelo del AQ.....	49



## RESUMEN

La enfermedad de Huntington (HD) es un trastorno neurodegenerativo hereditario causado por una mutación en el exón 1 del gen de la huntingtina, cursa con pérdida neuronal y respuesta neuroinflamatoria entre otros procesos patológicos. Se ha encontrado que las células cebadas (CC) participan en procesos inflamatorios donde la histamina (Hist) participa como su principal mediador. En varios modelos de neuroinflamación, la Hist se ha utilizado para potenciar los efectos citotóxicos mediados por el receptor de NMDA. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar la participación de las CC durante el establecimiento del daño neurológico y el estrés oxidante en un modelo de excitotoxicidad inducido por la administración intraestriatal de ácido quinolínico (AQ) en ratones. Ratones *W-sh / w-sh* (*W-sh*) deficientes en CC y *C57BL6 / J* se inyectaron intraestriatalmente con AQ (30 nmoles /  $\mu\text{L}$ ), se midió la conducta de giros, contenido de GABA estriatal, peroxidación de lípidos (PL) y la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Los ratones *W-sh* presentaron una menor conducta de giros y se encontraron niveles más bajos de GABA, PL y EROs en comparación con el grupo de control. Para establecer la relación entre la presencia de CC y la susceptibilidad de los ratones al daño inducido por AQ, los ratones *W-sh* se reconstituyeron con CC obtenidas a partir de médula ósea de ratones. La reconstitución con CC de médula ósea (BMMC) se realizó mediante la administración intraperitoneal (IP) ( $5 \times 10^6$  células) e intracerebroventricular (ICV) ( $5 \times 10^5$  células). En paralelo, se administró un grupo independiente de ratones *W-sh* con 5 microgramos (ICV) de Hist. Nuestros resultados demostraron que los ratones reconstituidos con BMMC IP no mostraban diferencia con respecto al control mientras que los reconstituidos ICV y los administrados con Hist no estaban protegidos en la conducta de giros y mostraron niveles intraestriatales de GABA muy similares a los encontrados en animales del grupo de control. Los datos obtenidos evidencian la participación de las CC en el daño inducido por AQ. Por lo tanto, este estudio proporciona evidencia interesante sobre la participación de la Hist liberada a partir de las CC aumentando el daño neurológico y oxidativo en este modelo de excitotoxicidad de la EH.

## **ABSTRACT**

Huntington's disease (HD) is a hereditary neurodegenerative disorder caused by a mutation in exon 1 of the huntingtin gene and it courses with neuronal loss and neuroinflammatory response among other pathological processes. Mast cells (MCs) have been found to participate in inflammatory processes involving histamine (Hist) as their principal mediator. In several neuroinflammation models, Hist has been used to potentiate NMDA receptor-mediated cytotoxic effects. This study is aimed to characterize the participation of MCs during the establishment of neurological damage and oxidative stress in a mouse model of excitotoxicity induced by intrastriatal administration of quinolinic acid (AQ). MCs-deficient Kit w-sh/w-sh (W-sh) and C57BL6/J mice were injected intrastrially with AQ (30 nmoles/ $\mu$ L) and ipsilateral turns, striatal GABA content, lipid peroxidation (LP) and reactive oxygen species (ROS) levels were measured. We observed that the W-sh mice were protected against ipsilateral circling behavior and lower striatal GABA, LP and ROS levels were found when compared to control group. To establish the relationship between MCs presence and mice's susceptibility to AQ-induced damage, W-sh mice were reconstituted with MCs obtained from mice bone marrow. Reconstitution with bone marrow mast cells (BMMC) was performed by their intraperitoneal (IP) ( $5 \times 10^6$  cells) and intracerebroventricular (ICV) administration ( $5 \times 10^5$  cells). In parallel, an independent group of W-sh mice was administered with 5 micrograms (ICV) of Hist only. Our results demonstrated that those mice reconstituted with BMMC IP don't show difference with the control group, however the ICV-reconstituted mice and those administered with Hist were not protected against ipsilateral circling behaviour and showed intrastriatal GABA levels very similar to those found in animals from control group. Obtained data evidence the participation of MCs in AQ-induced damage. Therefore this study provides interesting evidence about participation of histamine released from MCs increasing neurological and oxidative damage in this excitotoxicity model of HD.

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AQ	Ácido quinolínico
BHE	Barrera hematoencefálica
BMMC	Células cebadas derivadas de médula ósea
C-57	Ratones C-57BL6/J
CAG	citosina-adenina-guanina
CC	Células cebadas
DCF	2'7'-diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2'7'-diclorodihidro fluoresceína
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis lateral amitrófica
EM	Esclerosis múltiple
EP	Enfermedad de Parkinson
EROs	Especies reactivas a oxígeno
GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HIST	Histamina
HTT	Huntingtina
ICV	Intracerebroventricular
ID	Intradérmica
IP	Intra peritoneal
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAR2	Receptor activado por proteinasa 2
SNpr	Par reticular de la sustancia negra
SSI	Solución salina isotónica
STN	Núcleo subtalámico
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
VA/VL	Núcleo ventral anterior y ventro lateral
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
<i>W-sh</i>	Ratones c-Kit <i>W-sh/W-sh</i>

## 1. Introducción

La inflamación es la respuesta de los tejidos vivos ante las lesiones. Puede ser desencadenada por infecciones microbianas, elementos físicos o químicos, así como reacciones inmunitarias. El principal objetivo de este proceso es contener y aislar el sitio de lesión, destruir el estímulo agresor y reparar el tejido para la curación (Mitchel *et al.*, 2012). Durante este proceso ocurren cambios vasculares, se induce el reclutamiento y la activación de células proinflamatorias, con la posterior liberación de mediadores proinflamatorios, antiinflamatorios, compuestos angiogénicos, así como la producción de especies reactivas a oxígeno y óxido nítrico (Kumar, Herbec, & Foster , 2008).

La inflamación puede clasificarse como inflamación aguda (horas a días) o crónica (meses a años), dependiendo del tiempo de duración. La inflamación aguda comprende la respuesta inmediata y temprana a un agente dañino y es básicamente una respuesta defensiva que prepara el camino para la reparación del sitio dañado. La inflamación crónica es el resultado de estímulos persistentes o brotes repetidos de inflamación aguda y se caracteriza por el infiltrado de células mononucleares inflamatorias y destrucción tisular inducida por la lesión o inflamación persistente (Robbins , 2002).

El término neuroinflamación se utiliza generalmente para describir eventos crónicos, donde la activación de la microglía y astrocitos contribuyen al efectos neurodestrutivo (disfunción, lesión y pérdida neuronal), así como en la interrupción de la capacidad regenerativa de las células madre cerebrales (Russo, Barlati, & Bosetti , 2011), se ha observado que la activación de la microglia y el posterior proceso inflamatorio causa deterioro cognitivo (Lee, y otros, 2008), atenúa el LTP (potencial de larga duración) en el giro dentado del hipocampo y en la corteza entorrinal ( Hauss-Wegrzyniak , Lynch, Vraniak, & Wenka, 2002) y produce cambios conductuales (Dinel *et al.*, 2011; Cunningham, 2013). Diversas patologías entre las que se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, se caracterizan por cursar con procesos neuroinflamatorios, pérdida cognitiva y cambios conductuales (Streit *et al.*, 2004).

## **1.1. Células cebadas**

Las células cebadas (CC) fueron descritas por primera vez por Paul Ehrlich en 1878 (Ehrlich, 1878), son células inmunes del linaje mieloide, se caracterizan por contener gránulos que almacenan mediadores inflamatorios, una sola CC puede contener hasta 1000 gránulos. Las CC juegan un papel importante en las enfermedades alérgicas (Sayed *et al.*, 2008; Blank & Rivera, 2004), participan en la defensa del huésped a través de la inmunidad innata y la inmunidad adquirida y actúan como células efectoras que exacerbaban el desarrollo de los trastornos alérgicos o autoinmunes (Morita *et al.*, 2016), de igual forma participan en la inflamación aguda y crónica liberando citocinas con actividad proinflamatorias como antiinflamatorias (Mitchell *et al.*, 2012), encontrándose así involucradas tanto en la degeneración como en la reparación de los tejidos (Amor & Woodroffe, 2014).

### **1.1.1. Distribución de las CC en el Sistema Nervioso Central (SNC)**

Las CC se derivan de la médula ósea y posteriormente transitan por el torrente sanguíneo para madurar en los tejidos periféricos a partir de progenitores inmaduros (Dahlin & Hallgren, 2015). Es difícil determinar el número exacto de las CC en los tejidos, debido a que estas varían dependiendo de la edad y especie (Nautiyal *et al.*, 2012a, Silver *et al.*, 1996). Las CC residen en todos los tejidos, predominantemente en los tejidos vascularizados que interactúan con el medio ambiente externo (intestinos, vías respiratorias y piel) (Theoharides *et al.*, 2012); así como en la duramadre, en la médula espinal, meninges (Varatharaj *et al.*, 2012) y regiones específicas del cerebro (perivasculatura del hipocampo, tálamo, habénula, etc.) (Lambracht-Hall *et al.*, 1990; Silver *et al.*, 1996).

Durante el desarrollo las CC ingresan al cerebro a través de los vasos sanguíneos (Skaper *et al.*, 2014). Es posible observar la presencia de las CC desde el desarrollo. En las ratas a partir del día 15 de gestación, éstas se observan esparcidas escasamente en el feto, al día 16 de gestación, se encuentran en los tejidos conectivos profundos (Gamble & Stempak, 1961), al día fetal 19 las CC se concentran en la piamadre rodeando el diencéfalo, del día 5-7 postnatal se pueden observar en la fisura

coroidea, al día 14 se encuentran a lo largo de los vasos sanguíneos del tálamo. Para el día 31, la distribución de las CC se observa de forma idéntica a la presente en los animales adultos (Lambracht-Hall *et al.*, 1990). En la etapa adulta las CC son capaces de emigrar de la periferia al cerebro (Nautiyal *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2000) y se ha observado que diversos estados conductuales y hormonales permiten dicha migración (Persinger, 1980; Zhuang *et al.*, 1993; Bugajsk *et al.*, 1994).

### **1.1.2. Activación**

La activación de las CC a través del receptor FcεRI (Receptor de alta afinidad para IgE) y mediante el receptor c-KIT ha sido estudiado ampliamente, sin embargo, existen múltiples compuestos que pueden activarlas por diversas vías. Yu y colaboradores (2016), clasifican a las diversas sustancias que pueden activar a las CC en: inmunoglobulinas, factores de complemento, ligandos de los receptores Toll (TLR), patógenos, péptidos antimicrobianos, neuropéptidos, citocinas, mediadores inflamatorios, quimocinas y moléculas exógenas (Yu *et al.*, 2016).

Dependiendo del receptor activado en la membrana de las CC, se lleva a cabo la desgranulación y liberación de mediadores solubles preformados y sintetizados *de novo* (figura 1). Los mediadores preformados incluyen proteasas (triptasa, quimasa, etc.) aminas biogénicas (histamina y serotonina), proteoglicanos (heparina), enzimas lisosomales, factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), entre otros compuestos (sintasa del óxido nítrico, endotelina y quininas). Los mediadores sintetizados *de novo* incluyen prostaglandinas, leucotrienos, citocinas (TNF, interleucinas, interferones), quimocinas, factores de crecimiento (como el *stem cell* factor) y péptidos antimicrobianos (Gri *et al.*, 2012).

# Activación de las CC

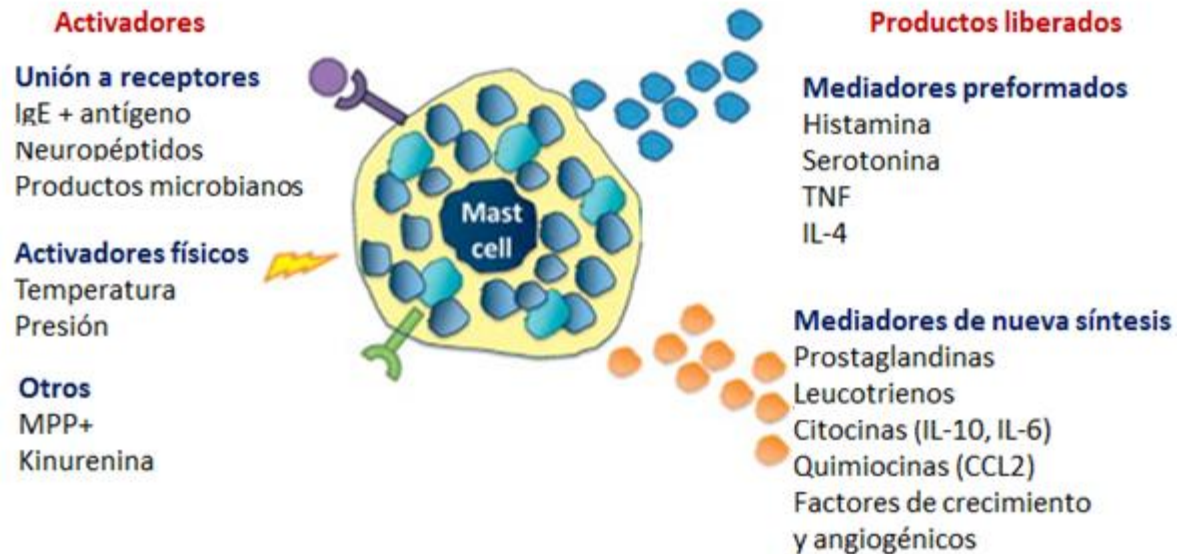


Figura 1. Activación de las Células Cebadas y liberación de productos (Modificada de Yu *et al.*, 2016)

## 1.1.3. Principales mediadores liberados por la Células cebadas con acción en el SNC

Las citocinas inflamatorias y las quimiocinas ocupan un papel clave en la regulación de las respuestas del huésped a infecciones, la inflamación, el estrés y traumas (Le Thuc *et al.*, 2015). Muchos de los productos liberados por las CC tienen efectos en el sistema nervioso central o en el sistema nervioso periférico. En la tabla 1, se muestran algunos de los mediadores liberados y su acción en estos sistemas (Silver & Curley, 2013).

**Tabla 1. Efecto de los mediadores liberados por las células cebadas en el SNC**

	<b>Mediador</b>	<b>Efecto fisiológico</b>
<b>Preformados</b>	Histamina	Modula la permeabilidad vascular de la barrera hemato-encefálica
		Sensibiliza los nociceptores y activa las vías de dolor trigémino cervical y lumbosacra
		Potencia la participación de receptores NMDA en la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo
		Modula el comportamiento del ratón (ansiedad o la actividad locomotora)
	Serotonina	Promueve la neurogénesis en el hipocampo y favorece el aprendizaje y la memoria dependiente del hipocampo
	Triptasa	Activa las neuronas sensoriales
		Induce la liberación de mediadores proinflamatorios de la microglía
Quimasa	Regula la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica después de la inflamación	
<b>Citocinas</b>	TNF $\alpha$	Reduce los umbrales de activación nerviosa
		Facilita el reclutamiento de neutrófilos durante la inflamación para modular la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica
		Regula las respuestas termorreguladoras después de la inducción sepsis
	Interleucinas	Regular la actividad microglial
<b>Factores de crecimiento</b>	NGF	Promueve la supervivencia y la diferenciación de las neuronas; reduce los umbrales de disparo neuronal

### 1.1.3.1. Histamina en el SNC

La histamina (4-imidazolil-2-etilamina) es una amina biogénica presente en la mayoría de los tejidos, como un constituyente normal, con múltiples efectos en varios órganos de mamíferos e invertebrados. En humanos la histamina se encuentra en diferentes concentraciones en la mayoría de los órganos del cuerpo (cerebro, estómago, intestinos, útero y uretra) (Fernández-Novoa & Cacabelos, 2001). La histamina es producida y almacenada predominantemente en las células cebadas, basófilos y



neuronas (Galli, 1993; Panula *et al.*, 1990), en el cerebro regula y orquesta funciones conductuales y homeostáticas. Cerca del 50% de los niveles de histamina en el cerebro de ratas se encuentra en las CC (Skaper *et al.*, 2001). Existen evidencias que sugieren que una señalización aberrante de la histamina en el cerebro, puede ser un factor importante en conductas adictivas y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y esquizofrenia (Passani *et al.*, 2014; Fernández-Novoa & Cacabelos, 2001).

El efecto de la histamina está mediado por 4 receptores (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>) distribuidos entre los diferentes órganos, incluido el cerebro, los cuales están acoplados a proteínas G (ver tabla 2).

**Tabla 2. Receptores a Histamina, expresión y vías de señalización.**

Receptor	Sitio de expresión	Vía de señalización intracelular	Proteína G
H <sub>1</sub>	Células nerviosas, vías aéreas y músculo vascular, hepatocitos, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, monocitos, células B y T	Ca <sup>+2</sup> , cGMP, FLD, FLA <sub>2</sub> , NFκB	G <sub>q/11</sub>
H <sub>2</sub>	Células nerviosas, vías aéreas y músculo vascular, hepatocitos, células epiteliales, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas, monocitos, células B y T	Adenilato ciclasa, cAMP, c-Fos, c-Jun, PKC	Gα <sub>s</sub>
H <sub>3</sub>	Neuronas histaminérgicas, eosinófilos, células dendríticas, monocitos, tejidos periféricos.	Ca <sup>+2</sup> , MAP sinasa, inhibición cAMP	G <sub>i/o</sub>
H <sub>4</sub>	Células hematopoyéticas, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, células T, basófilos, células cebadas, células nerviosas, hepatocitos, bazo, intestino, colon, corazón.	Ca <sup>+2</sup> , inhibición de cAMP	G <sub>i/os</sub>

A través del receptor H<sub>1</sub>, la histamina produce alguno de los signos y síntomas de las enfermedades alérgicas en la piel, nariz y vías respiratorias bajas. Los receptores H<sub>2</sub> son potentes supresores de la inflamación y de funciones efectoras. Los receptores H<sub>3</sub>

han sido identificados en el sistema de nervios periféricos y central como receptores pre sinápticos que controlan la liberación de histamina y otros neurotransmisores y la activación de receptores H<sub>4</sub>, promueve la acumulación de células inflamatorias en el lugar de la inflamación alérgica (Akdis & Simons, 2006).

Skaper *et al.*, en 2001, observaron que la histamina proveniente de las células cebadas, potencia la excitotoxicidad mediada por el receptor a NMDA en cultivos de neuronas de hipocampo incubadas con glicina (Skaper *et al.*, 2001) y en este mismo año Arias-Montaña *et al.*, observaron que la histamina a través del receptor H<sub>3</sub>, reduce la liberación de GABA, cuando cortes de estriado de rata son estimulados eléctricamente (Arias-Montaña *et al.*, 2001). Está reportado por Molina-Hernández y Velasco (2008), que en el SNC a través del receptor H<sub>1</sub>, la histamina es crítica para la diferenciación neuronal y la supervivencia celular y que la proliferación celular, está importantemente mediada por el receptor H<sub>2</sub> (Molina-Hernández y Velasco, 2008). En cultivos neuronales se ha observado que la histamina mediante la activación del receptor H<sub>1</sub> aumenta hasta tres veces el número de neuronas y disminuye la población de astrocitos. Por otro lado, los animales deficientes del receptor H<sub>1</sub> muestran niveles reducidos de neurogénesis (Ambrée *et al.*, 2014).

#### **1.1.4. Función de las células cebadas en el SNC**

##### **1.1.4.1. Interacción células cebadas-neuronas**

Aunque la relación funcional entre las CC y las neuronas no está del todo caracterizada, la comunicación de las CC con los nervios periféricos ofrece una aproximación de lo que ocurre a nivel central. En la mayoría de los tejidos, las células cebadas y los nervios están yuxtapuestos con huecos espaciales de aproximadamente 20 nm, de igual forma, ambas comparten vías de señalización y activación comunes, sugiriendo una comunicación bidireccional (Silver & Curley, 2013). Del mismo modo los productos liberados por las CC pueden alterar la respuesta de las neuronas, suponiendo así una

comunicación neuro-inmune (Wilhelm *et al.*, 2005). Un ejemplo de esto es la liberación de heparina la cual se utiliza para bloquear la liberación de calcio intracelular, inhibiendo así la respuesta neuronal (Wilhelm *et al.*, 2005).

#### **1.1.4.2. Interacción células cebadas-células gliales**

La triptasa liberada por las CC puede activar el receptor activado por proteínasa 2 (PAR2) presente en la microglía, lo que conlleva a la liberación de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-6 y la producción de especies reactivas a oxígeno (EROs) (Silver y Curley, 2013; Zhang *et al.*, 2012a). Mediante este mismo receptor (PAR2), se regula positivamente la expresión del receptor P2X4 (receptor purinérgico), que promueve la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (Yuan *et al.*, 2010). De igual forma la microglía expresa los cuatro receptores de histamina y la estimulación de dichos receptores dan como resultado la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Bañuelos Cabrera *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2012).

#### **1.1.4.3. Neuroinflamación**

Las células que contribuyen mayoritariamente en la neuroinflamación son las células gliales, éstas además pueden responder a las señales inflamatorias procedentes de otras células de origen inmunológico como las CC (Dheen *et al.*, 2007). Existe evidencia de que en los animales carentes de CC, la activación de la microglía es menor (Dong *et al.*, 2017), por lo que es claro que las CC participan en procesos inflamatorios y se encuentran presentes en dichos sitios de lesión, jugando un papel importante en los procesos inflamatorios, dado a que son sensores ambientales por comunicar al organismo con su medio exterior y dar respuesta a condiciones fisiológicas inmunes (da Silva *et al.*, 2014).

#### **1.1.4.4. Neurodegeneración**

Existen dos procesos fundamentales de muerte neuronal, ya sea por apoptosis o necrosis, el primero es un proceso controlado que es parte de la fisiología natural, mientras el segundo ocurre tras un daño en el SNC, sin embargo, es posible inducir la muerte neuronal durante la neurodegeneración aguda y crónica (Lyman *et al.*, 2014). La neuroinflamación afecta de manera directa la apoptosis neuronal por la producción de moléculas inflamatorias (Lyman *et al.*, 2014). Se cree que el TNF- $\alpha$  en conjunto con otras citosinas liberadas por las CC pueden llevar a una neurotoxicidad con la posterior muerte neuronal (Skaper *et al.*, 1996; Hendrix *et al.*, 2013).

#### **1.1.5. Patologías cerebrales y células cebadas**

El papel de las CC en el cerebro normal y en condiciones patológicas es complejo. Las CC tienen un papel regulador de la microvasculatura cerebral, de la integridad de la barrera hematoencefálica (Purcell & Atterwill, 1995; Zhuang *et al.*, 1996), así como de la conducta sexual en aves (Silver *et al.*, 1996). Existen diversas patologías cerebrales que tienen asociado un incremento en el número de células cebadas como el asma psicósomática, migrañas, esclerosis múltiple, neurofibromatosis y ciertos tumores (Theoharides, 1990).

##### **1.1.5.1. Depresión**

Existe una marcada presencia de depresión mayor en pacientes que sufren infecciones crónicas, como la artritis reumatoide o inflamación del intestino. Por lo que se sugiere que la inflamación crónica puede aumentar el riesgo de padecer este tipo de depresión (Isch *et al.*, 2007; Benros *et al.*, 2013). Esto puede apoyarse en los estudios que utilizan algunos componentes inmunológicos como el IFN- $\alpha$  y la IL-2, los cuales inducen una mayor incidencia de depresión en los pacientes bajo dichos tratamientos, mientras que el uso de anticuerpo contra el TNF- $\alpha$  pueden disminuir los síntomas de la depresión mayor (Tyring *et al.*, 2006; Uguz *et al.*, 2009; Hoyo-Becerra *et al.*, 2014)

### 1.1.5.2. Esclerosis Múltiple

Amor y Woodrooffe en 2014, demostraron que las proteasas liberadas por las CC degradan las proteínas específicas de la mielina, sugiriendo que las CC participan en el proceso de desmielinización (Amor & Woodrooffe, 2014). En un modelo murino de animales carentes de CC (ratón *Kit<sup>Wv/Wv</sup>*), al inducir encefalomiелitis experimental alérgica (EEA) (manipulación experimental que mimetiza a la EM), se observó que el daño neuronal en dichos animales es menor con respecto al control (animales con el fondo genético C57BL6/J). Además, la reconstitución de los ratones *Kit<sup>Wv/Wv</sup>* con CC derivadas de medula ósea por vía intravenosa, se observó el mismo daño que en sus controles. Estos experimentos le dan un papel importante de las CC a nivel periférico en la regulación de procesos neurodegenerativos (Bennett *et al.*, 2009).

### 1.1.5.3. Enfermedad de Alzheimer

Estudios en tejido *post mortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer, mostraron presencia de CC cercanos a las lesiones de placa amiloide en diversas regiones cerebrales (Maslinska *et al.*, 2007). En cultivos de CC de ratones APP<sup>swe</sup>/PS1dE9 (ratones que expresan placas de  $\beta$ -amiloide a partir de su cuarta semana de edad en el parenquima ) tratados con el péptido A $\beta$ 25-35 puede activar el Panx1 y mediar la afluencia de Ca<sup>2+</sup> y la desgranulación, aumentaron su liberación de histamina y presentaron un aumento en el número de CC en la corteza e hipocampo antes de la aparición de la placa amiloide (Harcha *et al.*, 2015), las citosinas proinflamatorias liberadas por las CC y microglía puede regular positivamente la  $\beta$ -secretasa (Sastre *et al.*, 2003), dando como resultado un aumento de la producción de las especies amiloideas A $\beta$  (Corrigan *et al.*, 2011).

#### 1.1.5.4. Enfermedad de Parkinson

En un modelo *in vitro* para la enfermedad de Parkinson, se observó que al incubar tanto CC derivadas de medula ósea de ratón por un lado y CC de humanos por otro lado con 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>; toxina dopaminérgica utilizada para inducir EP en animales), ocasiona la liberación de la quimiocina CCL2 (Kempuraj *et al.*, 2016), lo cual en un organismo completo, se traduce un mayor reclutamiento de células inmunes al sitio de inflamación y una mayor neuroinflamación en el caso específico de daño al SNC. Contrariamente Tuncel y colaboradores (2004), proponen que el VIP (péptido intestinal vasoactivo) contenido en las CC puede reducir el daño observado tras la lesión estriatal con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), dado que observaron que dicho neuropéptido atenúa los cambios de la respuesta motora, reduce la muerte celular y pérdida de mielina causada por la administración de 6-OHDA (Tuncel *et al.*, 2004).

#### 1.1.6. Modelo de estudio de las células cebadas in vivo

##### 1.1.6.1. Ratones *c-Kit*<sup>*W-sh/W-sh*</sup>

Los ratones deficientes en células cebadas son una herramienta valiosa para la identificación y cuantificación de la contribución de ese tipo celular en respuestas biológicas *in vivo*. La mutación *Kit*<sup>*Wsh/Wsh*</sup> (*W-sash* o *W-sh*) surgió de manera espontánea, en un cruce entre dos cepas puras de ratones (*C3H / HeH* × *101 / H*), y esta fue trasladada a ratones C57BL6/J a través de retrocruzas. *W-sh* es una mutación de inversión en los elementos reguladores de la transcripción río arriba del sitio de inicio de transcripción de *c-kit* en el cromosoma 5 del ratón. Esta mutación modifica también la expresión de la proteína corina y causa diversas alteraciones fenotípicas, como la interrupción del crecimiento y supervivencia normal de las CC, la carencia de células intersticiales de Cajal, la coloración blanca del pelaje del ratón por la deficiencia de melanocitos en la piel y ligeras alteraciones en la contracción cardíaca (Grimbaldeston *et al.*, 2005). Existen anomalías en la angiogénesis que afecta a la vascularización de los tumores de estado sólido y del tejido adiposo, dando como resultado tumores

más pequeños y la prevención de la obesidad inducida por la dieta (Soucek *et al.*, 2007).

Los animales *W-sh* presentan algunas ventajas con respecto a otros modelos animales con mutaciones o deficiencias de *c-kit*, porque son fértiles, no desarrollan anemia ni otras anormalidades fenotípicas (Grimbaldeston *et al.*, 2005). El receptor *c-kit* es necesario para la maduración de los melanocitos, por lo cual los ratones mutantes homocigotos presentan una coloración blanca y los mutantes heterocigotos presentan una franja blanca o “sash” a la mitad del torso (Besmer *et al.*, 1993).

Una característica de los animales carentes de CC es que pueden ser reconstituidos con precursores obtenidos de médula ósea que, al igual que las CC normales, se instalan en distintos tejidos. La reconstitución de CC también puede hacerse por trasplante directo de médula ósea o por inyección de sangre periférica total proveniente de ratones normales. Al realizar estas manipulaciones se puede tener una repoblación de CC en diversos tejidos y órganos como son: los pulmones, intestinos, la médula ósea, el hígado, el bazo, etc., sin embargo, ninguno de estos métodos permite la reconstitución completa del SNC (Bennett *et al.*, 2009; Nautiyal *et al.*, 2011; Tanzola *et al.*, 2003; Grimbaldeston *et al.*, 2005).

Los modelos más cercanos de infiltrado de CC en el cerebro, están relacionados con la ruptura o daños en la barrera hematoencefálica (BHE). Tanzola y colaboradores observaron la presencia de CC, en el cerebro de animales  $W/W^V$  carentes de CC tras realizar el modelo de EEA, dicho modelo consiste en una respuesta inflamatoria generalizada que irrumpe con la permeabilidad de la BHE (Tanzola *et al.*, 2003). La inyección de sangre periférica a través de la arteria carótida ha demostrado la infiltración de CC en el cerebro (Nautiyal *et al.*, 2011), esto puede estar relacionado con los modelos de oclusión de la arteria carótida, lo cual ocasiona daño en la BHE (Sandoval & Witt, 2008).

## **1.2. Enfermedades neurodegenerativas**

La degeneración del SNC se caracteriza por la pérdida progresiva de la estructura y funciones neuronales, lo que resulta en alteraciones funcionales y mentales (Campbell *et al.*, 1999). Si bien las causas asociadas con la neurodegeneración son poco conocidas, la incidencia de ésta aumenta con la edad en la vida adulta y vejez (Hof & Mobbs, 2010). Este fenómeno que afecta principalmente a las personas mayores es un proceso común, aunque de diferente etiología en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Chen *et al.*, 2016), y la enfermedad de Huntington (Woodrooffe & Amor, 2014). Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de trastornos incurables, crónicos y degenerativos del SNC. El estrés oxidante, la neuroinflamación y neurodegeneración son procesos presentes en estas enfermedades (Peterson & Toborek, 2014).

### **1.2.1. Enfermedad de Huntington**

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo hereditario causado por una mutación en el exón 1 del gen de la huntingtina (HTT), localizado en el brazo corto del cromosoma 4 y consiste en la repetición del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) (O Walker, 2007). Dicha repetición CAG se traduce a una expansión de glutaminas en la proteína HTT. La HTT, se encuentra de manera normal en individuos sanos, presentando menos de 35 repetidos de CAG. En pacientes con la EH se presenta una expansión de repetidos de CAG mayor a 36 lo cual provoca el desarrollo de la enfermedad (Kremer *et al.*, 1994 ). El periodo de vida de un paciente que cursa con al EH se reduce a un promedio de 15.5 años después de aparecidas las manifestaciones motoras de la enfermedad, que suelen aparecer en la cuarta década de la vida. La expansión de CAG es relativamente inestable, particularmente cuando el padre es el portador, dado que permite el aumento en el número de repetidos en la descendencia (Myer *et al.*, 1982), esta característica permite que la enfermedad se presente en etapas tempranas de la vida generalmente antes de los 21 años de edad,



la aparición temprana de la EH se encuentra relacionada de manera inversa con el número de repetidos de CAG (Figura 2) (Nance & Myers, 2001).

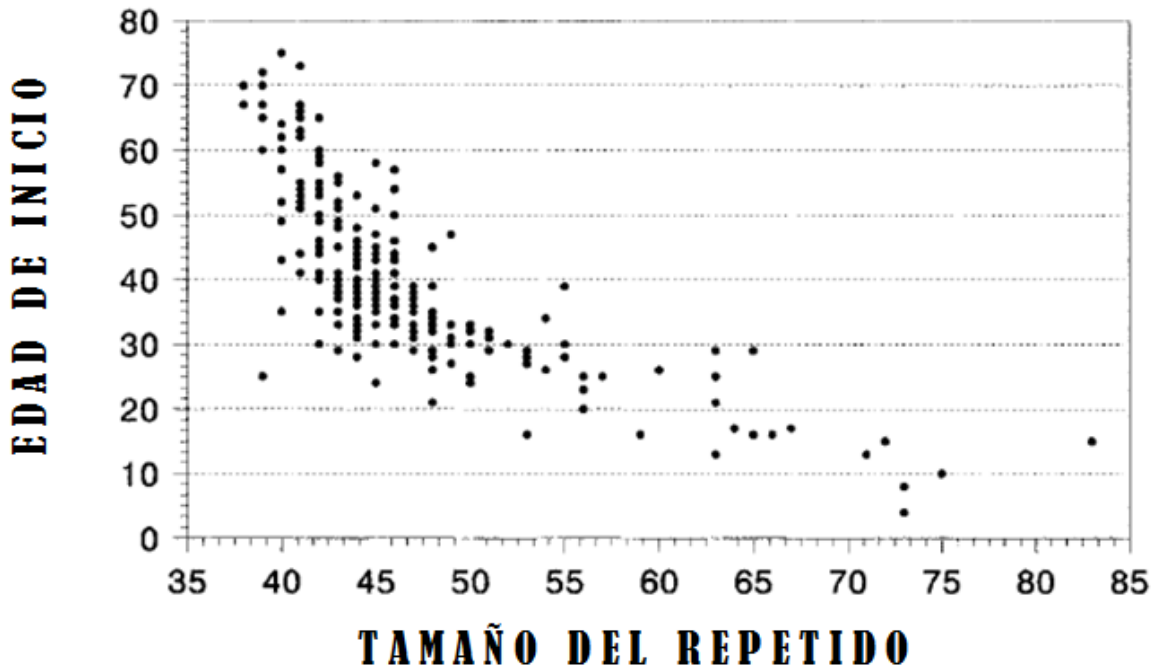


Figura 2. Relación entre el número de repetidos de CAG y la edad de inicio de la enfermedad de Huntington. El tamaño de la repetición está fuertemente relacionado con la edad de inicio. La edad de inicio antes de los 20 años suele asociarse con un tamaño repetido de más de 60 unidades de CAG (Modificado de Nance & Myers, 2001).

La agregación intranuclear o citoplasmática de la HTTmutada, está asociada a la atrofia neostriatal y a la neurodegeneración en el putamen y caudado en los pacientes y en el cuerpo estriado en los roedores. Los agregados de HTT mutada causan la muerte neuronal a través de la apoptosis, entre otros mecanismos. Y es posible que los productos de la apoptosis, puedan desencadenar respuestas inmunes inflamatorias (Creus, 2012). En general, la actividad neuroinflamatoria en la EH es atribuida a la microglía (Woodrooffe & Amor, 2014).

Existe evidencia que sugiere que los procesos excitotóxicos y el estrés oxidante están involucrados en la etiología de la EH (Browne *et al.*, 1999), esto se ha demostrado, tanto en pacientes como en modelos con roedores (Browne *et al.*, 1997). Dicho estrés oxidante se caracteriza por un aumento en el daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos, así como un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes tales como: la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa, como respuesta al daño (Sorolla *et al.*, 2008).

A consecuencia del daño a nivel celular se presentan alteraciones en el fenotipo del individuo afectado, pueden aparecer síntomas psicóticos, paranoides o depresivos, precediendo a los movimientos coreicos. Los movimientos tales como coreas, atetosis, balismos, distonias y tics, se relacionan con lesiones en los ganglios basales los cuales están asociados principalmente con el inicio y fin de los movimientos voluntarios e involuntarios (Afifi & Bergman, 2006). Estudios de imagenología *post-mortem* de individuos que padecieron la EH, muestran que al inicio existe atrofia cerebral característica, la cual es notable en el cuerpo estriado; debido a esto existe una severa pérdida de neuronas de proyección espinosa media, especialmente las que sintetizan encefalina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Novak & Tabrizi, 2010). El daño en la vía indirecta de los ganglios basales en la EH intensifica los impulsos excitatorios a la neocorteza, con lo que se producen movimientos coreiformes involuntarios (Figura 3). En algunos pacientes el signo clínico predominante es la rigidez y no la corea, situación especialmente frecuente en pacientes cuyo trastorno comenzó en la juventud y esto se asocia a un daño en la vía directa como indirecta de los ganglios basales (Brunton, 2012).

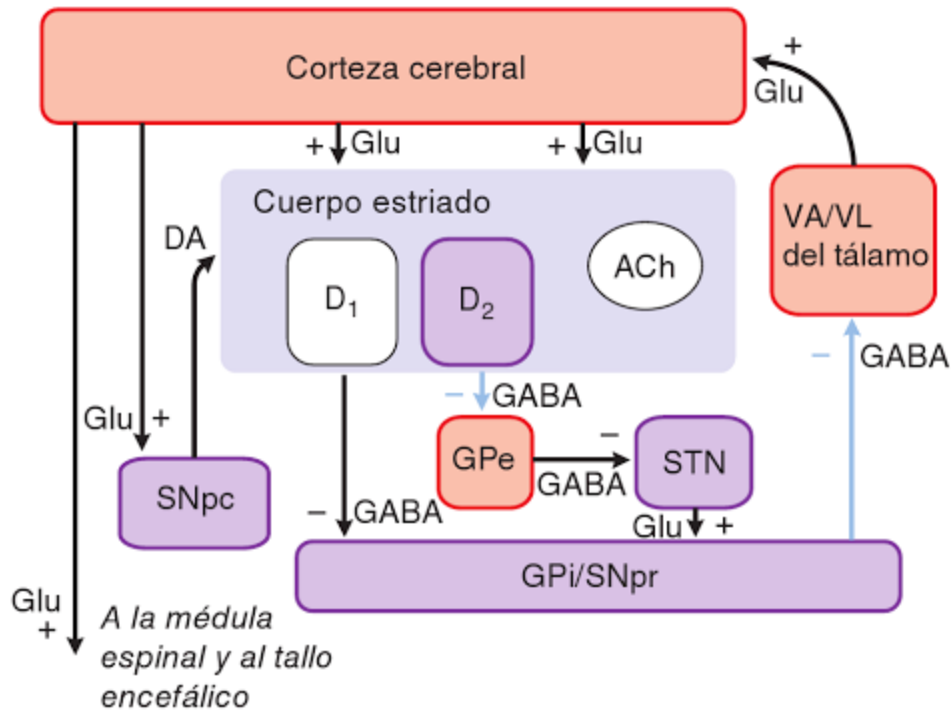


Figura 3. Los ganglios basales en la enfermedad de Huntington. Las neuronas que establecen proyecciones desde el estriado a GPe y forman la vía indirecta son afectadas primero en la evolución de la enfermedad, lo cual causa que se pierda la inhibición de GPe. A su vez, la mayor actividad de dicha estructura inhibe STN, SNpr y GPI, lo cual causa pérdida de la inhibición al núcleo VA/VL y un mayor impulso excitador talamocortical. Las estructuras violetas muestran menor actividad en HD, en tanto las de color rojo muestran mayor actividad. La línea azul pálido denota vías primarias con menor actividad. Par reticular de la sustancia negra (SNpr), par compacta de la sustancia negra (SNpc), globo pálido interno (GPI), globo pálido externo (GPe), núcleo subtalámico (STN), núcleos ventroanterior y ventrolateral (VA/VL).

### 1.2.1.1. Modelo animal para estudiar la enfermedad de Huntington

#### 1.2.1.1.1. Modelo del ácido quinolínico

Schwarcz y colaboradores en 1983, demostraron que la inyección estriatal con ácido 2,3-piridina descarboxílico (AQ), ejerce un efecto citotóxico en el estriado, así como cambios conductuales y patológicos. El AQ es un metabolito endógeno del triptófano, cuando este se dirige a la vía de las kinureninas. Está reportado que el metabolito AQ está presente de manera normal en el cerebro de rata y humano (Schwarcz *et al.*, 1983). En 1981 Stone y Perkins, descubrieron que el AQ es un potente excitador de las

neuronas en el SNC, debido a que es un agonista de los receptores a NMDA (N-metil-D-aspartato) (Stone & Perkins, 1981).

La vía de las kinureninas se encuentra en células gliales y en células inflamatorias de la circulación, así como en otros grupos celulares, diferentes grupos han demostrado que una activación inapropiada de la vía de las kinureninas puede conducir a un aumento de los niveles de AQ. La alteración en los niveles de AQ, está implicado en diferentes patologías tales como el EA, EP y EH, así como en modelos experimentales de dichas enfermedades en las que AQ desempeña un papel especial que actúa en la cascada neurodegenerativa (Maddison & Giorgini, 2015).

Se ha observado que en este modelo neuroquímico hay una reducción de los niveles de GABA y sustancia P, sin alterar los niveles de dopamina, vasopresina, somatostatina y neuropéptido Y, en comparación con otros modelos que disminuyen estos últimos (Tabla 3), y asemeja de manera más adecuada a las características bioquímicas expresadas en los pacientes con la EH (Beal *et al.*, 1986; Ellison *et al.*, 1987; Caraceni *et al.*, 1977).

**Tabla 3. Contenido de neurotransmisores en el estriado en diferentes modelos neuroquímicos de la EH**

Neurotransmisor	GHIH	NPY	SP	GABA	DA	VP
<b>Ácido quinolínico</b>	=	=	-	-	=	=
<b>N-metil-D-aspartato</b>	-	-	-	-	=	=
<b>Ibotenato</b>	-	-	-	-	=	=
<b>Kainato</b>	-	-	-	-	=	=

Misma concentración del neurotransmisor (-), menor concentración del neurotransmisor (-) con respecto al contenido basal en animales sin lesión. Somatostatina (GHIH), neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP), ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), dopamina (DA), vasopresina (VP).

## **2. Justificación**

Debido a los recientes estudios donde se observa la participación de las CC en diversas patologías cerebrales y al papel de la histamina como potenciador o atenuador del daño ocasionado por el receptor NMDA, es de sumo interés estudiar como interacción estos en un modelo neuroquímico de la enfermedad de Huntington.

### **3. Hipótesis General**

Con base a los antecedentes, en este proyecto se plantea la siguiente hipótesis general:

Las CC participan en el proceso neurodegenerativo que se induce con un agonista NMDA en el modelo murino de la enfermedad de Huntington

Asimismo, pondremos a prueba las siguientes hipótesis:

### **4. Objetivo general**

Caracterizar la participación de las células cebadas y su mediador histamina en el proceso de daño neuronal en un modelo neuroquímico de la enfermedad de Huntington.

#### **4.1. Objetivos específicos**

- 1) Evaluar el daño neurológico conductual y el contenido de GABA estriatal en ratones deficientes de células cebadas (*W-sh*) y ratones C-57BL6/J posterior a la lesión con AQ.
- 2) Determinar el nivel de daño oxidante estriatal en ratones deficientes de células cebadas (*W-sh*) y ratones C57BL6/J posterior a la lesión con AQ.
- 3) Realizar la reconstitución de las células cebadas en el SNC de ratones deficientes (*W-sh*).
- 4) Evaluar el efecto de la lesión intraestriatal con AQ en ratones *W-sh*, reconstituidos con CC y/o administrados con su mediador histamina por medio de la evaluación conductual y parámetros de oxidación.

## 5. Metodología

### 5.1. Material biológico

Se utilizaron ratones C57BL6/J y ratones Kit <sup>W-sh/W-sh</sup> hembras de 12 semanas de edad, mantenidos con agua y alimento estériles *ad libitum* bajo condiciones de temperatura, humedad y ciclos luz-oscuridad 12:12. Los animales fueron obtenidos bajo el protocolo 0074-13 del CICUAL.

Se formaron 10 grupos con una n=12 ratones por grupo, bajo el siguiente esquema de trabajo descrito en la tabla 4.

**Tabla 2. Grupos experimentales de acuerdo al tratamiento y lesión intraestriatal**

Grupo	Tratamiento	Intraestriatal
C57BL6/J	---	SSI
C57BL6/J	---	AQ
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	---	SSI
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	---	AQ
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	BMMC IP	SSI
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	BMMC IP	AQ
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	BMMC ICV	SSI
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	BMMC ICV	AQ
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	Histamina ICV	SSI
Kit <sup>W-sh/W-sh</sup>	Histamina ICV	AQ

---= sin ningún tratamiento SSI=Solución salina isotónica BMMC= CC derivas de medula ósea de ratón

AQ= Ácido quinolínico IP= Intraperitoneal ICV= Intracerebroventricular

Posterior a la inyección intra estriatal con AQ o SSI, una n=6 de ratones de cada grupo experimental se sacrificó para la medición del estrés oxidante. Una n=6 ratones se mantuvieron durante 3 días después de la lesión para realizar la prueba de conducta rotatoria y un día después de la prueba se sacrificaron para la medición de GABA.

## **5.2. Modelo neuroquímico inducido por la lesión estereotóxica con ácido quinolínico**

Bajo anestesia general (PISABENTAL<sup>®</sup>; pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg IP), los ratones fueron colocados en un aparato estereotáxico modificado para especies pequeñas. Se realizó la asepsia a la cabeza del ratón con solución de yodopovidona (10%) y se realizó un corte sagital no mayor a 2 cm, partiendo de la línea de los ojos del animal, para así exponer el cráneo. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de AQ (30 nmol/ $\mu\text{L}$ ) o SSI en el cuerpo estriado del hemisferio derecho, usando las siguientes coordenadas: +0.6 mm anterior y -2.0 mm lateral a bregma y -2.7 mm ventral a la duramadre, para los animales entre 25-30 g de peso y +0.5 mm anterior y -1.8 mm lateral a bregma y -2.5 mm ventral a la duramadre para los animales de 20-25 g, esto de acuerdo al atlas de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin, 2012), la inyección de AQ y SSI se realizó a un flujo controlado de 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , dejando un minuto para la difusión de los compuestos, transcurrido este tiempo se retiró la jeringa y se realizó la sutura de la piel y la esterilización de la herida con la solución de yodopovidona (el cual tiene un espectro muy amplio de actividad germicida, ya que actúa contra una gran variedad de bacterias, hongos, virus, protozoarios y esporas).

## **5.3. Disección del tejido cerebral**

Los ratones de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación, inmediatamente se tomó la cabeza y fracturó el cráneo para exponer el cerebro del animal. Se extrajo el cerebro con ayuda de una espátula y se colocó sobre papel filtro puesto sobre un vidrio de reloj incrustado en hielo. Con pinzas tipo relojero se separaron los hemisferios y se dejó expuesto el cuerpo estriado, con ayuda de las pinzas se disecó la región de interés



y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

## **5.4. Conducta**

### **5.4.1. Evaluación conductual**

La conducta de rotación se evaluó a los 3 días posteriores de la lesión intraestriatal 5 minutos antes de la prueba los ratones se administraron con apomorfina (1mg/kg vía subcutánea) disuelta en una solución antioxidante de ácido ascórbico, preparada el mismo día. Los animales se colocarán en cajas de acrílico independientes, limpias, deodorizadas con metanol y una cama delgada de aserrín. Pasados los 5 minutos se cuantificó el número de giros ipsilaterales (lado derecho) realizados por cada ratón durante una hora (Norman *et al.*, 1987).

### **5.4.2. Medición de los niveles de GABA**

Un día después de la prueba de conducta rotatoria, se administró un inhibidor de la glutamato descarboxilasa (GAD), el ácido 3-mercaptopropiónico (1.2 mmol/kg IP) para inhibir el incremento GABA *post mortem*. Dos minutos después, los animales se sacrificaron por decapitación y se diseccionara el cuerpo estriado derecho (lado lesionado). Los tejidos estriatales se homogenizaron con 20 volúmenes metanol-agua (85% v/v). Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos y se tomó el sobrenadante, posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su análisis por HPLC. Los niveles de GABA se cuantificaron utilizando un método por HPLC con detección por fluorescencia. Primeramente, se realizó una reacción de derivatización precolumna, se adicionan 10 µL de reactivo de OPA a 10 µL de los sobrenadantes del tejido estriatal. Se inyectó 20 µL de la mezcla al cromatógrafo de líquidos. Para llevar a cabo la separación, se utilizó una columna OPA-HS (RP 12.5 x 4.5 mm, tp 3 µm Alltech) con una fase móvil consistente de solución 50 mM de acetato de sodio (pH 5.9), conteniendo 1.5% v/v de tetrahidrofurano, y metanol grado HPLC en un gradiente lineal que va desde un 10% hasta un 65% de metanol. La cuantificación se realizará por

medio de un detector de fluorescencia a 232 nm de excitación y 455 nm de emisión. Para su reporte se estandarizan los valores de GABA con respecto a la concentración de proteínas de cada muestra (Monge-Acuña & Fornaguera-Trías, 2009).

## **5.5. Medición del daño oxidante**

### **5.5.1. Cuantificación de la peroxidación de lípidos**

Para la determinación de la peroxidación de lípidos se realizó la técnica descrita por Triggs y Willmore, basada en la determinación de productos lipídicos que generan fluorescencia en extracciones cloroformo-metanol (Triggs & Willmore, 1984). Los tejidos estriatales se homogenizaron con 2 mL de SSI, de dicho homogenizado se tomaron dos alícuotas de 900  $\mu$ L. A 900  $\mu$ L de homogenado se agregaron 4 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v) y se mezclaron. Posteriormente la mezcla se refrigeró por 30 minutos para permitir la separación de las fases, siempre protegida de la luz. La fase acuosa (fase superior) se aspiró con una bomba de vacío. Finalmente se transfirieron 2 mL de la fase orgánica (clorofórmica) a una celda de cuarzo y se agregó 200  $\mu$ L de metanol. La muestra se analizó usando un espectrofotómetro de fluorescencia (Perkin Elmer LS50B) a longitudes de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Para la referencia se utilizó una solución de 0.001 mg/mL de quinina. Los valores de fluorescencia se corrigen con los valores de proteínas en cada muestra (Pérez-Severiano *et al.*, 2004).

### **5.5.2. Cuantificación de la formación de especies reactivas a oxígeno**

La formación de especies reactivas de oxígeno se evaluó utilizando diacetato de 2´7´-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), el cual es oxidado por acción de las EROs para formar 2´7´-diclorofluoresceína (DCF), la cual es capaz de generar fluorescencia. Se preparó una solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1). A partir de esta mezcla se tomaron 5  $\mu$ L de muestra los cuales se incuban con 145  $\mu$ L de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) y 50  $\mu$ L de DCF-DA 50  $\mu$ M a 37°C durante 1 hora con agitación

constante en una placa de 96 pozos. Posteriormente se determinó la fluorescencia de cada muestra en un multi-lector de placa FLx800 (Biotek Instruments, Inc.), a una longitud de onda de 488 nm de excitación y 525 nm de emisión. Los valores obtenidos se calcularon a partir de la interpolación en una curva de calibración de DCF. Los valores de proteínas de cada muestra se utilizaron para expresar los resultados como nmoles de DCF/mg proteína/min (Gomes *et al.*, 2005).

## **5.6. Cuantificación de proteínas por BCA**

Se colocaron en una placa de 96 pozos 95  $\mu$ L de agua, posteriormente se adicionará 5  $\mu$ L de muestra, adicionalmente se agregarán 100  $\mu$ L de reactivo BCA por muestra, se incubó la placa durante 20 minutos a 60°C. Se realizó la lectura a 540 nm y 450 nm de referencia. Antes de agregar el BCA por cada mililitro de este se agregaron 20  $\mu$ L de sulfato de cobre al 4%, para obtener las concentraciones de proteínas se realizó una curva con albúmina bovina (BSA) (Stoscheck, 1990).

## **5.7. Reconstitución con Células cebadas**

### **5.7.1. Obtención de BMMC**

Se recolectó la médula ósea de fémures de animales *wild type* (C57BL6/J) y se realizaron cultivos de células cebadas en medio RPMI con IL-3. Para la reconstitución, se centrifugaron las células durante 6 minutos a 1000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en buffer isotónico (Tyrode's) sin albúmina.

### **5.7.2. Reconstitución intraperitoneal**

Los ratones *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* hembras de 8 semanas de edad se administraron intraperitonealmente con  $2 \times 10^6$  células en 200  $\mu$ L de Tyrode's sin albúmina (Grimbaldeston *et al.*, 2005), se dejaron recuperar durante 4 semanas para ser sometidos posteriormente al modelo neuroquímico de la EH.

### **5.7.3. Reconstitución intracerebroventricular**

Bajo anestesia general (PISABENTAL<sup>®</sup>; pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg IP) los ratones *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* hembras de 10 semanas de edad se administraron ICV en el ventrículo lateral derecho con  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  células en 200  $\mu$ L de Tyrode's sin albúmina, usando las siguientes coordenadas: -1.0 mm lateral a bregma y -2.0 mm ventral a la duramadre (Grimbaldeston *et al.*, 2005; Paxinos & Franklin, 2012), se dejaron recuperar durante 2 semanas para posteriormente someterlos al modelo neuroquímico de la EH.

### **5.8. Administración intracerebroventricular de Histamina**

Bajo anestesia general (PISABENTAL<sup>®</sup>; pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg IP) los ratones *Kit<sup>W-sh/W-sh</sup>* hembras de 12 semanas de edad se administraron ICV en el ventrículo lateral derecho con 1  $\mu$ L de histamina (5  $\mu$ g/ $\mu$ L) en el ventrículo derecho, usando las siguientes coordenadas: -1.0 mm lateral a bregma y -2.0 mm ventral a la duramadre (Paxinos & Franklin, 2012; Masaki *et al.*, 2001), pasados 20 minutos los animales fueron sometidos al modelo neuroquímico de la EH.

### **5.9. Histología**

#### **5.9.1. Tinción azul de toluidina**

Bajo anestesia general (PISABENTAL<sup>®</sup>; pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg IP), los animales fueron perfundidos con una solución de formalina al 4 %, posteriormente se obtuvieron los cerebros y se realizaron 5 cortes coronales seriados de 100  $\mu$ m de grosor del tejido. Se preparó una solución madre al 1% de azul de toluidina en alcohol al 70% disuelta en NaCl al 0.5% (pH 2.3), y los portaobjetos con rebanadas se sumergieron durante 30 min en la solución. Posteriormente se realizaron tres lavados en agua destilada, se deshidrataron en una serie de concentraciones

crecientes de etanol y por último las muestras se montaron para su observación al microscopio (Dong *et al.*, 2016). Las células fueron observadas bajo microscopio óptico a 10x, 40x y 100x. La tinción de azul de toluidina, utiliza un colorante catiónico débilmente hidrófilo, el cual al unirse al ADN, ARN, cromatina o cuerpos de Nissl tiene una coloración azul, mientras que al unirse con los glicosaminoglicanos contenidos en los gránulos de las CC (por la presencia de heparán sulfato, heparina e histamina), torna a un color metacromático púrpura (Sridharan & Shankar, 2012).

### **5.10. Estadística**

Los datos recolectados se analizaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6. Realizando prueba de Kruskal-Wallis para las mediciones conductuales seguidas de la prueba de Dunnet. Para el contenido de GABA, PL y EROs se realizó un análisis de varianza (ANOVA), las comparaciones múltiples se llevaron a cabo por la prueba de rangos de Tukey. Los valores reportados se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar.

## 6. Resultados

Con el fin de observar cómo se desarrollaba el modelo del AQ en los animales *W-sh*, se realizó el análisis del número de giros posteriores a la lesión con AQ en ratones C57BL6/J (C-57) y *W-sh* administrando apomorfina (s.c.) y midiendo los giros ipsilaterales durante 1 hora. En los ratones C57BL6/J lesionados con AQ se observó una media de  $57.83 \pm 1.47$  giros por hora. En los animales *W-sh* con AQ se obtuvo una media de  $35 \pm 1.26$  giros. Este dato es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo de ratones C-57 (Figura 4). En los diferentes grupos examinados se observa que al ser inyectados con solución salina y posteriormente estimulados con apomorfina no se presentan giros.

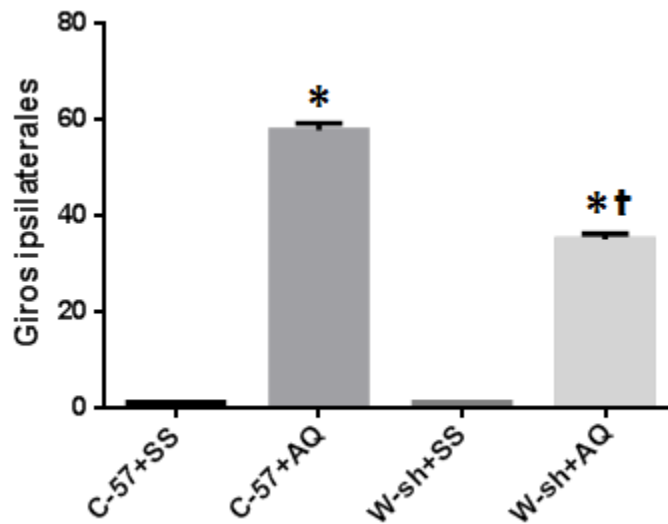


Figura 4. Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ ratones *W-sh*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. Kruskal-Wallis seguido por Dunnet. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

Para evaluar la pérdida de neuronas GABAérgicas tras la lesión con AQ se midió por HPLC el contenido de GABA en el estriado. En los ratones C-57 inyectados con solución salina (SS) se observó un contenido de  $0.029 \pm 0.003$   $\mu\text{mol/mg}$  proteína de GABA que disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) al ser lesionados con AQ  $0.0155$

$\pm 0.003 \mu\text{mol/mg}$ . Los ratones *W-sh* con SS presentaron una concentración media de GABA de  $0.034 \pm 0.004 \mu\text{mol/mg}$  la cual no representa diferencia significativa con respecto al grupo C-57 con SS. Al ser lesionados con AQ el valor de GABA en ratones *W-sh* disminuye a  $0.027 \pm 0.002 \mu\text{mol/mg}$  el cual presenta diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el grupo C-57 y AQ y el grupo *W-sh* con SS (Figura 5).

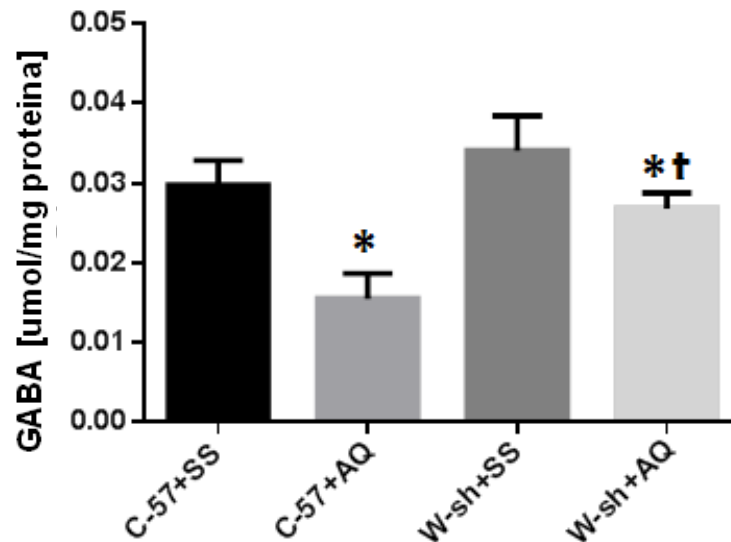


Figura 5. Contenido de GABA después de la lesión con AQ ratones *W-sh*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

Con el fin de observar el daño oxidante producido en los animales *W-sh* bajo el modelo del AQ, se midió la producción de especies reactivas a oxígeno (EROs) en los ratones tratados con AQ, los animales fueron sacrificados dos horas después de la lesión con AQ y el tejido fue procesado para efectuar la medición de las EROs utilizando diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína. En los ratones C-57 con AQ, se detectó la formación de  $10.70 \pm 0.57 \text{ pmol/mg proteína/minuto}$  de EROs. En los ratones *W-sh* el valor de EROs fue significativamente menor  $7.593 \pm 0.2807 \text{ pmol/mg proteína/ minuto}$  ( $p < 0.05$ ) que el obtenido en el grupo C-57 con AQ (Figura 6).

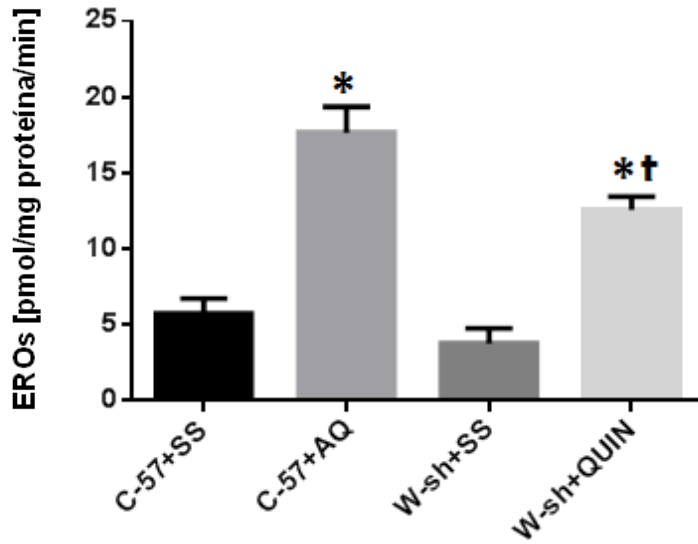


Figura 6. Producción de EROs después de la lesión con AQ ratones *W-sh*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

La peroxidación de lípidos en los ratones C-57 lesionados con AQ, fue de  $17.65 \pm 1.72$  UF/mg proteína, en los ratones *W-sh* con AQ se obtuvo un valor menor que fue estadísticamente significativo con respecto al grupo C-57  $12.59 \pm 0.86$  UF/ mg proteína ( $p < 0.05$ ) (Figura 7).

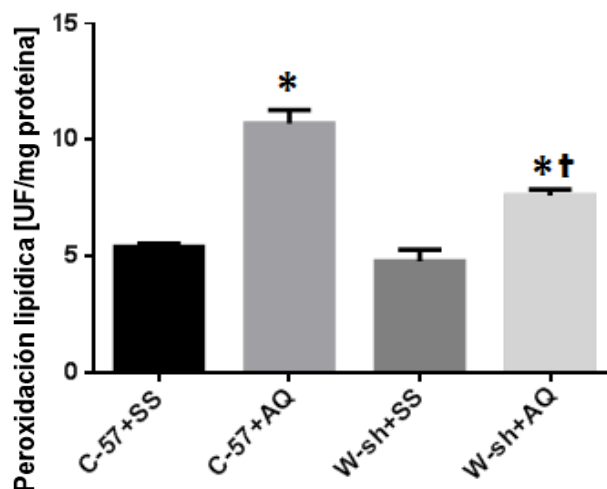


Figura 7. Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ ratones *W-sh*. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.



Con el fin de repoblar el cerebro de animales *W-sh* con CC, se llevó a cabo la reconstitución ICV en los ratones deficientes *W-sh*. Se inyectó ICV  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^4$  y  $5 \times 10^5$  CC derivadas de médula ósea (BMMC; contenidas en 10  $\mu$ L de solución Tyrode's sin albúmina), en el ventrículo lateral derecho de los animales. Posteriormente, bajo anestesia, se llevó a cabo la perfusión cardiaca con PBS y PFA al 4% e inmediatamente los cerebros fueron recolectados y mantenidos en PFA al 4% hasta su utilización. Previo a realizar los cortes histológicos del cerebro, éstos permanecieron 24 hrs en solución de sacarosa al 30% con 0.01% de azida de sodio. Posteriormente se procedió a realizar los cortes coronales a diferentes niveles cerebrales.

Las imágenes representativas de los cerebros analizados de los diferentes grupos, se muestran en la figura 8. Se observa una clara proliferación de las CC en el estriado de los animales C-57, y en los cerebros de animales *W-sh*, como ya está reportado hay ausencia de éstas. En los cerebros reconstituidos con  $5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^4$  BMMC, se observa una menor densidad de esta población celular. En los cerebros de los animales reconstituidos con  $5 \times 10^5$  BMMC, se observó una población semejante a la de los animales C-57. Por lo que la cantidad de  $5 \times 10^5$  BMMC administrada por la vía ICV fue la que mejor repobló con CC. En la figura 9 se muestra la gráfica de conteo de las CC en los diversos grupos analizados.

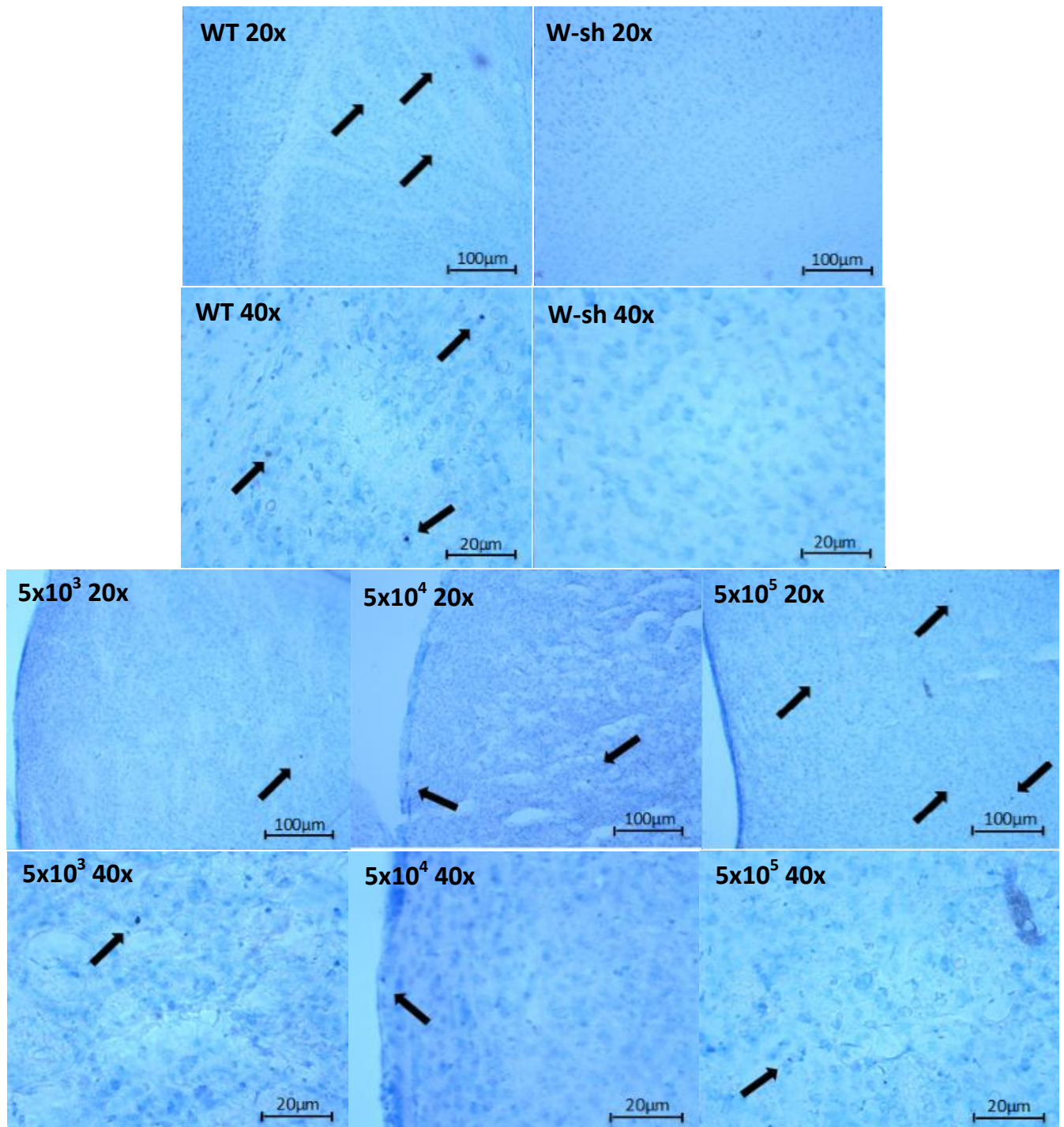


Figura 8. Imágenes representativas del estriado de los diferentes grupos analizados posterior a la reconstitución ICV con BMMC, objetivos 10x y 40x. Ratones C-57BL6/J (WT), Ratones W-sh/W-sh (W-sh), ratones reconstituidos con  $5 \times 10^3$  células ( $5 \times 10^3$ ), ratones reconstituidos con  $5 \times 10^4$  células ( $5 \times 10^4$ ) y ratones reconstituidos con  $5 \times 10^5$  células ( $5 \times 10^5$ ).

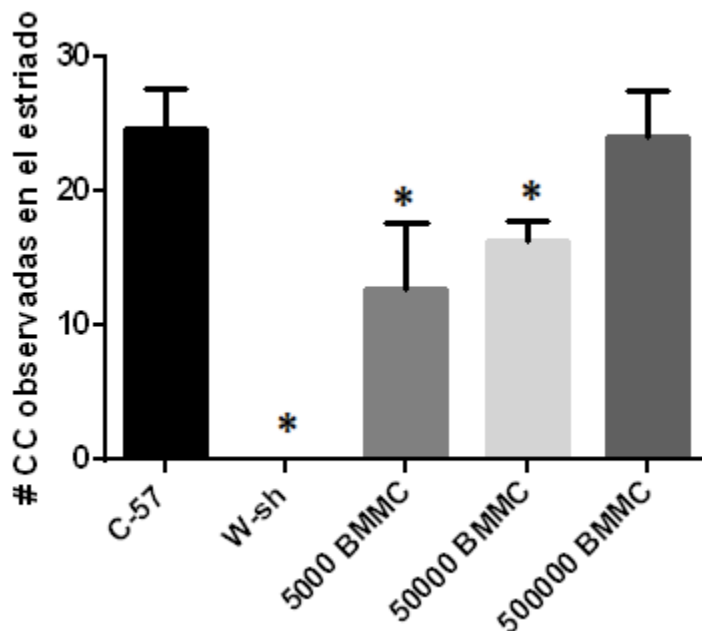


Figura 9. Promedio del coteo de CC en el estriado de los diferentes grupos analizados. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 3 animales por grupo. Kruskal-Wallis seguido por U de Mann Whitney. \* $p < 0.05$  diferente con respecto al grupo WT

En la figura 7 se muestra el número promedio de CC encontrados en el estriado de los diferentes grupos evaluados, determinando así un promedio de 24 CC en los animales WT, la usencia de estas células en los animales *W-sh*, un promedio 13 CC en los ratones reconstituidos ICV con  $5 \times 10^3$  BMMC, 16 CC en los ratones reconstituidos con  $5 \times 10^4$  BMMC y un promedio de 23 CC en los animales reconstituidos con  $5 \times 10^5$  BMMC, por lo cual se determinó que la cantidad adecuada para reconstituir a estos animales con CC es de  $5 \times 10^5$  BMMC vía ICV.

Con el fin de observar la participación de las CC a nivel periférico en el daño inducido por AQ, se llevó a cabo la reconstitución de los animales *W-sh* con  $2 \times 10^6$  BMMC intraperitonealmente (*W-shIP*) y se sometieron al modelo neuroquímico inducido con AQ, midiendo posteriormente la conducta de giros, y daño oxidante en dichos animales. Al ser lesionados con AQ, la media de número de giros aumentó ligeramente a  $39.17 \pm 3.71$ , sin embargo no se observó el mismo nivel de daño que en su fondo

C57BL6/J (Figura 10). La formación de EROs aumentó a  $8.528 \pm 0.4123$ , sin embargo no se observó el mismo nivel de EROs que en su fondo C57BL6/J (Figura 11), y en PL de igual manera no se observó el mismo valor que en su fondo C57BL6/J (Figura 12). Por lo que se comprobó que esta vía no parece contribuir en los parámetros de daño en el modelo del AQ.

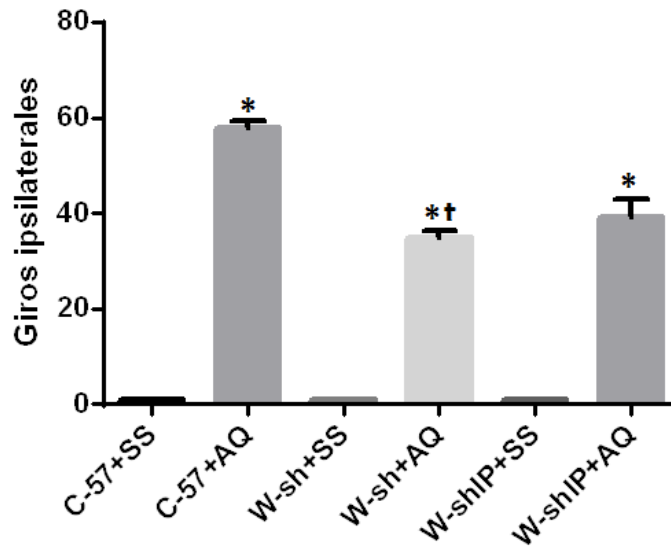


Figura 10. Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ reconstitución IP. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. Kruskal-Wallis seguido por Dunnet. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

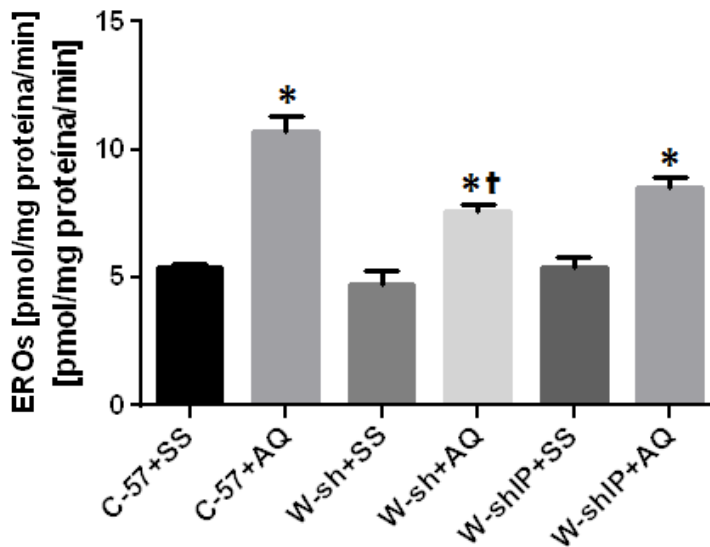


Figura 11. Producción de EROs después de la lesión con AQ reconstitución IP. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

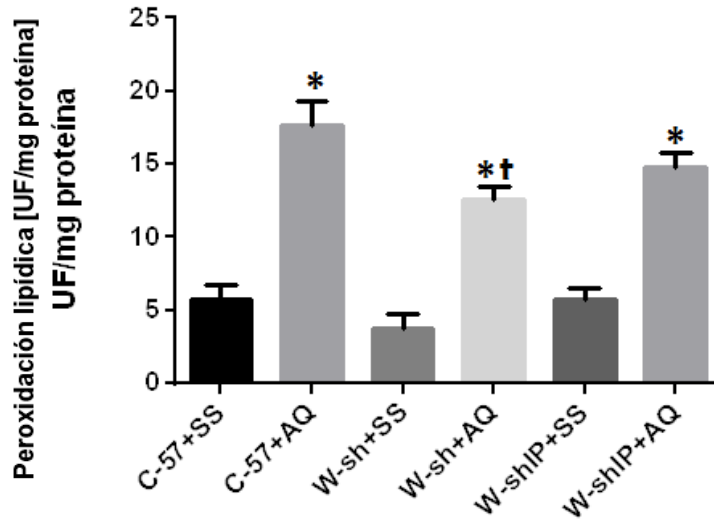


Figura 12. Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ reconstitución IP. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

Prosiguiendo con el estudio de la participación de las CC en el daño inducido por AQ, se realizó la reconstitución ICV de CC en animales *W-sh* con  $2 \times 10^5$  BMMC, posteriormente se realizó la lesión con AQ y se midieron la conducta de giros, niveles de GABA estriales, formación de EROs y PL.

Con respecto a la conducta de giros los animales reconstituidos ICV con BMMC (*W-shICV*), aumentaron el número de giros alcanzando un promedio de  $48.7 \pm 4.3$ , dicho valor no presenta diferencia significativa con respecto al grupo C-57 lesionado con AQ (Figura 13), en el contenido de GABA estriatal se observa una disminución del contenido de este neurotransmisor  $0.0183 \pm 0.003$  que no presenta diferencia con respecto al contenido de GABA estriatal de los animales C-57 lesionados con AQ (Figura 14), con lo cual se observa que la reconstitución ICV recupera la condición de daño en los animales *W-sh*.

En los parámetros de oxidación se observa un aumento tanto en los parámetros de formación de EROs así como la PL en los animales reconstituidos ICV con BMMC, dando un promedio de  $10.026 \pm 0.268$  en EROs (Figura 15) y  $18.23 \pm 1.27$  en PL (Figura 16), dichos datos no difieren estadísticamente con los observados en los animales WT lesionados con AQ, por lo cual el daño oxidante está relacionado con la presencia de estas células en dicho modelo.

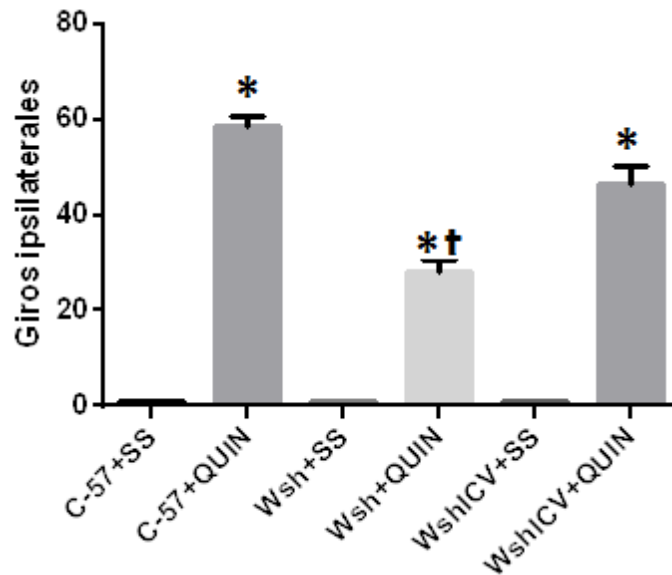


Figura 13. Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ reconstitución ICV. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. Kruskal-Wallis seguido por Dunnet. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SS. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

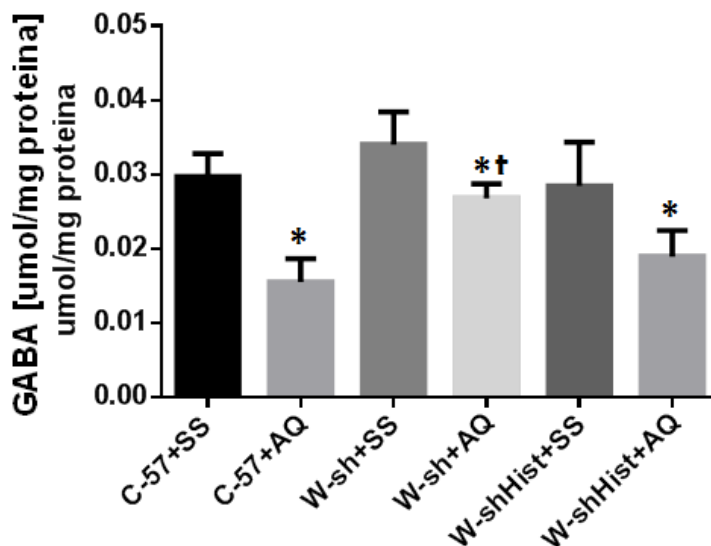


Figura 14. Niveles de GABA estriatal después de la lesión con AQ reconstitución ICV. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

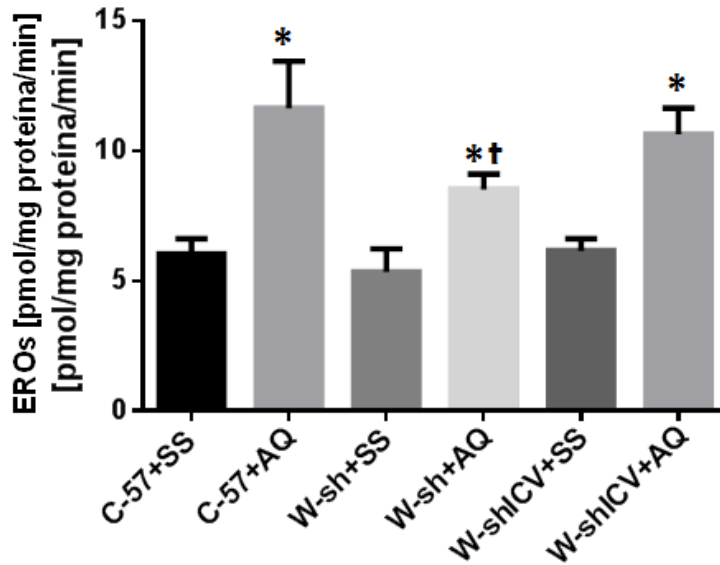


Figura 15. Producción de EROs después de la lesión con AQ reconstitución ICV. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

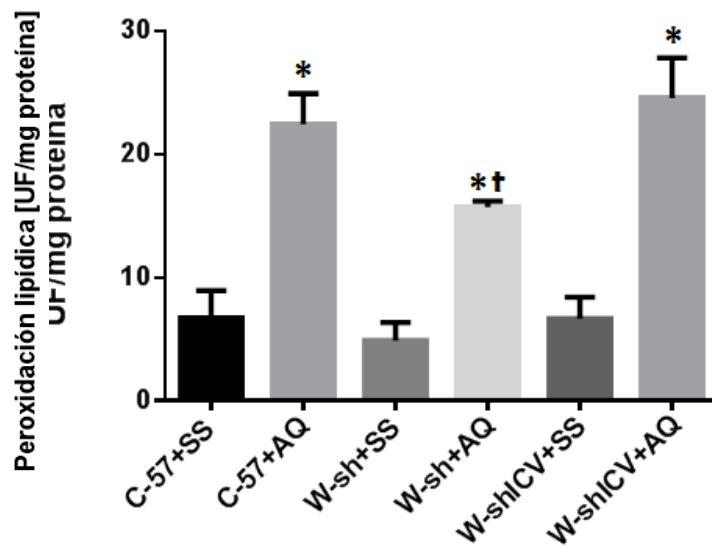


Figura 16. Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ reconstitución ICV. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

Dentro de los objetivos propuestos de este trabajo, fue evaluar como la histamina puede mediar el daño observado en el modelo del AQ dado que se conoce que esta amina es uno de los principales mediadores liberado por las CC, por lo cual se administró histamina ICV en los animales *W-sh* y posteriormente se realizó el modelo del AQ. Con respecto a la conducta rotatoria se observó un aumento en el número de giros llegando un valor de  $63.5 \pm 4.97$ , el cual no difiere con lo observado en los animales C-57 (Figura 17), de igual forma en el contenido de GABA, dicho neurotransmisor se encuentra reducido en el estriado de animales tratados con histamina a una cantidad de  $0.02476 \pm 0.003$  el cual no presenta diferencia con el contenido de GABA en los animales C-57 (Figura 18).

En los parámetros de daño oxidante, la formación de EROs en los animales tratados con histamina, llego a valores de  $12.3 \pm 0.72$ ), los cuales se asemejan a los vistos en los animales C-57 (Figura 19), de igual forma sucede con la PL donde se observan valores de  $25.23 \pm 2.46$  que no difieren con respecto a los animales C-57 lesionados con AQ (Figura 20). Por lo cual se observa que la histamina media el daño conductual y oxidante en el modelo del AQ.

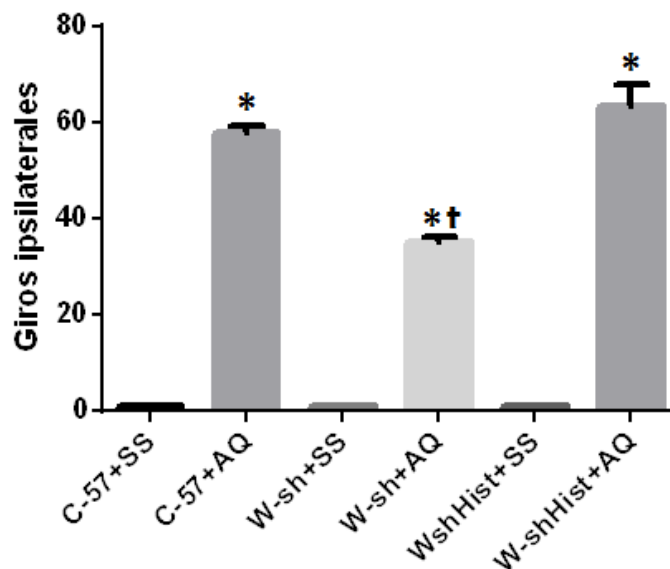


Figura 17. Evaluación de la conducta rotatoria después de la lesión con AQ administración de Hist. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. Kruskal-Wallis seguido por Dunnet. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.



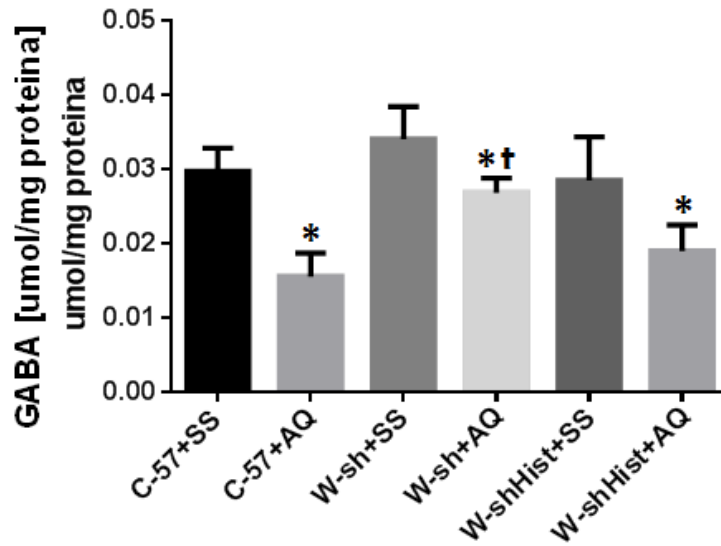


Figura 18. Niveles de GABA estriatal después de la lesión con AQ administración de Hist. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

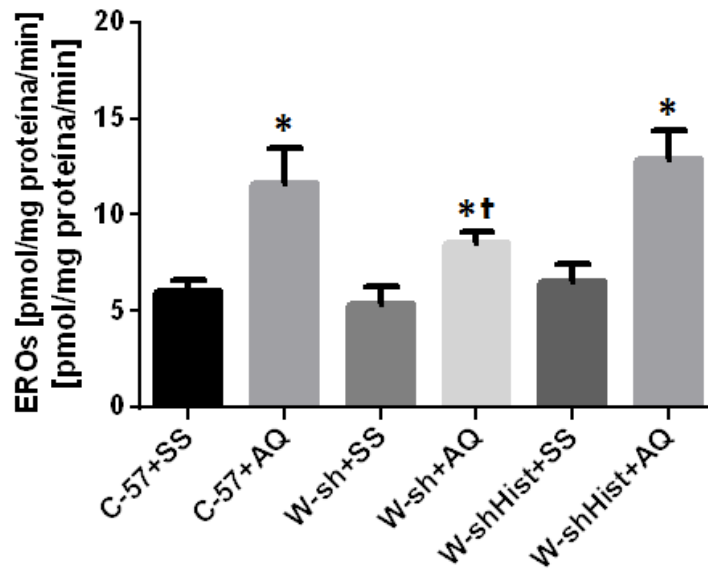


Figura 19. Producción de EROs después de la lesión con AQ administración de Hist. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SSI. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

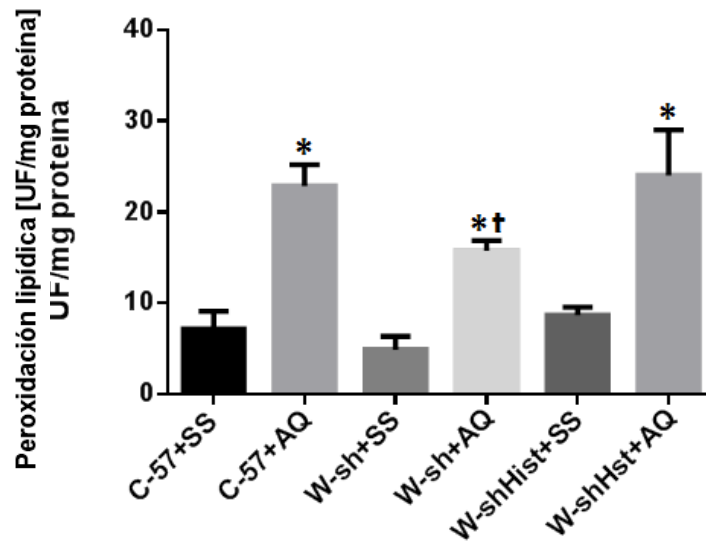


Figura 20. Peroxidación de lípidos después de la lesión con AQ administración de Hist. Los valores representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 animales por grupo. ANOVA seguido por Tukey. \* $p < 0.05$  diferentes del grupo SS. † $p < 0.05$  diferentes del grupo control con AQ.

## 7. Discusión

La enfermedad de Huntington es una enfermedad neurodegenerativa causada por una mutación en el brazo corto del cromosoma 4 en el gen que codifica para la proteína HTT (O Walker, 2007). Dicha mutación causa la expresión de una HTT<sup>m</sup> la cual se encuentra relacionada con la baja supervivencia y muerte de las células neuronales (Creus, 2012). En general la EH el inicio de la enfermedad se caracteriza por la pérdida neuronal progresiva de las neuronas GABAérgicas que participan en la vía indirecta de los ganglios basales, ocasionando de esta manera una pérdida en el control del movimiento en los pacientes que cursan con la enfermedad (Brunton, 2012). Entre otra de las características de los pacientes con Huntington es una desregulación en la vía de las kinureninas, disminuyendo la producción de ácido kinurénico y un aumento de la formación del AQ (Maddison & Giorgini, 2015). El AQ es un agonista de los receptores NMDA lo cual puede producir una desregulación en el influjo de calcio al interior de las neuronas (Stone & Perkins, 1981). La teoría de la participación del AQ en la enfermedad de Huntington, así como en algunas otras patologías del SNC nos dan una herramienta para el estudio de la EH en modelos animales que permitan simular las

características neuroquímicas y anatómicas de dicha enfermedad (Schwarcz *et al.*, 1983). La inyección de AQ intraestriatalmente estimula las neuronas GABAérgicas a través del receptor NMDA llevando a cabo la producción de EROs, PL y la posterior muerte neuronal en el sitio de lesión (Stone & Perkins, 1981; Schwarcz *et al.*, 1983).

### **7.1. Conducta de giro**

El modelo experimental de la EH inducido por AQ permite mostrar una conducta de giros inducidos por la administración de apomorfina, debido a la muerte neuronal asociada a la afinidad del AQ al receptor NMDA lo cual ocasiona una sobre estimulación de dicho receptor y un influjo de calcio al interior de la célula ocasionando excitotoxicidad (Schwarcz *et al.*, 1983; Stone & Perkins, 1981).

En este trabajo se observa que los animales carentes de CC presentan un menor número de giros que su fondo genético que posee dichas células, esta característica de disminución de daño en modelos de daño cerebral concuerdan con los estudios realizados por Tanzola en 2003, donde al inducir un modelo de encefaleomielitis experimental alérgica (EEA) los animales carentes de CC presentan un daño disminuido en las alteraciones motoras evaluadas en el modelo (Tanzola *et al.*, 2003), de igual forma en un modelo de isquemia focal se observa una disminución del volumen de edema e infiltrado de neutrófilos en el SNC de animales carentes de CC (Mc Kittrick *et al.*, 2015). Dichos estudios demuestran que la ausencia de CC disminuye el daño ocasionado en diversos modelos experimentales, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Tras la reconstitución de las CC en el estriado de los animales *W-sh* e inducir el modelo neuroquímico de la EH observamos un aumento en el daño ocasionado por el AQ, esto concuerda con el experimento de Tanzola de EEA donde al reconstituir a los animales carentes de CC con BMMC de animales WT se aumenta el nivel de daño en dicho modelo (Bennett *et al.*, 2009). Del mismo modo en un modelo de miocarditis autoinmune experimental, se inmunizaron corazones de ratas con miosina cardíaca porcina lo cual llevo a un aumento en la dilatación del ventrículo derecho, su disfunción y la formación de fibrosis miocárdica, sin embargo al utilizar un estabilizador de las CC (Cromoglicato de sodio) dichos parámetros fueron reducidos

(Mina *et al.*, 2012), por otro lado en un modelo de isquemia intestinal inducida por reperfusión en perros, se observó que el compuesto 48/80 (un desgranulador de las CC) aumentaba el daño ocasionado en dicho modelo (Boros *et al.*, 1999). Lo cual demuestra un papel importante de las CC en el potenciamiento del daño inducido en diversos modelos.

La conducta de giros inducida por apomorfina se encuentra regulada por la liberación del neurotransmisor GABA de las neuronas en el estriado, una menor liberación de este neurotransmisor se asocia con la falta del control del movimiento en dicha estructura (Pan *et al.*, 1990). Los animales *W-sh* se conocen tienen disminuido el nivel de histamina en el cerebro (Nautiyala *et al.*, 2008). Este hecho es importante dado que estudios muestran que el agonista H3 (immepip) y la histamina inhiben la liberación de GABA marcado radiactivamente [<sup>3</sup>H] en cortes de la par reticulata de la sustancia nigra, tras su activación. Dicha inhibición es revertida por el antagonista del receptor H3 (tioperamida) (García *et al.*, 1997), esto demuestra un papel importante de la histamina como modulador de conductas motoras.

En general se sabe que las neuronas histaminérgicas del NTM tienen proyecciones hacia los ganglios basales innervando principalmente el estriado. Existe una amplia expresión de los receptores H1, H2 y H3 en el estriado siendo el receptor H3 el de mayor prevalencia (Bolam y Ellender, 2016). Esto es de gran importancia debido a que se conoce que la histamina es un neuromodulador de las transmisiones neuronales (Albach, 2002), y específicamente para este modelo la liberación de dicha amina en el estriado se encuentra relacionada al control de la función motora. Una característica de nuestro modelo es la administración de apomorfina para inducir la conducta de giros (Pan *et al.*, 1990), y se ha observado que la administración de un agonista de los receptores D2 (quinpirona) en el NTM incrementa la liberación de histamina. De igual forma las neuronas en el NTM responde a la administración de dopamina, quinpirola (agonista D2) y SKF 38393 (agonista D1/D5) aumentando la tasa de disparo de las neuronas de dicha región (Yanovsky *et al.*, 2011), estos datos son importantes dado que la liberación de histamina pudiera mediar la conducta de giro observada en nuestro modelo. En un modelo de la EP ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina en la par

compacta de la sustancia nigra tras la administración de apomorfina presentan una conducta de giros contralateral al hemisferio de lesión y dicha conducta se ve aumentada por la administración de histidina (precursor de la histamina), mientras que la administración de  $\alpha$ -flurometilhistidina (inhibidor irreversible de la histamina descarboxilasa) inhibe la conducta de giros. De igual forma la administración de pirilamina (antagonista H1) y cimetidina (antagonista H2) disminuye la conducta de giros de igual forma que un agonista del receptor H3 (imemepip) (Liu *et al.*, 2008). Por otro lado ratas neonatas (3 días) inyectadas ICV con 6-OHDA presentan una conducta de masticado de manera espontánea y esta aumenta con la administración de SKF 38393 mientras que la administración de un antagonista H3 (tioperamida) induce la conducta de masticado similar al agonista dopaminérgico, así también la tioperamida aumentó la conducta en animales tratados con SKF 38393 y el antagonista H3 (Nowak *et al.*, 2006). En otro modelo de ratas lesionadas con 6-OHDA el número de giros inducidos por apomorfina se redujo por la administración de emmepip intranigralmente (García-Ramirez *et al.*, 2004). Por otro lado se sabe que la administración de apomorfina en ratas induce una conducta de lamida y se ha observado que la administración ICV e IP de agonistas H1 o H2, aumenta dicha conducta inducida por apomorfina, mientras que el agonista del receptor H3 (imetit) la reduce (Farzin y Attarzadeh, 2000). Estos estudios sugieren que los mecanismos histaminérgicos pueden estar implicados en la modulación del comportamiento inducido por apomorfina y en nuestro caso los animales carentes de CC y que poseen menor cantidad del neuromodulador histamina presenten una conducta de giros disminuida por la escasa participación del neuromodulador en el sistema motor.

## **7.2. Contenido de GABA**

Otro parámetro relacionado con la muerte neuronal por el daño excitotóxico de dicho modelo es la disminución de contenido de GABA debido a la selectividad del AQ por las neuronas GABAérgicas (Schwarcz *et al.*, 1983) y la posterior exitotoxicidad mediada por el receptor NMDA (Stone & Perkins, 1981). Nuestros resultados muestran una disminución del contenido de GABA estriatal en todos los grupos lesionados con AQ,

sin embargo los animales carentes de CC presentan un mayor contenido de este neurotransmisor, esto como se mencionó anteriormente por la participación de dicho linaje celular en la potenciación de daño causado en diferentes modelos de daño, así como también este hallazgo concuerda con lo observado por Ryu y cols (2077), donde en un modelo animal en el cual se le ocasiona neutropenia por el uso de suero anti-neutrófilos la lesión con AQ disminuye la pérdida neuronal en dichos animales (Ryu *et al.*, 2007), lo cual indica que una carencia de linajes celulares relacionados con las respuestas inflamatorias reduce la pérdida neuronal tras una lesión excitotóxica.

En el caso específico de los animales *W-sh* tratados con histamina, la disminución del contenido de GABA asociado a la pérdida de neuronas estriatales por la acción del AQ, se asemeja a lo visto en un modelo de la EP, donde ratas lesionadas con 6-OHDA en la sustancia nigra reduce el contenido de las neuronas dopaminérgicas en dicha región y que tras el tratamiento diario de los animales con histidina incrementa la pérdida de neuronas dopaminérgicas, mientras que la administración de  $\alpha$ -flurometilhistidina disminuye dicha lesión. De igual forma el tratamiento diario con pirilamina (antagonista H1) disminuye la pérdida neuronal dopaminérgica (Liu *et al.*, 2007), observándose una participación de la histamina en la pérdida neuronal tras un daño excitotóxico. Así también los experimentos de Burban y col. en 2009 muestran que el activar el receptor NMDA en cultivos hipocampales para determinar la muerte neuronal, presentan una disminución en el número de células sobrevivientes con la administración exógena de histamina, así como también el realizar cocultivos de células hipocampales con CC y posteriormente inducir la activación de estas últimas aumenta la muerte neuronal mediada por el receptor NMDA (Burban *et al.*, 2009 ), lo cual concuerda con nuestros resultados observados al repoblar el estriado de los animales *W-sh* con CC y realizar la lesión con el AQ. Estos resultados contrastan con los observados en células corticales, donde la administración de histamina aumenta la supervivencia tras el tratamiento con NMDA (Bravo *et al.*, 2008), lo cual sugiere que la histamina puede aumentar o disminuir el daño excitotóxico mediada por el receptor NMDA de manera región dependiente, aumentando el daño en estructuras como el hipocampo y estriado y protegiendo en la corteza.

### 7.3. Daño oxidante

Con respecto a los valores de peroxidación de lípidos y formación de EROs, los radicales libres oxidan a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular y los grupos tioles de algunos aminoácidos (Behan, 1999), resultando en daño celular. Se ha demostrado que la administración de AQ aumenta la PL de manera dosis dependiente (Kubicova *et al.*, 2013), por lo cual en todos nuestros grupos de animales lesionados con AQ, presentan un aumento en dicho parámetro oxidante. De igual forma se sabe que la estimulación del receptor NMDA induce la producción de EROs debido a la activación de óxido nítrico sintasa y debido a disfunción mitocondrial (Behan, 1999) por lo cual en nuestro modelo dicho parámetro se observó de misma cuenta aumentado en todos los grupos con AQ.

En los animales *W-sh* se observó disminuidos los parámetros de PL y formación de EROs lo que concuerda con los observado por Ryu y col en 2007, en su modelo de neutropenia, tras el cual al realizar la lesión con AQ se disminuye el estrés oxidante (Ryu *et al.*, 2007), también se ha observado que la activación del sistema inmunológico aumenta la formación de EROs, en el caso de las CC se ha estudiado que la activación de dichas células a través de la estimulación con IgE, aumenta la producción de EROs (Kumar *et al.*, 2008), por otro lado el sulfito de sodio promueve la formación de EROs en cultivos de CC (RBL-2H3) (Collaco *et al.*, 2006), y de manera importante para este trabajo se ha observado que la estabilización de las CC ejerce un efecto neuroprotector disminuyendo la peroxidación lipídica e inhibieron la formación de óxido nítrico tras la administración sistémica de rotenona (Abdel-Salam *et al.*, 2016), por lo cual se observa que la ausencia de linajes celulares inmunológicos así como la modulación de las CC disminuye el nivel de daño oxidante en modelos excitotóxicos y esto podría explicar nuestros resultados en los cuales se observa que la ausencia de las CC disminuye la producción de EROs mientras que al reconstituir los animales *W-sh* con BMMC dicho parámetro aumenta.

Se sabe que las CC en alergias y enfermedades inflamatorias de la piel como la dermatitis atópica, la urticaria y la psoriasis muestran un aumento de marcadores de daño oxidante formado por las CC, dentro de estas se observa un aumento de la 8–

hidroxiguanina (marcador de daño de DNA), aumento de la 4-hidroxi-2-nonenal, y malondialdehído (marcadores de daño oxidante lipídico) (Okayama, 2005). Por otro lado en los modelos de isquemia por reperfusión en el intestino delgado se ha observado que las CC aumenta el daño oxidante producido en el modelo (Zhao *et al.*, 2014). Al tratar a los animales con cromoglicato de sodio los niveles de malonaldehído posteriores a la reperfusión se encuentran disminuidos, mientras que al usar el compuesto 48/80 los niveles de dicho marcador de daño lipídico se encuentran aumentando (Huang *et al.*, 2012), esto concuerda con nuestros resultados en los cuales la reconstitución estriatal de CC aumenta los parámetros de daño oxidante en los animales lesionados.

En el modelo de inyección sistémica de rotenona se observa una disminución del daño oxidante al utilizar antagonistas del receptor H1 (ketotifeno y loratadina) lo cual indica una participación de dicho receptor a histamina en el control del daño oxidante causado por rotenona (Abdel-Salam *et al.*, 2016). Por otro lado se ha observado que la histamina permite un mayor flujo de calcio tras la activación del receptor NMDA por L-aspartato o NMDA en neuronas hipocámpales (Burban *et al.*, 2010), este aumento de calcio al interior de la célula mediado por el receptor NMDA y potenciado por la histamina conlleva a la producción de un mayor número de EROs y por consiguiente un mayor nivel de PL en los animales tratados ICV con histamina al igual que a los animales *W-sh* reconstituidos ICV con CC, pudiera poseer dicho efecto por la liberación de dicha amina tras ser activadas estas células y por consiguiente potenciar la citotoxicidad por el receptor NMDA.

#### **7.4. Daño inflamatorio**

Debido al tiempo en el cual se desarrolla el modelo del AQ se puede intuir que éste representa un modelo de neuro-inflamación aguda. Cuando se inyecta AQ en el estriado de rata se ha visto una activación de la microglía, no solo en el área de lesión, sino en área cercana. Desde el día 1 post inyección se observa la activación de la microglía en el estriado y el glóbulo pálido, en el día 3 post inyección se ve activación



de la microglía en la sustancia y para el día 5 se observa su activación en el tálamo (Töpfer *et al.*, 1993), lo cual indica un papel importante de la microglía y los procesos inflamatorios en dicho daño, de igual forma se ha observado un aumento en el mRNA de la IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  tras la inyección de AQ en el estriado de ratas, lo cual da evidencias de que algunos mediadores inflamatorios pudieran tener participación en el daño ocasionado por el AQ (Ryu *et al.*, 2006). La inhibición de TNF- $\alpha$  por la administración de XPro1595, disminuye los niveles altos de este en la corteza y estriado de animales R6/2, así como también reduce los cambios motores, la activación de la caspasa, disminuye los agregados de HTT mutada, la gliosis y aumenta la densidad neuronal en el estriado de dichos animales (Hsiao *et al.*, 2014), observándose así una neuroprotección al bloquear a dicha citosina y dándole un papel importante en el daño ocasionado en la EH. Por otro lado al agregar un vector lentiviral para aumentar la expresión de IL-6 e IL6/IL6R (recombinante de la IL-6 con su receptor), se observa un menor daño estriatal en ratas lesionadas con AQ, sin embargo en la conducta rotatoria el aumento de IL-6 no muestra protección con respecto al control de daño (Bensadoun *et al.*, 2001). También se ha observado un aumento en la liberación de la quimiocina CCL2 en cultivos primarios de astrocitos fetales humanos, tras la adición de AQ (Guillemin *et al.*, 2003), CCL-2 es uno de los quimioatrayentes más potentes para monocitos (Hayashi *et al.*, 1995; Hurwitz *et al.*, 1995) esto puede llevar a la propagación de la respuesta inflamatoria a las células microgliales del cerebro (Peterson *et al.*, 1997, Andjelkovic *et al.*, 1999). Por el contrario se ha visto que el factor neurotrófico derivado de glía disminuye la conducta de giros inducida por anfetamina en ratas lesionadas unilateralmente en el estriado con AQ, así como también disminuye la pérdida neuronal causada por dicha toxina (Araujo y Hilt, 1997), esto indica que la microglia tiene un

papel fundamental en el modelo del AQ sin embargo se ha observado que la depleción de diversos linajes celulares inmunológicos disminuyen la activación de la microglía tras la lesión cerebral, el uso de suero anti-neutrófilos para inducir neutropenia, disminuye la gliosis después de la inyección con AQ (Ryu *et al.*, 2007) y más importante para este trabajo se ha observado que la modulación de las CC y los animales carentes de estas disminuyen la activación de la microglía tras la administración en el hipotálamo de C48/80 (Dong *et al.*, 2016).

De acuerdo con nuestros resultados, proponemos el siguiente esquema que muestra los posibles mecanismos por los que las CC están ejerciendo un aumento en el daño causado por el AQ. Se sabe que la histamina puede modular el receptor de NMDA aumentando y disminuyendo la excitotoxicidad de este (Bravo *et al.*, 2008; Burban *et al.*, 2010; Skaper *et al.*, 2001), por lo que una posible vía que se sigue es la liberación de histamina por las CC que aumenta la entrada de calcio llevando a un aumento de la muerte neuronal, PL y formación de EROs, mediada por este receptor (Fig. 5A). Del mismo modo, es posible que la histamina liberada por las CC active la microglía (Ferreira *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2016), ya que se sabe que las CC pueden activar a la microglía llevando a la liberación de TNF- $\alpha$  e IL-6 y la producción de EROs (Fig. B) (Silver y Curley, 2013; Zhang *et al.*, 2012a). Por otro lado, en los animales W-sh debido a la ausencia de CCs en el cerebro, presentan un daño disminuido debido a la baja Hist, asimismo debido a esta falta de Hist liberada por las CC no puede llevarse a cabo la señal de daño y, por lo tanto, la microglía no recibe una señal que induzca la liberación de sus mediadores inflamatorios.

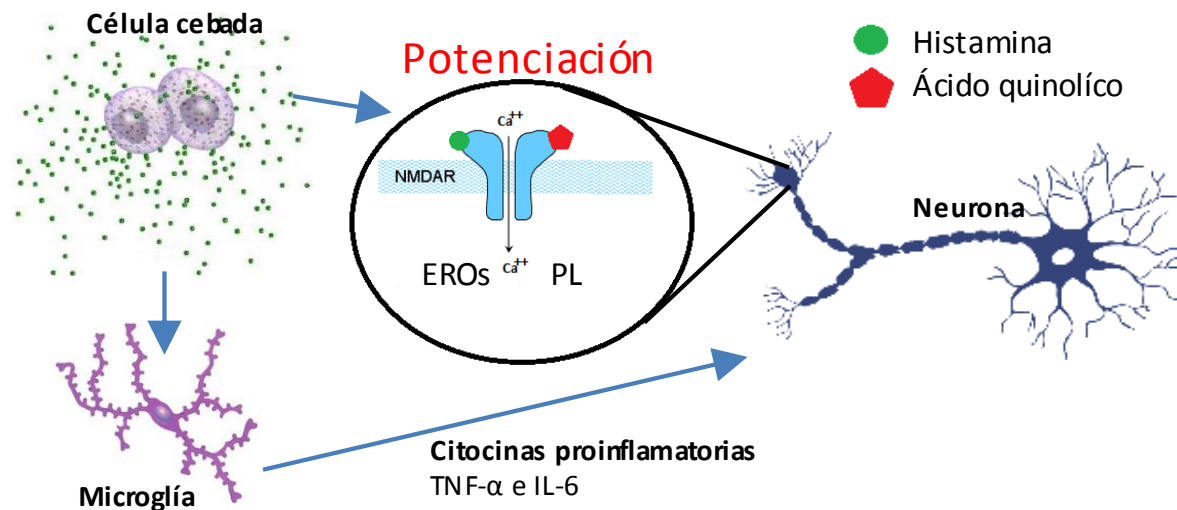


Figura 21. Esquema propuesto de los posibles mecanismos de daño que se llevan a cabo en el modelo del AQ. A) La liberación de histamina por las CC pueden potenciar la excitotoxicidad del receptor NMDA lo cual conlleva a un aumento en la formación de EROs y PL. B) La histamina liberada por las CC puede llevar a la activación de la microglía y por consiguiente a la liberación de citocinas proinflamatorias que contribuyen al daño neuronal ocasionado por el AQ.

## 7.5. Reconstitución ICV de CC

Para utilizar una cepa destinada al estudio de la función de las CC en vivo, se requiere que cumpla con dos puntos importantes, 1) los animales de deben carecer completamente de este linaje celular y 2) su deficiencia puede ser reparada (Wolters *et al.*, 2008).

De acuerdo con estos dos puntos, se ha caracterizado que los ratones *W-sh* recién nacidos presentan algunas CC en la piel, las cuales desaparecen en su semana 8 de vida (Duttlinger *et al.*, 1993). En nuestro estudio observamos que los animales *W-sh* de 12 semanas de edad carecen de este linaje celular en el estriado, esto mediante el uso de la tinción de azul de toluidina, lo cual concuerda con lo observado por Grimbaldeston

y col. en 2005, donde analizan el contenido de CC en las meninges, cerebelo y tálamo de los animales *W-sh*, observando que en ninguna de estas regiones se encuentran presentes las CC (Grimbaldeston *et al.*, 2005).

Con respecto en las estrategias de reconstitución para lograr la repoblación de CC en el cerebro, se ha observado que ni la inyección peritoneal ni por la vena de la cola del ratón con BMMC permite observar el asentamiento de las CC en diversas estructuras periféricas, sin embargo estos métodos de reconstitución no permiten repoblar el cerebro de los animales *W-sh* con CC (Bennett *et al.*, 2009; Nautiyal *et al.*, 2011; Tanzola *et al.*, 2003; Grimbaldeston *et al.*, 2005). Se sabe que en condiciones normales las CC dejan la médula ósea y circulan en la sangre como precursores inmaduros y que maduran asentados en los tejidos (Kitamura y Fujita, 1989), las diversas formas de reconstitución demuestran que no existen problema en el movimiento de las CC a través del torrente sanguíneo para llegar a asentarse en diferentes órganos y tejidos (Cyphert *et al.*, 2011; Wolters *et al.*, 2005; Seeley *et al.*, 2011; Nautiyal *et al.*, 2011).

La reconstitución en el SNC de los ratones *W-sh* presenta grandes retos, las reconstituciones periféricas (por la vena de la cola del ratón o inyección IP de BMMC) presentan dificultad en la repoblación del cerebro probablemente a la disminuida permeabilidad de la BHE en los ratones *W-sh* (Zhuang *et al.*, 1996), dado que se ha observado que la administración de sangre periférica total de animales Okabe en animales WT los cuales presentan una mayor permeabilidad de la BHE logran llegar al cerebro (Nautiyal *et al.*, 2011), este método permite la llegada de las CC a la pia madre de los animales *W-sh*, sin embargo no permite el ingreso de las CC al interior del cerebro, este modelo se relacionan con una ruptura de la BHE, dado que este modelo

simula la isquemia focal donde se ocluye una arteria por un lapso corto de tiempo y en el cual se ha observado conlleva a la ruptura de la BHE (Nautiyal *et al.*, 2011). El éxito obtenido en nuestro método de reconstitución puede deberse a la inyección directa de las BMMC en el cerebro de los animales *W-sh*, pasando así la dificultad de la permeabilidad de la BHE.

Por otro lado el uso de BMMC, es decir precursores inmaduros de cultivos conlleva a otro punto importante de análisis y es el establecer la maduración de dichas células en los tejidos. Se sabe que las CC se encuentran de manera normal circulando en la sangre (Kitamura y Fujita, 1989) y que los estímulos específicos obtenidos en los diversos ejidos donde se establecen conllevan a la maduración de estas células (Dahlin & Hallgren, 2015). Se ha observado que los precursores inmaduros requiere la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  y el receptor de quimiocinas CXCR2, para su tráfico hacia el intestino y la expresión de MAdCAM-1 y VCAM-1 en el endotelio intestinal, en el caso del pulmón los progenitores deben expresar las integrinas  $\alpha 4\beta 7$  y  $\alpha 4\beta 1$  para su tráfico hacia los pulmones (Galli, 1987). Esto indica que las CC que se encuentren en dichos tejidos desde etapas inmaduras se deben encontrar pre dispuestas para su asentamiento en los tejidos específicos y a partir de esto llevar a cabo su maduración en su órgano de residencia, esto podría dar explicación a porque al utilizar cantidades altas de CC para ser inyectadas solo un número pequeño de estas logran asentarse en el SNC, esto podría apoyar las teorías de que las CC se encuentran pre destinadas a llevar su maduración en tejidos específicos desde etapas tempranas de su desarrollo (Kitamura y Fujita, 1989; Valent *et al.*, 1991; Dahlin y Hallgren, 2015).

## 8. Conclusiones

Las células cebadas y la histamina participan en el daño oxidante causado por la administración intraestriatal de ácido quinolinico.

Las células cebadas y su mediador histamina participan en el proceso de daño neuronal en el modelo del ácido quinolinico de la enfermedad de Huntington.

Las células cebadas a nivel periférico no ejercen efecto en nivel de daño observado en el modelo del ácido quinolinico.

La inyección intracerebroventricular de  $5 \times 10^6$  células cebadas permite repoblar el estriado de los animales deficientes (*W-sh*).

## 9. Perspectivas

De acuerdo a los resultados obtenidos se propone analizar la participación de otros mediadores inflamatorios liberados por las CC en el modelo del AQ para descartar o proponer la participación de dichos mediadores tanto en el daño inducido en el modelo como en la conducta motora observada.

Se propone realizar estudios farmacológicos para ver el efecto de los diferentes receptores a histamina y su papel en el daño inducido en el modelo del AQ, para dilucidar mediante cuál de estos se está llevando a cabo dicho daño.

Basándose en los resultados obtenidos utilizar fármacos que inhiban la actividad histaminérgica como posible terapéutica en modelos de la EH.

## 10. Referencias

- Arias-Montaña, J. A., Floran, B., Garcia, M., Aceves, J., & Young, J. M. (2001). Histamine H3 receptor-mediated inhibition of depolarization-induced, dopamine D1 receptor-dependent release of [3H]- $\gamma$ -aminobutyric acid from rat striatal slices. *Br J Pharmacol*, 165–171.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Lynch, M. A., Vraniak, P. D., & Wenka, G. L. (2002). Chronic Brain Inflammation Results in Cell Loss in the Entorhinal Cortex and Impaired LTP in Perforant Path-Granule Cell Synapses. *Experimental Neurology*, 336-341.
- Owusu-Ansah, E., Yavari, A., & Banerje, U. (2008). A protocol for in vivo detection of reactive oxygen species. *Protocol Exchange*.
- Sayed, B. A., Christy, A., Quirion, M. R., & Brown, M. A. (2008). The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu. Rev. Immunol*, 705–739.
- Afifi, A., & Bergman, R. (2006). *Neuroanatomía Funcional*. Mexico: McGrawHill.
- Akdis, C. A., & Simons, F. R. (2006). Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *European Journal of Pharmacology*, 69-76.
- Amor, S., & Woodroffe, M. N. (2014). Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. *Immunology*, 287–291.
- Bennett, J. L., Blanchet, M.-R., Zhao, L., Zbytniuk, L., Antignano, F., Gold, M., . . . McNagny, K. Y. (2009). Bone Marrow-Derived Mast Cells Accumulate in the Central Nervous System During Inflammation but Are Dispensable for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 5507-5514.
- Bjorkqvist, M., Wild, E. J., & Thiele, J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 1869–1877.

- Brandt, J., & Butters, N. (1986). The Neuropsychology of Huntington's disease. *Trends Neurosci*, 387-392.
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., & Muqit, M. M. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's. *Ann Neurol*, 646-53.
- Browne, S. E., Ferrante, R. J., & Beal, M. F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol*, 147-163.
- Brunton, L. L. (2012). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México: McGraw Hill.
- Campbell, I. L., Krucker, T., Steffensen, S., Akwa, Y., Powell, H. C., Lane, T., . . . Siggins, G. R. (1999). Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN-alpha. *Brain Research*, 835, 46-61.
- Cha, J. H. (2000). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci*, 118-120.
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Molecular Medicine Report*, 13(4), 3391–3396.
- Creus, J. (2012). Una teràpia possible per a la malaltia de Huntington. *OmnisCellula*, 30-33.
- Dahlin, J. S., & Hallgren, J. (2015). Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. *Molecular Immunology*, 63(1), 9–17.
- Dong, H., Zhang, X., Wang, Y., Zhou, X., Qian, Y., & Zhang, S. (2016). Suppression of Brain Mast Cells Degranulation Inhibits Microglial Activation and Central Nervous System Inflammation. *Mol Neurobiol*, 1-11.
- Ehrlich, P. (1878). *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. Leipzig: University of Leipzig.
- Ellrichmann, G., Reick, C., Saft, C., & Linker, R. A. (2013). The Role of the Immune System in Huntington's Disease. *Clinical and Developmental Immunology*.



- Fernández-Novoa, L., & Cacabelos, R. (2001). Histamine function in brain disorders. *Behavioural Brain Research*, 213-233.
- Galli, S. J. (1993). New concepts about the mast cell. *N Engl J Med*, 257–265.
- Gamble, H. J., & Stempak, J. G. (1961). Observations upon the mast cells of rat foetal tissues. *EXPERIENTIA*, 440-441.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 65, 45–80.
- Gri, G., Frossi, B., D’Inca, F., Danelli, L., Betto, E., Mion, F., . . . Pucillo, C. (2012). Mast cell: An emerging partner in immune interaction. *Front. Immunol*, 3, 120.
- Grimbaldeston, M. A., Chen, C. C., Piliponsky, A. M., Tsai, M., Tam, S. Y., & Galli, S. J. (2005). Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Journal of Pathology*, 167(3), 835-48.
- Hanisch, U.-K. (2002). Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 140–155.
- Hof, P. R., & Mobbs, C. V. (2010). *Handbook of the neuroscience of aging*. Amsterdam: Elsevier.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Fattal, R., Pattani, S., Yang, E., Zaheer, S., . . . Zaheer, A. (2016). Mast Cells Release Chemokine CCL2 in Response to Parkinsonian Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-Pyridinium (MPP+). *Neurochemical Research*, 1042–1049.
- Kumar, R. K., Herbec, C., & Foster, P. S. (2008). The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current Drug Targets*, 485-94.
- Kwan, W., Trager, U., & Davalos, D. (2012). Mutant huntingtin impairs immune cell migration in Huntington disease. *Journal of Clinical Investigation*, 4737–4747.
- Lambracht-Hall, M., Dimitriadou, V., & Theoharides, T. C. (1990). Migration of mast cells in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.*, 56(2), 151-159.
- Lee, J. W., Lee, Y. K., Yuk, D. Y., Choi, D. Y., Ban, S. B., & Oh, K. W. (2008). Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *Journal of Neuroinflammation*, 37-52.

- Leszek, J., Barreto , G. E., Gąsiorowski , K., Koutsouraki , E., Ávila-Rodrigues , M., & Aliev , G. (2016). Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 15(3), 329-336.
- Lugo-Huitrón, R., Muñiz, P., Pineda, B., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., & Pérez-de la Cruz, V. (2013). Quinolinic Acid: An Endogenous Neurotoxin with Multiple Targets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Maddison, D. C., & Giorgini, F. (2015). The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 134–141.
- Masaki, T., Yoshimatsu, H., Chiba, S., Watanabe , T., & Sakata, T. (2001). Central Infusion of Histamine Reduces Fat Accumulation and Upregulates UCP Family in Leptin-Resistant Obese Mice. *American Diabetes Association*, 376-384.
- Monge-Acuña, A. A., & Fornaguera-Trías, J. (2009). A high performance liquid chromatography method with electrochemical detection of gamma-aminobutyric acid, glutamate and glutamine in rat brain homogenates. *Journal of Neurescience*, 183(2), 176-181.
- Morita, H., Saito, H., Matsumoto, K., & Nakae, S. (2016). Regulatory roles of mast cells in immune responses. *Seminars in Immunopathology*, 623.
- Nance, M. A., & Myers, H. M. (2001). Juvenile onset Huntington's disease—clinical and research perspectives. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 153–157.
- Nautiyal, K. M., Liu, C., Dong, X., & Silver, R. (2011). Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse. *J Neuroimmunol*, 142–146.
- Nautiyal, K. M., Liu, C., Dong, X., & Silver, R. (2011). Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse. *Journal of Neuroimmunology*, 142–146.

- Norman, A. B., Calderon, S. F., Giordano, M., & Sanberg, P. R. (1987). Striatal tissue transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral kainic acid lesions. *Neuropharmacology*, 27(3), 333–336.
- Novak, J. U., & Tabrizi, S. J. (2010). Clinical Review Huntington´s disease. *British Medical Journal*, 34-40.
- O Walker, F. (2007). Huntington´s disease. *The Lancet*, 218-128.
- Okayama, Y., & Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunology Reserch*, 34, 97–115.
- Panula, P., Airaksinen, M. S., Pirvola, U., & Kotilainen, E. (1990). A histamine-containing neuronal system in human brain. *Neuroscience*, 127–132.
- Passani, M. B., Panula, P., & Lin, J.-S. (2014). Histamine in the brain. *Front Syst Neurosci*, 64.
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2012). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates* (7 ed.). London: ELSEVIER.
- Peña, M., Pérez, E., & Picart, P. (2004). Enfermedad de Huntington: aspectos genéticos. *Medwave*, 3-9.
- Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Pérez, M., Pedraza-Chaverrí, j., Maldonado, P. D., Medina-Campos, O. N., Ortíz-Plata, A., . . . Santamaría, A. (2004). S-Allylcysteine prevents amyloid-beta peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits. *Journal of Pharmacology*, 489, 197-202.
- Peterson, P. K., & Toborek, M. (2014). *Neuroinflammation and Neurodegeneration*. New York : Springer.
- Purcell , W. M., & Atterwill, C. K. (1995). Mast Cells in Neuroimmune Function: Neurotoxicological and Neuropharmacological Perspectives. *Neurochemical Research*, 521-532.

- Robbins , S. L. (2002). *Manual de patología estructural y funcional*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Russo, I., Barlati, S., & Bosetti , F. (2011). Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. *Journal of Neurochemistry*, 947–956.
- Sandoval, K. E., & Witt, K. A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease*, 200–219.
- Schwarcz, R., Whetsell , W. O., & Mangano, R. M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 316–318.
- Selye, H. (1976). *The Stress of Life*. New York: McGraw Hill.
- Silver, R., & Curley, J. P. (2013). Mast cells on the mind: new insights and opportunities. *Trends in Neurosciences*, 36(9), 513-21.
- Silver, R., Silverman, A. J., Vitkovic, L., & Lederhendler, I. (1996). Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends in Neuroscience*, 25–31.
- Skaper , S. D., Facci , L., Kee, W. J., & Strijbos, P. J. (2001). Potentiation by histamine of synaptically mediated excitotoxicity in cultured hippocampal neurones: a possible role for mast cells. *J Neurochem*, 47-55.
- Sorolla , M. A., Reverter-Branchat , G., Tamarit , J., Ferrer, I., Ros, J., & Cabiscol, E. (2008). E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med*, 667-678.
- Sridharan, G., & Shankar, A. A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 251–255.
- Stone , T. W., & Perkins, M. N. (1981). Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *European Journal of Pharmacology*, 411–412.
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*, 182, 50-69.
- Streit, W. J., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation*, 14.

- Tai, Y. F., Pavese, N., & Gerhard, A. (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*, 1759–1766.
- Tanzola, M. B., Robbie-Ryan, M., Gutekunst, C. A., & Brown, M. A. (2003). Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course. *Journal of Immunology*, 4385-91.
- Theoharides, T. C. (1990). MAST CELLS: THE IMMUNE GATE TO THE BRAIN . *Life Sciences*, 46, 607-617 .
- Theoharides, T. C., Alysandratos, K. D., Angelidou, A., Delivanis, D. A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., . . . Miniati, A. (2012). Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys*, 1822, 21–33.
- Triggs, W. J., & Willmore, L. J. (1984). In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. *Journal of Neurochemical*, 976-980.
- Urbán, N. (2007). Malaltia de Huntington. *Omnis cellula*, 25-29.
- Varatharaj, A., Mack, J., Davidson, J. R., Gutnikov, A., & Squier, W. (2012). Mast cells in the human dura: Effects of age and dural bleeding. *Childs Nerv. Syst*, 28, 541–545.
- Woodroffe, N., & Amor, S. (2014). *Neuroinflammation and CNS Disorders*. UK: Wiley.
- Yu, Y., Blokhuis, B. R., Garssen, J., & Redegeld, F. A. ( 2016). Non-IgE mediated mast cell activation. *European Journal of Pharmacology*, 778, 33–43.
- Zhuang , X., Silverman , A. J., & Silver , R. (1996). Brain Mast Cell Degranulation Regulates Blood-Brain Barrier. *Journal of Neurobiology*, 393-403.