



**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias

“La neuroinflamación aguda inducida por lipopolisacárido conduce al parkinsonismo, involucrando la activación del inflamasoma NLRP3 y la disfunción del complejo I mitocondrial en la sustancia negra de la rata”

T E S I S

Que presenta

M. en C. Irais Erendira Valenzuela Arzeta

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

**En la especialidad de:
Neurobiología Celular y Molecular**

Director de Tesis:

Dr. Daniel Martínez Fong

Asesores:

Dr. José Antonio Arias Montaña (DFBN)

Dr. Porfirio Nava Domínguez (DFBN)

Dra. Yazmín Montserrat Flores Martínez (ENMyH)

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca de Doctorado otorgada con número de registro 722153.

Al Dr. Daniel Martínez Fong, director de este proyecto, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y por todas sus enseñanzas. Gracias por su confianza

Al Dr. Oskar Soto Rojas y la Dra. Yazmín Montserrat Flores Martínez por todas sus contribuciones, este proyecto es fruto del enorme trabajo en equipo que hicimos, que fortuna coincidir.

A mis asesores: Dr. Porfirio Nava, Dr. J. Antonio Arias Montaña y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega por sus consejos y contribuciones para la realización de esta tesis.

A David, Bismark y Uriel, gracias por brindarme siempre su apoyo y amistad y por todo el trabajo que hicieron para la realización de este proyecto.

Al Sr. Ignacio Araoz y miembros pasados y actuales del laboratorio del Dr. Fong, gracias por el apoyo constante durante mi estancia.

Agradezco también el apoyo brindado por Karen M. Delgado-Minjares, gracias, amiga por tu amistad y tus contribuciones a este proyecto.

A mis amigas, ustedes mujeres son mi motivación constante, gracias por enseñarme el enorme valor que tenemos las mujeres y lo increíblemente fuertes que somos.

A mis amigos de la vida y del CINVESTAV, gracias por enseñarme que los amigos también son familia.

A mi mamita hermosa, Alicia eres el pilar de mi vida mamita, nada sería posible sin tu amor. A mis hermanos Isaura e Isaid, gracias por siempre confiar en mí. A mis sobrinos Jaen, Joad e Iñaki, los amo mis chiquitirris. A mi papá, Don

Ever, te extraño hoy y te voy a extrañar todos los días de mi vida. Familia gracias por todos los días que pasamos juntos, son mi motor.

A mi pequeña orejona, Canelita, me enseñaste el enorme valor y respeto a la vida de los animales. Gracias por tu compañía siempre.

Por último, a mi compañero de vida y amigo Ulises, gracias por cada vez que me abrazaste y me dijiste que todo iba a estar bien, por todas las veces que me acompañaste cuando la jornada de trabajo era larga, por todo tu amor, ternura y paciencia. Eres el amor de esta parte de mi vida.

“Que nada nos limite, que nada nos defina, que nada nos sujete. Que la libertad sea nuestra propia sustancia”

Simone de Beauvoir

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.2 Tipos de Parkinson	3
1.4 Estructura del LPS.....	6
1.5 Vía de señalización LPS-TLR4.....	7
1.6 Activación del Inflamasoma	8
1.7 Microgliosis en la neuroinflamación inducida por LPS.....	12
1.8 Astrogliosis en la neuroinflamación inducida por LPS	15
2. Justificación.....	18
3. Hipótesis.....	19
4. Objetivo General	19
5. Objetivos Particulares	20
6. Material y métodos	21
6.1 Animales.....	21
6.2 Inyección estereotáxica del LPS.....	23
6.3 Temperatura corporal	23
6.4 Grado de enfermedad (<i>Sickness Behavior</i>).....	24
6.5 Pruebas de Comportamiento.....	24
6.6 Prueba de la viga.....	24
6.7 Prueba del cilindro de Scharlet	24
6.8 Prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por vibrisas 25	
6.9 Prueba de campo abierto.....	25
6.10 Procedimientos de inmunotinción	26
6.11 Ensayos de inmunohistoquímica	26
6.12 Ensayos de inmunofluorescencia	27
6.13 Densitometría y Conteo de Neuronas.....	29
6.14 Ensayo de Western Blot	30

6.15	Determinación de la actividad del Complejo I Mitocondrial (CI) en homogeneizado de SN	31
6.16	Análisis estadístico	31
7.	Resultados	33
7.1	La inyección intranigral de LPS provocó fiebre y manifestaciones clínicas de la enfermedad en ratas.....	33
7.2	Activación de la microglia después de la inyección intranigral de LPS. 34	
7.3	El LPS induce preferentemente astrocitos con fenotipo neurotóxico A1. 37	
7.4	Activación del inflammasoma en la SNpc después de la inyección de LPS. 42	
7.5	La administración de LPS conlleva a una disminución en la actividad del complejo I (CI) mitocondrial en homogeneizados de SN.	44
7.6	El LPS induce senescencia en neuronas dopaminérgicas.	45
7.7	Neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal después de la administración de LPS intranigral.	46
7.8	Comportamiento motor y déficit sensoriomotor en el día 30 después de la inyección intranigral de LPS.	49
8.	Discusión.....	53
9.	Conclusión.....	58
10.	Perspectivas	60
11.	Referencias.....	61

Resumen

Aún es controversial si la neuroinflamación conduce a la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal. Abordamos esta cuestión induciendo neuroinflamación aguda en la sustancia negra (SN) mediante una única inyección local (5 µg/2 µL de solución salina) de lipopolisacárido (LPS). La respuesta neuroinflamatoria celular se evaluó desde las 48 h hasta los 30 días después de la inyección intranigral por medio de inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de microglía (Iba-1+), astrocitos neurotóxicos A1 (C3+ y GFAP+) y caspasa-1 activa. También se evaluó la activación de NLRP3 y los niveles de Interleucina-1 beta (IL-1β) mediante *Western blot* y la actividad del complejo I (CI) mitocondrial. La fiebre y el grado de enfermedad se evaluaron durante las 24 horas iniciales, y los déficits de comportamiento motor se registraron hasta el día 30 post-inyección. En este día, se evaluó el marcador de senescencia celular β-galactosidasa (β-Gal) y tirosina hidroxilasa (TH) en la SN y en el cuerpo estriado. Tras la inyección de LPS, las células Iba-1 (+), C3 (+) y S100A10 (+) alcanzaron su máxima expresión a las 48 horas y los niveles basales a los 30 días. La activación de NLRP3 se produjo a las 24 horas y fue seguida por un aumento de la caspasa-1 activa, IL-1β, así como por la disminución de la actividad del CI mitocondrial hasta las 48 horas. La pérdida significativa de células TH (+) nigrales y terminales estriatales se asoció con déficits motores en el día 30. Se identificaron células TH (+) que colocalizaron con el marcador β-Gal, lo que sugiere la presencia de neuronas dopaminérgicas senescentes en la SN. Sorprendentemente todos los cambios histopatológicos evaluados aparecieron en el hemisferio contralateral. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la neuroinflamación unilateral inducida por LPS ocasiona neurodegeneración bilateral del sistema dopaminérgico nigroestriatal, tales datos son relevantes para comprender la neuropatología de la enfermedad de Parkinson (EP).

Abstract

Whether neuroinflammation leads to dopaminergic nigrostriatal system neurodegeneration is controversial. We addressed this issue by inducing acute neuroinflammation in the substantia nigra (SN) with a single local administration (5 µg/2 µL saline solution) of lipopolysaccharide (LPS). Neuroinflammatory variables were assessed from 48 h to 30 days after the injury by immunostaining for activated microglia (Iba-1 +), neurotoxic A1 astrocytes (C3 + and GFAP +), and active caspase-1. We also evaluated NLRP3 activation and Il-1 levels by western blot and mitochondrial complex I (CI) activity. Fever and sickness behavior was assessed for 24 h, and motor behavior deficits were followed up until day 30. On this day, we evaluated the cellular senescence marker β-galactosidase (β-Gal) in the SN and tyrosine hydroxylase (TH) in the SN and striatum. After LPS injection, Iba-1 (+), C3 (+), and S100A10 (+) cells were maximally present at 48 h and reached basal levels on day 30. NLRP3 activation occurred at 24 h and was followed by a rise of active caspase-1 (+), Il-1, and decreased mitochondrial CI activity until 48 h. A significant loss of nigral TH (+) cells and striatal terminals was associated with motor deficits on day 30. The remaining TH (+) cells were β-Gal (+), suggesting senescent dopaminergic neurons. All the histopathological changes also appeared on the contralateral side. Our results show that unilaterally LPS-induced neuroinflammation can cause bilateral neurodegeneration of the nigrostriatal dopaminergic system and are relevant for understanding Parkinson's disease (PD) neuropathology.

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en todo el mundo, caracterizada por disfunciones motoras y no motoras [1, 2]. Esta enfermedad neurodegenerativa presenta muerte exacerbada de las neuronas dopaminérgicas en la Sustancia Negra parte compacta (SNpc), el resultado es una deficiencia de dopamina en los ganglios basales que llevan a un desorden del movimiento caracterizado por signos motores parkinsonianos clásicos y signos no motores. Sin embargo, la EP involucra otros sistemas de neurotransmisores además del dopaminérgico y regiones del sistema nervioso fuera del circuito de los ganglios basales. El estándar de oro para el diagnóstico de la EP es la degeneración de la SNpc y la patología de Lewy en la examinación *postmortem* [3].

1.2 Tipos de Parkinson

James Parkinson realizó la descripción inicial del síndrome de Parkinson en el siglo XIX, más tarde refinada por Jean-Martin Charcot. Los principales signos del parkinsonismo incluyen acinesia, bradicinesia, rigidez muscular, temblor en reposo e inestabilidad postural. Observaciones clínicas sugieren dos principales subtipos de Parkinson, EP con temblor dominante (con relativa ausencia de otros síntomas motores) y la EP sin temblor dominante, la cual incluye fenotipos descritos como síndrome acinético-rígido y trastorno de la marcha por inestabilidad postural. Un subgrupo adicional de pacientes presenta fenotipos combinados o intermedios con varios síntomas motores de comparable severidad. A diferencia del subgrupo sin temblor dominante, la EP con temblor dominante es frecuentemente asociada con una progresión lenta y menos discapacidad funcional [4].

La edad es el mayor factor de riesgo para desarrollar la EP. La prevalencia e incidencia incrementan casi exponencialmente con la edad y alcanzan el mayor grado después de los 80 años. Otro factor de riesgo para la EP es la exposición ocupacional y ambiental a metales pesados. Un meta-análisis realizado por Mortimer y col. en 2012 confirma que la exposición a soldadura y manganeso está asociada con el incremento de riesgo de Parkinson [5].

La característica patológica determinante de la EP es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, específicamente el área ventrolateral la cual contiene neuronas que proyectan al neostriado. Resultados de estudios de correlación clínica-patológica muestran que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en esta área es, probablemente, la causa de signos motores, en particular de la bradicinesia y la rigidez muscular [6]. La pérdida neuronal en la EP ocurre también en otras regiones del cerebro, que incluyen el locus cerúleo, el núcleo basal, los núcleos del rafé, el núcleo dorsal motor del vago, la amígdala y el hipotálamo [3].

Recientes hallazgos clínicos y experimentales apoyan la idea que la neuroinflamación desempeña un papel fundamental en la EP [7], pudiendo ser el evento primario de la neurodegeneración dopaminérgica en el parkinsonismo idiopático [8], por desencadenar senescencia celular, estrés oxidativo, activación inmunológica de células microgliales e inducción de astrocitos reactivos neurotóxicos [9-11]. Además, la presencia enriquecida de células microgliales en la sustancia negra (SN) y las regiones cerebrales circundantes contribuye a aumentar la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas a la neuroinflamación [12, 13]. Otros factores agravantes son la alta concentración de productos dopaminérgicos oxidados [14], el aumento en la concentración de hierro redox activo asociado a la neuromelanina [15], las bajas concentraciones de glutatión (GSH) y disminución de la actividad de la glutamilmisteína ligasa en la SN [16].

1.3 Inflamación y neuroinflamación

La inflamación es una respuesta biológica compleja que experimentan los tejidos de los mamíferos ante una lesión. La inflamación puede ser causada por cualquier agente lesivo. Se trata de una reacción de defensa del cuerpo para eliminar o limitar la propagación del agente perjudicial, con la subsecuente eliminación de las células y tejidos dañados [17]. La inflamación se caracteriza por cuatro signos clave descritos por primera vez por el médico romano Aulus Cornelius Celsus (25 a.C. - 50 d.C.): calor, rubor, tumefacción y dolor. El calor se debe a la dilatación de los vasos sanguíneos, lo que se conoce como hiperemia, el rubor (color rojo) es generado por la extravasación sanguínea en el sitio de lesión, la tumefacción es generada el incremento en la vascularidad y acumulación de líquido en la parte dañada (edema) y el dolor por la liberación de mediadores químicos y la compresión de terminales nerviosas. Tales signos son bastante evidentes en conjunto cuando ocurren en tejidos expuestos como la piel, sin embargo, la inflamación localizada en tejidos internos no puede ser identificada fácilmente, tal como es el caso de la neuroinflamación [18]. La respuesta inflamatoria que involucra al tejido nervioso recibe el prefijo neuroinflamación. La neuroinflamación se caracteriza por la activación inmunológica de células microgliales (microgliosis o microglia reactiva). La microglía activa es capaz de sintetizar y liberar al medio una amplia gama de inmunomoduladores como el óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, citocinas proinflamatorias, quimiocinas y prostaglandinas, que a su vez son capaces de estimular y activar inmunológicamente a un segundo linaje celular, los astrocitos [18-20].

El agente lesivo responsable de provocar inflamación puede ser de origen físico como la radiación ionizante, el daño mecánico, agentes químicos como sustancias orgánicas e inorgánicas (venenos), materiales inertes como cuerpos extraños o ajenos al cuerpo (prótesis) y por último los agentes biológicos como los virus, hongos y bacterias o algunos de sus componentes estructurales como es el caso del lipopolisacárido [17-19].

1.4 Estructura del LPS

El lipopolisacárido (LPS) es el principal componente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y es el estímulo arquetipo de inflamación, aunque a concentraciones elevadas funciona como una potente toxina [21]. Químicamente está formado por tres estructuras, el lípido A, el *core* o núcleo, y el antígeno O [22]. El lípido A está constituido por cadenas de ácidos grasos que se anclan a la membrana externa de la bacteria y por una columna vertebral de azúcar que se une al oligosacárido central (*core*). La región más externa del LPS es el antígeno O compuesto por unidades repetidas de sacáridos [23]. La estructura del LPS presenta un patrón molecular conservado en las bacterias patógenas Gram-negativas (**Figura 1**) por eso forma parte de los “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs de *Pathogen-associated molecular patterns*) que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs de *Pattern-recognition receptors*) de las células inmunológicas especializadas. El LPS puede activar a la microglía mediante el reconocimiento por los receptores tipo Toll (de *Toll-like receptors*) en la membrana celular, específicamente por el receptor Toll-like tipo 4 [23].

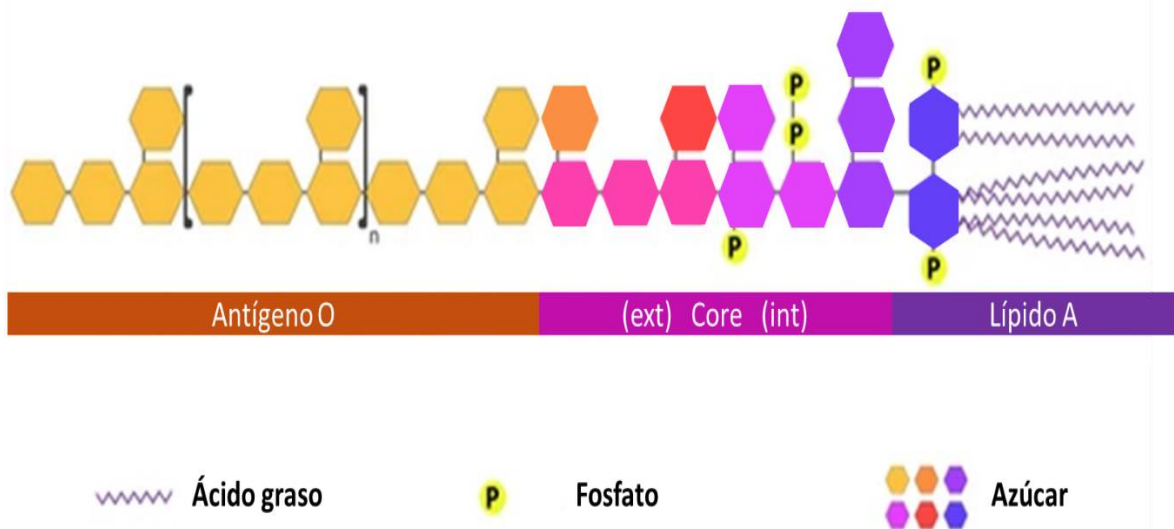


Figura 1. Estructura química del LPS de *E. coli*. Los restos de azúcares en la región del core y la composición del lípido A se conservan en las diferentes cepas de *E. coli*. Sin embargo, la región del antígeno O es variable. Modificado de Rietschel et ál.,1996 [22].

Además de los PAMPs, los receptores tipo Toll (TLRs) también pueden ser activados por moléculas endógenas conocidas como DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), las cuales se generan durante el daño tisular. Tanto los PAMPs como los DAMPs pueden activar una respuesta inmune aguda, seguida de una respuesta inmune adaptativa [24]. La dinámica de señalización de los TLRs está influenciada por varios factores, como el tipo y la concentración del ligando, la duración del estímulo y los tipos celulares involucrados.

1.5 Vía de señalización LPS-TLR4

El LPS se une a la proteína LBP (*LPS-binding protein*) y luego al TLR4, que se dimeriza junto a dos co-receptores, CD14 y MD-2 (*myeloid differentiation protein 2*) [25]. La MD-2 es una proteína soluble que se asocia con el receptor para llevar a cabo la transducción del LPS [26-29]. Existen referencias que sugieren que esta proteína es capaz de unirse al LPS en ausencia del receptor TLR4 originando en menor proporción los efectos del LPS sobre las células del hospedero, por lo que parece que la presencia del TLR4 es esencial tanto para el reconocimiento como para la magnitud de la respuesta generada por el LPS [30].

La activación de TLR4 conduce a dos vías de transducción de señales, una dependiente y otra independiente de MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*). La vía dependiente de MyD88 activa la cinasa IRAK 1 (*IL-1-receptor-associated kinase*) y TRAF 6 (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor 6*) para activar el complejo IKK (*inhibitor of nuclear factor- κ B*) y libera al factor nuclear- κ B (NF- κ B), que se transloca al núcleo e induce la

expresión de citocinas inflamatorias. La vía independiente activa al interferón regulador del factor 3 (IRF3) y la producción de interferón (IFN) e IFN- β , que activan la expresión de genes específicos. TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), es una proteína adaptadora implicada en la vía dependiente de MyD88 que contiene el dominio TIR [31].

La inhibición de la señal emitida por el TLR4 ocurre a nivel citoplasmático por las proteínas TIRAF1 – TIRAF4 (factor 1/4 asociado al receptor de TNF) e IRAK-M (Kinasa 4 asociada al receptor de IL-1) que inhiben al NF- κ B y a la proteína MyD88 respectivamente; en superficie también se encuentran proteínas encargadas de la inhibición como son las proteínas radioprotector 105 (RP105), análogo del receptor de IL-1 (ST2L) y la molécula relacionada con la inmunoglobulina 1 (SIGIRR) que inhiben directamente al receptor TLR4, a la proteína MyD88 y al TIRAP respectivamente [32]. Cuando los procesos de regulación se ven superados y se intensifican las respuestas provocadas por el LPS, se pueden desencadenar situaciones graves como el choque endotóxico, la falla multiorgánica e incluso la muerte del huésped [33-35].

1.6 Activación del Inflamasoma

Tschopp y su equipo de investigación crearon el término "inflamasoma" para describir una plataforma proteica que activa a la caspasa-1 y es característica de la inmunidad innata. Esta plataforma es una respuesta coordinada que busca suprimir microorganismos patógenos y prevenir daños tisulares. Está compuesta por un receptor con dominio de oligomerización y unión a nucleótido (NLR) o AIM2 (ausente en melanoma 2), la proteína tipo adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein*) y la caspasa-1. Esta plataforma proteica genera caspasas inflamatorias y procesa la pro-interleucina-1 β (pro-IL-1 β) y la pro-interleucina-18 (pro-IL-18) para producir sus formas activas: la interleucina-1 β (IL-1 β) y la interleucina-18 (IL-18) (**Figura 2**) [36].

Las NLRs son una familia de 23 proteínas que se caracterizan por tener un dominio de unión de nucleótidos y un dominio repetido rico en leucina, y engloban a grupos como NALP, NOD, PYPAF y CATERPILLER. Dentro de este conjunto, se han identificado 8 miembros capaces de formar los inflamasomas. Estos miembros son la proteína NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRP2, NLRC4, ALR (también conocido como receptor tipo AIM-2 o ausente en melanoma 2) y el sensor citoplasmático RIG-1. NLRP3 (también conocido como criopirina o NALP3) es el sensor más estudiado y está implicado en numerosas patologías inflamatorias, incluyendo la enfermedad de Alzheimer [37].

Se han propuesto diversos modelos para explicar la activación del inflamasoma: uno de ellos sugiere el flujo del ion potasio (K^+) para la activación del NLRP3 [38] en cultivo *in vitro* de macrófagos de ratón donde la concentración normal de ión K^+ es de ~140-150 mM, una disminución en su concentración intracelular de a 70 mM provoca la activación del inflamasoma NLRP3, debido a que sale de la célula a través de un receptor purinérgico ubicado en la superficie celular denominado P2X7 (también conocido P2X7R), el cual es activado por los altos niveles de ATP extracelular o por ribosilación de ADP, la cual es una característica que se presenta en las células en necrosis y/o apoptosis como señal de peligro [39-44]. Adicionalmente, la unión del ATP a los receptores P2X7 permite el reclutamiento del hemicanal panexina-1 y de manera posterior se forma un gran poro en la membrana plasmática, a través del cual ingresan los productos bacterianos como el LPS al citosol y la subsecuente activación del inflamasoma [44-46]. A nivel del sistema nervioso se ha demostrado que el ATP se une a los receptores purinérgicos P2X7R y P2X4R, activando la caspasa-1 dependiente del inflamasoma NLRP3 y NLRP1 [37]. El receptor P2X4 se encuentra expresado en los diversos tipos de células del sistema nervioso tanto central como periférico, P2X4R y P2X7R interactúan formando homotrímeros en la membrana plasmática de la microglía y macrófagos [47].

Otro modelo considera la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) de corta duración como un estímulo crítico para la activación del inflamasoma, ya que induce un cambio conformacional en la proteína TXNIP (proteína de interacción con tioredoxina), la cual en condiciones de reposo interactúa con la proteína tioredoxina (TRX). Luego de un incremento en la concentración de ROS, la proteína TXNIP es liberada de la TRX y se une al NLRP3 produciendo la activación del inflamasoma. La principal fuente de ROS celular es la mitocondria y pueden ser derivado de una variedad de procesos fisiológicos como el desacoplamiento de la citocromo oxidasa P-450, la respiración mitocondrial, la activación de xantina oxidasa, la peroxisoma oxidasa o las NADPH oxidasas y diversas condiciones de estrés que incluye el incremento en las tasas metabólicas, la hipoxia o el daño de la membrana que inducen la producción de ROS mitocondrial [38, 43, 48, 49].

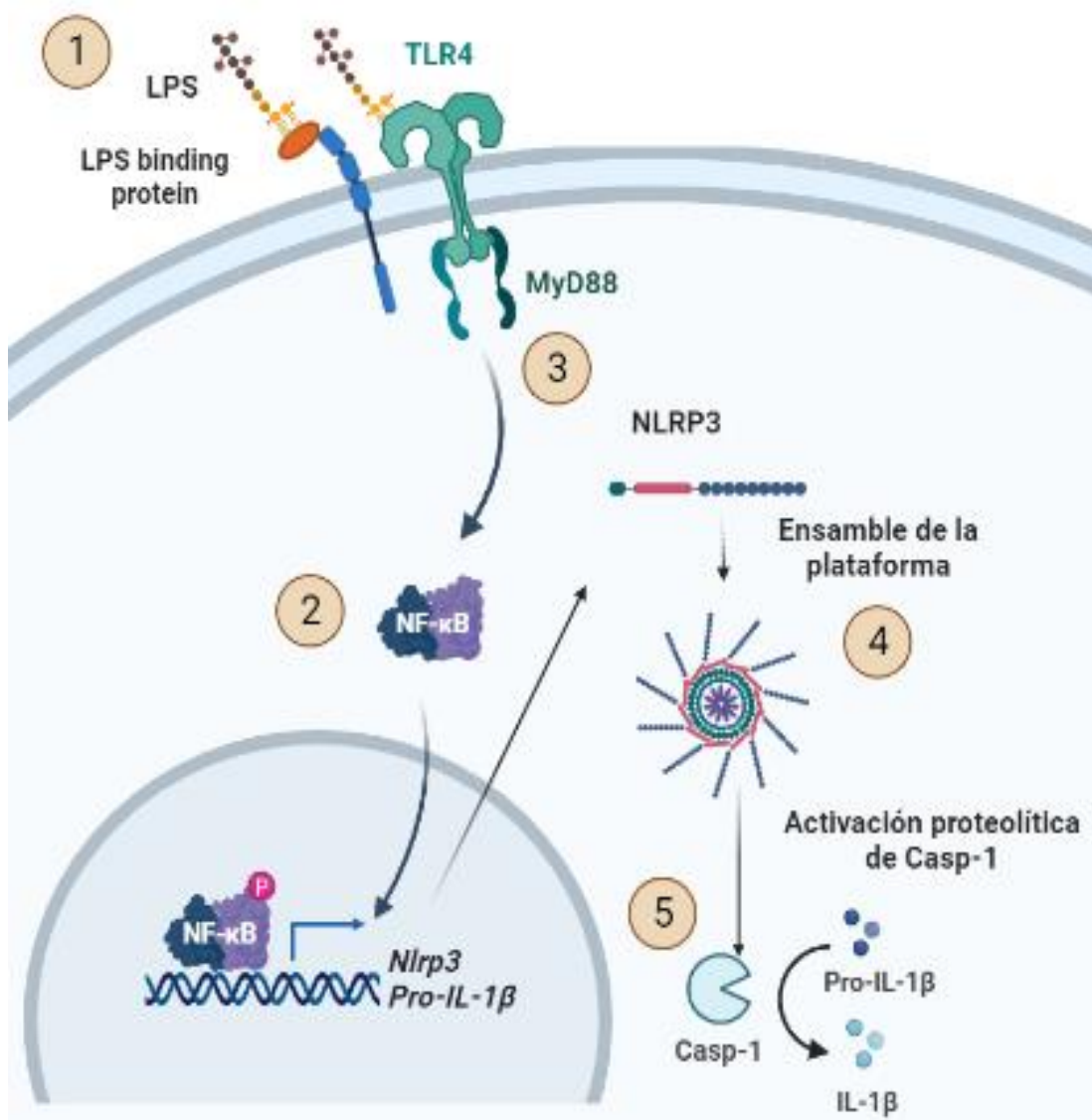


Figura 2. Eventos moleculares clave que participan en el ensamble del inflammasoma [50]. 1) Unión del LPS al receptor TLR-4 a través de la proteína de unión a LPS y el correceptor para su posterior dimerización. 2) Liberación de NF-κB y su translocación nuclear. 3) Expresión y síntesis de NLRP3. 4) Ensamble de NLRP3, 5) Activación de caspasa 1. Imagen creada con la aplicación BioRender.com.

1.7 Microgliosis en la neuroinflamación inducida por LPS

La neuroinflamación mediada por astrocitos y microglia activados dentro de áreas de neurodegeneración es otra característica patológica de la EP así como de otras enfermedades neurodegenerativas. La microglía activa puede liberar factores tróficos, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) [51] al igual que especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y citocinas proinflamatorias [52]. Sin embargo, el balance de esas acciones benéficas y dañinas para las neuronas en la inflamación aún no está bien establecido. Resultados de estudios epidemiológicos muestran que se reduce el riesgo de la EP con el uso de antiinflamatorios no esteroideos, apoyando la hipótesis de que la inflamación puede promover un proceso de enfermedad subyacente [3]. El uso de bloqueadores de canales de calcio reducen el riesgo de Parkinson, lo anterior asociado a la capacidad de los bloqueadores de reducir el estrés oxidativo de las neuronas dopaminérgicas [53]. Resultados de investigaciones demuestran que las neuronas de la SNpc tienen altos niveles basales de estrés oxidativo mitocondrial debido a las altas concentraciones intracelulares de calcio que causan una mayor actividad mitocondrial [54].

La neuroinflamación aguda se define como la respuesta glial inmediata ante un daño hasta las 96 horas posteriores [55]. En el caso del cerebro, cuando la barrera hematoencefálica se encuentra comprometida, componentes de la sangre periférica como los linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares invaden el sistema nervioso central (SNC) [55, 56]. Cuando la neuroinflamación aguda no se resuelve, ni se repara el daño, la inflamación se convierte en un proceso crónico y a menudo patológico [57].

Las principales células involucradas en la neuroinflamación son la microglía. Estas células son derivadas de la médula ósea durante el desarrollo embrionario, se alojan en el cerebro y quedan establecidas ahí al cerrarse la barrera hematoencefálica, comprenden aproximadamente el 12% de las

células en el SNC [58]. En el SNC adulto, la microglía está aparentemente inactiva (microglía en reposo o microglía quiescente), pero está monitoreando activamente el entorno, contribuyendo al mantenimiento de la integridad neurovascular. Cuando se presenta un estímulo nocivo, la microglía en reposo se transforma morfológicamente para activarse y activar a su vez a los astrocitos, ambos linajes celulares evitarán la propagación del daño y promoverán la reparación del tejido. Tras su activación, la microglía desencadena la liberación de mediadores proinflamatorios, incluidos las especies reactivas de oxígeno por ejemplo, el anión superóxido ($O^{\cdot-}$), óxido nítrico (NO) y peroxinitritos ($ONOO^{\cdot-}$), además de varias citocinas entre las que destacan las citocinas proinflamatorias: interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), interleucina-6 (IL-6), y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), quimiocinas y enzimas proinflamatorias como COX-2 e iNOS [58] (**Figura 3**). Se sabe que la activación de vías de señalización de mediadores lipídicos desencadena la liberación de ácido araquidónico (AA). El AA se oxigena fácilmente por acción catalítica de las ciclooxigenasas (COX)-1 y 2 y las lipoxigenasas (LO) 5 y 15 para formar una serie de eicosanoides proinflamatorios como las prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT) [57]. Además, la activación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) en las células endoteliales conduce a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica, lo que permite la infiltración local de neutrófilos y otros leucocitos, que liberan mediadores proinflamatorios adicionales quienes activarán aún más a la microglía y exacerbarán la respuesta inflamatoria (**Figura 3**). Estos son algunos de los eventos que conllevan al proceso de inflamación crónica que sucede cuando el estímulo no ha sido eliminado impidiendo el retorno de la homeostasis [59]. Existen dos fases de activación microglial, la primera involucra cambios inmunofenotípicos, morfológicos y funcionales. Los eventos inmunofenotípicos incluyen la expresión de moléculas encontradas exclusivamente en células del sistema inmune, llamadas Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) [60]. La expresión del antígeno CMH lleva a la microglía a funcionar como célula presentadora de antígenos. Los cambios morfológicos involucran la

transformación de microglía ramificada a una conformación esférica morfológica llamada ameboide [58]. Tal cambio en la morfología de la microglía incluye la liberación de citocinas y otros mediadores mencionados anteriormente. Además, existe un incremento en la proliferación y reclutamiento de microglía en el sitio de lesión. En la segunda fase, la microglía activada adquiere características fagocíticas, de hecho, la fagocitosis es clave para la regeneración y remodelación de las conexiones neuronales después del daño [59].

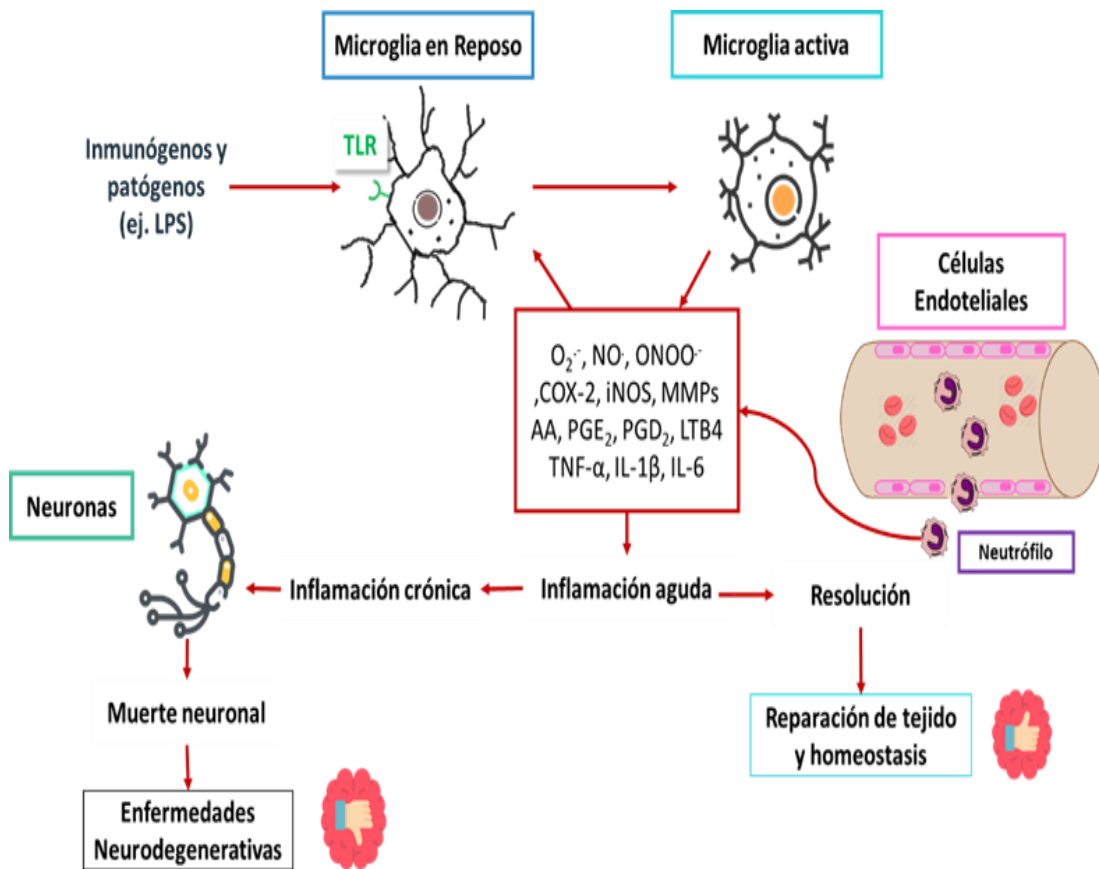


Figura 3. Respuesta neuroinflamatoria. Eventos moleculares y celulares que participan en la respuesta inflamatoria aguda en el SNC. Modificado de Bazán y col., 2012 [59].

1.8 Astrogliosis en la neuroinflamación inducida por LPS

Se sabe que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son particularmente sensibles al estrés oxidativo, esto por su alto consumo de oxígeno y su alto contenido de dopamina (la cual es propensa a la oxidación espontánea), además de su abundante contenido de lípidos y su baja capacidad antioxidante. Lo anterior aunado a un microambiente con alta población microglial [61].

De los tres tipos de células gliales los astrocitos son los más abundantes [62]. Estas células modulan la red neuronal modificando el ambiente sináptico. Similar a la microglía los astrocitos tienen prolongaciones celulares altamente dinámicas, que se extienden, mueven y retractan [63], expresan canales iónicos y transportadores de neurotransmisores. Los astrocitos contribuyen al señalamiento de calcio, por lo que tienen la habilidad de regular cómo, cuándo y qué neuronas serán capaces de comunicarse entre ellas [64].

En 2017 Liddelow y colaboradores evidenciaron la presencia de astrocitos reactivos A1 y demostraron que la microglía activada convencionalmente los induce por medio de citocinas proinflamatorias y una fracción del complemento: IL-1 α , TNF- α y C1q respectivamente. Estas biomoléculas son suficientes y necesarias para la activación de los astrocitos A1. Una vez que un astrocito muestra el fenotipo A1 pierde las principales funciones del astrocito normal, así como su habilidad de inducir la formación de sinapsis y su capacidad de fagocitar, pero adquiere funciones neurotóxicas, las cuales consisten en promover la muerte de neuronas y oligodendrocitos maduros diferenciados. Los astrocitos A1 son inducidos *in vivo* después de un daño en el SNC y se han encontrado presentes en las principales enfermedades neurodegenerativas en humanos. Un marcador diferencial de los astrocitos A1 es la proteína del complemento C3, por ser una de las moléculas que expresan *de novo* [9].

Nuestro grupo de trabajo demostró que la inyección intranigral de LPS en la SNpc produce una respuesta neuroinflamatoria aguda típica, la cual se resuelve a las 96 horas [55]. Los eventos tempranos son la producción de NO, la activación de la microglía y astrogliía, así como la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1 β) [55]. En el máximo grado de activación microglial sucede la infiltración de leucocitos CD45 (+) en la SNpc. Después de la resolución del proceso neuroinflamatorio (a las 96 horas), se observó un aumento de los niveles de NO y de peroxidación lipídica, además de signos de fagocitosis por parte de la microglía hacia las células TH (+) y una disminución significativa de la inmunorreactividad a TH en la SNpc [55] (**Figura 3**). De manera relevante para este proyecto, se observa que la activación de los astrocitos se presentó después de la activación microglial, incrementándose gradualmente y permaneciendo activos hasta el final del estudio (168 horas) [55] (**Figura 3**). Estos resultados sugieren que la reacción inflamatoria inducida por el LPS puede causar la muerte de las neuronas dopaminérgicas, posiblemente a través de los astrocitos neurotóxicos A1, los cuales pudieron haber sido inducidos después de la resolución de la neuroinflamación aguda [55].

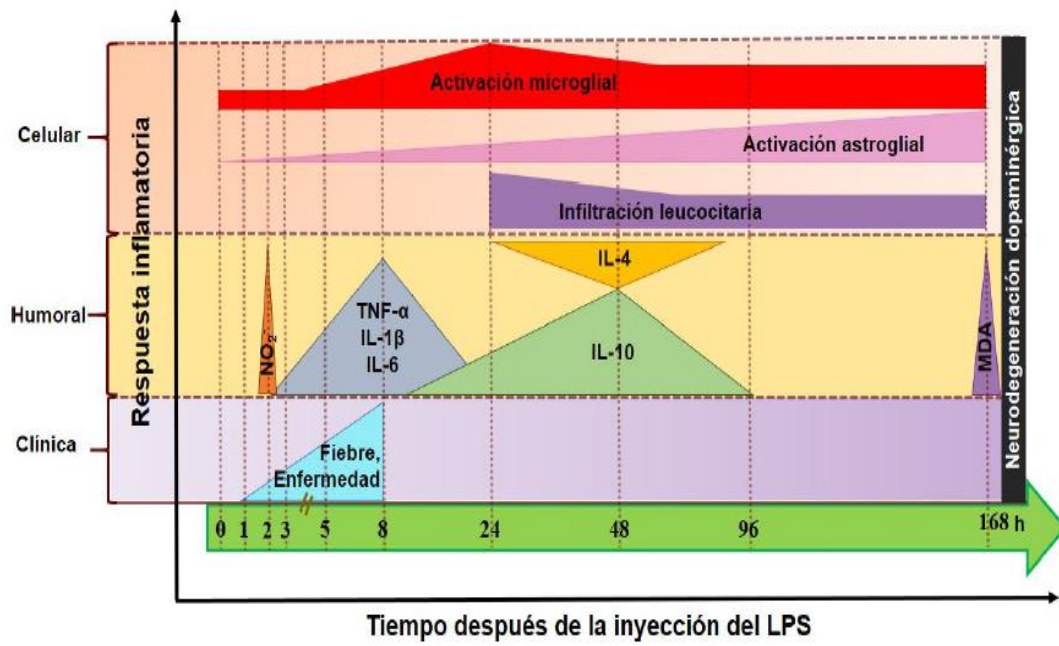


Figura 3. Resumen esquemático de la neuroinflamación aguda inducida con LPS en la sustancia negra de la rata. Tomado de Flores-Martinez et al., 2018 [55].

2. Justificación

En el 2018 propusimos que la neuroinflamación aguda por una microdosis de LPS puede causar neurodegeneración dopaminérgica del sistema nigroestriatal.

In vitro, Liddelow (2018) demostró que el LPS induce activación microglial y activación de astrocitos neurotóxicos A1 y que ambos linajes celulares pueden causar muerte neuronal.

Comprobar la muerte neuronal dopaminérgica por medio de evaluaciones en la viabilidad mitocondrial y estado de senescencia celular en tipos no agudos posteriores a la lesión con LPS ayudaría a descartar la posible recuperación de la pérdida del fenotipo dopaminérgico y afirmar que un proceso biológico tan complejo y natural como es la neuroinflamación es capaz de inducir eventos no deseados como la neurodegeneración dopaminérgica.

Por lo tanto, es importante profundizar sobre posibles mecanismos celulares y moleculares que promueven la neurodegeneración para ayudar a comprender la fisiopatología de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

3. Hipótesis

La neuroinflamación aguda inducida por una única inyección de LPS en la sustancia negra conducirá a la muerte de neuronas dopaminérgicas nigrales al activar la microglía, los astrocitos neurotóxicos A1 y el inflamasoma NLRP3, y provocar disfunción del complejo I mitocondrial.

4. Objetivo General

Demostrar la generación de eventos neuroinflamatorios nocivos, tales como la activación de la microglía, astrocitos neurotóxicos A1 y el inflamasoma NLRP3, y su asociación con evidencias de muerte celular como la disfunción del complejo I mitocondrial y la senescencia neuronal, además de la pérdida del fenotipo dopaminérgico, como la disminución del marcador TH, y disfunciones sensoriomotoras. en el sistema dopaminérgico nigroestriatal

5. Objetivos Particulares

1. Confirmar la inducción de la neuroinflamación aguda por LPS a través de manifestaciones clínicas de la enfermedad.
2. Confirmar la presencia de la activación microglial en sustancia negra.
3. Explorar la presencia de astrocitos A1 por inmunofluorescencia contra GFAP y C3.
4. Explorar la presencia de astrocitos A2 por inmunofluorescencia contra GFAP y S100A10.
5. Evaluar la activación del inflamasoma mediante marcadores como Caspasa 1, NLRP3 e IL-1 β .
6. Valorar la afectación del complejo I mitocondrial en SN.
7. Evaluar la presencia de senescencia inducida con LPS en la SN.
8. Valorar la afectación de la vía dopaminérgica nigroestriatal por inmunohistoquímica para TH.
9. Evaluar las alteraciones motoras y sensoriomotoras mediante las pruebas conductuales de la viga, cilindro de Scharllet, vibrisas y campo abierto.

6. Material y métodos

6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de dos meses de edad (200-210 g) de acuerdo con el protocolo #162-15, autorizado y supervisado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) siguiendo la legislación mexicana vigente, NOM-062-ZOO-1999, y NOM-087-ECOL-1995 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Considerando las tres R's (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) para la experimentación animal [65], la cantidad de roedores se mantuvo al mínimo de acuerdo con el diseño experimental y la significancia estadística (The National Academies Collection: Informes financiados por los Institutos Nacionales de Salud, 2011). Se hizo todo lo posible por minimizar el sufrimiento de los animales.

Se alojaron cinco ratas por caja de acrílico (34 cm × 44 cm × 20 cm) en una sala con condiciones controladas de temperatura (22 °C ± 2 °C), humedad relativa (60 ± 5%), ciclos invertidos de luz-oscuridad de 12 h, comida y agua *ad libitum*. Se distribuyeron 93 animales en tres grupos experimentales (**Figura 4**): 1) Ratas no tratadas (Nt), sin ningún procedimiento; 2) Ratas inyectadas de forma intranigral con solución salina fisiológica estéril libre de pirógenos y sin endotoxina (Mock), 3) Ratas inyectadas intranigralmente con la endotoxina LPS. Dieciocho ratas fueron usadas para la evaluación del curso temporal del comportamiento de enfermedad y la temperatura hasta las primeras 24 h post lesión (n = 6 por grupo). Dieciocho ratas fueron evaluadas con pruebas sensoriomotoras, antes de la cirugía y el día 15 y 30 post lesión (n = 6 por grupo; sacrificadas el día 30). Algunas ratas fueron sacrificadas a las 24 h (animales utilizados para la evaluación del comportamiento de enfermedad), 48 h (n = 3 por grupo experimental) y el día 30 (animales utilizados para las pruebas sensoriomotoras) para estudios de inmunotinción. Los ensayos de actividad de complejo I mitocondrial se analizaron simultáneamente con los

estudios histológicos (n = 6 por grupo). Por último, las pruebas de Western blot (n = 3 por grupo) se evaluaron a las 8 h, 24 h, 48 h y 30 días tras la administración de LPS.

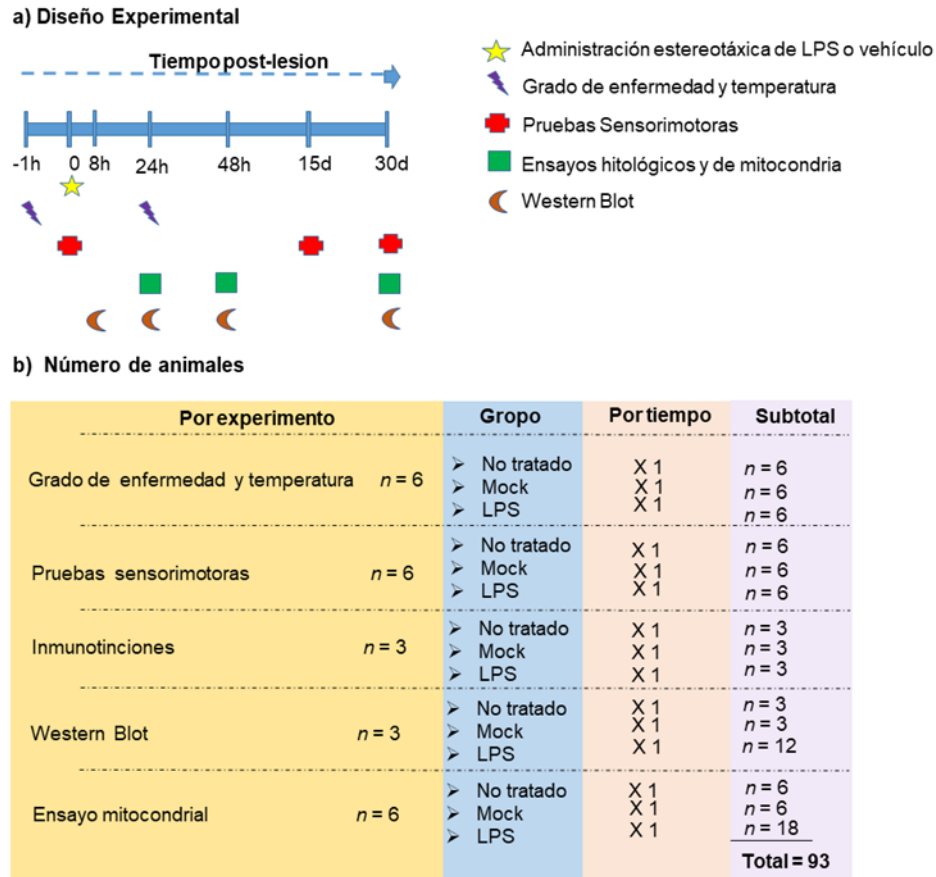


Figura 4. Diseño experimental. (a) Los símbolos de color indican cuándo se realizaron los ensayos correspondientes. (b) La tabla resume el número de animales utilizados por experimento en cada tiempo y grupo evaluado. Las inmunotinciones se realizaron a las 24 h (animales utilizados en el grado de enfermedad), 48 h y 30 días (animales utilizados en las pruebas sensoriomotoras).

6.2 Inyección estereotáxica del LPS

El LPS se administró intranigralmente en ratas anestesiadas con una mezcla de Ketamina (70 mg/kg) / Xilacina (6 mg/kg), vía intraperitoneal (i.p.) utilizando un equipo estereotáxico (Stoelting; Wood Dale, ILL, EU). Se inyectó una sola dosis de LPS de la cepa *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, EU) en una concentración de 5 µg/2 µL de solución salina fisiológica libre de pirógenos [55], en el borde superior de la SN izquierda utilizando las siguientes coordenadas: anteroposterior (AP), +3.2 mm de la línea interaural; mediolateral, +2.0 mm de la sutura intraparietal, y dorsoventral (DV), a -6.5 mm de la duramadre [55]. La barra del incisivo se fijó en 0-5 mm. El flujo de inyección se mantuvo constante a 0.13 µL/min, utilizando una microbomba de inyección (Mod 100, Stoelting; Wood Dale, ILL, EUA). Después de la inyectar el volumen deseado, la aguja permaneció en el sitio de la inyección por 7 min más para asegurar una correcta difusión y se retiró en pasos de 1 mm/min. El grupo de ratas mock fue sometido al procedimiento anterior para inyectarles 2 µL de solución salina fisiológica libre de pirógenos. Después de la cirugía los animales fueron colocados en una caja hasta su recuperación, posteriormente se colocaron en cajas de alojamiento (cinco ratas por caja) con agua y alimento *ad libitum*.

6.3 Temperatura corporal

Para medir la temperatura corporal de las ratas, se utilizó un termómetro infrarrojo (Pioway Medical; DT-8809CC, LUGAR). La temperatura se tomó a 10 cm del pecho rasurado de cada rata, aislada en una caja con aserrín para evitar la manipulación y por consiguiente el aumento de su temperatura corporal. Las mediciones se realizaron antes de la cirugía (ratas no tratadas) y a diferentes tiempos después de la inyección intranigral (1, 2, 3, 5, 8, 21 y 24 horas) del LPS o solución salina fisiológica libre de endotoxinas (mock).

6.4 Grado de enfermedad (*Sickness Behavior*)

La apariencia general de cada rata (grado de enfermedad exhibido) fue evaluada antes y después de la inyección intranigral del LPS o solución salina fisiológica libre de pirógenos (mock) a 1, 2, 3, 5, 8, 21 y 24 h. El grado de enfermedad se evaluó mediante una escala de cuatro puntos en donde 0 = ningún signo presente, 1 = un signo presente, 2 = dos signos presentes y 3 = tres o más signos presentes. Los signos evaluados fueron los siguientes: 1) ausencia de exploración y locomoción, 2) postura corporal curva (acurrucada), 3) piel irregular, 4) piloerección y 5) ojos cerrados [55, 66]. Durante las observaciones conductuales cada rata fue puesta en una caja con aserrín limpio y al término de esta se pasó a su respectiva caja de alojamiento (caja con cinco ratas).

6.5 Pruebas de Comportamiento

Las pruebas de comportamiento fueron realizadas de 10:00 a 14:00 horas y los grupos de animales fueron evaluados de forma aleatoria, en todas las pruebas entre cada evaluación, los materiales y las superficies se limpiaron con etanol al 70 %.

6.6 Prueba de la viga

La prueba de la viga está diseñada para evaluar la habilidad de cruzar una viga estrecha (1 cm de ancho y 2 m de largo). El balance y la coordinación motora fueron evaluados y evidenciados reportando el tiempo que los animales tardan en subir la viga y la cantidad de errores por paso en las extremidades posteriores ya que proporcionan la medida más sensible de rendimiento y déficits motores. La prueba se llevó a cabo según lo descrito previamente por otros grupos [67], con dos días de entrenamiento y la prueba final fue videograbada al tercer día.

6.7 Prueba del cilindro de Scharllet

La prueba de cilindro o prueba del cilindro de Scharllet se realizó para evaluar la asimetría locomotora [68]. Las ratas fueron colocadas en un cilindro de

acrílico transparente (30 cm de alto y 20 cm de diámetro) y fueron videograbadas. Los primeros 20 contactos con las extremidades delanteras que las ratas realizaron fueron contados. El tiempo requerido para generar este número de observaciones varía entre rata y rata. El porcentaje de asimetría fue calculado con la siguiente fórmula [67].

$$\% \text{ de asimetría} = \frac{\text{contactos de ipsilateral} + \frac{1}{2} \text{contactos simultáneos}}{\text{ipsilateral} + \text{contralateral} + \text{contactos simultáneos}} \times 100$$

Antes de la prueba, el cilindro se limpió con etanol al 70%.

6.8 Prueba de colocación de la extremidad anterior evocada por vibrisas

Esta prueba conductual muestra la asimetría en la corteza sensoriomotora [68, 69]. Se sujetó suavemente a los animales por el torso para que las cuatro extremidades colgaran libremente. Se estimularon las vibrisas de cada lado rozando el borde de una mesa para provocar una respuesta de la extremidad anterior ipsilateral que consistía en colocar la pata sobre el tablero de la mesa. La reacción esperada de los animales sanos incluye una rápida colocación del miembro anterior sobre la superficie de la mesa. Su déficit revela principalmente una alteración motora más que sensorial. Se contó un máximo de diez eventos en los lados contralateral e ipsilateral, y se registró el porcentaje de colocaciones con éxito.

6.9 Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto evalúa el comportamiento de exploración de un nuevo entorno a través de la actividad locomotora espontánea [68, 69]. En una habitación en silencio, se colocaron las ratas en el centro de una caja cuadrada de cloruro de polivinilo (PVC) (80 cm largo x 80 ancho cm y 40 cm de altura). Se utilizó una cámara para monitorizar los tiempos de marcha e inmovilidad durante 10 min. La arena se limpió con una solución de etanol al 30% antes

de cada prueba conductual para evitar un posible sesgo debido a olores y residuos dejados por ratas sometidas a pruebas anteriores.

6.10 Procedimientos de inmunotinción

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) y perfundidas a través de la aorta ascendente con 30 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguida de 90 mL de paraformaldehído al 4% en PBS. Se extrajeron los cerebros y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 30%. Se hicieron cortes coronales seriados de 30 μ m de grosor utilizando un micrótomo de deslizamiento con una platina de congelación (Leica SM1100; Heidelberg, Alemania), los cortes seriados se recogieron en 6 pocillos y sólo se analizaron los cortes de un pocillo. Los cortes se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.1% durante 20 minutos y se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) en PBS-Tritón al 0.1% durante 30 minutos para bloquear los sitios de unión inespecíficos a temperatura ambiente (TA).

6.11 Ensayos de inmunohistoquímica

El tratamiento de las muestras es el mismo que en el apartado anterior hasta el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos, para la actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó utilizando una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y metanol al 10% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 24 horas a 4° C. Los anticuerpos primarios fueron anti-TH monoclonal de ratón (1:1000; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.), anti-Iba1 policlonal de cabra (1:1000; Abcam; Cambridge, Reino Unido), y anti-caspasa 1 activa policlonal de conejo (1: 200; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, OR, EE.UU.). Tras retirar el anticuerpo primario y lavar con PBS, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes, que fueron IgG anti-ratón de caballo biotinilado (1:300; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU.), IgG anti-cabra de caballo biotinilado (1:300; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU.) e IgG

anti-conejo de burro biotinilado (1:500; Zymed; Cambridge, MA, EE.UU.). Posteriormente, los tejidos se incubaron con el complejo biotina-avidina-peroxidasa (ABC Kit; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU.), el color fue producido con 3,3 diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU.). Algunos tejidos se contratiñieron con β -Gal para evidenciar células senescentes [70] y Nissl (0.1% de violeta de cresilo) para teñir específicamente el citoplasma de las neuronas y delimitar así la SN [67, 71].

Por último, los cortes cerebrales se lavaron 3 veces durante 5 min en PBS, se montaron en portaobjetos utilizando resina Entellan (Merck, KGaA; Darmstadt, Alemania) y se observaron con un microscopio óptico Leica DMIRE2 equipado con objetivos de 5X, 20X, 40X y 63X (inmersión en aceite) (Leica Microsystems; Nussloch, Alemania). Las imágenes se observaron mediante un microscopio de campo claro Leica DMIRE2 (Leica; Nussloch, Alemania) y se digitalizaron con una cámara Leica DC300F (Leica Microsystems; Nussloch, Alemania).

6.12 Ensayos de inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron después de bloquear los sitios de unión no específicos [11]. Para los ensayos de doble inmunofluorescencia, las muestras se incubaron con el correspondiente par de anticuerpos primarios (**Tabla 1**) durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron anticuerpo policlonal de conejo anti-C3 de complemento (1:50; Abcam; Cambridge, Reino Unido), anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP (1:500; Cell Signaling Technology; Danvers, MA, EE. UU.), anticuerpo policlonal de conejo anti-S100A10 (1:100; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, OR, EE. UU.), anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa 1 (1:200; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, OR, EE. UU.), y anticuerpo policlonal de cabra anti-Iba1 (1:1000; Abcam; Cambridge, Reino Unido). Después de la incubación, los tejidos se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios correspondientes (**Tabla 1**) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpo IgG de pollo Alexa Fluor 488 anti-

conejo H + L (1:300; Invitrogen Molecular Probes; Eugene, OR, EE. UU.), anticuerpo IgG de caballo Texas rojo anti-ratón H + L (1:900; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.), y anticuerpo IgG de asno Alexa Fluor 555 anti-cabra H + L (1:300; Abcam; Cambridge, MA, EE. UU.). Para el contraste nuclear, después de la inmunotinción algunas rebanadas de cerebro se incubaron con 1 μ M de colorante de Hoechst (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE. UU.) durante 5 minutos. Después de lavar con PBS, las rebanadas se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando VECTASHIELD (Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE. UU.). Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con el microscopio Leica DMIRE2 (Leica; Nussloch, Alemania) a través de los filtros A para el tinte Hoechst, K3 para Alexa Fluor 488 (fluorescencia verde), y TX2 para Texas rojo y Alexa Fluor 555 (fluorescencia roja) utilizando los objetivos de 20X y 63X. Las imágenes se digitalizaron con una cámara Leica DC300F (Leica Microsystems; Nussloch, Alemania).

Tabla 1. Combinaciones de anticuerpos para las inmunofluorescencias dobles.

Epitope	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Objetivo
C3	policlonal de conejo Anti-C3 de complemento	H+L IgG de gallina anti-conejo Alexa Fluor 488	Astrocitos Neurotoxicos A1
GFAP	monoclonal de ratón anti-GFAP	H+L IgG de caballo anti-ratón Rojo Texas	
S100A10	polyclonal de conejo anti-S100A10	H+L IgG de gallina anti-conejo Alexa Fluor 488	Astrocitos Neuroprotectores A2

GFAP	monoclonal de ratón anti-GFAP	H+L IgG de caballo anti-ratón Rojo Texas	
Caspasa 1	policlonal de conejo anti-caspasa 1	H+L IgG de gallina anti-conejo Alexa Fluor 488	Caspase 1 activa en astrocitos
GFAP	monoclonal de ratón anti-GFAP	H+L IgG de aballo anti-ratón Rojo Texas	
Caspasa 1	policlonal de conejo anti-caspasa 1	H+L IgG de gallina anti-conejo Alexa Fluor 488	Caspasa 1 activa en células de la microglia
Iba 1	policlonal de cabra anti-Iba1	H+L IgG de asno anti-cabra Alexa Fluor 555	

6.13 Densitometría y Conteo de Neuronas

Se utilizó el software ImageJ (Institutos Nacionales de Salud; Bethesda, MD, EE. UU.) para contar las neuronas TH (+) en la SN para medir la densidad total del área de las ramificaciones nigrales TH (+) y las terminales estriatales en rebanadas tratadas por inmunohistoquímica [69]. La medición se realizó con imágenes tomadas con los objetivos 20x para la SNpc y SNpr y 5x para el estriado. Se eliminó toda la intensidad del fondo de área teñida con inmunohistoquímica para cuantificar solo la inmunorreactividad de células TH (+). El conteo de neuronas y la densidad del área de las neuronas ramificaciones TH (+) se determinaron en al menos en tres niveles anatómicos (n = 3 ratas para cada grupo experimental) [11, 55]. La medición final fue el valor medio calculado a partir de la cuantificación de los tres niveles (anterior, medial y caudal) por núcleo y por rata. Se siguió un procedimiento similar para

medir la densidad del área de la tinción de β -Gal, Iba 1 (marcador de células microgliales) y caspasa 1 en la SN. Se utilizaron los siguientes criterios morfológicos para discernir el estado fisiológico de la microglía: las células microgliales quiescentes (condición fisiológica normal) presentan una morfología altamente ramificada con núcleos y soma pequeños, mientras que las células microgliales activas pierden gran parte de sus ramificaciones y conservan pocas acortando su longitud, su soma se ensancha haciéndose evidente su núcleo, si el estímulo persiste más tarde se transformarán en células casi esféricas (morfología ameboide)[72, 73].

El complemento de ImageJ, Fiji, se utilizó para la descomposición de color a partir de la tinción doble de β -Gal con TH y la tinción de violeta de cresilo con Iba 1/caspasa 1 [67]. La intensidad de fluorescencia para los ensayos de fluorescencia doble se midió mediante el software Image J (Institutos Nacionales de Salud; Bethesda, MD, EE. UU.) en los tres niveles anatómicos de la SN anterior, medial y caudal por rata (n = 3 ratas independientes por condición experimental). La medición final fue el valor medio calculado a partir de la cuantificación en los tres niveles por núcleo y por rata.

6.14 Ensayo de *Western blot*

Se detectó IL-1 β y NLRP3 mediante western blot siguiendo el procedimiento reportado previamente [74]. Las proteínas de las muestras de SN fueron extraídas en solución de radioinmunoprecipitación (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% ácido deoxicólico, 0.1% SDS y 50 mmol/L Tris, pH 8.0) y homogenizadas usando un homogenizador Benchmark BeadBlaster (Benchmark Scientific; Sayreville, NJ, EE. UU.). La concentración de proteína se determinó utilizando el ensayo de proteína de BCA (Pierce, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EE. UU.). Se cargaron 25 μ g de proteína para el análisis de Western blot. Después de bloquear en leche baja en grasa al 5% en 50 mL de PBS (8.1 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) - 0.1% Tween 20 durante 1 h con agitación, se incubaron las membranas con anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-1 β (dilución 1:1000; Abcam; Cambridge, Reino

Unido) y anticuerpo policlonal de conejo anti-NLRP3 (dilución 1:1000; Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, EE. UU.) a 4 °C durante la noche. Se incubaron las membranas 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo peroxidasa (dilución 1:10,000; Amersham Bio-Sciences; Piscataway, NJ, EE. UU. Para normalizar la cantidad total de proteína por carril, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-14-3-3-z (dilución 1:1500; Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo peroxidasa (dilución 1:10,000; Abcam; Cambridge, Reino Unido). La inmunorreactividad se detectó mediante quimioluminiscencia.

6.15 Determinación de la actividad del Complejo I Mitochondrial (CI) en homogeneizado de SN

El tejido de toda la SN se homogenizó en PBS pH 7.4 y posteriormente se centrifugó durante 5 min a 2000 g. Se recolectaron los sobrenadantes y se usaron para realizar los análisis. La medición de la actividad de CI se basa en su capacidad para oxidar Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH) mientras reduce Decilubiquinona (Dub) a Dihydrodecilubiquinona (DUbH₂), una molécula que es posteriormente oxidada por 2,6-Dicloroindofenol (DCPIP) [75]. Este producto puede absorber la luz a 600 nm. Se incluyó también, la determinación de la actividad de CI con 20 mM de rotenona como inhibidor específico. Todas las mediciones se realizaron utilizando un lector de microplacas Synergy-Biotek (Biotek Instruments; Winooski, VT, EE. UU.) a 37 °C. La actividad de CI se definió restando la actividad obtenida con el inhibidor de rotenona de la actividad no inhibida y se expresó como nmol/min/mg de proteína (datos normalizados por los valores medios del grupo no tratado).

6.16 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como el valor medio \pm el error estándar de medición (SEM) de al menos 3 experimentos independientes (n = 3). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante análisis de varianza unidireccional (una vía ANOVA) y bidireccional (2 vías ANOVA)

respectivamente, seguido de la prueba post hoc de Tukey. Se utilizó el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.) para el análisis estadístico. La diferencia estadística se consideró significativa para un valor de $p < 0.05$.

7 Resultados

7.1 La inyección intranigral de LPS provocó fiebre y manifestaciones clínicas de la enfermedad en ratas.

La administración intranigral de LPS provocó signos agudos y reversibles similares a una infección en ratas. En el grupo mock, la temperatura corporal se mantuvo constante en $36,7 \pm 0,6$ °C durante el periodo de evaluación. En contraste con el grupo tratado con LPS en el que se detectó un aumento de la temperatura corporal a partir de las 4 horas post-inyección, alcanzando un máximo $37,95 \pm 0,75$ °C entre las 8 y 21 horas ($p < 0,05$) y disminuyendo a $37,1 \pm 0,3$ °C a las 24 horas (**Figura 5a**).

Las ratas con inyección intranigral de LPS mostraron signos de enfermedad a partir de las 3 horas post-inyección, alcanzando un máximo grado a las 5 horas y manteniéndose hasta las 21 horas cuando comenzaron a disminuir los signos evaluados ($p < 0,05$; Figura 5b). Entre las 3 y 8 horas después de la inyección de LPS, los principales signos de enfermedad fueron adinamia, postura corporal encorvada, ojos cerrados y piloerección; esta última respuesta se mantuvo hasta el final de las mediciones (Figura 5b). Las ratas del grupo mock no presentaron signos de enfermedad ($p > 0,05$), excepto la adinamia en el 20% de ellas y el pelaje irregular en el 15% de todo el grupo mock en comparación con el grupo control Nt (Figura 5b).

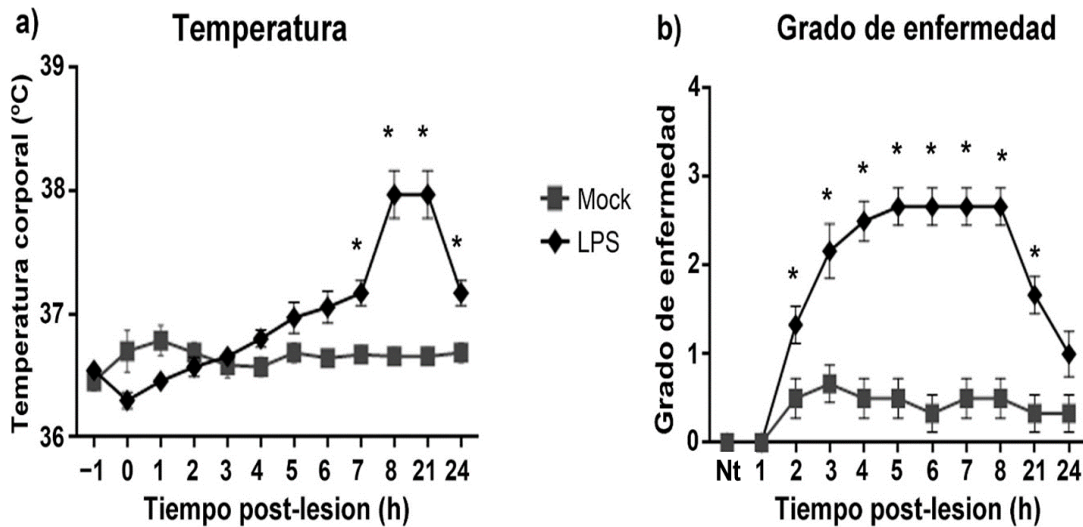


Figura 5. Evolución clínica después de una sola inyección de LPS en la SN izquierda de la rata. (a) Temperatura corporal y (b) puntuación de signos de enfermedad después de la lesión. Mock = ratas inyectadas con el vehículo (2 µL de solución salina fisiológica libre de endotoxinas) en la SN izquierda. Nt = ratas no tratadas. Todos los valores representan la media ± error estándar de la media (SEM) (n = 6 ratas). Los asteriscos (*) indican diferencias (p < 0,05) entre los grupos LPS y mock. ANOVA de dos vías y prueba post hoc de Tukey.

7.2 Activación de la microglia después de la inyección intranigral de LPS.

Como se esperaba, la administración intranigral de LPS activó las células microgliales del lado inyectado, evidenciado por un aumento del 296% de la inmunorreactividad de Iba1 a las 24 horas en comparación con el grupo mock (p < 0,0001), alcanzando una respuesta máxima (563%) a las 48 horas (p < 0,0001) y disminuyendo hasta alcanzar valores basales en el día 30 después de la inyección (p > 0,0001). También se produjo un aumento significativo del 177% (p < 0,0001) de las células Iba1 (+) con un curso temporal similar al lado inyectado en el lado contralateral en comparación con el grupo mock (**Figura 6a, b**). No hubo diferencia significativa (p > 0,05) al comparar la respuesta del lado ipsilateral con el contralateral. Además, se observó una morfología celular activa en animales tratados con LPS en comparación con las formas

quiescentes observadas en el lado ipsilateral del grupo Nt (Figura 6c) y mock (**Figura 6d**). A las 24 horas después de la inyección de LPS, la morfología reactiva se observó predominantemente en la SNpc ipsilateral (**Figura 6e**) y contralateral (**Figura 6f**). A las 48 horas, las células con morfología ameboide fueron más abundantes en la SNpc ipsilateral (**Figura 6**).

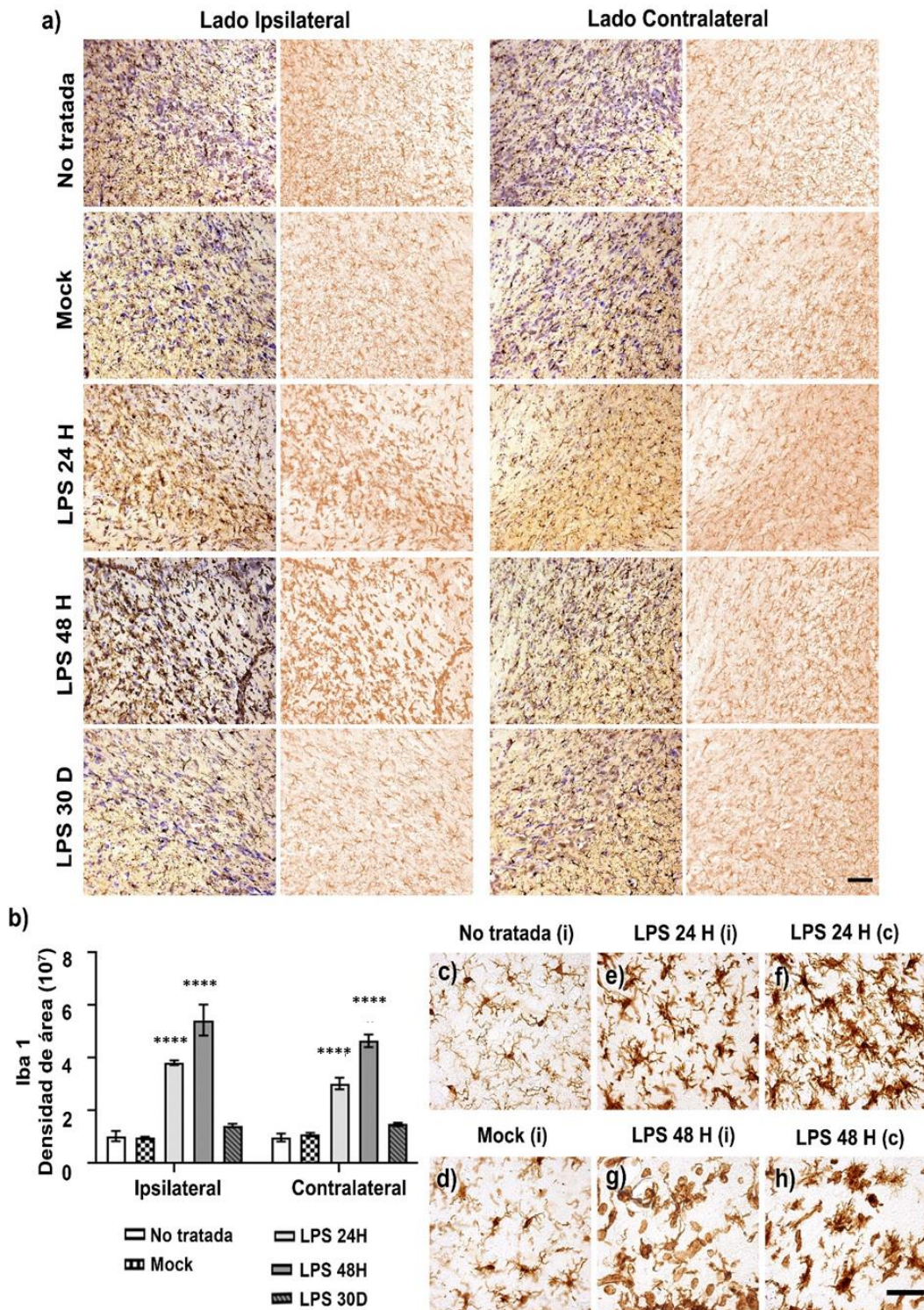


Figura 6. El LPS induce la activación de células microgliales en la SNpc. (a) Micrografías representativas de células Iba1 (+) y contratinción de Nissl en la SNpc de los grupos de control (Nt y mock) en diferentes tiempos después de

la inyección de LPS. (b) El gráfico muestra la densidad de área de Iba1 en ensayos de inmunohistoquímica utilizando el software ImageJ v.1.46r (Institutos Nacionales de Salud; Bethesda, MD, EE. UU.). Las barras muestran la media \pm SEM calculada a partir de las medidas de tres niveles anatómicos de las mismas ratas, n = 3 ratas independientes por grupo. El asterisco (****) compara el grupo LPS con el grupo mock en ambos lados, $p < 0,0001$. ANOVA de dos vías y post hoc de Tukey. Las micrografías ampliadas representativas muestran varias morfologías microgliales en la SNpc de los grupos Nt (c) y mock (d) para comparar el estado de activación inducido por LPS en el ipsilateral (e, g) y contralateral (f, h). Barra de escala = 50 μ m para todas las micrografías.

7.3 El LPS induce preferentemente astrocitos con fenotipo neurotóxico A1.

Los ensayos de doble inmunofluorescencia mostraron la inducción de astrocitos del fenotipo neurotóxico A1 a través de la inmunorreactividad de C3 en células positivas para la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) [11] después de la inyección intranigral de LPS. El aumento significativo en la inmunorreactividad de C3 ($p < 0.0001$) corresponde al aumento de células GFAP (+) y se expresó como densidad de área de inmunofluorescencia (IF), los valores en el ipsilateral de la SN en comparación con los grupos de control fueron de 300% para C3 y de 266% para GFAP a las 24 horas, a las 48 horas fue de 217% para C3 y de 204% para GFAP (**Figura 7a, b**). La SN contralateral a la inyección de LPS, también aumentó significativamente la densidad de área de IF ($p = 0.04$) en un 112% para C3 y un 355% para GFAP a las 24 horas, y en un 86% para C3 y un 258% para GFAP a las 48 horas (**Figura 7a-c**). Sin embargo, la inducción de C3 en el lado contralateral fue un 38% menor que en el ipsilateral a las 24 horas ($p = 0.0094$) después de la administración de LPS (**Figura 7a, b**). En grupos control se observa inmunorreactividad no específica que no colocaliza con células GFAP (+) (**Figura 7a**). En contraste, la inmunorreactividad de astrocitos A1 neurotóxicos colocaliza con el soma y los

procesos de los astrocitos y en astrocitos presentes en los vasos sanguíneos de la barrera hematoencefálica (BHE), se observa colocación de C3 y GFAP en los pies terminales de los astrocitos. Este patrón de colocación fue más evidente en el ipsilateral que en el contralateral (**Figura 7d-g**).

La administración de LPS *in vitro* induce astrocitos del fenotipo neurotrófico A2 que fueron identificados por el marcador S100A10. Encontramos, *in vivo*, que la administración del vehículo únicamente aumentó un 268% ($p < 0.0001$) la inmunorreactividad de S100A10 en células GFAP (+) en la SN de ambos lados del grupo mock en comparación con el grupo de control Nt, lo que sugiere una respuesta de defensa del cerebro, a la lesión mecánica causada por el procedimiento de inyección (**Figura 8a-c**). Además, la administración de LPS produjo un aumento adicional ($p < 0.0001$) del 189% a las 24 horas y del 174% a las 48 horas en la inmunorreactividad de S100A10 y GFAP sobre la producida por la inyección del vehículo (**Figura 8a-c**). Aunque se detectó un aumento significativo en las células A2 (+) en la SN contralateral a las 24 y 48 horas, este fue un 42% (24 h) y un 58% (48 h) menor que en la SN ipsilateral (Figura 4a-c). Curiosamente, la inmunorreactividad de A2 mostró un patrón diferente en las células GFAP (+) dependiendo del lado de la SN que se evaluara; en el ipsilateral, la inmunorreactividad de S100A10 fue predominantemente nuclear, mientras que en el contralateral fue citoplasmática (**Figura 8d, e**).

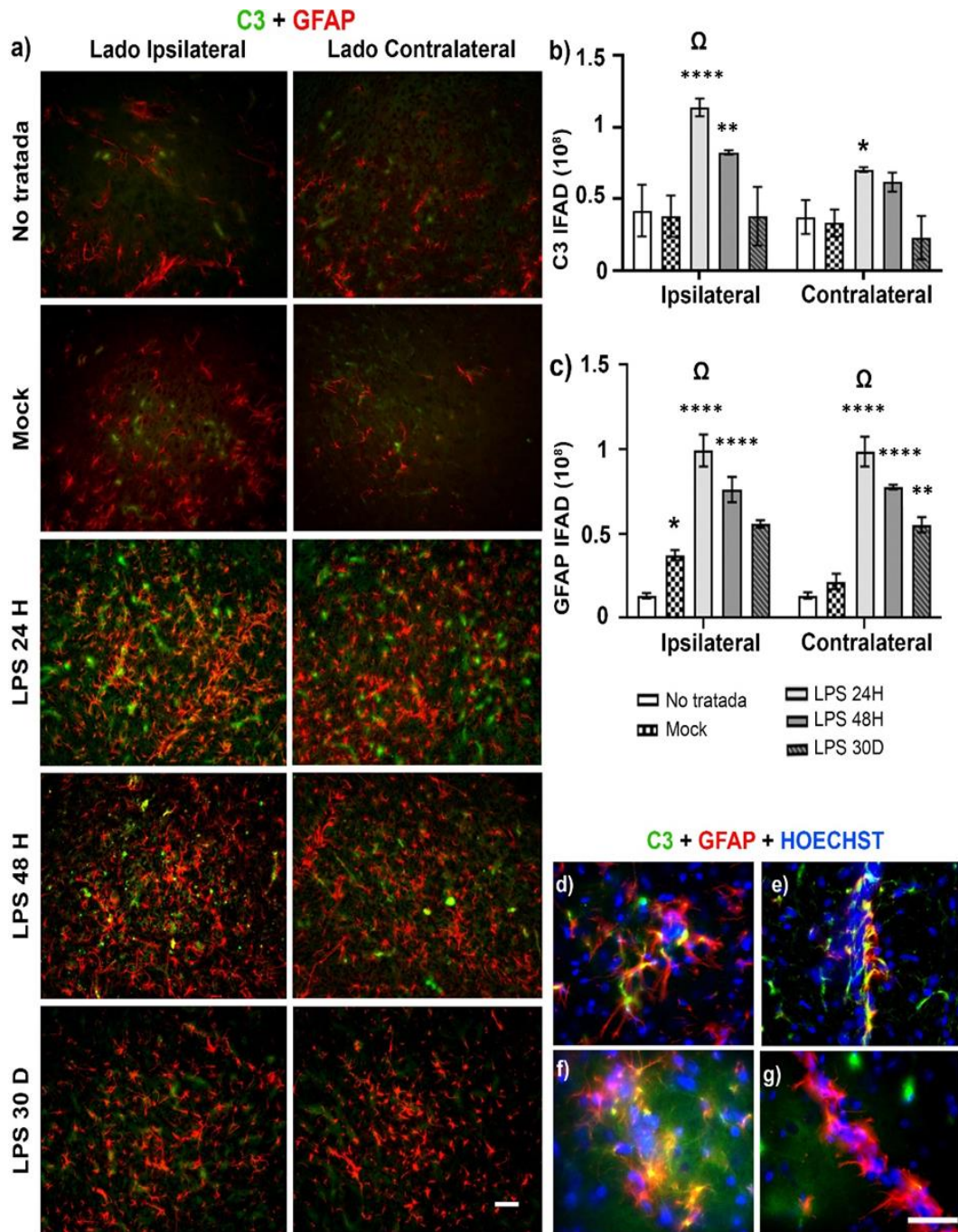


Figura 7. El LPS induce el fenotipo neurotóxico A1 en astrocitos de la SNpc. (a) Micrografías representativas de doble inmunofluorescencia contra C3 (verde) y GFAP (rojo) en diferentes tiempos después de la inyección intranigral de LPS. Los gráficos muestran la densidad de IF para C3 (b) y GFAP (c) medidas en las micrografías (a) utilizando el software ImageJ v.1.46r (Institutos Nacionales de Salud; Bethesda, MD, EE. UU.). Las barras representan la

media \pm SEM calculada a partir de las medidas en tres niveles anatómicos por rata (n = 3 ratas independientes por grupo). Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos LPS con el grupo mock en los lados indicados del cerebro, (****) p < 0.0001, (**) p = 0.002, (*) p = 0.04. El símbolo omega (Ω) compara el efecto en la SN ipsilateral con la SN contralateral p = 0.0094. ANOVA de dos vías y post hoc de Tukey. Las micrografías ampliadas representativas muestran detalles de los astrocitos neurotóxicos A1 en el lado ipsilateral (d, e) y contralateral (f, g) a las 24 horas después de la inyección de LPS. Barra de escala = 50 μ m para todas las micrografías.

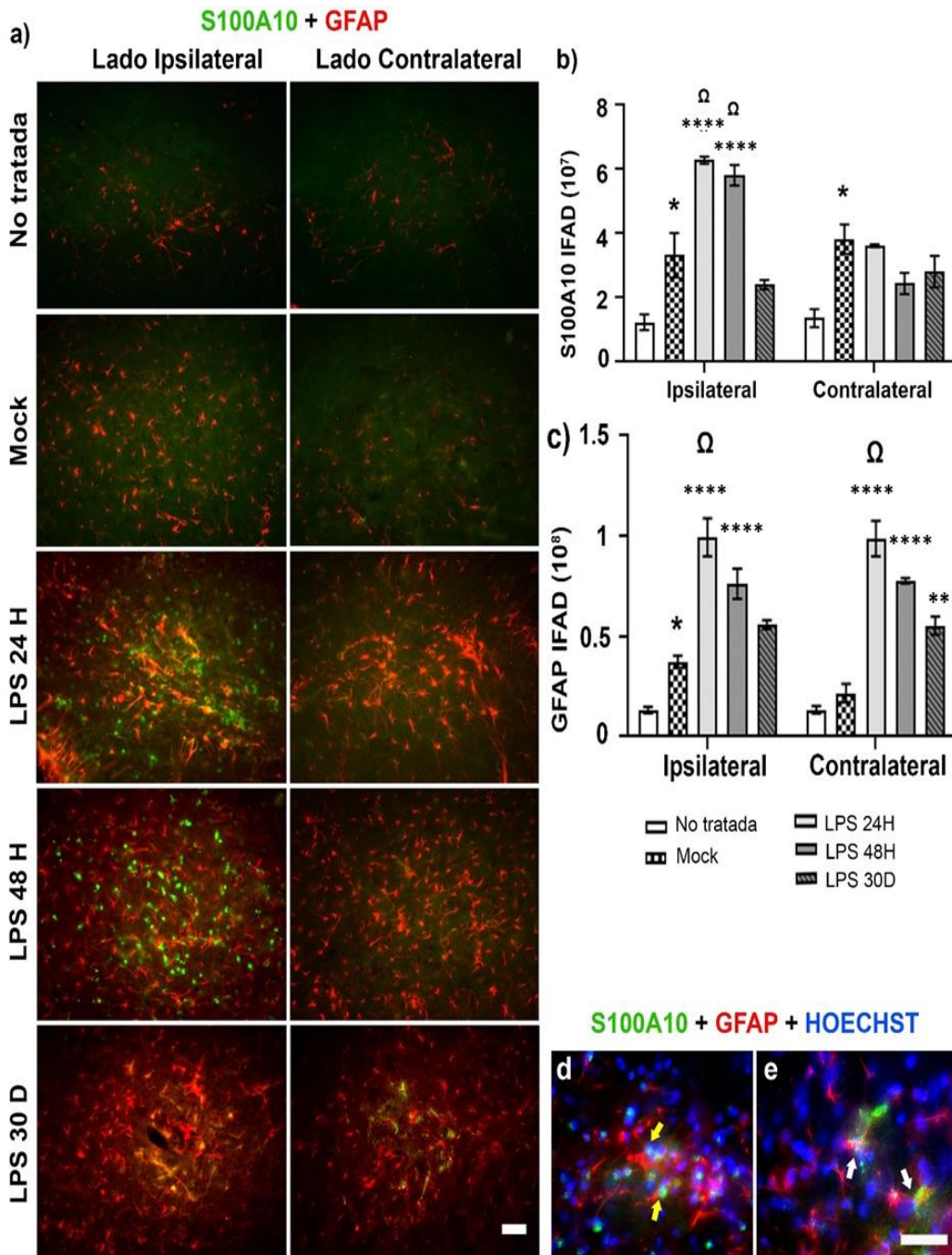


Figura 8. El LPS induce el fenotipo neurotrófico A2 en astrocitos de la SNpc. (a) Micrografías representativas de la inmunofluorescencia doble contra S100A10 (verde) y GFAP (rojo) en diferentes tiempos después de la inyección intranigral de LPS. Los gráficos muestran la densidad de IF para S100A10 (b) y GFAP (c) medidos en las micrografías usando el software ImageJ v.1.46r (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA). Las barras representan la

media \pm SEM calculada a partir de las mediciones en tres niveles anatómicos por rata ($n = 3$ ratas independientes por grupo). El asterisco (*) compara el grupo LPS con el grupo mock en ambos lados, (****) $p < 0.0001$, (**) $p = 0.0001$, (*) $p = 0.023$. El símbolo omega (Ω) compara el efecto de LPS en la SN ipsilateral la SN contralateral a las 24 y 48 horas. ANOVA de dos vías y pruebas post hoc de Tukey, $p < 0,0001$. Las micrografías ampliadas representativas muestran la inmunorreactividad de S100A10 en (d) núcleos (flechas amarillas) de células GFAP (+) en la SNpc ipsilateral y (e) en el citoplasma de astrocitos (flechas blancas) en el contralateral a las 24 horas después de la lesión. Barras de escala = 50 μ m para todas las micrografías.

7.4 Activación del inflamasoma en la SNpc después de la inyección de LPS.

Para confirmar la presencia de inflamación inducida por LPS en respuesta aguda y crónica se evaluó la activación del inflamasoma, quien desempeña un papel central durante este proceso biológico complejo [50, 76], se realizaron ensayos de inmunohistoquímica y Western Blot (WB) después de la inyección intranigral de LPS. La inyección de LPS aumentó significativamente ($p < 0.0001$) la inmunorreactividad de caspasa-1 activa en la SNpc ipsilateral a las 24 horas (792%) y 48 h (333%) en comparación con los grupos control (**Figura 9a, b**). También se observó un aumento significativo del 315% ($p = 0.02$) en la SNpc contralateral, pero solo a las 24 horas después de la administración de LPS (**Figura 9a, b**). El análisis detallado mediante microscopía de campo claro (**Figura 9c**) y microscopía fluorescente mostró inmunorreactividad de caspasa-1 activa en células microgliales (**Figura 9b, d**) y astrocitos (**Figura 9e**). El análisis de WB mostró un aumento significativo del 203,69% ($p < 0,0001$) en la densidad de banda de NLRP3 (+) de la SN ipsilateral a las 24 h después de la inyección de LPS en comparación con los niveles basales de ratas mock (**Figura 9f**). De las mismas muestras, se observa un aumento a las 8 h de la densidad de banda de IL-1 β (192,51%) y a las 24 horas (186,25%)

después de la inyección de LPS en comparación con los valores de los controles ($p < 0.05$; Figura 5g). No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en las SN contralaterales.

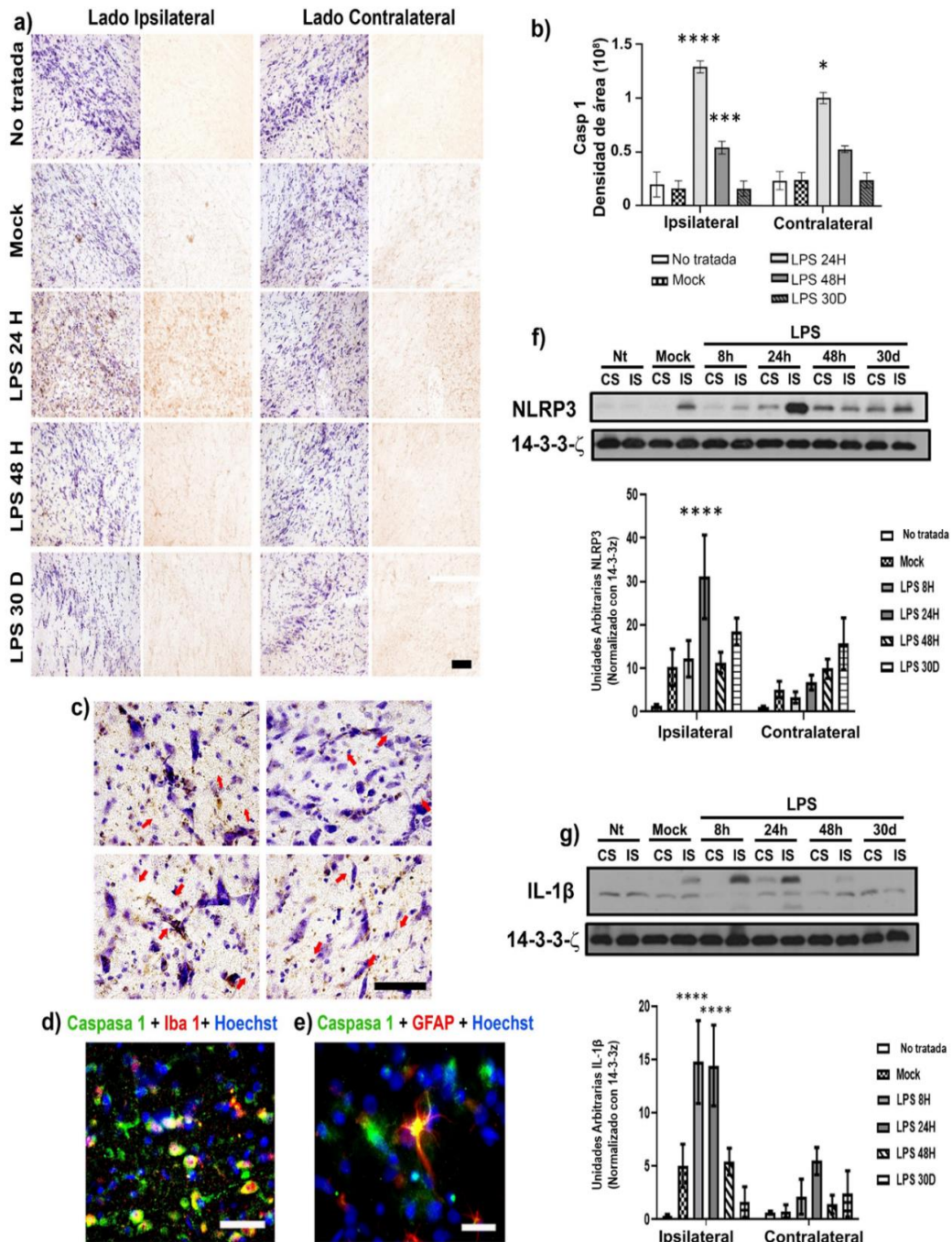


Figura 9. El LPS provocó la presencia de caspasa-1 activa en microglía y astrocitos de la SNpc. (a) Micrografías representativas de células positivas para caspasa-1 activa y tinción de Nissl en la SNpc de grupos de control (Nt y mock) en diferentes tiempos después de la inyección de LPS. (b) El gráfico muestra la densidad de área para la inmunorreactividad de caspasa-1 activa cuantificada en las micrografías. (c) Micrografías representativas de la inmunohistoquímica y tinción de Nissl sugieren la presencia de caspasa-1 en células no neuronales (flechas rojas). La doble inmunofluorescencia con tinción de Hoechst (azul) confirma la inmunorreactividad de caspasa-1 (verde) en (d) microglía (rojo) y (e) astrocitos (rojo). Barra de escala = 50 μ m es para las micrografías. La cuantificación de NLRP3 (f) e IL-1 β (g) en el lado inyectado (IS) y en el contralateral (CS) se midió mediante ensayos de WB. Las barras representan la media \pm SEM calculada a partir de las mediciones en tres niveles anatómicos (n = 3 ratas independientes por grupo). El asterisco (*) compara los grupos de LPS con los grupos de control en ambos lados, (****) p < 0,0001 (*) p = 0,02. ANOVA de dos vías y post hoc de Tukey.

7.5 La administración de LPS conlleva a una disminución en la actividad del complejo I (CI) mitocondrial en homogeneizados de SN.

Se encontró una disminución significativa de la actividad del complejo I mitocondrial (CI) tanto en la SN ipsilateral (53,9%; p < 0,0001) como en la contralateral (66,6%; p < 0,0001) a las 24 horas después de la administración de LPS en comparación con el grupo mock (Figura 6). A las 48 horas, la disminución (60,7%; p < 0,05) en la actividad CI mitocondrial se mantuvo solo en el hemisferio ipsilateral en comparación con el grupo mock (**Figura 10**). No se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos de control y LPS en el día 30 después de la administración intranigral de LPS (p > 0,05; **Figura 10**) ni entre los grupos Nt y mock en ambos hemisferios (**Figura 10**).

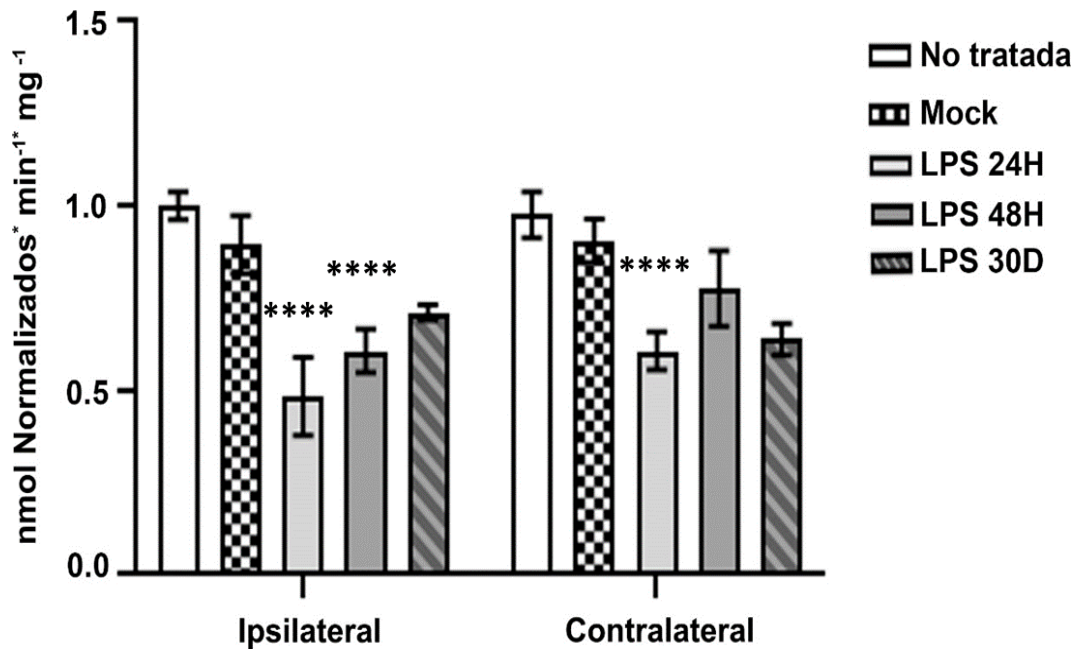


Figura 10. La administración unilateral de LPS en la sustancia negra disminuyó la actividad del CI mitocondrial en homogeneizados de SN. Los datos se expresan como la media \pm SEM ($n = 6$ ratas independientes por tiempo y condición experimental). El asterisco (*) compara los grupos LPS con los grupos mock y Nt. ANOVA de dos vías y Tukey post hoc, $p < 0.0001$.

7.6 El LPS induce senescencia en neuronas dopaminérgicas.

La tinción con β -galactosidasa (β -gal) se utilizó para evaluar si el LPS inducía senescencia en neuronas dopaminérgicas nigrales [67] 30 días después de la lesión. En comparación con los grupos control, los animales inyectados con LPS aumentaron significativamente la densidad del área de β -gal ($p < 0,05$) en un 140% en la SNpc ipsilateral y un 143% en el lado contralateral (**Figura 11a, b**). Se encontró diferencia significativa ($p < 0,0001$) entre el lado ipsilateral y contralateral en el día 30 después de la inyección de LPS (**Figura 11a, b**). Un análisis detallado mostró que la marca de β -gal se superpone con células TH (+) en la SNpc de ambos hemisferios cerebrales (Figura 7c-f). No se detectó colocalización en los grupos control (**Figura 11g - j**).

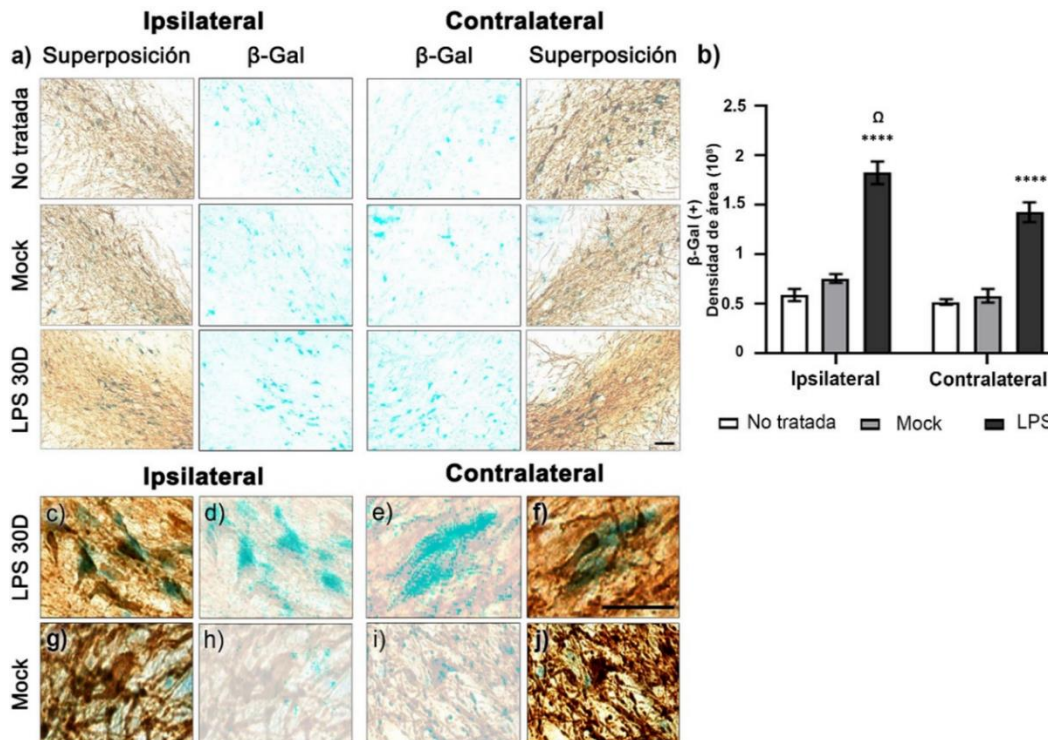


Figura 11. El LPS induce senescencia en neuronas dopaminérgicas de la SNpc. (a) Micrográficas representativas de la SNpc con tinción de β -gal e inmunohistoquímica de TH. (b) La densidad del área de β -gal se midió mediante el software ImageJ v.1.46r (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD). Los valores son la media \pm SEM de tres niveles anatómicos, $n = 3$ ratas independientes en cada condición experimental. El asterisco (*) compara los grupos de LPS con el grupo mock en ambos lados (****) $p < 0.0001$. El símbolo omega (Ω) compara la SNpc ipsilateral con el lado contralateral, $p = 0.002$. ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey, . Las fotomicrográficas ampliadas muestran la colocalización de la tinción de β -gal con células TH (+) en el SNpc del grupo LPS (c-f) que no están presentes en el grupo Mock (g-j). Barra de escala = 50 μ m para todas las micrográficas.

7.7 Neurodegeneración dopaminérgica nigroestriatal después de la administración de LPS intranigral.

Se cuantificó el número de neuronas TH (+) y la densidad de área de las ramificaciones en la SNpc/SNpr, también se cuantificó la densidad de área de

las ramificaciones en el estriado el día 30 después de la administración intranigral de LPS (**Figura 12**). El número de neuronas TH (+) contadas fue de 222 (promedio de tres niveles anatómicos) en el SNpc ipsilateral y 219 en el lado contralateral de animales sanos. El LPS causó una pérdida significativa de células TH (+) (48%) y ramificaciones (55%) en comparación con los valores de control respectivos ($p < 0.00015$) (**Figura 12b, c**). También ocurrió una pérdida de células TH (+) (34%) y sus ramificaciones (32%) en el SNpc contralateral, lo cual fue estadísticamente significativo en comparación con los valores del grupo control ($p = 0.0007$). No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los hemisferios ipsilateral y contralateral.

En la densidad de área de las ramificaciones TH (+) del estriado 30 días después de la inyección intranigral de LPS se obtuvieron resultados similares. De nuevo, la densidad de área TH (+) disminuyó significativamente ($p = 0.0007$) en el estriado ipsilateral (38%) y estriado contralateral (25%) (Figura 8d, e). Además, se observó diferencia significativa ($p < 0.00087$) en la inmunorreactividad de TH entre el estriado de los dos hemisferios (**Figura 12d, e**).

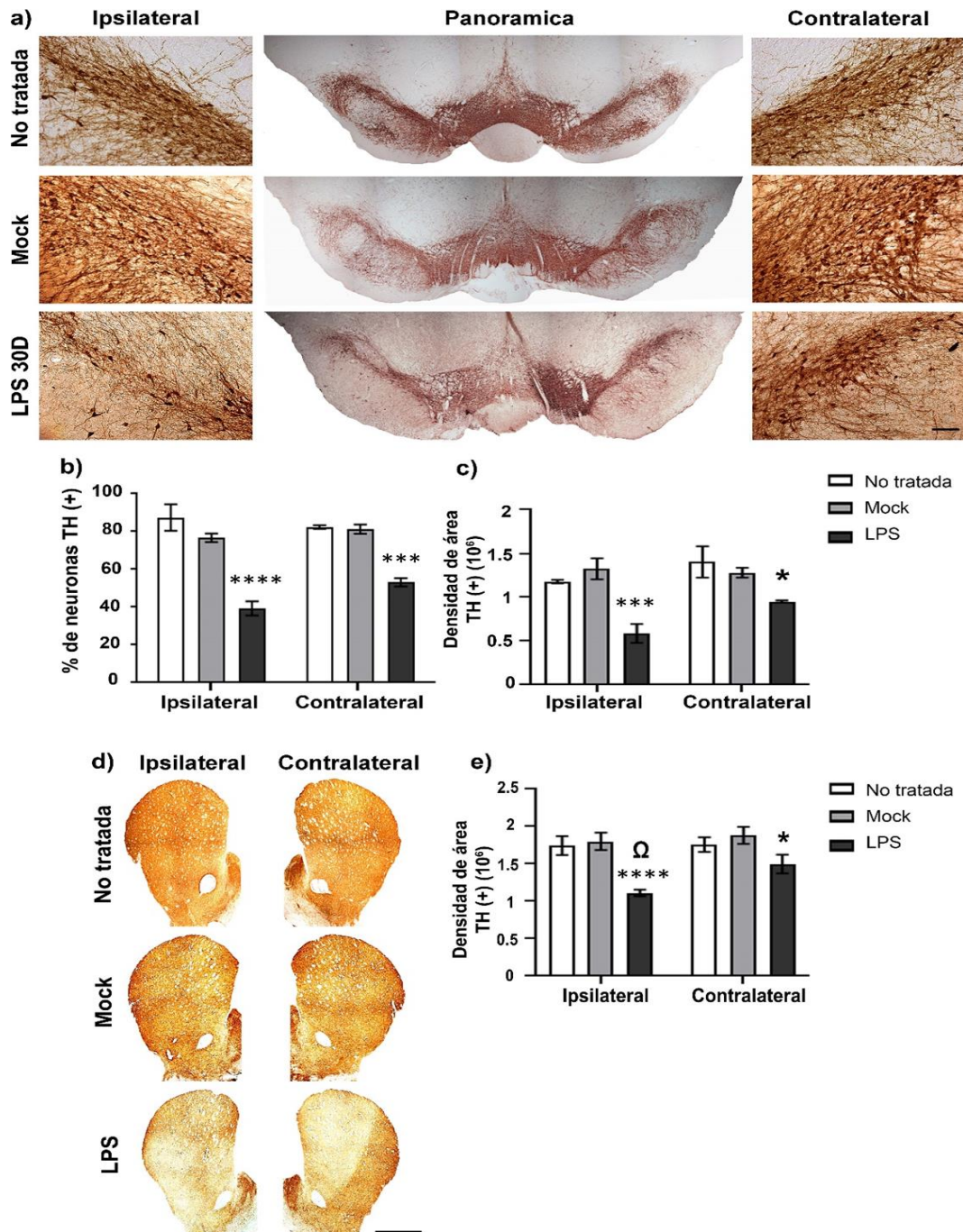


Figura 12. La inyección intranigral de LPS disminuye bilateralmente las células TH (+) y sus ramificaciones en la SNpc y el estriado. (a) Micrografías representativas del mesencéfalo procesadas con inmunohistoquímica TH. Los paneles laterales muestran una amplificación 20X de la SNpc correspondiente. (b) Conteo de neuronas y (c) cuantificación de la densidad de área en la sustancia negra. (d) Micrografías representativas del estriado procesadas con

inmunohistoquímica TH y (e) sus medidas de densidad de área. Se utilizó el software ImageJ v.1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para cuantificar las neuronas y la densidad de área de las ramificaciones. Barra de escala es de 50 μm para las micrografías (a) y 1 mm para las micrografías (d). Los valores son la media \pm SEM de tres niveles anatómicos ($n = 3$ ratas independientes por condición experimental). El asterisco (*) compara los grupos de LPS con su respectivo grupo mock en ambas SN (****) $p < 0.0001$, (***) $p = 0.0007$ (*) $p = 0.003$. El símbolo (Ω) compara el efecto de LPS en el lado ipsilateral con el del lado contralateral. ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, $p = 0.0087$.

7.8 Comportamiento motor y déficit sensoriomotor en el día 30 después de la inyección intranigral de LPS.

Se realizaron cuatro pruebas independientes de comportamiento motor que mostraron el déficit fisiológico de la neurodegeneración nigroestriatal dopaminérgica inducida por LPS [68]: la prueba de caminata sobre viga para evaluar la coordinación motora y el equilibrio y la asimetría en el uso de las extremidades ("cilindro") para evaluar asimetría locomotora, la prueba de colocación de extremidades anteriores evocada por vibrisas para evaluar la asimetría en la corteza sensoriomotora y el estriado, y la prueba de campo abierto para analizar cambios en la locomoción. Las evaluaciones se llevaron a cabo en cuatro grupos de ratas: (1) no tratadas (Nt), (2) mock, y en los días (3) 15 y (4) 30 después de la administración de LPS (**Figura 13**).

La prueba de la viga reveló que las ratas lesionadas con LPS tardaron más tiempo en cruzar la viga en los días 15 ($17,5 \pm 6,5$ s) y 30 ($16,5 \pm 6,5$ s) en comparación con el grupo mock (en los días 15, $6,5 \pm 2,5$ s y 30, $8,5 \pm 1,5$ s; ambos $p = 0,0001$) y el grupo Nt (en el día 15, $9,5 \pm 3,5$ s y en el día 30, 9 ± 1 s). Además, las ratas lesionadas con LPS cometieron más errores en la marcha en el día 15 ($15,5 \pm 6,8$ resbalones) y 30 (16 ± 6 resbalones) que el grupo Mock (en el día 15, $2,5 \pm 1,5$ resbalones y en el día 30, $2,5 \pm 1,5$

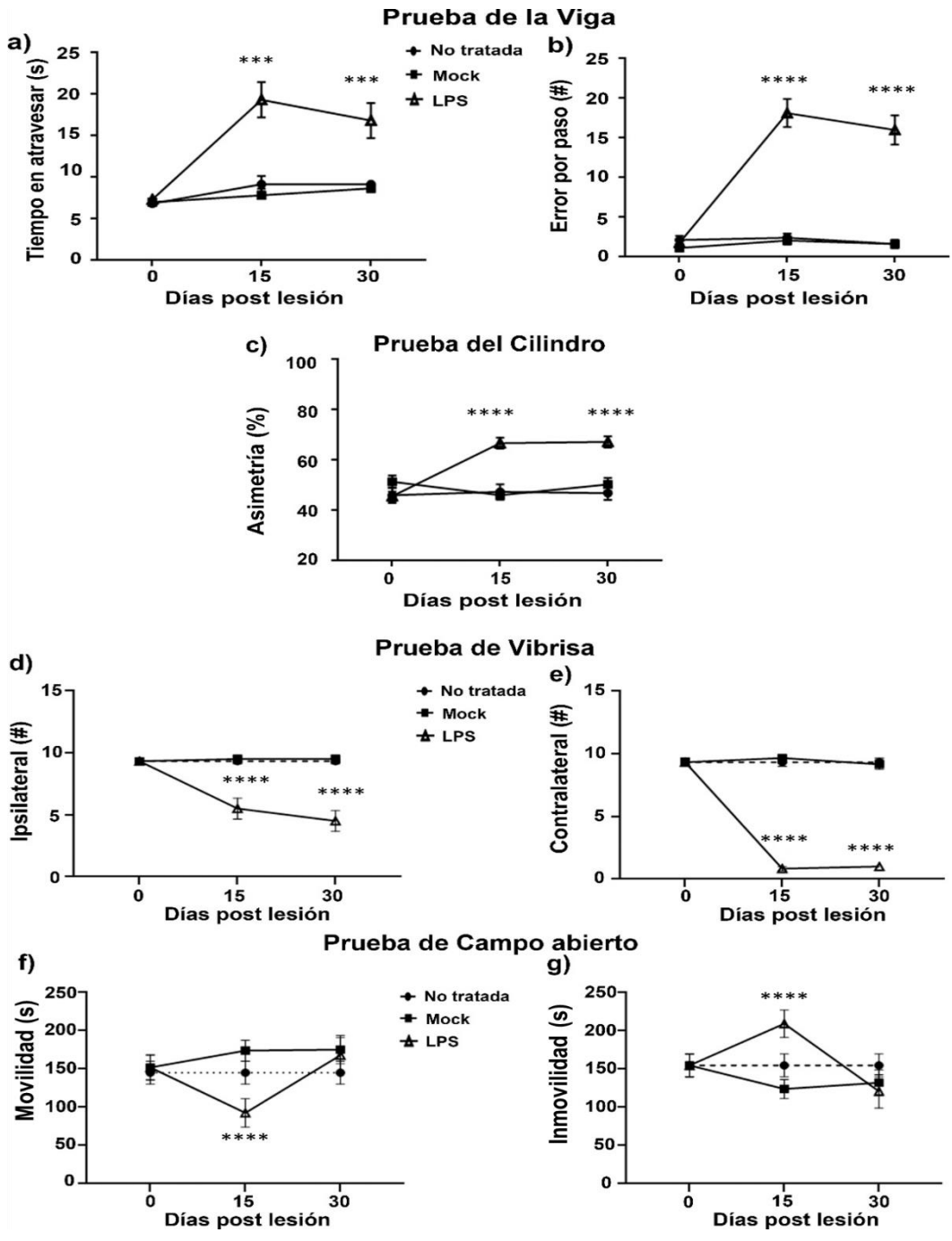
resbalones; $p = 0,0001$) y las ratas Nt (en el día 15, 3 ± 2 resbalones y en el día 30, $2,5 \pm 1,5$ resbalones) (**Figura 13b**).

La prueba del cilindro mostró que las ratas inyectadas con LPS presentaron asimetría locomotora en el uso de sus extremidades anteriores en los días 15 ($67,5 \pm 7,5\%$) y 30 ($69,4 \pm 9,45\%$) en comparación con las ratas Nt y mock ($p < 0,0001$), que mostraron un uso igual (50%) de sus extremidades anteriores (**Figura 13c**).

La prueba de colocación de extremidades anteriores evocada por vibrisas mostró que el LPS causó una disminución significativa ($p < 0,0001$) en la respuesta de colocación de la extremidad anterolateral ipsilateral en los días 15 ($5,5 \pm 2,5$) y 30 ($4,5 \pm 2,5$), en comparación con el grupo mock en el día 15 ($9,0 \pm 1$) y 30 ($9,0 \pm 1$) (**Figura 13d**). El LPS también disminuyó significativamente ($p < 0,0001$) la respuesta de los movimientos del miembro anterior contralateral en los días 15 ($0,5 \pm 0,5$) y 30 ($1,0 \pm 0,5$) después de la lesión en comparación con el grupo mock en los días 15 ($9,5 \pm 0,5$) y 30 ($9 \pm 1,0$) (**Figura 13e**). El LPS causó una disminución significativa en el tiempo de movilidad de las ratas en el día 15 después de la lesión LPS ($71,5 \pm 51,5$ s; $p < 0,0001$; **Figura 13f**) en comparación con el grupo mock (172 ± 39 s). En ese día, por el contrario, el LPS aumentó significativamente el tiempo de inmovilidad de las ratas (232 ± 48 s; $p < 0,0001$; **Figura 13g**) en comparación con el grupo mock (123 ± 34 s). En las cuatro pruebas de comportamiento, el grupo mock no presentó diferencias significativas con el grupo Nt.

Figura 13. La inyección intranigral de LPS provoca déficits en el comportamiento motor y sensoriomotor en los días 15 y 30 después de la inyección. Se evaluaron las ratas con la prueba de la viga para medir (a) el tiempo de recorrido y (b) el número de errores por paso. (c) El uso de las extremidades anteriores se midió con la prueba del cilindro para determinar la asimetría motora. El déficit sensoriomotor se evaluó a través de la respuesta evocada por las vibrisas en la colocación de la extremidad anterior ipsilateral (d) y contralateral (e). La actividad locomotora se cuantificó utilizando la prueba

de campo abierto mediante el tiempo de movilidad (f) y el tiempo de inmovilidad (g). Los datos se expresan como la media \pm SEM (n = 6 ratas independientes por tiempo y condición experimental). El asterisco (*) compara los grupos de LPS con los grupos mock y Nt. ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, (****) $p < 0.0001$, (***) $p = 0.0001$.



8. Discusión

Este estudio confirma resultados previos en los que la administración de una única dosis de LPS en la SNpc desencadena neuroinflamación local aguda [55] y proporciona nuevos hallazgos que consisten en la inducción de astrocitos A1 neurotóxicos, la activación de la vía del inflamasoma NLRP3 y el deterioro mitocondrial que, en conjunto con la activación de la microglía, conducen a la neurodegeneración del sistema nigroestriatal y a déficits sensoriomotores. Otro hallazgo novedoso reportado en este trabajo fue la neuroinflamación que se propagó al lado contralateral (no inyectado), causando deterioro mitocondrial y neurodegeneración del sistema nigroestriatal. Nuestros resultados refuerzan aún más la idea de que la neuroinflamación aguda puede conducir a la neurodegeneración, ayudando a explicar la fisiopatología de variantes parkinsonianas independientes de α -sinucleinopatía [77].

Anteriormente, mostramos que la microglía responde al estímulo de LPS en tiempos tempranos como es a partir de las 0.2 horas post-inyección, liberando citocinas proinflamatorias y adquiriendo una morfología fagocítica que resulta ser más evidente a los 7 días después de la inyección del LPS [55]. Interesantemente en este estudio encontramos que a tiempos tardíos como es los 30 días post-inyección, la cantidad de células microgliales disminuye acercándose a los niveles basales en ambos hemisferios, lo que podría sugerir control y contención ante la posible propagación de la respuesta inflamatoria (mecanismo antiinflamatorio celular).

Además, demostramos que la activación de la microglía y la producción de citocinas proinflamatorias preceden a la astrocitosis reactiva en la SN [55]. Por lo tanto, los astrocitos A1 neurotóxicos mostrados aquí podrían ser inducidos por la microglía activada previamente [9]. De acuerdo con informes anteriores [9, 78], también confirmamos que el LPS induce astrocitos neurotróficos A2, positivos para S100A10 y GFAP, lo que sugiere nuevamente la activación de mecanismos antiinflamatorios como una respuesta biológica para contener y

controlar el daño. En consecuencia, después de la estimulación con LPS, la proteína S100A10 en complejo con la proteína de unión a Ca^{2+} /lípidos anexina A2 (complejo anexina A2-S100A10) [79] inhibe la proliferación astrocítica y modula la activación del inflamasoma, así como las citocinas liberadas en el SNC [80]. Sin embargo, el efecto perjudicial del LPS prevaleció a pesar de la presencia de los astrocitos A2 neurotróficos, como se muestra aquí y por otros autores [81-83]. Lo anterior sugiere que el mecanismo neurotrófico endógeno necesita un refuerzo adicional para superar el efecto neurotóxico de los astrocitos A1 [84-86].

Interesantemente nuestros resultados muestran que la neuroinflamación implica la activación, proliferación y muy probablemente la migración de microglía y astrocitos al sitio de daño como la indica la literatura, debido a que son los reguladores clave del proceso inflamatorio en el SNC, coexistiendo como una población heterogénea de fenotipos neurotóxicos y neuroprotectores (M1, M2, A1 y A2) [87].

Recientemente ha sido demostrado que el inflamasoma NLRP3 de la microglía juega un papel crítico en la inducción de astrocitos reactivos neurotóxicos A1 a través de la liberación de una mezcla de citocinas que involucran la vía NF- κ B y la activación río abajo de la caspasa-1 [88]. En consecuencia, el LPS indujo la activación del inflamasoma NLRP3 y la caspasa-1 y el posterior procesamiento de IL-1 β sólo en la SN ipsilateral, lo que explica la activación de astrocitos reactivos neurotóxicos A1. Como hipótesis para explicar la neurodegeneración dopaminérgica en el lado contralateral, en ausencia de la activación del inflamasoma NLRP3, proponemos que las células activadas de la microglía aumentan la liberación de moléculas inmunomoduladoras perjudiciales para inducir astrocitos reactivos neurotóxicos A1 [46]. Las células de microglía podrían ser el candidato más plausible para propagar la neuroinflamación en el lado contralateral ya que estas células son altamente dinámicas, distribuibles y capaces de monitorear el cerebro en poco tiempo [89, 90]. Por lo tanto, la neurodegeneración del sistema nigroestriatal

contralateral encontrada en el día 30 después de la administración de LPS podría ser resultado de la acción directa de astrocitos reactivos neurotóxicos A1, células de la microglía activadas y la pobre contribución neurotrófica de astrocitos reactivos A2. Aunado a lo anterior es importante comprender que la relación entre estas células gliales activadas es complicada, y que la distribución fenotípica puede cambiar en función de la progresión de las enfermedades neurodegenerativas.

Cada vez hay más evidencia que respalda el papel patológico del inflamasoma NLRP3 en la neurodegeneración, basado en una asociación mutua con la disfunción mitocondrial [91-94], la cual se correlaciona con la neurodegeneración en ratas parkinsonianas con α -sinucleopatía [75]. En consecuencia, hemos demostrado aquí que la disfunción del complejo I mitocondrial y la activación de NLRP3 coincidieron en la fase temprana de neuroinflamación inducida por LPS y con un aumento del estrés nitrosativo/oxidativo, como se demostró previamente [55].

Los ROS mitocondriales (ROSmt) y el ADN mitocondrial (ADNmt) liberados por las mitocondrias dañadas [92] funcionan como señales moleculares asociadas al daño (DAMPs) (**Figura 14**), que, al igual que los PAMPs, son reconocidos por los PRR [24] y desencadenan cascadas de señalización que inducen la respuesta inflamatoria [24, 27] mediante la producción de interferón de tipo I (IFN) y citocinas proinflamatorias [38]. La activación de la caspasa 1 resulta en la liberación de IL-1 β e IL-18, siendo la producción de IL-1 β fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y también puede iniciar la activación de mediadores inflamatorios secundarios, como IL-6 y la proteína C reactiva. De esta manera, la activación continua del inflamasoma NLRP3 incrementa la liberación de nuevos DAMPs, creando un ciclo de retroalimentación que amplifica la respuesta inflamatoria [36-38]. Nuestros resultados sugieren que todos estos eventos tempranos pueden llevar a la neurodegeneración del sistema nigroestriatal dopaminérgico y al déficit

sensoriomotor. Es necesario corroborar si también existe un deterioro del metabolismo mitocondrial e identificar la línea neuronal afectada.

Anteriormente se propuso que existe una neurodegeneración dopaminérgica basada en la reducción de células TH (+) en la SNpc encontrada en el día siete después de la neuroinflamación inducida por LPS [55]. Aquí, mostramos que persistió hasta los 30 días y que también ocurrió en la SNpc del lado contralateral y en ambos núcleos: sustancia negra y estriado. Además, las células TH (+) nigrales restantes de ambos hemisferios también fueron positivas para β -Gal, un producto enzimático de la β -Galactosidasa asociada a la senescencia (SA-B-gal) [95, 96], mostrando así neuronas dopaminérgicas senescentes. Dado que la disfunción mitocondrial desencadena la senescencia neuronal a través del estrés oxidativo (**Figura 14**), [97, 98], sugerimos que el deterioro de las mitocondrias podría estar involucrado en la senescencia inducida por LPS de las neuronas dopaminérgicas. Esta sugerencia es respaldada por la evidencia en la que la administración sistémica de LPS desencadena una disfunción mitocondrial asociada con lesiones en neuronas dopaminérgicas y alteraciones sensoriomotoras [99]. Sin embargo, deben realizarse estudios de colocalización para demostrar sólidamente que el deterioro mitocondrial y el estrés oxidativo ocurren en neuronas dopaminérgicas senescentes.

Además, se demostró que los astrocitos A1 también pueden interrumpir la BHE al liberar mediadores proinflamatorios, incluyendo TNF- α y varias quimiocinas [100], que promueven la infiltración de leucocitos [55, 101]. En este trabajo, documentamos que la inmunorreactividad de los terminales podocíticas de astrocitos neurotóxicos A1 es más evidente en el lado ipsilateral que en el contralateral, lo que sugiere una alteración importante de la BHE en el hemisferio ipsilateral. Este desequilibrio puede explicar la predominancia de la neurodegeneración en el sistema nigroestriatal ipsilateral. Estos resultados nos sugieren que mejorar la disfunción astrocítica es un enfoque terapéutico prometedor para modular las funciones de la BHE y tratar enfermedades

neurológicas [100]. Una estrategia apunta a bloquear la transformación mediada por microglia de los astrocitos hacia un fenotipo A1 mediante el agonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (NLY01 que se encuentra en investigación clínica) [82]. Otra consiste en exosomas derivados de células madre mesenquimales que permiten suprimir la activación de astrocitos A1 mediante la regulación a la baja de la subunidad de fosforilación NF-p65, como se demostró en la lesión de la médula espinal [102, 103].

Por el contrario, la excitación de vías de señalización específicas en los astrocitos A2 puede disminuir el deterioro cognitivo; por ejemplo, se demostró que la terapia con insulina mejora la competencia mental de los pacientes con enfermedad de Alzheimer debido a la activación del receptor de insulina en los astrocitos A2 [104, 105]. Asimismo, los receptores 5-HT1A de la serotonina aceleran la expresión de moléculas antioxidantes por los astrocitos A2 en un modelo de ratón Parkinsoniano, en el que un agonista del receptor 5-HT1A, el compuesto 8-OH-DPAT, protege las neuronas dopaminérgicas [106]. Todos estos hallazgos sugieren que el cambio de los astrocitos de un fenotipo A1 a un fenotipo A2 puede tratar potencialmente enfermedades neurodegenerativas.

9. Conclusión

Este estudio confirma que una única administración de LPS en la SN desencadena proceso neuroinflamatorio y demuestra que la neuroinflamación se propaga a la SN contralateral. En ambos hemisferios se desencadenaron fenómenos nocivos, como la activación microglial y de astrocitos A1, y activación de la vía del inflamasoma NLRP3, que se acompañaron de la disfunción del complejo I mitocondrial. Debido a la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas, los eventos neuroinflamatorios causaron la neurodegeneración del sistema nigroestriatal bilateral manifestada por senescencia neuronal y decremento del marcador TH. El grado de neurodegeneración bilateral del sistema dopaminérgico nigroestriatal alcanzado a los 30 días post-LPS detonó déficits sensoriomotores. Los astrocitos A2 neurotróficos, aunque presentes, no pudieron contrarrestar el efecto neurotóxico del LPS.

Por lo tanto, la administración intranigral de LPS es un modelo adecuado para evaluar moléculas antiinflamatorias para proponer nuevas vías terapéuticas contra la EP.

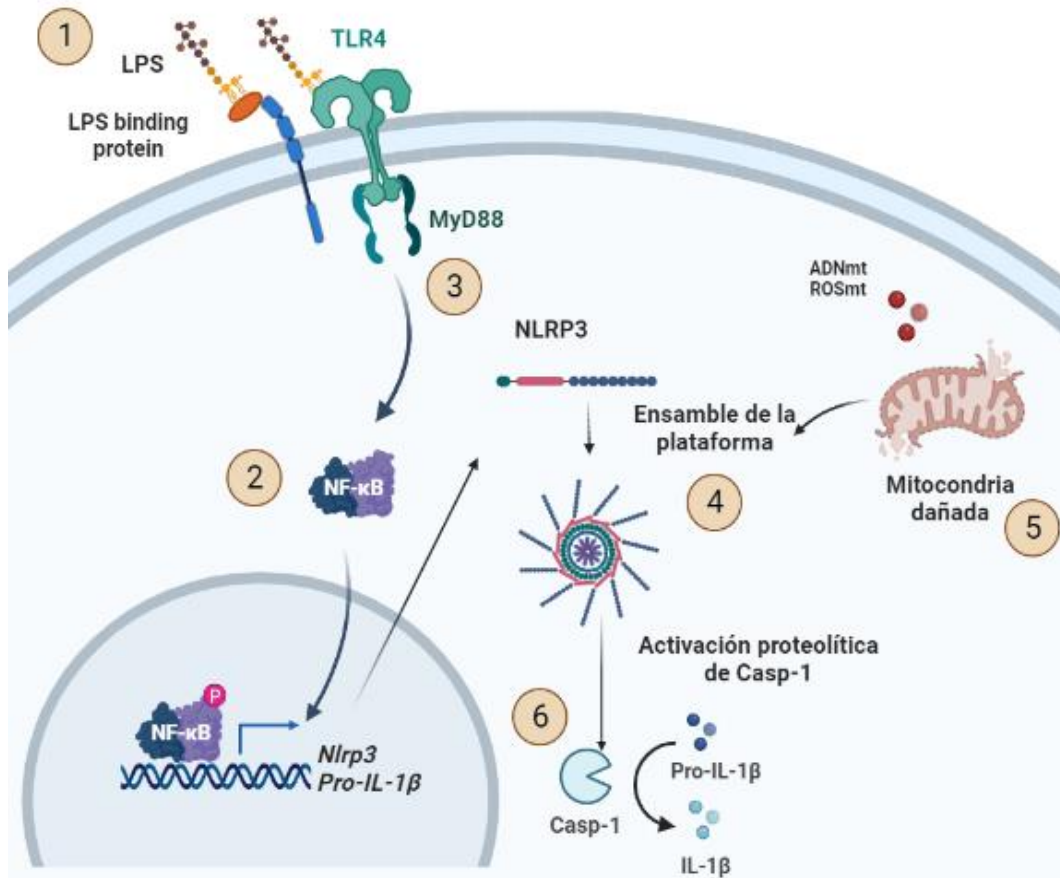


Figura 14. Resumen esquemático de los eventos moleculares identificados durante la neuroinflamación inducida con LPS en la SN de la ratona. 1) Unión de LPS al receptor TLR-4 a través de la proteína de unión a LPS y el correceptor para su posterior dimerización. 2) Liberación de NF-κB y su translocación nuclear. 3) Expresión y síntesis de NLRP3. 4) Ensamble de NLRP3, 5) Daño mitocondrial, 6) Activación de caspasa 1. Imagen creada con la aplicación BioRender.com.

10.Perspectivas

- ✓ Evaluar los mecanismos responsables de la activación de astrocitos neurotóxicos A1 y de astrocitos neurotróficos A2.
- ✓ Cuantificar ambos fenotipos y estudiar la posible presencia de astrocitos con fenotipos distintos, su distribución y sus cambios a largo del proceso inflamatorio.
- ✓ Estudiar marcadores de senescencia en astrocitos y microglía.
- ✓ Evaluar la actividad lisosomal de las neuronas senescentes.
- ✓ Bloquear la activación de astrocitos A1 y evaluar la neurodegeneración subsecuente.
- ✓ Evaluar factores neurotróficos antiinflamatorios para demostrar el potencial neuroprotector contra la neurodegeneración.

12.Referencias

1. Balestrino, R. and A.H.V. Schapira, *Parkinson disease*. Eur J Neurol, 2020. **27**(1): p. 27-42.
2. Pringsheim, T., et al., *The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis*. Mov Disord, 2014. **29**(13): p. 1583-90.
3. Kalia, L.V. and A.E. Lang, *Parkinson's disease*. Lancet, 2015. **386**(9996): p. 896-912.
4. Jankovic, J., et al., *Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort*. The Parkinson Study Group. Neurology, 1990. **40**(10): p. 1529-34.
5. Mortimer, J.A., A.R. Borenstein, and L.M. Nelson, *Associations of welding and manganese exposure with Parkinson disease: review and meta-analysis*. Neurology, 2012. **79**(11): p. 1174-80.
6. Dickson, D.W., et al., *Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria*. The Lancet. Neurology, 2009. **8**(12): p. 1150-1157.
7. Lee, Y., et al., *Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention*. Arch Pharm Res, 2019. **42**(5): p. 416-425.
8. Pajares, M., et al., *Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications*. Cells, 2020. **9**(7).
9. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
10. Calabrese, V., et al., *Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis*. Free Radic Biol Med, 2018. **115**: p. 80-91.
11. Luna-Herrera, C., et al., *Intranigral Administration of beta-Sitosterol-beta-D-Glucoside Elicits Neurotoxic A1 Astrocyte Reactivity and Chronic Neuroinflammation in the Rat Substantia Nigra*. J Immunol Res, 2020. **2020**: p. 5907591.
12. Kim, W.G., et al., *Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia*. J Neurosci, 2000. **20**(16): p. 6309-16.
13. Lawson, L.J., et al., *Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain*. Neuroscience, 1990. **39**(1): p. 151-70.
14. Goldstein, D.S., *The Catecholaldehyde Hypothesis for the Pathogenesis of Catecholaminergic Neurodegeneration: What We Know and What We Do Not Know*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
15. Faucheux, B.A., et al., *Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease*. J Neurochem, 2003. **86**(5): p. 1142-8.

16. Smeyne, M. and R.J. Smeyne, *Glutathione metabolism and Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2013. **62**: p. 13-25.
17. Mohan, H., *Textbook of pathology*. 2005.
18. Kaur, N., et al., *Neuroinflammation Mechanisms and Phytotherapeutic Intervention: A Systematic Review*. ACS Chem Neurosci, 2020. **11**(22): p. 3707-3731.
19. Feldman, R.A., *Microglia orchestrate neuroinflammation*. Elife, 2022. **11**.
20. Muzio, L., A. Viotti, and G. Martino, *Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy*. Front Neurosci, 2021. **15**: p. 742065.
21. Moran, A.P., I.M. Helander, and T.U. Kosunen, *Compositional analysis of Helicobacter pylori rough-form lipopolysaccharides*. J Bacteriol, 1992. **174**(4): p. 1370-7.
22. Bagheri, M., S. Keller, and M. Dathe, *Interaction of W-substituted analogs of cyclo-RRRWWF with bacterial lipopolysaccharides: the role of the aromatic cluster in antimicrobial activity*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(2): p. 788-97.
23. Nilsson, C., et al., *Lipopolysaccharide diversity evolving in Helicobacter pylori communities through genetic modifications in fucosyltransferases*. PloS one, 2008. **3**(11): p. e3811-e3811.
24. Vijay, K., *Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future*. Int Immunopharmacol, 2018. **59**: p. 391-412.
25. Spencer, A.J., *Diagnostic exercise: subcutaneous nodules in rhesus monkeys*. Lab Anim Sci, 1985. **35**(1): p. 79-80.
26. Haziot, A., et al., *The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage*. J Immunol, 1988. **141**(2): p. 547-52.
27. Backhed, F., et al., *Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications*. Microbes Infect, 2003. **5**(12): p. 1057-63.
28. O'Neill, L., *The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(5): p. 557-63.
29. Akira, S., *Toll-like receptors: lessons from knockout mice*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(5): p. 551-6.
30. Shimazu, R., et al., *MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1777-82.
31. Edey, H.H., *Parotid tumours: a review of 138 cases*. Aust N Z J Surg, 1970. **40**(1): p. 1-14.
32. Liew, F.Y., et al., *Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 446-58.
33. Suffredini, A.F., et al., *The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin*. N Engl J Med, 1989. **321**(5): p. 280-7.

34. Pixley, R.A., et al., *The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons.* J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 61-8.
35. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins.* Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
36. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta.* Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
37. de Rivero Vaccari, J.P., et al., *P2X4 receptors influence inflammasome activation after spinal cord injury.* J Neurosci, 2012. **32**(9): p. 3058-66.
38. Jin, C. and R.A. Flavell, *Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation.* J Clin Immunol, 2010. **30**(5): p. 628-31.
39. Holbourn, K.P., C.C. Shone, and K.R. Acharya, *A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins.* FEBS J, 2006. **273**(20): p. 4579-93.
40. Khakh, B.S. and R.A. North, *P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease.* Nature, 2006. **442**(7102): p. 527-32.
41. Di Virgilio, F., *Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome.* Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(9): p. 465-72.
42. Sun, S., et al., *The ATP-P2X7 signaling axis is dispensable for obesity-associated inflammasome activation in adipose tissue.* Diabetes, 2012. **61**(6): p. 1471-8.
43. Tschopp, J. and K. Schroder, *NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 210-5.
44. Suárez, R. and N. Buelvas, *El inflammasoma: mecanismos de activación* %J Investigación Clínica. 2015. **56**: p. 074-099.
45. Hung, S.C., et al., *P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation.* PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70210.
46. Fernandes-Alnemri, T., et al., *The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation.* Cell Death Differ, 2007. **14**(9): p. 1590-604.
47. Weinhold, K., et al., *Interaction and interrelation of P2X7 and P2X4 receptor complexes in mouse lung epithelial cells.* Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(15): p. 2631-42.
48. Zhou, R., et al., *Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation.* Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 136-40.
49. Spindel, O.N., C. World, and B.C. Berk, *Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms.* Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(6): p. 587-96.
50. Johann, S., et al., *NLRP3 inflammasome is expressed by astrocytes in the SOD1 mouse model of ALS and in human sporadic ALS patients.* Glia, 2015. **63**(12): p. 2260-73.

51. Batchelor, P.E., et al., *Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge*. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **21**(3): p. 436-53.
52. Nalls, M.A., et al., *Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease*. *Nat Genet*, 2014. **46**(9): p. 989-93.
53. Noyce, A.J., et al., *Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease*. *Ann Neurol*, 2012. **72**(6): p. 893-901.
54. Surmeier, D.J. and P.T. Schumacker, *Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(15): p. 10736-41.
55. Flores-Martinez, Y.M., et al., *Acute Neuroinflammatory Response in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rats after a Local Injection of Lipopolysaccharide*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 1838921.
56. Kalra, S., et al., *Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs*. *Inflammopharmacology*, 2022. **30**(4): p. 1153-1166.
57. Streit, W.J., R.E. Mrak, and W.S. Griffin, *Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective*. *J Neuroinflammation*, 2004. **1**(1): p. 14.
58. Block, M.L., L. Zecca, and J.S. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. *Nat Rev Neurosci*, 2007. **8**(1): p. 57-69.
59. Bazan, N.G., *Neuroinflammation and proteostasis are modulated by endogenously biosynthesized neuroprotectin D1*. *Mol Neurobiol*, 2012. **46**(1): p. 221-6.
60. El Khoury, J., et al., *Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils*. *Nature*, 1996. **382**(6593): p. 716-9.
61. Wang, J., et al., *Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage and oxidative stress in a rat model of Parkinson's disease*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015. **138**: p. 96-103.
62. Araque, A. and M. Navarrete, *Glial cells in neuronal network function*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. **365**(1551): p. 2375-81.
63. Carson, M.J., J.C. Thrash, and B. Walter, *The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival*. *Clin Neurosci Res*, 2006. **6**(5): p. 237-245.
64. Liddelow, S.A. and B.A. Barres, *Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential*. *Immunity*, 2017. **46**(6): p. 957-967.
65. Flecknell, P., *Replacement, reduction and refinement*. *ALTEX*, 2002. **19**(2): p. 73-8.
66. Dantzer, R., *Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand?* *Brain Behav Immun*, 2001. **15**(1): p. 7-24.
67. Soto-Rojas, L.O., et al., *Unilateral intranigral administration of beta-sitosterol beta-D-glucoside triggers pathological alpha-synuclein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat*. *Acta Neuropathol Commun*, 2020. **8**(1): p. 56.

68. Soto-Rojas, L.O., et al., *A sequential methodology for integral evaluation of motor and non-motor behaviors in parkinsonian rodents*. *MethodsX*, 2020. **7**: p. 100821.
69. Soto-Rojas, L.O., et al., *A single intranigral administration of beta-sitosterol beta-d-glucoside elicits bilateral sensorimotor and non-motor alterations in the rat*. *Behav Brain Res*, 2020. **378**: p. 112279.
70. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
71. Kadar, A., et al., *Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining*. *J Neurosci Methods*, 2009. **184**(1): p. 115-8.
72. Gonzalez Ibanez, F., et al., *Immunofluorescence Staining Using IBA1 and TMEM119 for Microglial Density, Morphology and Peripheral Myeloid Cell Infiltration Analysis in Mouse Brain*. *J Vis Exp*, 2019(152).
73. Zilka, N., et al., *Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways*. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 47.
74. Fernandez-Parrilla, M.A., et al., *Cerebral dopamine neurotrophic factor transfection in dopamine neurons using neurotensin-polyplex nanoparticles reverses 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal neurodegeneration*. *Neural Regen Res*, 2022. **17**(4): p. 854-866.
75. Morales-Martinez, A., et al., *Oxidative Stress and Mitochondrial Complex I Dysfunction Correlate with Neurodegeneration in an alpha-Synucleinopathy Animal Model*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(19).
76. Guo, H., J.B. Callaway, and J.P. Ting, *Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics*. *Nat Med*, 2015. **21**(7): p. 677-87.
77. Gelders, G., V. Baekelandt, and A. Van der Perren, *Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease*. *J Immunol Res*, 2018. **2018**: p. 4784268.
78. Pierre, W.C., et al., *Modulatory effect of IL-1 inhibition following lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in neonatal microglia and astrocytes*. *Int J Dev Neurosci*, 2022. **82**(3): p. 243-260.
79. Rescher, U. and V. Gerke, *S100A10/p11: family, friends and functions*. *Pflugers Arch*, 2008. **455**(4): p. 575-82.
80. Chen, J., et al., *The upregulation of annexin A2 after spinal cord injury in rats may have implication for astrocyte proliferation*. *Neuropeptides*, 2017. **61**: p. 67-76.
81. Zamanian, J.L., et al., *Genomic analysis of reactive astrogliosis*. *J Neurosci*, 2012. **32**(18): p. 6391-410.
82. Yun, S.P., et al., *Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease*. *Nat Med*, 2018. **24**(7): p. 931-938.
83. Liddelow, S.A., S.E. Marsh, and B. Stevens, *Microglia and Astrocytes in Disease: Dynamic Duo or Partners in Crime?* *Trends Immunol*, 2020. **41**(9): p. 820-835.

84. Neal, M., et al., *Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes*. *Glia*, 2018. **66**(10): p. 2137-2157.
85. Jiang, S., et al., *Melatonin Ameliorates Axonal Hypomyelination of Periventricular White Matter by Transforming A1 to A2 Astrocyte via JAK2/STAT3 Pathway in Septic Neonatal Rats*. *J Inflamm Res*, 2021. **14**: p. 5919-5937.
86. Hasel, P., et al., *Neuroinflammatory astrocyte subtypes in the mouse brain*. *Nat Neurosci*, 2021. **24**(10): p. 1475-1487.
87. Kwon, H.S. and S.H. Koh, *Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes*. *Transl Neurodegener*, 2020. **9**(1): p. 42.
88. Li, S., et al., *Microglial NLRP3 inflammasome activates neurotoxic astrocytes in depression-like mice*. *Cell Rep*, 2022. **41**(4): p. 111532.
89. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science*, 2005. **308**(5726): p. 1314-8.
90. Smolders, S.M., et al., *Microglia: Brain cells on the move*. *Prog Neurobiol*, 2019. **178**: p. 101612.
91. Won, J.H., et al., *Rotenone-induced Impairment of Mitochondrial Electron Transport Chain Confers a Selective Priming Signal for NLRP3 Inflammasome Activation*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(45): p. 27425-27437.
92. Iyer, S.S., et al., *Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation*. *Immunity*, 2013. **39**(2): p. 311-323.
93. Shimada, K., et al., *Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis*. *Immunity*, 2012. **36**(3): p. 401-14.
94. Zhou, R., et al., *A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation*. *Nature*, 2011. **469**(7329): p. 221-5.
95. Feng, G., et al., *Repeated stimulation by LPS promotes the senescence of DPSCs via TLR4/MyD88-NF-kappaB-p53/p21 signaling*. *Cytotechnology*, 2018. **70**(3): p. 1023-1035.
96. Geng, Y.Q., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(4): p. 866-9.
97. Correia-Melo, C. and J.F. Passos, *Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence?* *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1847**(11): p. 1373-9.
98. Passos, J.F., G. Saretzki, and T. von Zglinicki, *DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection?* *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(22): p. 7505-13.
99. Kaizaki, A., et al., *Celecoxib reduces brain dopaminergic neuronal dysfunction, and improves sensorimotor behavioral performance in neonatal rats exposed to systemic lipopolysaccharide*. *J Neuroinflammation*, 2013. **10**: p. 45.
100. Zhang, Q., et al., *Blocking C3d(+)/GFAP(+) A1 Astrocyte Conversion with Semaglutide Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption in Mice after Ischemic Stroke*. *Aging Dis*, 2022. **13**(3): p. 943-959.

101. Shigemoto-Mogami, Y., K. Hoshikawa, and K. Sato, *Activated Microglia Disrupt the Blood-Brain Barrier and Induce Chemokines and Cytokines in a Rat in vitro Model*. *Front Cell Neurosci*, 2018. **12**: p. 494.
102. Wang, L., et al., *Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Reduce A1 Astrocytes via Downregulation of Phosphorylated NFkappaB P65 Subunit in Spinal Cord Injury*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **50**(4): p. 1535-1559.
103. Liu, W., et al., *Exosomes Derived from Bone Mesenchymal Stem Cells Repair Traumatic Spinal Cord Injury by Suppressing the Activation of A1 Neurotoxic Reactive Astrocytes*. *J Neurotrauma*, 2019. **36**(3): p. 469-484.
104. Gabbouj, S., et al., *Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain - Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway*. *Front Neurosci*, 2019. **13**: p. 629.
105. Finsterwald, C., P.J. Magistretti, and S. Lengacher, *Astrocytes: New Targets for the Treatment of Neurodegenerative Diseases*. *Curr Pharm Des*, 2015. **21**(25): p. 3570-81.
106. Miyazaki, I. and M. Asanuma, *Serotonin 1A Receptors on Astrocytes as a Potential Target for the Treatment of Parkinson's Disease*. *Curr Med Chem*, 2016. **23**(7): p. 686-700.