



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SEDE SUR

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Papel del receptor Toll-like 4 en los procesos de
neurodegeneración e inflamación asociados a la enfermedad
de Huntington**

T E S I S

Que presenta

M. EN C. PABLO ELIASIB MARTÍNEZ GOPAR

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS EN NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA
EXPERIMENTAL**

Directoras de la Tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Francisca Pérez Severiano

Ciudad de México

Agosto de 2023

El trabajo experimental realizado en la presente tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio 11 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Sede Sur y en el Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Esta tesis estuvo bajo la co-tutoría de las Dras. Claudia González Espinosa y Francisca Pérez Severiano.

El presente trabajo se desarrolló con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), proyecto CF-2019-51488 (CGE) y Beca 781556 (PEMG).

Agradecimientos

A las doctoras Claudia González Espinosa y Francisca Pérez Severiano, por todo su apoyo y dirección en mi formación como doctor en ciencias, se han convertido en un ejemplo de dedicación y esfuerzo en el campo de la investigación.

A mi sinodo, Dra. Silvia L. Cruz Martín del Campo, Dra. Penelope Aguilera Hernández, Dra. Ma. Alicia Sánchez Mendoza y Dr. Emilio J. Galván Espinosa por sus comentarios que ayudaron a la formación de este trabajo y gracias a los cuales me enorgullece presentar este trabajo.

Al doctor Juan Carlos Martínez Lazcano, quien sus comentarios tanto en los avances como en el laboratorio me ayudaron a formar una manera de pensar crítica.

A la doctora Marian J. Pérez Rodríguez amiga y compañera sin la cual este trabajo no hubiera sido posible y con quien he logrado formar un excelente equipo de trabajo.

Al M.V.Z. Diego López Orozco por sus enseñanzas en el trato a los animales de experimentación y su amistad durante este tiempo.

A los doctores Quetzalli Ángeles López y Rene Garduño Gutierrez por su apoyo y enseñanza en las técnicas de microscopia.

A las doctoras Gabriela Rodríguez Manzo y Carolina Lopez Rubalcava por permitirme trabajar en sus laboratorios para enriquecer este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Nancy Sanchez Fuentes, Itzel Ramírez Moreno y Jorge Castillo Arellano, con los cuales logre entablar una buena amistad y con quienes el trabajar en el laboratorio se hacía disfrutar más.

A mis amigos Erick Oliverio Jeronimo Pacheco, Nestor Arturo Jeronimo Pacheco, Rodrigo Ramirez Bautista, Estefanía Gonzáles Morales, Yarim E. De la Luz Cuellar y Mariana Jacobo Antonio, quienes han sido un apoyo emocional durante todo el transcurso del doctorado, apoyándome incondicionalmente en las cuestiones académicas y personales, amigos esto sin ustedes no hubiera podido culminar de una manera tan satisfactoria, muchas gracias.

A mi familia, quien siempre estuvo apoyándome y alentándome a seguir mis sueños y metas y gracias a los cuales puedo seguir adelante.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis padres Ma. Soledad Gopar Jarquín y Pablo Martínez Vasquez, quienes siempre me apoyaron e impulsaron a seguir mis sueños y quienes son un ejemplo de dedicación y amor, muchas gracias.

Y a mi ahijada Abril Orea Jacobo, quien su nacimiento me llenó de alegría. Este trabajo es prueba de que aun en los momentos difíciles es posible salir adelante, en conjunto de personas que se vuelven parte importante en tu vida.

Índice

Lista de tablas	5
Lista de figuras	4
Lista de abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract.....	10
1. Introducción.....	11
1.1. Reconocimiento de estímulos dañinos	12
1.2. Receptores de reconocimiento de patrones	13
1.2.1. Receptores tipo Toll.....	13
1.3. TLR en células cebadas.....	17
1.4. TLRs en el SNC.....	20
1.5. Enfermedades neurodegenerativas.....	22
1.5.1. Enfermedad de Huntington	22
1.5.2. DAMP y TLR en EH.....	23
1.6. Antecedentes	26
1.7. Justificación	27
2. Hipótesis.....	27
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo general.....	27
3.2. Objetivos específicos	28
4. Materiales y métodos.....	29
4.1 Animales	29
4.2. Reactivos y fármacos.....	30
4.3. Lesión estriatal con AQ.....	31

4.4. Determinación del número de giros ipsilaterales	31
4.5. Prueba en la caja luz-oscuridad	32
4.6. Prueba de campo abierto	32
4.7. Prueba de malla invertida	33
4.8. Análisis de la marcha.....	33
4.9. Disección del tejido cerebral.....	33
4.10. Medición de GABA por HPLC	34
4.11. Cuantificación de proteínas mediante la reacción del ácido bicinconínico (BCA).....	35
4.12. Tinción de fluoro-jade B	35
4.13. Cuantificación de lípidos peroxidados	36
4.14. Formación de especies reactivas de oxígeno	36
4.15. Cruza de ratones R6/1 y TLR4-KO.....	37
4.16. Extracción del ADN y determinación de genotipos	37
4.17. Evaluación del fenotipo de los animales producto de la cruza TLR4-KO x R6/1	38
4.18. Seguimiento del peso corporal	39
4.20. Prueba en rotarod.....	39
4.21. Evaluación de feet clasping.....	39
4.22. Obtención de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC).....	40
4.23. Reconstitución intracerebroventricular (i.c.v.) de células cebadas	40
4.24. Tinción de azul de toluidina	40
4.25. Análisis estadístico	41
4.26. Diseño experimental	42
5. Resultados	47
5.1. La ausencia del TLR4 modifica los cambios en la actividad locomotora inducidos por la administración estriatal de AQ.....	47

5.2. La inyección intraestriatal con AQ no produce cambios en la conducta de ansiedad y la coordinación motora	49
5.3. La ausencia del TLR4 disminuye el daño neuronal después de la inyección estriatal con AQ	51
5.4. La ausencia del TLR4 disminuye el daño oxidante después de la inyección estriatal con AQ	54
5.5. La ausencia del TLR4 en las células cebadas no modifica el daño inducido por la inyección estriatal de AQ	55
5.6. El TLR4 participa en la ganancia de peso corporal en ratones R6/1	59
5.7. El TLR4 participa en la coordinación motora de los ratones R6/1	61
5.8. El TLR4 participa en la conducta de feet clasping en los ratones R6/1	63
6. <i>Discusión</i>.....	64
6.1. Efecto de la ausencia del TLR4 en la actividad locomotora en el modelo de inyección de AQ	64
6.2. La inyección de AQ en las conductas de ansiedad y coordinación en ratones.	65
6.3. Efecto de la ausencia del TLR4 en el daño neuronal inducido por la administración estriatal de AQ.	66
6.4. Ausencia del TLR4 en el daño oxidante en el modelo de inyección de AQ.	67
6.5. Ausencia del TLR4 en las células cebadas en el modelo de inyección de AQ.	68
6.6. Participación del TLR4 en la ganancia de peso corporal de ratones R6/1.	69
6.7. Participación del TLR4 en la coordinación motora de ratones R6/1.....	70
6.8. Efecto del TLR4 en la conducta de feet clasping de ratones R6/1.	71
7. <i>Conclusiones</i>	72
8. <i>Perspectivas</i>.....	73
9. <i>Bibliografía</i>	74

Índice de figuras

Figura 1. Principales receptores TLR y sus sistemas de transducción de señales.....	15
Figura 2. Tipos celulares en el SNC con receptores TLR y sistemas de transducción asociados.....	21
Figura 3. Origen molecular de la Enfermedad de Huntington (EH).....	23
Figura 4. Vía de las kinureninas.....	25
Figura 5. Diseño experimental para el cumplimiento de los objetivos 1, 2 y 3.....	42
Figura 6. Diseño experimental para el cumplimiento del objetivo 4.....	44
Figura 7. Cuadro de Punnett con los genotipos posibles de los ratones producidos de la cruce de ratones TLR4-KO y R6/1.....	45
Figura 8. Diseño experimental para el cumplimiento del objetivo 5.....	46
Figura 9. Efecto del AQ en la generación de giros ipsilaterales y movimientos verticales en ratones.....	48
Figura 10. La ausencia del TLR4 reduce el daño neuronal en ratones inyectados estriatalmente con AQ.....	53
Figura 11. La ausencia del TLR4 reduce el daño oxidante en ratones inyectados estriatalmente con AQ.....	55
Figura 12. Reconstitución de las CC en el cerebro de ratones Wsh.....	56
Figura 13. La ausencia del TLR4 en CC no modifica los giros ipsilaterales y daño oxidante en ratones inyectados estriatalmente con AQ.....	58
Figura 14. Efecto del TLR4 en la ganancia de peso corporal en ratones R6/1.....	60
Figura 15. Efecto del TLR4 en la coordinación motora en ratones R6/1.....	62
Figura 16. Efecto del TLR4 en la conducta de feet clasping en ratones R6/1.....	63
Figura 17. Conclusiones.....	73

Índice de tablas

Tabla 1. Ligandos principales para los receptores tipo Toll (TLR).....	14
Tabla 2. Ligandos del TLR4 y proteínas involucradas en su señalización.	17
Tabla 3. Expresión de los TLR en las CC de ratón, de humanos y líneas celulares de diverso origen..	199
Tabla 4. Características de las líneas de ratones empleados para la realización del presente trabajo.....	30
Tabla 5. Valores promedio de los giros ipsilaterales y de la actividad locomotora en ratones inyectados intraestriatalmente con SSI o AQ.	49
Tabla 6. Valores promedio en la conducta de ansiedad en ratones inyectados intraestriatalmente con SSI o AQ.	50
Tabla 7. Valores promedio en la coordinación motora modelo inyección de AQ.	51

Lista de abreviaturas

AP-1	Proteína activadora 1
AQ	Ácido quinolínico
BCA	Ácido bicinconínico
BMMC	CC derivadas de médula ósea
C57/B6	Grupo constituido por ratones WT y B6CBAF1/J
CAG	Trinucleótido citosina-adenina-guanina
CBDMC	CC aisladas de sangre de cordón umbilical
CC	Células cebadas
CLR	Receptores de lectina tipo C
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FSDMC	CC derivadas de piel fetal
Het-TLR4	Heterocigoto para TLR4
Het-TLR4/mHtt	Heterocigoto para TLR4 con el gen para mHtt
HIF	Factor inducido por hipoxia
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo 1
HSP	Proteína de choque térmico
Htt	Huntingtina
HTT	Gen de la proteína htt
mHtt	Huntingtina mutada
i.c.v.	Intracerebroventricular
IFN	Interferon
IKK	Cinasa del inhibidor de NF κ B
IL	Interleucina
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina 1
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MPTP	1-Metil-4-Fenil-6-tetrahidropiridina

MyD88	Factor 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas
NLR	Receptores tipo NOD
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NOX	NADPH oxidasas
OPA	O-ftaldehido
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBDMC	CC aisladas de sangre periférica
PBS	Buffer de fosfatos
PCDMC	CC provenientes de peritoneo
PFA	Paraformaldehido
PRR	Receptor de reconocimiento de Patrones
R6/1	Línea de ratón transgénico de la enfermedad de Huntington
RAGE	Receptor para productos finales de glicación avanzada
RLR	Receptores parecidos al gen inducido por el ácido retinoico
RPM	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central
SSI	Solución salina isotónica
TIR	Dominio de homología del receptor Toll-Interleucina 1
TLR	Receptor tipo Toll
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TLR4-KO	Ratón carente del receptor TLR4
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF6	Factor asociado al receptor de TNF
Wsh	Línea de ratones deficientes de células cebadas
WT	Ratones silvestres C-57BL6/J

Resumen

El receptor Toll-like 4 (TLR4) es una molécula de reconocimiento de patrones moleculares que juega un papel central en la inmunidad innata. Ese receptor inicia y amplifica reacciones inflamatorias en el sistema nervioso central (SNC) y existen evidencias de su participación en padecimientos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP). La Enfermedad de Huntington (HD), un padecimiento autosómico dominante que produce discapacidad y muerte prematura, tiene componentes inflamatorios en los que pudiera participar el TLR4. La presente tesis se centró en estudiar el papel de ese receptor en el establecimiento del daño neurológico, el estrés oxidante y los defectos conductuales observados en dos modelos murinos de la EH, a saber, el inducido por la inyección intraestriatal de ácido quinolínico (AQ) y el de expresión transgénica de la proteína Huntingtina mutante (mHTT) en ratones (cepa EH B6CBA-Tg (HDexon1)61Gpb/1 J, también llamada R6/1). Para llevar a cabo el estudio, se utilizaron ratones silvestres (WT) y carentes del TLR4 (TLR4-KO) que recibieron una inyección intraestriatal de AQ y fueron sometidos a pruebas de actividad locomotora, conducta de ansiedad, y coordinación motriz. En esos ratones también se realizaron determinaciones de daño neuronal y estrés oxidante. Adicionalmente, para averiguar el tipo celular en el que pudiera expresarse el TLR4 y contribuir al daño observado en el modelo del AQ, se utilizaron ratones deficientes de células cebadas (CC) (Wsh), y ratones Wsh reconstituídos con CC de animales WT y TLR4-KO, en donde se evaluaron distintos parámetros de daño inducidos por el AQ. Finalmente, se cruzaron ratones R6/1 y TLR4-KO y, en la primera línea filial (F1), se midió la ganancia de peso corporal, la coordinación motora y conducta de *feet clasping*. Los resultados mostraron que la ausencia del TLR4 atenúa los cambios en la actividad motora y reduce el daño neurológico y oxidante observados por la inyección de AQ. Sin embargo, la administración de AQ no altera la conducta de ansiedad ni coordinación motora. Por otro lado, la ausencia del TLR4 en las CC no afecta el establecimiento del daño conductual y oxidante por la inyección del AQ. En el modelo transgénico para la EH, observamos que una menor expresión del

TLR4 en los ratones R6/1 modifica la ganancia de peso corporal, retrasa la aparición de las alteraciones en la coordinación motora y reduce la severidad de la conducta de *feet clasping*. En conclusión, el TLR4 se encuentra involucrado en el daño neuronal y en las alteraciones motoras observables tanto en el modelo de inyección con AQ como el modelo transgénico de la EH, promoviendo en ambos modelos el daño neurológico e incrementando la aparición y severidad de las alteraciones motoras y conductuales. Debido a lo anterior, se propone que el receptor TLR4 puede considerarse un potencial blanco terapéutico para las alteraciones bioquímicas y conductuales que acompañan a la EH.

Abstract

Toll-like receptor 4 (TLR4) is a pattern-recognition molecule that plays a central role in innate immunity. That receptor initiates and amplifies inflammatory reactions inside the Central Nervous System (SNC) and evidence points to its participation in neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's Disease (AD) and Parkinson's Disease (PD). Huntington's Disease (HD), an autosomal-dominant pathology that produces disability and premature death, has inflammatory components in which the TLR4 receptor could participate. The present Thesis was focused on the study of the role of TLR4 in the establishment of neurological damage, oxidative stress, and conduct defects observed in two different murine models of EH, namely that induced by the intrastriatal injection of quinolinic acid (QA) and the transgenic expression of the mutant Huntingtin (mHTT) (strain EH B6CBA-Tg (HDexon1)61Gpb/1 J, also known as R6/1). To perform the study, we utilized wild type (WT) and TLR4-defective (TLR4-KO) that were administered intracerebroventricularly (i.c.v.) with QA prior to being tested for motor activity, anxiety conduct, motor coordination, and neuronal damage and oxidative stress. Also, we tested the role of TLR4 in mast cells (MC) in QA-induced motor and biochemical alterations using MC-deficient mice (Wsh mice) reconstituted with WT or TLR4-KO MC. Finally, R6/1 and TLR4-KO mice were crossed to generate mice with less expression of TLR4 and expression of mHtt. In those mice, changes in body weight, motor coordination, and feet claspings were evaluated. Results show that lacking TLR4 induce changes in motor activity and reduces neurological and oxidative damage induced by QA injection, however, AQ administration does not modify anxiety or motor coordination values. In the transgenic model of EH, less expression of TLR4 in R6/1 mice reduces body weight loss, delays motor coordination alterations, and reduces the severity of feet claspings observed in the R6/1 mice. In conclusion, the TLR4 receptor is involved in neuronal damage and motor alterations observed in the QA-induced and transgenic models of EH. We propose that TLR4 can be considered a therapeutic target to control biochemical and behavioral alterations present in EH.

1. Introducción

La inflamación es la respuesta de los tejidos ante el daño por agentes infecciosos o por algún factor físico, su principal objetivo es combatir a los patógenos y preparar los sitios dañados para recuperar la homeostasis tisular. Para ello, el organismo debe reconocer de manera adecuada estos insultos e iniciar así una respuesta reguladora (Brubaker et al., 2015; Takeuchi & Akira, 2010). Para promover la reparación del tejido dañado (Schett & Sieper, 2009), la inflamación promueve cambios vasculares, el reclutamiento y activación de células inmunológicas, la liberación de mediadores inflamatorios (aminas biogénicas, citocinas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos) y la producción de especies reactivas a oxígeno (ERO) y nitrógeno (Kumar et al., 2008).

Es importante modular las respuestas inflamatorias, ya que dependiendo de su intensidad y duración pueden llevar a la reparación o agravar el sitio dañado. Según la duración de la respuesta inflamatoria, ésta puede dividirse en aguda (de horas a pocos días), donde se realizan acciones inmediatas que permiten defenderse del estímulo agresor y prepara al tejido para su reparación; o crónica (de meses a años), que ocurre como consecuencia de estímulos persistentes con respuestas inflamatorias repetidas, lo que conlleva a un mayor daño tisular (Kumar, 2018).

Los sitios en procesos inflamatorios tienden a convertirse en regiones de baja concentración de oxígeno (tejidos hipóxicos), debido a la alta demanda de utilización de este gas por las células encargadas de la defensa del organismo. Esa condición lleva a la producción de ERO (Park et al., 2004). Las adaptaciones celulares a la hipoxia se basan en la acción del factor inducido por hipoxia (HIF: por sus siglas en inglés: Hypoxia Inducible Factor), que es degradado cuando el oxígeno es abundante, y aumenta su concentración en condiciones hipóxicas (Eltzschig & Carmeliet, 2011). Aunque la generación de sitios hipóxicos y de ERO pueden ayudar en los procesos de reparación, éstos (los procesos de reparación) pueden impulsar la disfunción tisular y el desarrollo de enfermedades porque las

células inmunes que participan en ellos pueden sufrir cambios fenotípicos, agravando el daño que dio inicio a la respuesta inflamatoria y convirtiéndola en una reacción crónica que contribuye a la degeneración tisular (Taylor y Colgan, 2017; Carta et al., 2009).

En el sistema nervioso central (SNC), el término neuroinflamación describe eventos crónicos inflamatorios, donde la activación constante y mantenida de la microglía y los astrocitos contribuye al efecto deletéreo neuronal (disfunción, lesión y/o pérdida neuronal) (Russo et al., 2011). Durante la neuroinflamación, la microglía tiene la capacidad de responder a las señales inflamatorias procedentes de diversas células de origen inmunológico, como las células cebadas (CC) (Thameem et al., 2007). Diversas patologías del sistema nervioso central, entre las que se encuentra la enfermedad de Huntington (EH), se caracterizan por cursar con procesos neuroinflamatorios (Streit et al., 2004).

1.1. Reconocimiento de estímulos dañinos

El sistema inmune innato reconoce diversos estímulos provenientes de patógenos o de células dañadas. Este tipo de moléculas son conocidas como patrones moleculares y, dependiendo a su procedencia, se clasifican en “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP; por sus siglas en inglés: Pathogen-associated molecular patterns) y “patrones moleculares asociados a daño” (DAMPs; por sus siglas en inglés: Damage-associated molecular patterns) (Hato & Dagher, 2015; Mesa-Villanueva & Patiño, 2006).

Los PAMP son estructuras moleculares presentes en los patógenos. Entre éstos podemos mencionar al lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana celular de bacterias Gram negativas, el peptidoglicano de bacterias Gram positivas, los lipofosfoglicanos de protozoarios, la flagelina de bacterias, el zymosan de la pared de hongos y el RNA viral, entre muchos otros más (Kawai & Akira, 2006; Mesa-Villanueva & Patiño, 2006). Por otro lado, los DAMP son moléculas que posee el

organismo y que son liberadas tras una lesión tanto en ambientes infecciosos como estériles. Estas señales provienen de componentes intracelulares y de la matriz extracelular propias del organismo, y entre ellas se encuentran las distintas proteínas de choque térmico (HSP), la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB1), el ATP extracelular y muchos otros compuestos (Anders & Schaefer, 2014; Mesa-Villanueva & Patiño, 2006).

1.2. Receptores de reconocimiento de patrones

Para llevar a cabo el reconocimiento de las señales de daño, el sistema inmune innato cuenta con una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los PRR se dividen en receptores membranales, como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina de tipo C (CLR), y en receptores intracelulares, como los receptores parecidos al gen inducido por el ácido retinoico (RLR) y receptores tipo NOD (NLR) (Brubaker et al., 2015; Takeuchi & Akira, 2010).

1.2.1. Receptores tipo Toll

Los TLR son proteínas transmembranales tipo 1 caracterizadas por un dominio extracelular rico en leucinas y una región citoplasmática que contiene una región conservada conocido como dominio Toll/IL-1 receptor (TIR) (Choe et al., 2005). Esos receptores se expresan predominantemente en los tejidos involucrados con la función inmune como el bazo, en las células inmunológicas periféricas, y en las regiones que tienen contacto con el ambiente externo (Mesa-Villanueva & Patiño, 2006; Ozinsky et al., 2000). Los tipos de receptores TLR, su localización, sus ligandos generales y su origen se muestran en la Tabla 1. En general, los ligandos de esos receptores son PAMP y DAMP que se liberan en grandes cantidades cuando se presentan infecciones (bacterianas o virales) o ruptura de células. También se pueden liberar cuando se presenta hipoxia o se altera el metabolismo energético de las células y se presenta disfunción mitocondrial (Fleshner, 2013).

Tabla 1. Ligandos principales para los receptores tipo Toll (TLR). (Modificada de Takeuchi & Akira, 2010).

TLR	Localización	Ligando	Origen del ligando
1	Membrana plasmática	Lipopéptidos triacilados	Bacterias
2	Membrana plasmática	Lipoproteínas	Bacterias, virus, parásitos, endógeno
3	Endolisosomas	dsRNA	Virus
4	Membrana plasmática	LPS, lipoproteínas oxidadas	Bacterias, suero
5	Membrana plasmática	Flagelina	Bacterias
6	Membrana plasmática	Lipopéptidos diacilados	Bacterias, virus
7/8	Endolisosomas	ssRNA	Virus, bacterias, endógeno
9	Endolisosomas	CpG-DNA	Virus, bacterias, parásitos, endógeno
10	Endolisosomas	Desconocido	Desconocido
11	Membrana plasmática	Profilinas	Parásitos

Cuando un ligando se une a algún receptor TLR, éste se dimeriza con otra molécula similar formando homodímeros, u otra molécula TLR diferente (formando heterodímeros), evento que induce cambios conformacionales para el reclutamiento de moléculas de señalización (Figura 1). Existen cuatro adaptadores que se unen a los dímeros de los TLRs (los pares TIRAP-MyD88 y TRAM-TRIF). El par TIRAP-MyD88 se une a receptores que señalizan desde la membrana plasmática y el par TRAM-TRIF a los receptores que señalizan desde vesículas intracelulares. De manera particular, el receptor TLR4 es el único que puede señalizar desde ambos compartimientos celulares, ya que, después de activar a varias moléculas desde la membrana, es internalizado y activa otras moléculas desde vesículas en el citoplasma. Todos los receptores TLR activan vías inflamatorias conservadas, que culminan en la activación del factor nuclear de unión al enhancer de la cadena κ de células B (NF κ B), el factor de respuesta al interferón

(IRF), el factor activado por AMP cíclico (CREB) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Akira & Takeda, 2004). La forma en que lo hacen es a través de cinasas membranales de serina-treonina de la familia IRAK (IRAK 1-4) y la familia RIP (RIP1), ligasas de ubiquitina (como TRAF 6 y TRAF3), cinasas citoplasmáticas de serina y treonina (como TAK1, TBK1 e IKK), que pueden estar unidas o no a adaptadores como TAB2/3. Las cinasas de las cinasas activadas por mitógenos (MKK 3/6, 4/7, y 1/2) son activadas en el citoplasma y fosforilan directamente a las cinasas activadas por mitógenos (MAPK p38, JNK y ERK, respectivamente). Uno de los puntos finales de la vía de señalización es la fosforilación directa de los factores de transcripción que, finalmente, se translocarán al núcleo e iniciarán la síntesis de RNAm para diversas citocinas pro-inflamatorias e interferones tipo I.

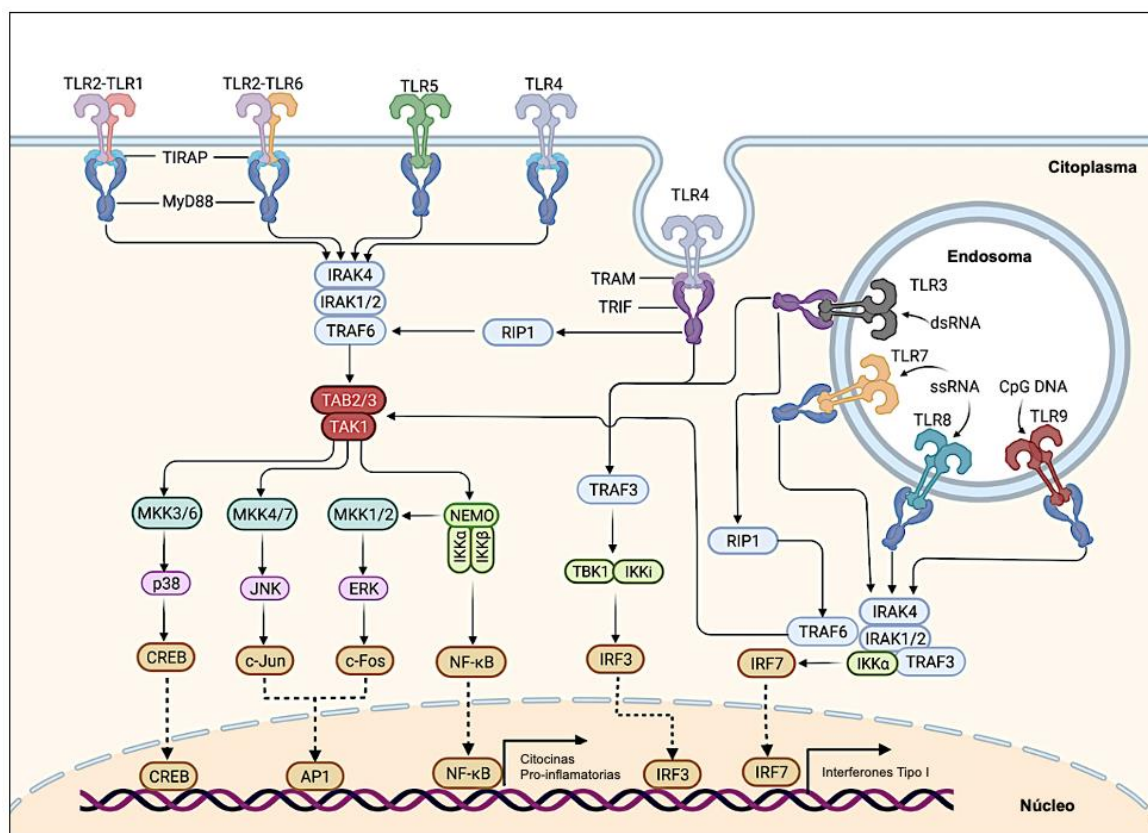


Figura 1. Principales receptores TLR y sus sistemas de transducción de señales. Los receptores TLR se localizan en la membrana plasmática o en membranas de vesículas intracelulares, activando vías de señalización que inducen la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y otros genes siguiente una cascada de señalización que involucra cinasas de serina-treonina, ligasas de ubiquitina y factores de transcripción específicos (Ver el texto para detalles). Modificado de Duan, 2022.

El NFκB es el factor de transcripción más importante en la respuesta inflamatoria, es un factor de transcripción dimérico, que en la mayoría de los tipos celulares se encuentra formado por las subunidades p65 y p50. Su ubicación es citoplasmática, donde se encuentra en forma inactiva unido a proteínas inhibidoras NF-κB (IκB). La activación de NFκB regula la expresión de una amplia variedad de genes. Tras la estimulación con diversos ligandos de los TLR, IκB se fosforila en residuos de serina, lo que ocasiona su ubiquitinación y su degradación por la vía proteosomal. La cinasa que fosforila a IκB es el complejo IKK, que consiste en las proteínas cinasas IKKα e IKKβ y una molécula reguladora (IKKγ/Nemo). Por otro lado, AP-1 es una proteína de cremallera de leucinas compuesta de miembros de Jun, Fos, ATF y la subfamilia Maf. Entre las proteínas de la familia AP-1, la proteína c-Jun desempeña un papel central en las respuestas inflamatorias (Kawai & Akira, 2006).

El receptor TLR4 fue el primero en caracterizarse funcionalmente y es el único de los TLR que puede utilizar todas las proteínas adaptadoras. Varios ligandos exógenos y endógenos pueden activar a este receptor, utilizando en algunos casos moléculas accesorias para su reconocimiento y señalización (Brubaker et al., 2015). En la tabla 2 se muestran algunos ligandos del TLR4, así como los correceptores o complejos necesarios para su señalización. La activación del receptor TLR4 con el LPS permite su acoplamiento a la NADPH oxidasa 4 (Nox4) (Park et al., 2004), lo que desencadena la producción de ERO desde la membrana plasmática o la mitocondria, sin embargo, también pueden producirse tales especies reactivas después de la activación de NFκB y AP-1 (Kohchi et al., 2009).

Tabla 2. Ligandos del TLR4 y proteínas involucradas en su señalización.

Ligando	Origen	Proteínas
LPS	Bacterias Gram negativas	TLR4, CD14, MD2
Taxol	Taxus brevifolia	TLR4, MD2
Fibrinógeno	Trombina/trombos	TLR4
HSP60/70	Endógeno	TLR4, MD2
Hialuronano	Endógeno	TLR4(TLR2)
Biglicano	Matrix extracelular	TLR4(TLR2)
HMGB1	Endógeno	TLR4
LDL oxidada	Endógeno	TLR4 (TLR6, CD36)
Proteína surfactante A	Endógeno	TLR4
Proteína β-amiloide	Endógeno	TLR4, MD2, CD14
α-sinucleína	Endógeno	TLR4

1.3. TLR en células cebadas

Las CC son células inmunes del linaje mieloide. Se caracterizan principalmente por contener una gran cantidad de gránulos en los cuales almacenan mediadores inflamatorios (Blank & Rivera, 2004). Las CC pueden participar en la defensa del huésped a través de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Morita et al., 2016). En el ratón, las CC derivan del saco vitelino en etapas embrionarias y en el adulto se derivan de precursores de la médula ósea que transitan a través el torrente sanguíneo y se establecen en los tejidos periféricos para madurar (Dahlin & Hallgren, 2015; Gentek et al., 2018). Las CC residen en los tejidos que tienen una mayor interacción con el medio externo (ambiente) (Lambracht-Hall et al., 1990), sin embargo, podemos encontrarlas en casi todos los tejidos del cuerpo. En particular, dentro del SNC se encuentran en las meninges, así como el hipocampo, tálamo, habénula y estriado (Lambracht-Hall et al., 1990; Martínez-Gopar et al., 2022; Silver et al., 1996; Varatharaj et al., 2012).

La CC poseen un gran número de receptores, como el receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E (FcεRI), el receptor para el factor de células madre (c-KIT) y los TLR (Yu et al., 2016). Dependiendo del tipo de receptor activado, las CC pueden liberar su contenido granular o promover la síntesis de citocinas para participar en las respuestas inflamatorias (Gri et al., 2012; McCurdy et al., 2003; Varadaradjalou et al., 2003). En la tabla 3 se muestra la expresión de los TLR en CC de ratones y humanos, así como también en líneas celulares.

Para el estudio *in vivo* de las CC se han generado ratones con deficiencias inmunológicas que bloquean la diferenciación de ese tipo celular. Los ratones *c-Kit^{Wsh/Wsh}* (Wsh), por ejemplo, presentan una inversión en el promotor del gen c-Kit y, debido a eso, tienen diversas alteraciones fenotípicas, como la ausencia de melanocitos, de células intersticiales de Cajal y de CC (Grimbaldeston et al., 2005). Una ventaja de este modelo es que los ratones pueden ser reconstituidos con CC provenientes de ratones silvestres (C-57BL/6J, WT) (Bennett et al., 2009; Grimbaldeston et al., 2005; Nautiyal et al., 2011; Tanzola et al., 2003). Recientemente, nuestro grupo de trabajo llevó a cabo, con éxito, la reconstitución de CC en el estriado de ratones Wsh, mediante la inyección intracerebroventricular de los precursores obtenidos de médula ósea (BMMC) de ratones WT, para así poder estudiar la participación de este linaje celular dentro del SNC específicamente en el estriado (Martínez-Gopar et al., 2021).

Tabla 3. Expresión de los TLR en las CC de ratón, de humanos y líneas celulares de diverso origen. (Modificada de Marshall & Jawdat, 2004; Sandig & Bulfone-Paus, 2012).

TLR	Ratón	Humano	Línea celular/ molécula detectada
1	BMMC mRNA FSDMC mRNA	PBDMC mRNA/Proteína CBDMC mRNA	HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 Proteína
2	BMMC mRNA/Proteína FSDMC mRNA/Proteína	Pulmón mRNA/Proteína Piel mRNA PBDMC mRNA/Proteína CBDMC mRNA/Proteína	LAD2 mRNA/Proteína MC-9 mRNA
3	BMMC mRNA FSDMC mRNA	Pulmón mRNA Piel mRNA PBDMC mRNA/Proteína Médula ósea	LAD1 Proteína HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 mRNA/Proteína
4	BMMC mRNA/Proteína FSDMC mRNA/Proteína PCDMC Proteína	Pulmón mRNA Piel mRNA PBDMC mRNA/Proteína CBDMC mRNA/Proteína	MC-9 mRNA HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 mRNA/Proteína
5	No descrita hasta el momento	Pulmón mRNA Piel mRNA PBDMC mRNA/Proteína	HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 mRNA
6	BMMC mRNA FSDMC mRNA	PBDMC mRNA	HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 mRNA/Proteína MC-9 mRNA
7	BMMC mRNA FSDMC mRNA	Pulmón mRNA Piel mRNA PBDMC mRNA/Proteína	HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 mRNA/Proteína
8	BMMC mRNA		HMC-1 mRNA/Proteína
9	FSDMC mRNA	Pulmón mRNA	HMC-1 mRNA/Proteína LAD2 mRNA/Proteína

CC derivadas de médula ósea (BMMC), CC derivadas de piel fetal (FSDMC), CC aisladas de peritoneo (PCDMC), CC aisladas de sangre periférica (PBDMC), CC aisladas de sangre de cordón umbilical (CBDMC).

1.4. TLRs en el SNC

La expresión de los TLRs se ha detectado en prácticamente todos los tipos celulares que componen al SNC (Paschton, 2016), (Figura 2). De manera particular, la microglía es el tipo celular donde se ha estudiado con más detalle. Esas son células inmunes residentes del SNC que sirven como sensores de los eventos dañinos y proporcionan la primera línea de defensa contra los microorganismos invasores (Olson & Miller, 2004). La microglía expresa los TLR 1-9 (Bsibsi et al., 2002; Lee & Lee, 2002) y parece que esto ocurre porque este tipo celular deriva del mismo linaje mieloide que los macrófagos, las células dendríticas y las CC (Becher et al., 1996; Dalpke et al., 2002; Greaves & Gordon, 2002; Kielian et al., 2002; Olson & Miller, 2004). Además, el sistema de señalización de los receptores TLR en la microglía parece ser el mismo que opera en células inmunes que residen fuera del SNC.

Tras el reconocimiento de PAMP y DAMP se ha observado la activación de los TLR mediante un aumento en la expresión de genes relacionados con la inflamación, como citocinas proinflamatorias, enzimas, moléculas de adhesión y radicales libres en distintas áreas cerebrales (Block et al., 2007; González-Scarano & Baltuch, 1999).

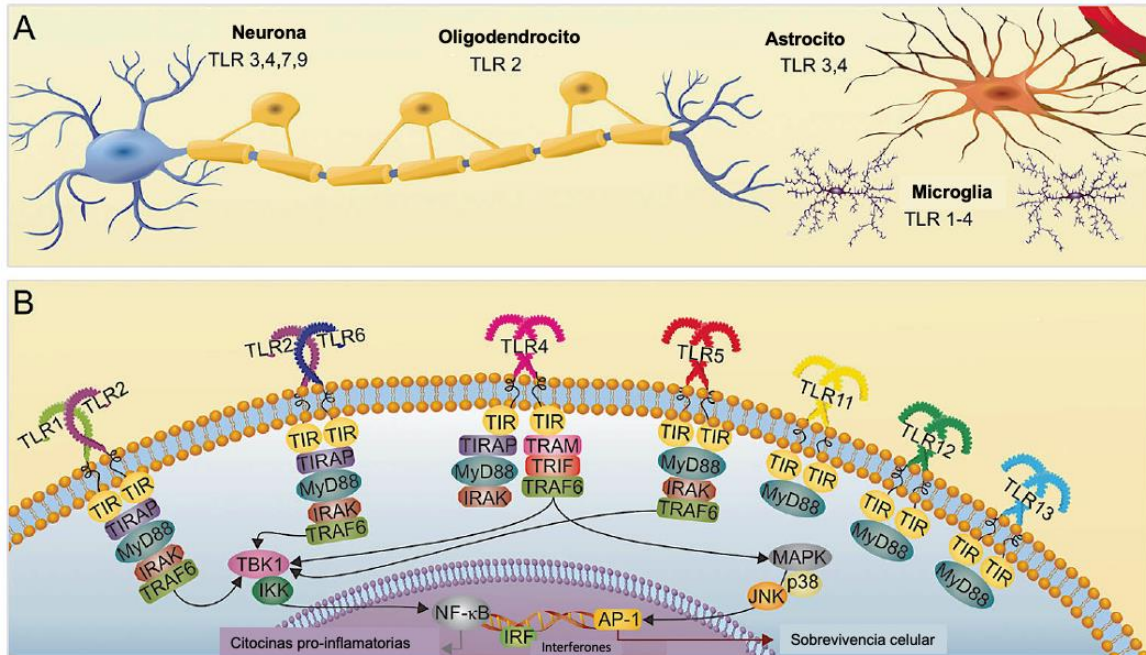


Figura 2. Tipos celulares en el SNC con receptores TLR y sistemas de transducción asociados. Panel A. Distintos TLRs se han descrito en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Panel B. Los sistemas de transducción de los receptores TLR en el SNC son similares a los descritos en células periféricas y culminan con la expresión de genes para citocinas pro-inflamatorias. Modificado de Paschton, 2016.

Diversos estudios han demostrado que la estimulación de la microglía de ratón con agonistas de los TLR, incluyendo el LPS para el TLR4, el peptidoglicano para TLR2, poli (I:C) para TLR3 y ADN de CpG para TLR9, conduce a un aumento de la secreción de citocinas como IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , NO (Olson & Miller, 2004). La liberación de estos compuestos inflamatorios puede llevar a eventos de exacerbación de daño tras un estímulo por PAMP o DAMP en el SNC y, por consiguiente, a la neurodegeneración (Frenkel et al., 2010; Kielian, 2006; Lehnardt, 2010).

Las respuestas inmunes en el SNC desempeñan un papel importante en diversas enfermedades cerebrales, ya que se ha observado la activación de la microglía en el parénquima cerebral (Kreutzberg, 1996). Como se menciona en la tabla 2, el TLR4 puede reconocer a la proteína β -amiloide fibrilar y a la α -sinucleína, dos proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, tal

es como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) (Noelker et al., 2013; Walter et al., 2007).

1.5. Enfermedades neurodegenerativas

La neurodegeneración es caracterizada por la pérdida de manera progresiva de las diversas estructuras y funciones neuronales que dan como resultado alteraciones funcionales y mentales (Campbell et al., 1999). Aunque no se conocen del todo las causas asociadas con el proceso de neurodegeneración, éstas aumentan con la edad (Hof & Mobbs, 2009). Así pues, las personas mayores son las principales afectadas y comparten procesos comunes, aunque de etiología diferente con las enfermedades denominadas como neurodegenerativas, dentro de las cuales encontramos la esclerosis múltiple, la esclerosis lateral amiotrófica, la EA, la EP y la EH (Amor & Woodroffe, 2014; Chen et al., 2016). En conjunto, las enfermedades neurodegenerativas son trastornos crónicos y degenerativos del SNC, incurables, donde procesos como el estrés oxidante, la neuroinflamación y neurodegeneración se encuentran presentes (Peterson & Toborek, 2014).

1.5.1. Enfermedad de Huntington

La EH es un desorden hereditario del SNC, derivado de la pérdida de la actividad normal de la proteína huntingtina (Htt), ocasionada por la mutación en el exón 1 del gen de la huntingtina (Figura 3). El gen de la HTT se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 4. La mutación que ocasiona la EH consiste en el aumento de repeticiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) en el primer exón del gen (Zheng & Diamond, 2012). La traducción de este trinucleótido repetido lleva a la síntesis de la glutamina, la cual se encuentra extendida en la proteína Htt. El tracto de poli- glutaminas está presente en todos los individuos de manera normal, sin embargo, cuando el número de repetidos de CAG es mayor a 35, esa proteína se llama Huntingtina mutante (mHtt) y lleva al desarrollo de la EH (Kremer et al., 1994). Un factor de suma relevancia dentro de la EH, es que, una vez aparecidas las manifestaciones motoras de la enfermedad, el periodo de vida

de los pacientes se estima de 15.5 años después de iniciados los síntomas, lo cual suele ocurrir en la cuarta década de la vida. (Ferrante, 2009).

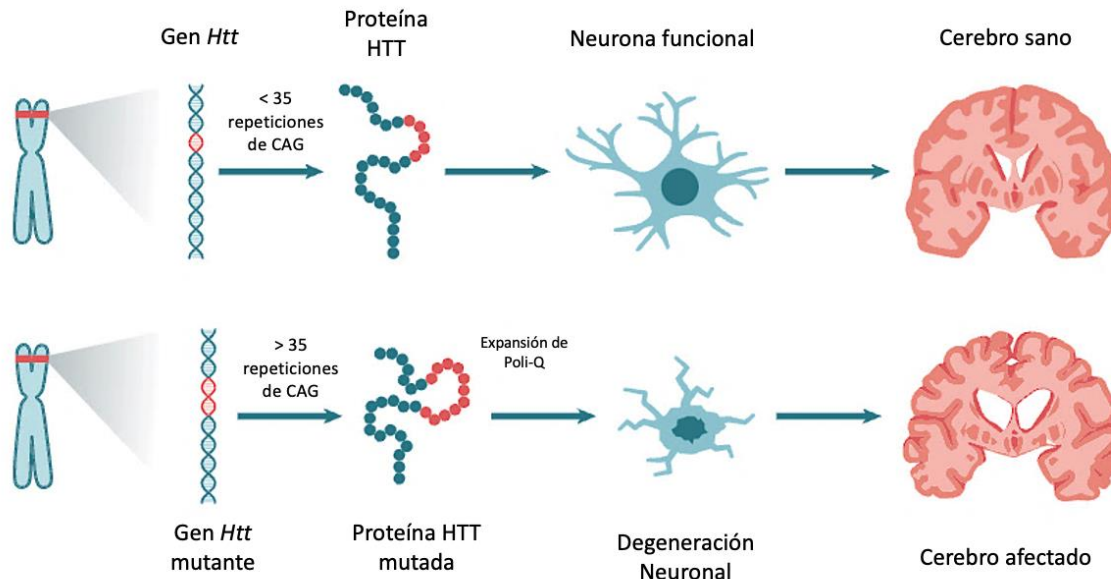


Figura 3. Origen molecular de la Enfermedad de Huntington (EH). Modificado de <https://www.cisbio.net/content/new-hope-for-huntingtons-disease-drug-discovery/>

Existe evidencia que sugiere que los procesos excitotóxicos y el estrés oxidante están involucrados en la etiología de la EH (Browne et al., 1999). Esto está ampliamente reportado en pacientes y se ha logrado modelar en roedores (Browne et al., 1997). Dicho estrés oxidante se caracteriza por un aumento en el daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos, así como un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes tales como glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Sorolla et al., 2008). Alteraciones conductuales como cambios en el estado de ánimo, la ansiedad y depresión suelen observarse en pacientes con EH (Tampi et al., 2021).

1.5.2. DAMP y TLR en EH

La neuroinflamación y la disfunción mitocondrial se observan en numerosas enfermedades neurodegenerativas (Beal, 1992; Brouillet et al., 1999; Mattson,

2006), lo cual puede llevar a la liberación de moléculas DAMP derivadas de mitocondrias (Harper, 1992), las cuales generan reacciones inflamatorias. Dentro de los DAMP mitocondriales se encuentran el ADN mitocondrial, el ATP, péptidos unidos a formil metionina, el factor de transcripción A y el citocromo C (Wilkins et al., 2017).

En la EH se reportan defectos en la cadena respiratoria, uno de ellos consiste en la reducción severa en la actividad del complejo II/III y una reducción más leve del complejo IV en el caudado y putamen de pacientes con la EH (Brennan et al., 1985; Browne et al., 1997; Butterworth et al., 1985; Gu et al., 1996), así como la pérdida del complejo piruvato deshidrogenasa (Butterworth et al., 1985).

Por otro lado, se ha reportado que en monocitos de pacientes con la EH, la mHtt puede unirse al complejo IKK e inducir la degradación acelerada de I κ B, permitiendo, así, la translocación al núcleo del factor de transcripción NF κ B, y posteriormente la liberación en condiciones basales de IL-6 y TNF- α , mostrando un perfil pro-inflamatorio. De manera interesante, al activar los monocitos con el LPS (ligando de TLR4), la liberación de ambas citocinas fue mayor que la observada en monocitos de personas sanas (Träger et al., 2014).

Existe evidencia experimental que indica que el TLR4 participa en el desarrollo de la enfermedad de Huntington. Así Griffioen en 2017, observó que al llevar a cabo retro-cruzas de ratones TLR4-KO y ratones N171-82Q (ratones transgénicos de la EH), el porcentaje de supervivencia fue mayor en las cruzas que poseían el gen de la EH y eran heterocigotos para el TLR4, mientras que los ratones que expresaban de manera normal el TLR4 y el gen de la EH tenían una supervivencia menor. Estos resultados sugieren que el TLR4 está mediando los efectos de daño presente en ese modelo transgénico (Griffioen et al., 2018).

Además de los modelos genéticos, existen modelos excitotóxicos para estudiar a la EH. El modelo de la EH inducido por la administración intraestriatal de ácido

quinolínico (AQ) en ratones, reproduce la citotoxicidad que se observa en pacientes con la enfermedad y en este modelo se observan cambios conductuales y motores (Schwarcz et al., 1983). La administración de AQ en el estriado ocasiona una reducción de los niveles de GABA y sustancia P, sin alterar los niveles de otros neurotransmisores, asemejando las características bioquímicas expresadas en los pacientes con la EH (Beal et al., 1986). El AQ es un metabolito producido durante la degradación del triptófano cuando éste es metabolizado por la vía de las kinureninas (Figura 4). Está reportado que el AQ está presente de manera normal en el cerebro de rata y humano (Schwarcz et al., 1983). En 1981 Stone y Perkins descubrieron que el AQ es un potente excitador de las neuronas en el SNC, debido a que es un agonista de los receptores a NMDA (N-metil- D-aspartato) (Stone & Perkins, 1981).

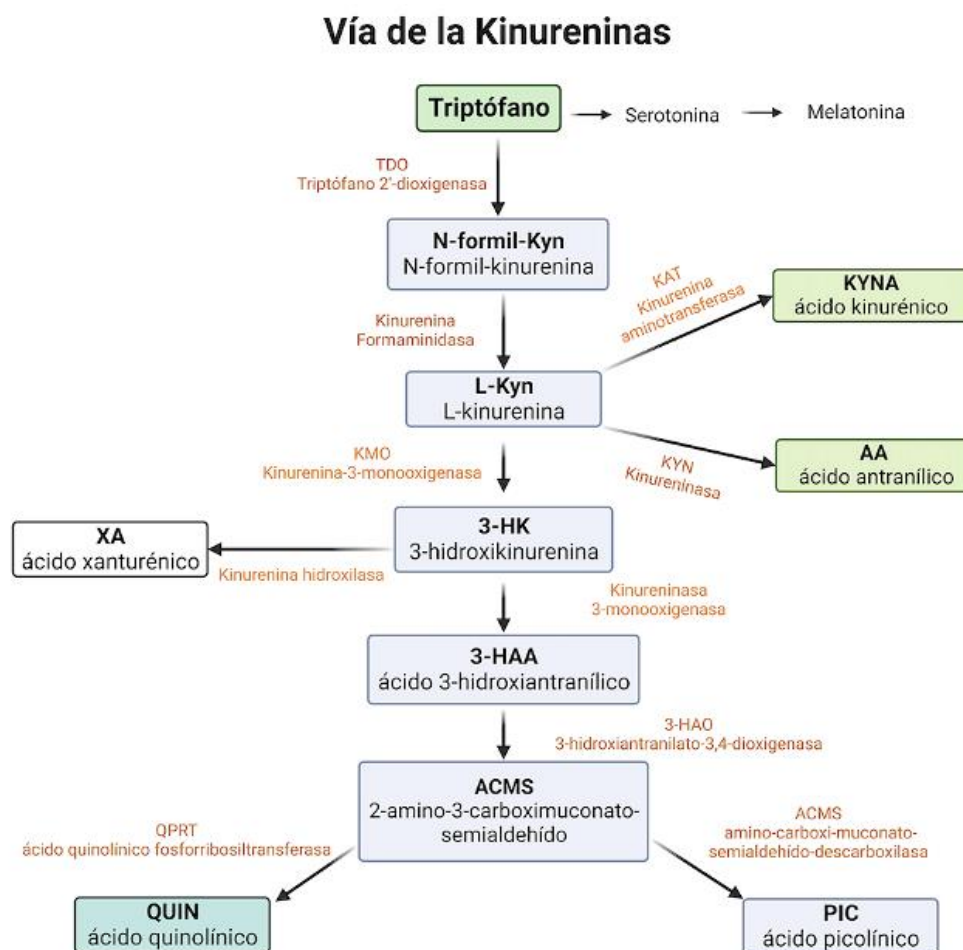


Figura 4. Vía de las kinureninas. Se muestran los principales elementos de la vía (ver texto para detalles). Modificada de Jones, 2013.

La vía de las kinureninas se encuentra en células gliales y en células inflamatorias de la circulación, así como en otros grupos celulares. Diferentes grupos han demostrado que una activación inapropiada de la vía de las kinureninas puede conducir a un aumento de los niveles de AQ en el sistema nervioso central. La alteración en los niveles de AQ, está implicada en diferentes patologías tales como el EA, EP y EH, así como en modelos experimentales de dichas enfermedades, que tienen en común un proceso neurodegenerativo (Maddison & Giorgini, 2015).

Por otro lado, existe el modelo transgénico de la EH (línea R6/1), donde los ratones expresan el exón 1 del gen *HTT* humano con 116 repeticiones de CAG. Esto lleva a la expresión de la mHtt y la Htt normal en todos los tipos celulares del ratón. La línea R6/1 tiene un inicio tardío y una progresión lenta de la enfermedad y los ratones muestran un déficit motor y reducción del volumen cerebral a las 18-20 semanas de edad. Esto lo hace un modelo adecuado para estudiar la EH que se desarrolla en adultos (Ferrante, 2009; Zheng & Diamond, 2012).

1.6. Antecedentes

En el 2021 demostramos que la ausencia de las CC en los animales Wsh disminuía el daño tanto conductual como oxidante, ocasionados por el AQ. La ausencia de CC mostró un efecto protector ya que se evitó la reducción del contenido del neurotransmisor GABA en los animales sometidos al modelo excitotóxico del AQ. Este efecto protector se abolió en animales Wsh que habían sido reconstituidos intracerebroventricularmente (i.c.v.) con CC provenientes de ratones *wild-type* (WT), lo cual demostró que las CC participan en el daño que se induce con el AQ. Por otro lado, en nuestro equipo de trabajo se observó que la Htt participa en las vías de señalización del TLR4 presente en las CC, y que la expresión de la mHtt disminuye la respuesta secreción del TNF en ese linaje celular (Pérez-Rodríguez et al., 2020). A pesar de la información existente, no se conoce el mecanismo mediante el cual las CC participan en la manifestación de los síntomas de la EH en

ratones sometidos al modelo neuroquímico de la EH y se desconoce el papel del TLR4 en la inflamación y daño observados en ese modelo.

1.7. Justificación

El estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y/o severidad de padecimientos crónico-degenerativos, como la EH, contribuirá a encontrar nuevos blancos terapéuticos para aminorar el daño ocasionado por estas patologías. Las evidencias que muestran la participación de componentes inmunitarios (como las CC y el TLR4) en la neuroinflamación observada en modelos murinos que mimetizan la EH, llevan a la necesidad de profundizar en el análisis de su posible participación en el desarrollo del daño conductual y motor observado en la EH.

2. Hipótesis

El TLR4 presente en las CC, así como en otras células del SNC, participa en los procesos de neurodegeneración observados en dos modelos murinos de la EH.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Estudiar la posible participación del TLR4, con énfasis en las células cebadas, en los procesos de neurodegeneración observados en dos modelos murinos de la enfermedad de Huntington.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar los cambios conductuales inducidos por la administración estriatal de AQ en ratones carentes del receptor TLR4 (TLR4-KO).
- 2) Determinar el daño neuronal en ratones TLR4-KO sometidos al modelo neuroquímico de la EH.
- 3) Evaluar el daño oxidante en ratones TLR4-KO sometidos al modelo neuroquímico de la EH.
- 4) Estudiar la participación del TLR4 expresado en las células cebadas en el modelo neuroquímico de la EH.
- 5) Examinar la participación del receptor TLR4 en las manifestaciones fenotípicas en un modelo transgénico de la EH.

4. Materiales y métodos

4.1 Animales

En este trabajo se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6J (WT, stock no. 000664), B6.B10ScN-TLR4^{ps-del}/JthJ (TLR4-KO, stock no. 007227), B6CBAF1/J (B6, stock no. 100011, B6CbA.Tg (HDexon1)61Gpb (R6/1, stock no. 002809) y *Kit^{Wsh}/HNihrJaeBsmJ* (Wsh, stock no. 005051). Los ratones fueron comprados a The Jackson Laboratory (Maine, USA) y criados en las instalaciones del Cinvestav y el INNN.

Los ratones fueron mantenidos en condiciones de temperatura, humedad y ciclos luz-oscuridad de 12:12 horas, con agua estéril y alimento Lab Diet® 5001 *ad libitum*. Los ratones fueron hospedados en cajas Super Mouse® 750 (4-5 ratones por caja) o Super Mouse® 1500 (8-10 ratones por caja). Todos los experimentos fueron realizados siguiendo el Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (NIH) y la Norma Oficial Mexicana de Uso y Manejo de Animales de Laboratorio (Ochoa, 1999). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el CICUAL del Cinvestav y del INNN bajo los protocolos 74-13 y 139-16, respectivamente. Las características relevantes de los animales utilizados para este trabajo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de las líneas de ratones empleados para la realización del presente trabajo.

Nombre de la cepa	Características	Nombre utilizado en esta Tesis
C57BL/6J	Ratones silvestres, expresan el receptor TLR4 y la proteína Htt y ambas proteínas son funcionales.	WT
B6.B10ScN-TLR4 ^{lps- del} /JthJ	Ratones carentes del receptor TLR4. Expresan la Htt funcional.	TLR4-KO
B6CBAF1/J	Ratones silvestres con fondo genético cercano al R6/1. Expresan al receptor TLR4 y a la Htt en sus formas funcionales.	B6
B6CbA.Tg (HDexon1)61Gpb	Ratones que expresan al receptor TLR4 en su forma funcional y expresan dos formas de la Htt: una forma silvestre murina y una forma mutante humana (mHtt).	R6/1
C57BL/6JXB6CbA.Tg (HDexon1)61Gpb	Ratones generados en este trabajo. Son producto de la cruce de los R6/1 y los TLR4. Expresan una cantidad reducida del TLR4 silvestre, además de expresar la Htt silvestre y la mHtt.	TLR4het/mHtt
<i>Kit</i> ^{Wsh} /HNihrJaeBsmJ	Ratones carentes de células cebadas debido a una mutación en el gen c-Kit, que codifica para el receptor del Factor de crecimiento de células madre (SCF).	Wsh

4.2. Reactivos y fármacos

El medio de cultivo celular (RPMI) y los componentes del medio de cultivo para las BMDCs (HEPES, aminoácidos no esenciales, glutamina, mezcla de penicilina / estreptomycin) y suero bovino fetal (FBS) se adquirieron de Gibco-Life Technologies (Gaithersburg, MD, EE. UU.). Los reactivos para geles de agarosa, PCR genómico para genotipificación y tinción de células con azul de toluidina fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). La IL-3 murina se adquirió a Peprotech (Cranbury, NJ, EEUU). El ácido quinolínico (AQ), el clorhidrato de apomorfina y el ácido ascórbico fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los reactivos para peroxidación de lípidos, quinina, metanol y cloroformo fueron de J.T. Baker (Toluca, EdoMex, Mexico). El reactivo 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína para la medición de ERO, fue de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El Fluoro

Jade B, fue de Millipore (Temecula, CA, USA), el kit de BCA para determinación de proteínas fue de Thermo Scientific (Rockford IL. USA). Los reactivos para la determinación del contenido de GABA, el ácido betamercaptopropiónico, O-petaldehyde y GABA fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El pentobarbital sódico Pisabital® fue de PiSA Pharmaceuticals (CDMX, Mx).

4.3. Lesión estriatal con AQ

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) y colocados en el aparato estereotáxico. Se utilizó solución de yodopovidona al 10% para esterilizar la zona de corte, se realizó un corte sagital (1.5-2.0 cm) en la línea media entre los ojos para exponer el cráneo del ratón. Se realizó un trepano utilizando las siguientes coordenadas: +0.6 mm anterior y -2.0 mm lateral a bregma. Con una jeringa Hamilton® se inyectó un microlitro de AQ (30 nmol/μL) o solución salina isotónica (0.9% NaCl, SSI), bajando -2.7 mm en el trepano para ubicar el estriado derecho, de acuerdo con el atlas de cerebro de ratón (Paxinos & Franklin, 2001). La inyección del AQ o SSI se realizó bajo un flujo controlado de 0.5 μL/min, utilizando una bomba de infusión, se esperó un minuto después de la infusión para permitir la difusión de la solución inyectada. La piel fue suturada con un único punto usando sedal y la asepsia se realizó nuevamente con la solución de yodopovidona al 10%. Se permitió la recuperación de los ratones durante tres días en cajas limpias sin aserrín y, una vez recuperados se utilizaron para pruebas conductuales y otras manipulaciones experimentales (ver siguientes secciones).

4.4. Determinación del número de giros ipsilaterales

Los animales recuperados de la cirugía recibieron una administración de apomorfina (1 mg/kg, s.c.) disuelta en SSI y conteniendo 1% de ácido ascórbico para evitar su oxidación. Cinco minutos después de la administración de apomorfina se empezó el conteo de giros ipsilaterales durante 60 minutos. Para ello, los ratones fueron colocados de manera individual en cajas Super Mouse® 750 que

previamente fueron desinfectadas con alcohol al 70% y que contenían una ligera cama de aserrín estéril (Martínez-Gopar et al., 2022). Los animales fueron observados durante 2 horas y se cuantificó el número de giros ipsilaterales que mostraron en ese periodo. Los resultados fueron expresados como número de giros/60 min.

4.5. Prueba en la caja luz-oscuridad

Siete días después de la cirugía estereotáxica, los ratones fueron colocados en una caja de acrílico separada en dos compartimentos, uno claro y otro oscuro, conectados por una puerta que permitía el libre movimiento de los ratones entre ambos compartimentos. Antes de iniciar la prueba, la caja fue esterilizada con alcohol al 70% y el ratón fue colocado en el centro de la parte iluminada. Se dejó durante 5 minutos para registrar el número de cruces entre ambos compartimentos, la latencia de paso al compartimento oscuro (tiempo de latencia) y el tiempo total de permanencia en cada compartimento (Bourin & Hascoët, 2003). La latencia y el tiempo total de permanencia en cada compartimento se expresaron en minutos.

4.6. Prueba de campo abierto

Ocho días después de la cirugía estereotáxica, los ratones fueron colocados en una caja de acrílico de 42.5 x 42.5 x 20.5 cm, acoplada a un sistema de registro automatizado de la actividad ambulatoria, además de los movimientos horizontales y verticales del ratón (Auto-track Opto-Varimex 4). Antes de iniciar la prueba, la caja fue desodorizada con alcohol al 70% y el ratón fue colocado en el centro de la caja y observado durante 5 minutos (García-Lara et al., 2018). Los resultados se expresaron como movimientos horizontales, verticales o ambulatorios en 5 min.

4.7. Prueba de malla invertida

Para realizar la prueba se usó un cuadrado de 43 cm de malla de alambre que consiste en cuadrados de 12 mm de alambre de 1 mm de diámetro, rodeado por un marco de madera de 4 cm de profundidad que impide que algún ratón intente trepar al otro lado. Doce días después de la cirugía estereotáxica, se colocó el ratón en el centro de la malla, se inició un cronómetro y se giró la pantalla a una posición invertida durante 2 segundos, con la cabeza del ratón declinando primero. Se colocó la malla a 40-50 cm por encima de una cama de aserrín de 4 cm. Al momento de caer el ratón se detuvo el cronómetro. Dependiendo el tiempo de permanencia en la malla se asignaron los siguientes valores: caída entre 1-10 s = 1, caída entre 11-25 s = 2, caída entre 26-60 s = 3, caída después de 60 s = 4 (Deacon, 2013).

4.8. Análisis de la marcha

Trece días después de la cirugía estereotáxica, las patas traseras y delanteras de los ratones se cubrieron con pinturas no tóxicas negra y roja, respectivamente. Luego se permitió que los ratones caminaran a lo largo de un túnel de acrílico de 50 cm de largo y 10 cm de ancho (con paredes de 10 cm de altura) hacia una caja cerrada, se colocó una hoja de papel blanco en el suelo del túnel para obtener la impresión de las pisadas de cada ratón. Para caracterizar el patrón de caminar de cada ratón, se midió la distancia promedio entre cada zancada en centímetros (Carter et al., 1999).

4.9. Disección del tejido cerebral

Los ratones fueron sacrificados mediante decapitación. Inmediatamente se fracturó el cráneo para exponer el cerebro. La extracción del cerebro se realizó con ayuda de una espátula, y fue lavado en un vaso de precipitado con SSI en hielo y posteriormente colocarlo un vidrio de reloj con papel filtro, todo esto mantenido en hielo. La disección estriatal se llevó a cabo con pinzas tipo relojero para separar los

hemisferios y dejar expuesto el cuerpo estriado, disecando el lado lesionado (estriado derecho) para colocarlo en tubos eppendorf® de 1.5 mL y almacenarlo a -70°C hasta su análisis.

4.10. Medición de GABA por HPLC

Un día después de la cuantificación de giros ipsilaterales, se administró ácido 3-mercaptopropiónico (1,2 mmol/kg, i.p.) para inhibir cualquier formación de GABA *post-mortem* (Morales-Martínez et al., 2017). Dos minutos después, se obtuvo el cuerpo estriado lesionado y se congeló a -70°C hasta su análisis. Para el análisis por HPLC, se homogeneizó el tejido del estriado con 20 volúmenes (aproximadamente 400 µL) de metanol-agua (85% v/v) y las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se colocó en viales cromatográficos. La cuantificación de los niveles de GABA se llevó a cabo utilizando un equipo de HPLC con detección de fluorescencia Agilent® 1100. En primer lugar, se realizó una reacción de derivatización del tejido, mezclando 10 µL de reactivo de O-ftaladehído (OPA) con 10 µL de sobrenadante de homogenizado. El volumen resultante se mezcló 3 veces durante 10 segundos y luego se inyectó en el sistema de HPLC usando una columna OPA-HS (PR 12.5 x 4.5 mm, ps 3 µm Alltech®) con una fase móvil que consiste en solución tampón de acetato 50 mM (pH 5.9), que contiene 1.5% v/v de tetrahidrofurano y metanol de calidad HPLC en un gradiente lineal que varía de 10% a 65% de metanol. Se utilizó un detector de fluorescencia a 232 nm de excitación y 455 nm de emisión para detectar el GABA. Los niveles de GABA obtenidos se normalizaron de acuerdo con el valor de concentración de proteína determinado para cada muestra (Morales-Martínez et al., 2017). Los resultados se expresaron como µmol de GABA por mg de proteína.

4.11. Cuantificación de proteínas mediante la reacción del ácido bicinconínico (BCA)

En una placa de 96 pozos se colocaron 95 μ L de agua destilada, posteriormente se adicionaron 5 μ L de muestra. Adicionalmente se agregaron 100 μ L de reactivo BCA por muestra, la placa se incubó durante 20 minutos a 60°C. Se leyó en equipo EON BioTek a 540 nm y 450 nm de referencia. Antes de agregar el BCA por cada mililitro de éste se agregaron 20 μ L de sulfato de cobre al 4%. Para obtener las concentraciones de proteínas se realizó una curva con albúmina bovina (Stoscheck, 1990).

4.12. Tinción de fluoro-jade B

Tres días después de la cirugía estereotáxica, los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (80 mg/kg, i.p.), posteriormente se perfundieron con 0.9% NaCl (SSI) seguida de paraformaldehído (PFA) en buffer de fosfato 0.1 M (pH 7.4, PBS). El cerebro fue removido y post-fijado en PFA a 4°C por 24 horas y criopreservado en sacarosa al 20% en PBS por 24 horas y en sacarosa al 30% en PBS por otras 24 horas a 4°C. Se realizaron cortes coronales de 30 μ m en vibratomo (Leica® VT1000 S). Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante toda la noche. Al día siguiente se colocaron en una estufa a 50°C por 10 minutos, posteriormente se sumergieron en solución de NaOH al 1% en etanol al 80% por 2 minutos, seguido por 2 minutos en etanol al 70% y 2 minutos más en agua destilada. Después se incubaron en solución de KMnO₄ al 0.06% por 10 minutos, y se pasaron dos veces en agua destilada por 2 minutos, en seguida se colocaron en solución de fluoro-jade B al 0.0004% en ácido acético al 0.1% por 20 minutos, se pasaron por agua destilada por un minuto y se dejaron secar por 5-10 minutos en oscuridad a 50°C, se sumergieron en xilol por 5 segundos y se sellaron con entelan. Las imágenes se obtuvieron con microscopio de fluorescencia (Olympus® Bx51) con el objetivo 20x.

(Martínez-Gopar et al., 2022). Los resultados se expresaron como el número de neuronas positivas a fluoro-jade B por campo, utilizando el software ImagenJ.

4.13. Cuantificación de lípidos peroxidados

Dos horas después de la cirugía estereotáxica, los ratones fueron sacrificados por decapitación y el estriado derecho se homogenizó con 2 mL de SSI. Se separaron dos alícuotas de 900 μ L en tubos de vidrio forrados con aluminio (para evitar la degradación inducida por la luz). El homogenizado restante se almacenó para la cuantificación de ERO y proteínas. A cada muestra de 900 μ L se le adicionaron 4 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v), los tubos fueron agitados en vortex por unos segundos y se dejaron reposar por 30 minutos a 4°C y protegidos de la luz. La fase acuosa (fase superior) fue retirada. Se transfirieron 2 mL de la fase orgánica a una celda de cuarzo y se adicionaron 200 μ L de metanol, se mezcló por inversión tres veces. Las muestras fueron analizadas con un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer® LS50B a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. Como referencia de la fluorescencia, se utilizó una solución de quinina (0.001 mg/mL). Los valores de fluorescencia se correlacionaron con el contenido de proteínas de cada muestra (Pérez-Severiano et al., 2004). Los resultados se expresaron como U.F./mg proteína.

4.14. Formación de especies reactivas de oxígeno

Se utilizó el sobrante del homogenizado utilizado para la determinación de lípidos peroxidados. Se preparó una solución de Tris-HEPES (18:1) a pH 7.4 HEPES (NaCl 120 mM, KCl 2.5 mM NaH₂PO₄ mM, MgCl₂ 0.1 mM, NaHCO₃ 5 mM, glucosa 6.0 mM, CaCl₂ 1.0 mM, HEPES 10.0 mM). Se incubaron 5 μ L del homogenizado con 145 μ L de la mezcla de Tris:HEPES (18:1) y 50 μ L de una solución de dicloro fluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) (50 μ M) en una placa de 96 pozos a 37°C durante 1 hora, en agitación constante. La fluorescencia de cada muestra fue determinada usando el equipo Biotek® FLx800 a 488 nm de excitación y 525 nm

de emisión. Para obtener la concentración, se utilizó una curva de DCF (García-Lara et al., 2015). Los resultados fueron expresados como nmoles DCF/mg proteína/ 60 min.

4.15. Cruza de ratones R6/1 y TLR4-KO

Para obtener ratones heterocigotos para el TLR4 con el gen de la huntingtina mutada, se colocaron harems compuestos por un ratón macho R6/1 y dos hembras TLR4-KO. Esta crua originó dos grupos diferentes de ratones, ambos heterocigotos para el TLR4, y expresando o no el gen de la EH. Estos animales fueron llamadas Het-TLR4 y TLR-Het/mHtt, respectivamente (ver sección de Diseño Experimental).

4.16. Extracción del ADN y determinación de genotipos

Para determinar el genotipo de cada ratón derivado del apareamiento de ratones R6/1 y TLR4-KO, se realizó una PCR genómica utilizando los cebadores recomendados por Jackson Laboratory. Cuando la primera camada tenía 4 semanas de edad, se tomó una biopsia de la cola, de 0.5 cm de largo, de cada ratón. A cada muestra se le añadieron 500 μ L de tampón de lisis (Tris-base 1 M, pH 8.5; EDTA 0.5 M; SDS 20%; NaCl 1 M) y 1.25 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Las muestras se mantuvieron en agitación a 50 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio, se añadieron 500 μ L de isopropanol y se mezcló vigorosamente hasta observar el ADN precipitado. El sedimento se lavó con 500 μ L de etanol al 70 % y el sedimento de ADN limpio se dejó secar durante 5 min a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en agua destilada y la integridad se probó en un gel de electroforesis (1% de agarosa). La cuantificación y la pureza se confirmaron mediante de la determinación de absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Multilectora Cytation Biotek-3) (Pérez-Rodríguez et al., 2020).

El genotipo de los ratones R6/1 y TLR4-Het/mHtt se realizó mediante PCR de punto final, amplificando el fragmento mutado del gen de la Huntingtina humana utilizando el cebador up (3' GCA GCA GCA GCA GCA ACA GCC GCC ACC GCC) y el cebador down (5' CGG CTG AGG CAG CAG CGG CTGT). Las reacciones de PCR se prepararon de la siguiente manera (por tubo, a un volumen final de 25 μ L): 1 μ L de ADN extraído (100–150 ng), 2.5 μ L de solución tampón (Tris-base 670 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 166 mM, MgCl_2 20 mM, albúmina de suero bovino 1.7 mg/mL, β -mercaptoetanol 10 mM, pH 8.8), 2.5 μ L de DMSO al 100 %, 1 μ L de cada cebador (25 pmol/ μ L), 0.825 μ L de MgCl_2 50 mM, 1 μ L de dNTP 12.5 mM, 0.25 μ L (1,5 U/ μ L) de Taq polimerasa y 12.92 μ L de agua tratada con DEPC. Las condiciones de amplificación fueron: 1 incubación a 94 °C por 2 min, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 90 s y, finalmente, 1 incubación a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR tenían un tamaño de 110 pares de bases y se analizaron en un gel de agarosa al 3 %, que se tiñó con gel rojo (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain Biotium) y se observó con luz ultravioleta. La heterocigosidad para el gen TLR4 fue confirmada por PCR genómica (<https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=007227&protocolID23072>), como lo sugirió el proveedor y la expresión más baja de la proteína TLR4 fue confirmada por Western blot de biopsias de cola.

4.17. Evaluación del fenotipo de los animales producto de la cruce TLR4-KO x R6/1

Para la evaluación del fenotipo de los ratones obtenidos de la cruce de los ratones R6/1 con TLR4-KO, se seleccionaron únicamente los machos obtenidos, dado que se ha observado que, en hembras, la expresión del gen de mHtt suele provocar manifestaciones más intensas de la EH, llevando a presentar las alteraciones bioquímicas y motoras de manera más temprana (Naver et al., 2003).

4.18. Seguimiento del peso corporal

Semanalmente, desde la semana 15 hasta la semana 25 de edad, de los ratones macho obtenidos de la cruce de ratones R6/1 y TLR4-KO, así como los ratones R6/1, TLR4-KO, B6 y WT fueron pesados utilizando una balanza. Los resultados fueron expresados en gramos (g).

4.20. Prueba en rotarod

Esta prueba consiste en un rodillo giratorio en el que son colocados los ratones, y se registra el tiempo y la velocidad a la que caen del rodillo. Para llevar a cabo esta prueba se entrena a los ratones 3 días previos al día de la prueba. En este trabajo los ratones fueron sometidos a la prueba antes de cumplir la semana 15 de edad y realizada semanalmente hasta las 25 semanas de edad.

En las sesiones de entrenamiento, los ratones son colocados a 3 diferentes velocidades, 10, 20 y 30 rpm durante 5 min a cada velocidad. El día de la prueba los ratones son colocados el rodillo giratorio en una rampa de velocidades de 2 a 40 rpm en 300 s (5 min). La latencia (tiempo) en que los ratones cayeron de rotor, así como la velocidad fueron registrados (García-Lara et al., 2018). Los resultados fueron expresados en minutos para la latencia al fallo y en RPM para la velocidad.

4.21. Evaluación de feet clasping

Desde la semana 15 hasta la 25 de edad, los ratones fueron suspendido por la cola y sujetos durante máximo 2 minutos, a aproximadamente 10 cm de la superficie. Durante ese tiempo, el movimiento de retracción de patas traseras fue evaluado. Se asignaron diferentes valores dependiendo del movimiento: ninguna contracción de las patas traseras durante más de 30 segundos = 0, contracción de una de las patas traseras = 1, contracción de ambas patas traseras = 2, contracción de ambas

patas traseras y sujeción con las patas delanteras =3 (Zhu et al., 2016). La extensión de las 4 patas fue tomada como negativo = 0.

4.22. Obtención de células cebadas derivadas de médula ósea (BMMC)

Se obtuvo la médula ósea del fémur y tibia de ratones WT (Meurer et al., 2016). A continuación, las células de médula ósea fueron colocados en medio RPMI 1640 suplementado con IL-3 murina recombinante (20 ng/mL), Stem cell factor murino recombinante (10 ng/mL), 10% de suero fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina, piruvato de sodio (1mM), 100 mg/mL de estreptomicina, 50 μ M de β -Mercaptoetanol, solución antibiótica-antimicótica 1x y aminoácidos no esenciales 1 mM. Las células fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO₂ por 5-7 semanas, reemplazando el medio cada 5-6 días (Manetz et al., 2001).

4.23. Reconstitución intracerebroventricular (i.c.v.) de células cebadas

Las BMMC de los cultivos se contaron en la cámara de Neubauer y se colectaron 5×10^5 células de los cultivos y posteriormente fueron centrifugadas por 6 minutos a 750 g, el sobrenadante fue removido y el pellet celular fue lavado una vez y resuspendido en buffer Tyrode (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 5.6 mM glucosa, 20 mM HEPES, pH 7.4). Para la reconstitución i.c.v., se siguió el mismo procedimiento utilizado para generar la lesión con AQ, cambiando las coordenadas: -1.0 mm lateral a bregma y -2.0 mm ventral para ubicar el ventrículo derecho e infundiendo las 5×10^5 células en 100 μ L de buffer Tyrode (Martínez-Gopar et al., 2022). Los ratones se dejaron recuperar durante 2 semanas.

4.24. Tinción de azul de toluidina

Dos semanas posteriores a la reconstitución i.c.v., los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (80 mg/kg, i.p.), posteriormente se perfundieron con SSI y con paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer de fosfato 0.1 M (pH 7.4, PBS). El

cerebro fue removido y post-fijado en PFA a 4°C por 2 horas y criopreservadas en sacarosa al 30% en PBS a 4°C hasta su uso. Se realizaron 48 cortes coronales de 30 μm (coordenadas 1.9 a -2.3 mm respecto a bregma), utilizando un microtomo Zeiss® Hyrax C25, los cortes fueron colocados en cubreobjetos gelatinizados. Los cortes fueron hidratados con agua destilada pasando las laminillas dos veces rápidamente y sumergidos en una solución de azul de toluidina [5 mL stock de azul de toluidina (1 g azul de toluidina en 100 mL de etanol al 70%) + 45 mL NaCl 1% (pH 2.5)] por 2 minutos. Después, los cortes fueron sumergidos en agua destilada y deshidratados en etanol de 95% y 100% v/v y aclaradas con xilol. Se adicionó medio de montaje Entelan. Los cortes fueron analizados usando un microscopio Leica® DM750 equipado con cámara digital Leica® ICC50E. Los cortes fueron escaneados bilateralmente de manera manual usando el software LAS EZ v3.2.1. Las imágenes fueron obtenidas con los objetivos 40x y 100x (Martínez-Gopar et al., 2022). Los resultados fueron reportados como el número de CC en el estriado.

4.25. Análisis estadístico

Los valores individuales fueron graficados indicando la media de cada grupo \pm el ESM. Primeramente, la distribución normal de los datos fue determinada utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, para los datos con distribución normal, se utilizó ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey, para los datos que no cumplían la distribución normal se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida por U de Mann-Whitney. Para los datos del fenotipo de la cruce de ratones R6/1 y TLR4-KO se realizó la prueba de ANOVA de dos vías. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis y graficas fueron realizados utilizando el Software GraphPad Prism v.9.

4.26. Diseño experimental

Con el fin de alcanzar los primeros tres objetivos de este trabajo, se realizaron distintas pruebas bioquímicas y conductuales en ratones silvestres y ratones carentes del receptor TLR4 (Figura 5).

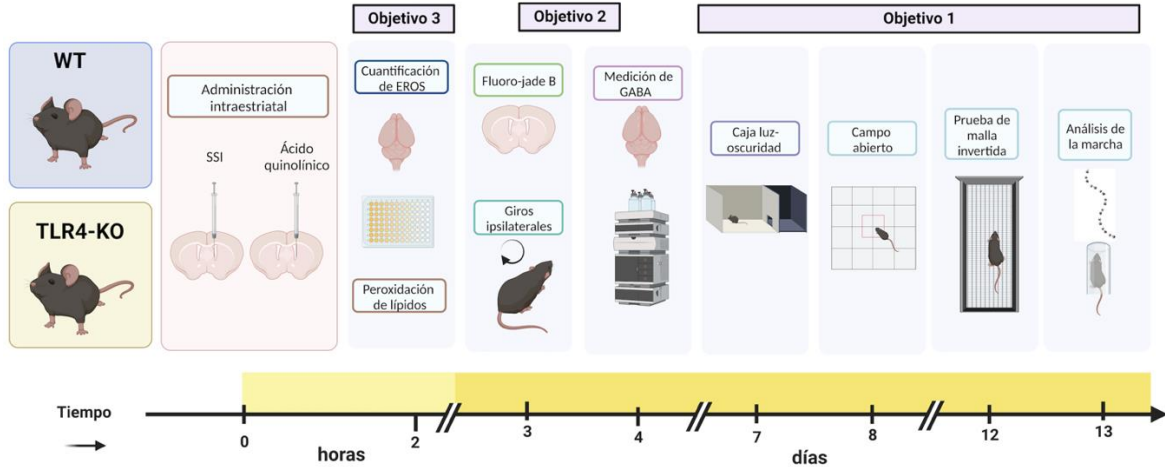


Figura 5. Diseño experimental para el cumplimiento de los objetivos 1, 2 y 3. Grupos de ratones macho adultos WT y TLR4-KO recibieron una administración intraestriatal de SSI o de AQ. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas y conductuales a los tiempos óptimos reportados para cada parámetro (ver sección de Materiales y Métodos). Imagen diseñada con Biorender.com

De manera particular, ratones hembras adultos WT y TLR4-KO recibieron una administración de SSI o de AQ en el estriado. Para cumplir con el objetivo 1, los animales se dejaron recuperar durante siete días después de la administración para realizar las pruebas de caja luz-oscuridad, ocho días para evaluar el movimiento en campo abierto, 12 días para realizar la prueba de malla invertida y 13 días para realizar el análisis de la marcha según se describe en la sección de Materiales y Métodos. Para cumplir con el objetivo 2, grupos de animales tratados con SSI o QA se dejaron recuperar durante tres días. Después de ese tiempo, fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos por vía intracardiaca, se les extrajo el cerebro y se realizaron cortes coronales de 30 μm . Posteriormente, se procesaron las muestras para realizar la tinción de fluoro-jade B y se analizaron los cortes por medio de microscopía de fluorescencia. Asimismo, tres días posteriores a la lesión estriatal con AQ, se midieron los giros ipsilaterales inducidos por la

administración de apomorfina. Al día siguiente, los ratones fueron tratados con ácido 3-mercaptopropiónico y sacrificados por decapitación, se diseccionó el estriado lesionado y se llevó a cabo la medición de GABA por HPLC y contenido de proteínas por BCA. Finalmente, para cumplir el tercer objetivo, dos horas posteriores a la lesión estriatal con AQ, los ratones fueron sacrificados por decapitación, se diseccionó el estriado lesionado y se homogenizó el tejido con solución salina isotónica, a continuación, se realizó la cuantificación de lípidos peroxidados y una parte del homogenizado fue destinado a medir la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y contenido de proteínas por BCA.

Para el cumplimiento del objetivo 4, ratones Wsh fueron reconstituidos i.c.v. con BMMC de ratones WT y TLR4-KO (Figura 6). Para asegurar la correcta reconstitución del estriado, dos semanas posteriores a la administración i.c.v. los ratones fueron perfundidos intracardiamente, se extrajo el cerebro y se realizaron cortes coronales de 30 μm , posteriormente se realizó la tinción de azul de toluidina y se analizaron los cortes bajo microscopio. Una vez asegurada la reconstitución, otro grupo de ratones fue reconstituido y dos semanas después los ratones de ese grupo se sometieron al modelo neuroquímico de la EH. Tres días posteriores a la lesión se midieron los giros ipsilaterales inducidos por la administración de apomorfina, en un grupo independiente de ratones dos horas posteriores a la lesión estriatal con AQ, los ratones fueron sacrificados por decapitación, se diseccionó el estriado lesionado y se homogenizó el tejido con solución salina isotónica. A continuación, se realizó la cuantificación de lípidos peroxidados, y una parte del homogenizado fue destinado para medir la formación de especies reactivas de oxígeno y contenido de proteínas por BCA. Como controles fueron utilizados ratones Wsh tratados i.c.v. con vehículo.

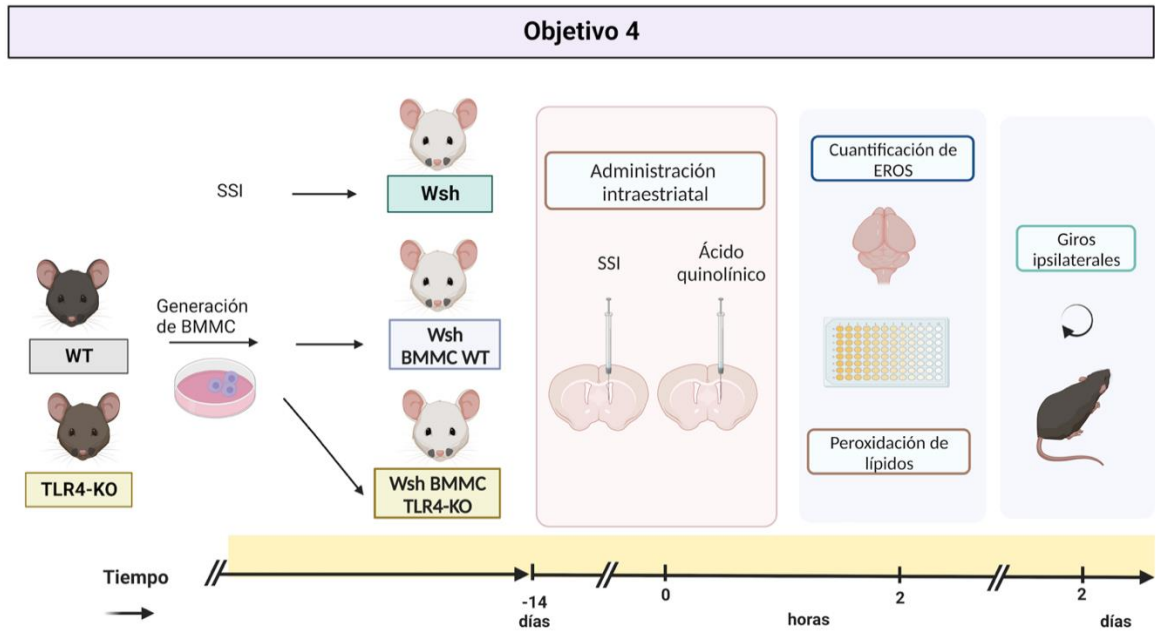


Figura 6. Diseño experimental para el cumplimiento del objetivo 4. Ratones Wsh fueron reconstituidos intraestriatalmente con BMMCs generadas a partir de ratones WT o TLR4-KO. Como control, se utilizaron animales Wsh que recibieron una administración intraestriatal de ISS. Catorce días después, los animales fueron sometidos al modelo neuroquímico de la EH y se realizaron distintas determinaciones bioquímicas y conductuales (ver sección de Materiales y Métodos). Imagen diseñada con Biorender.com

Con el fin de cumplir el objetivo 5, se realizó la cruce de ratones R6/1 con ratones TLR4-KO, para generar animales que fueran heterocigotos para el receptor TLR4 y que expresaran la mHtt. Los genotipos esperados en la descendencia (F1) pueden verse en la Figura 7, donde se muestra el cuadro de Punnett esperado para la cruce.

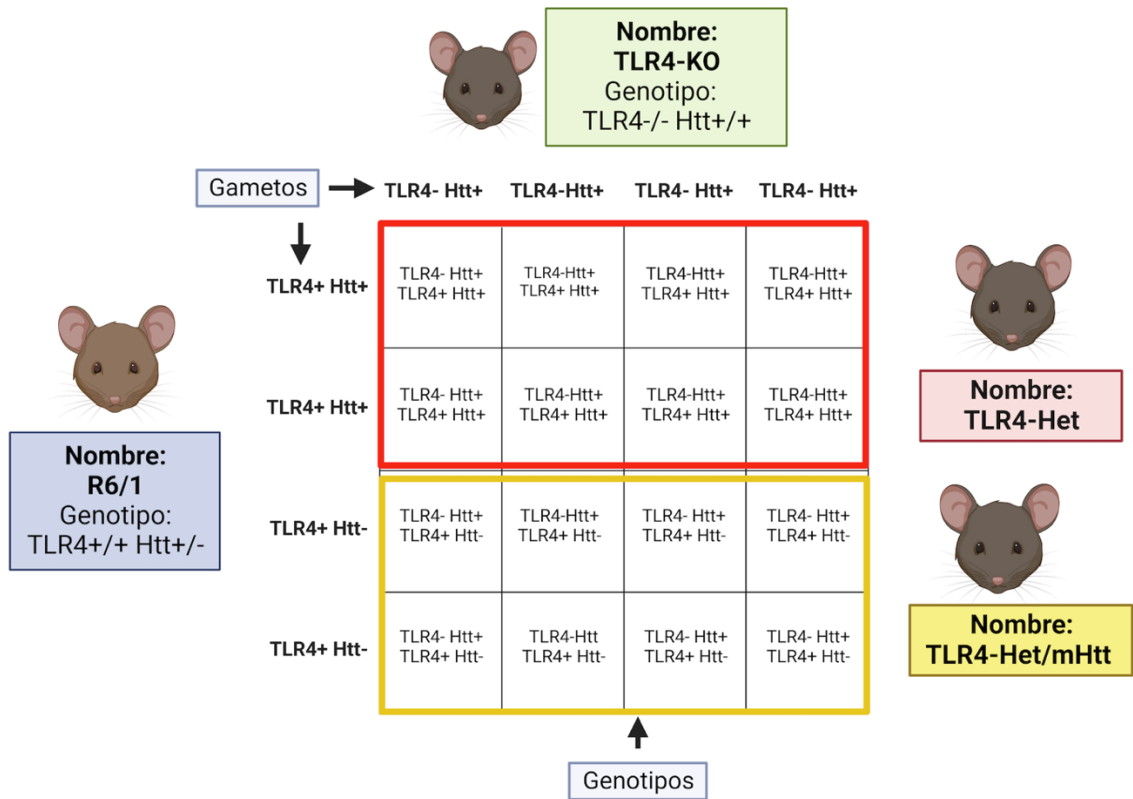


Figura 7. Cuadro de Punnett con los genotipos posibles de los ratones producidos de la cruce de ratones TLR4-KO y R6/1. Se muestran los genotipos de los ratones utilizados en la cruce y los animales resultantes (F1). En los recuadros rojo y amarillo se muestran los nombres de los grupos de animales utilizados en esta tesis, así como sus correspondientes genotipos. Imagen diseñada con Biorender.com

Una vez obtenidos los ratones TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt se evaluó semanalmente el fenotipo (peso corporal, prueba de rotarod y *feet clasping*), desde la semana 15 hasta la semana 25 de edad. Como controles se evaluaron ratones R6/1 y TLR4-KO, así como ratones silvestres de sus respectivos fondos genéticos (ratones B6CBAF1/J y C57BL/6J, respectivamente) los cuales fueron reunidos en un solo grupo denominado como C57/B6 debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros medidos en esos ratones (Figura 8).

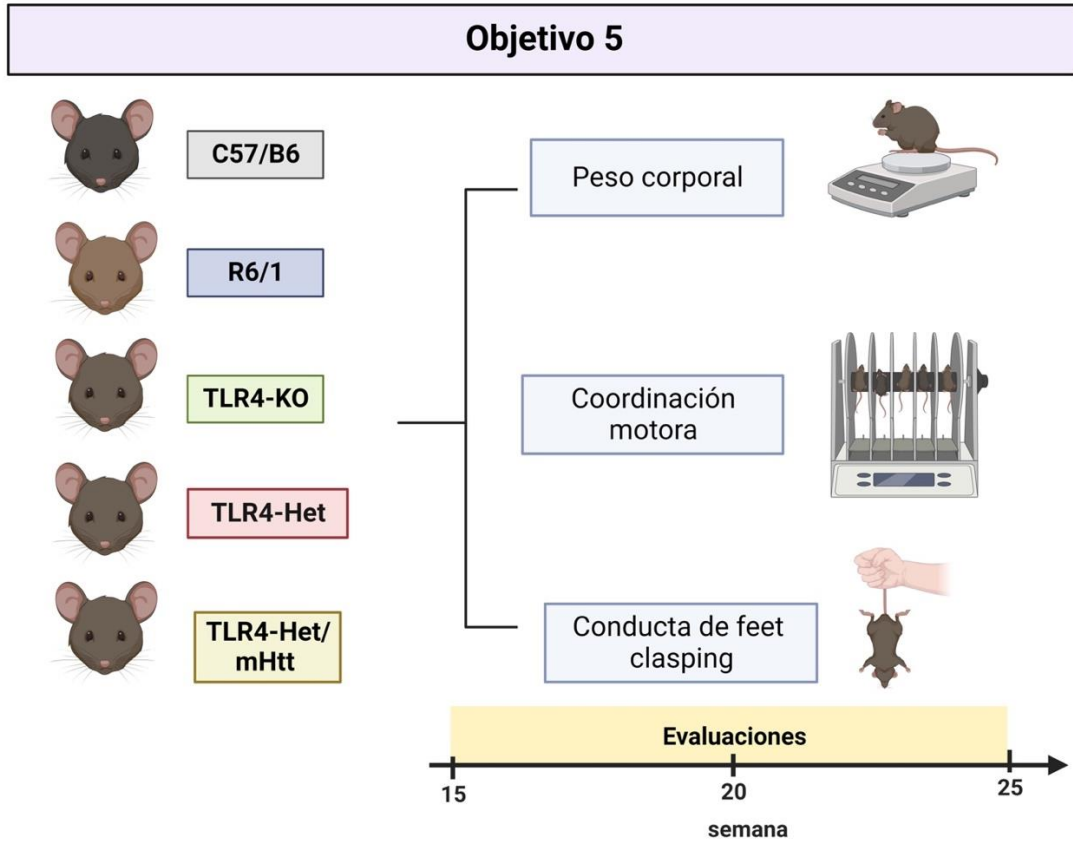


Figura 8. Diseño experimental para el cumplimiento del objetivo 5. Ratones TLR4-KO, TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt se dejaron crecer hasta la semana 15 y después se realizaron diversas evaluaciones semanales hasta la semana 25. Como control, se formó un grupo de animales silvestres con el fondo genético C57BL6/J y el fondo genético B6CBA. Ese grupo de ratones fue nombrado C57/B6. Imagen diseñada con Biorender.com

5. Resultados

5.1. La ausencia del TLR4 modifica los cambios en la actividad locomotora inducidos por la administración estriatal de AQ

El efecto de la administración de AQ ratones TLR4-KO se muestra en la Figura 9A, donde se representa en promedio los giros ipsilaterales contabilizados en los diferentes grupos durante 60 minutos. Los ratones WT y TLR4-KO inyectados con SSI no mostraron giros ipsilaterales durante la evaluación. Los ratones WT inyectados con AQ mostraron un mayor número respecto a los giros contados en los ratones WT inyectados con SSI. Los ratones TLR4-KO inyectados con AQ mostraron un mayor número de giros ipsilaterales respecto a los ratones TLR4-KO inyectados con SSI. Los ratones TLR4-KO inyectados con AQ presentaron un menor número de giros ipsilaterales en comparación con los ratones WT inyectados con AQ. Un grupo independiente de ratones fue inyectado con AQ, siete días después de la inyección con AQ se realizó la prueba de campo abierto y se registró el número de movimientos verticales, horizontales y ambulatorio (Fig. 9B, C y D). Los ratones WT y TLR4-KO inyectados con SSI no presentaron ninguna diferencia significativa en los movimientos verticales, movimientos horizontales y movimientos ambulatorios. Los ratones WT inyectados con AQ no presentaron ninguna diferencia significativa con los ratones WT inyectados con SSI en los movimientos verticales, horizontales y ambulatorios. Los ratones TLR4-KO inyectados con AQ mostraron un menor número de movimientos que los ratones TLR4-KO inyectados con SSI, en movimientos verticales, horizontales y ambulatorios. Los ratones TLR4-KO inyectados con AQ presentaron un número menor de movimientos que los ratones WT inyectados con AQ, en los movimientos verticales y horizontales.

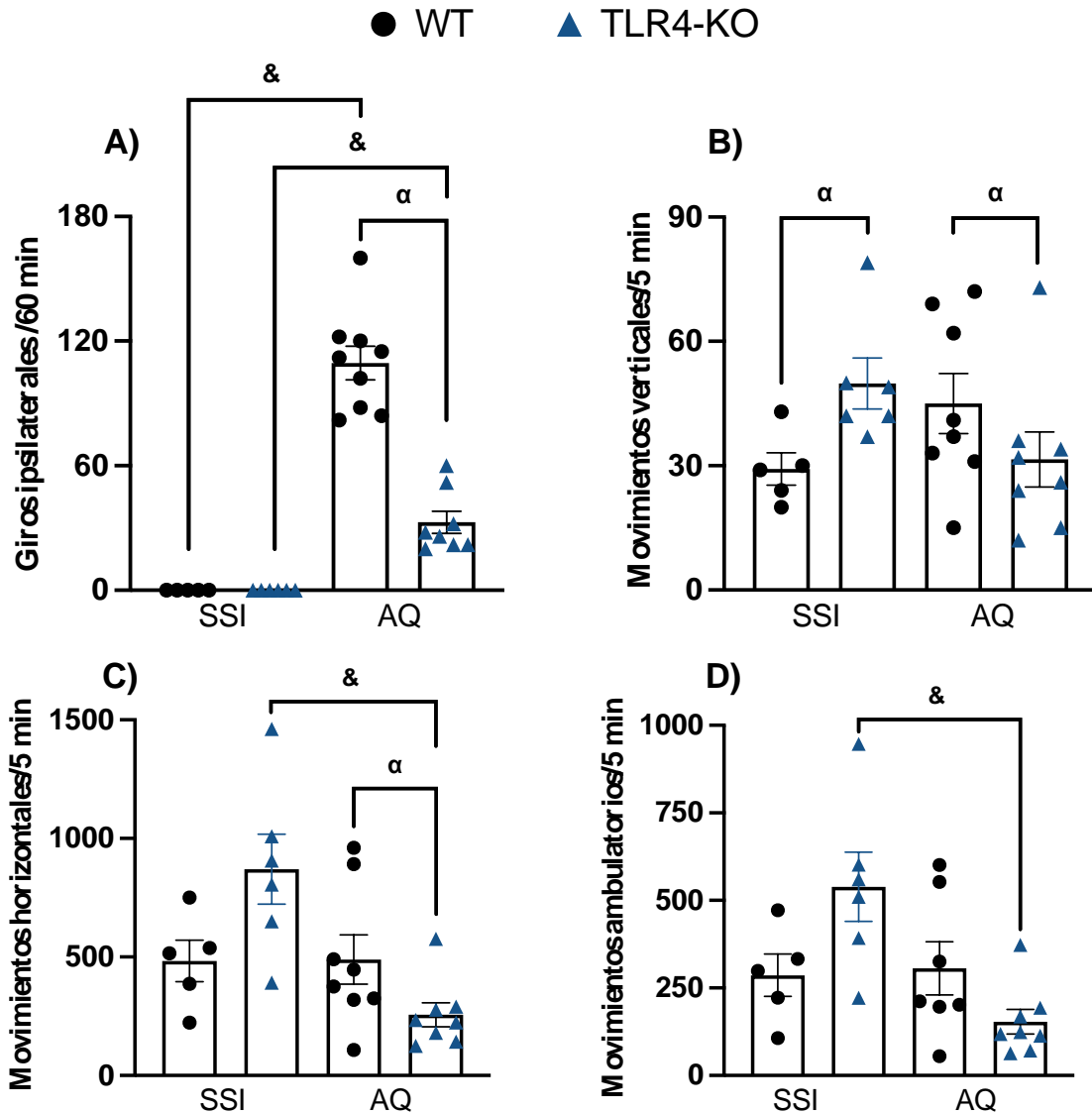


Figura 9. Efecto del AQ en la generación de giros ipsilaterales y movimientos verticales en ratones. Ratones TLR4-KO y WT intraestriatalmente administrados con AQ (30 nmol/ μ L) o 1 μ L de SSI. A) Giros ipsilaterales contados durante 60 minutos. Siete días después de la administración con AQ, se realizó la prueba de campo abierto se contó el número de movimientos: B) verticales, C) horizontales y D) ambulatorios, en la, durante 5 minutos. Los datos representan el promedio de \pm ESM de 5-8 ratones por grupo. Prueba de U de Mann-Whitney $^{\&}P < 0.05$ vs SSI, $^{\alpha}P < 0.05$ vs TLR4-KO (ANOVA Kruskal-Wallis, Giros ipsilaterales: $H(3,28) = 25.40$, $P < 0.001$; Mov. Verticales: $H(3,27) = 8.29$, $P = 0.040$; Mov. Horizontales: $H(3,27) = 12.19$, $P = 0.007$; Mov. Ambulatorios: $H(3,27) = 11.53$, $P = 0.009$).

Los valores promedio de cada grupo \pm el error estándar de la media (ESM), se muestran resumidos en la Tabla 5. Estos resultados muestran que la inyección con AQ no modifica la conducta locomotora en ratones WT, sin embargo, en ausencia del TLR4, sí se observan cambios locomotores después de la inyección estriatal con AQ.

Tabla 5. Valores promedio de los giros ipsilaterales y de la actividad locomotora en ratones inyectados intraestriatalmente con SSI o AQ.

WT + SSI	TLR4-KO + SSI	WT + AQ	TLR4-KO + AQ
Giros ipsilaterales durante 60 min			
0 giros	0 giros	109 \pm 8 giros ^{&, α}	33 \pm 5 giros ^{&}
Movimientos verticales durante 5 min			
29.20 \pm 3.89 movimientos ^{α}	49.83 \pm 6.16 movimientos	45.00 \pm 7.21 movimientos ^{α}	31.50 \pm 6.67 movimientos
Movimientos horizontales durante 5 min			
483.00 \pm 87.39 movimientos	870.80 \pm 147.50 movimientos	489.60 \pm 103.60 movimientos ^{α}	256.40 \pm 50.34 movimientos ^{&}
Movimientos ambulatorios durante 5 min			
286.60 \pm 60.46 movimientos	539.00 \pm 98.91 movimientos	306.30 \pm 76.09 movimientos	153.5 \pm 34.97 movimientos ^{&}

Los datos representan la media \pm ESM de 5–8 ratones por grupo. Prueba de U de Mann-Whitney [&]P<0.05 vs SSI, ^{α} P<0.05 vs TLR4-KO (ANOVA Kruskal-Wallis, Giros ipsilaterales: H_(3,28) = 25.40, P<0.001; Mov. Verticales: H_(3,27) = 8.29, P=0.040; Mov. Horizontales: H_(3,27) = 12.19, P=0.007; Mov. Ambulatorios: H_(3,27) = 11.53, P=0.009).

5.2. La inyección intraestriatal con AQ no produce cambios en la conducta de ansiedad y la coordinación motora

Para evidenciar la participación del TLR4 sobre los cambios en la conducta de ansiedad inducida por la administración estriatal de AQ, a los mismos ratones a los que previamente se habían evaluado en la prueba de campo abierto, fueron también evaluados en la caja de luz oscuridad. El número de cruces entre ambos compartimentos, así como el tiempo que tardan en pasar al compartimento oscuro (tiempo de latencia) o el tiempo total de permanencia en cada compartimento fue registrado. Los ratones WT inyectados con AQ no mostraron diferencias

significativas con respecto a los ratones WT inyectados con SSI en el tiempo de latencia, tiempo en luz, tiempo en oscuridad ni el número de cruces. De igual forma, no se encontró ninguna diferencia significativa entre los ratones TLR4-KO inyectados con AQ y los TLR4-KO inyectados con SSI en los diferentes parámetros. Los ratones TLR4-KO y WT inyectados con AQ no mostraron diferencias significativas en el tiempo de latencia, tiempo en luz, tiempo en oscuridad ni el número de cruces.

Tabla 6. Valores promedio en la conducta de ansiedad en ratones inyectados intraestriatalmente con SSI o AQ.

WT + SSI	TLR4-KO + SSI	WT + AQ	TLR4-KO + AQ
Latencia de entrada			
62.88 ± 21.45 segundos	68.64 ± 14.61 segundos	66.79 ± 14.76 segundos	58.39 ± 18.26 segundos
Tiempo en luz			
116.4 ± 15.75 segundos	116.0 ± 18.59 segundos	114.1 ± 11.18 segundos	117.6 ± 11.17 segundos
Tiempo en oscuridad			
184.1 ± 15.73 segundos	184.8 ± 18.71 segundos	187.1 ± 10.98 segundos	182.9 ± 11.17 segundos
Número de cruces			
15.80 ± 2.25 cruces	16.00 ± 1.59 cruces	17.25 ± 3.22 cruces	20.25 ± 4.58 cruces

Los datos representan la media ± ESM de 5 ratones por grupo. Prueba de U de Mann-Whitney $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. (ANOVA Kruskal-Wallis, Latencia entrada: $H_{(3,27)} = 0.5713$, $P = 0.903$; Tiempo en luz: $H_{(3,27)} = 0.423$, $P = 0.738$; Tiempo en oscuridad: $H_{(3,27)} = 0.4603$, $P = 0.713$; Número cruces: $H_{(3,27)} = 0.3521$, $P = 0.788$).

La media de cada grupo ± ESM se encuentra en la tabla 6. Estos resultados indican que la inyección estriatal con AQ no altera la conducta de ansiedad en ratones WT ni TLR4-KO.

Continuando con las evaluaciones conductuales, en el mismo grupo de ratones evaluados en la prueba de ansiedad, se midió la coordinación motriz mediante dos pruebas. Los ratones WT inyectados con AQ no mostraron cambios significativos

en el puntaje obtenido en comparación con los ratones WT inyectados con SSI. De igual forma, los ratones TLR4-KO inyectados con AQ no presentaron cambios significativos en el puntaje obtenido en comparación con los ratones TLR4-KO inyectados con SSI. Al día siguiente se analizó la marcha de los ratones. Obteniendo impresiones de las patas, se midió la distancia de zancada de: pata delantera derecha, pata delantera izquierda, pata trasera derecha y pata trasera izquierda (Ningún cambio significativo se observó en la distancia de zancada entre los ratones WT inyectados con AQ y WT inyectados con SSI, así como entre los ratones TLR4-KO inyectados con AQ y TLR4-KO con SSI. La media de cada grupo \pm el ESM se encuentran en la tabla 7. Estos resultados indican que la inyección estriatal con AQ no altera la coordinación de los ratones WT ni TLR4-KO.

Tabla 7. Valores promedio en la coordinación motora modelo inyección de AQ.

WT + SSI	TLR4-KO + SSI	WT + AQ	TLR4-KO + AQ
Puntaje malla invertida			
2.4 \pm 0.24	2.5 \pm 0.22	2.14 \pm 0.26	1.714 \pm 0.18
Distancia de zanca pata delantera derecha			
6.4 \pm 0.16 cm	6.8 \pm 0.25 cm	6.37 \pm 0.14 cm	6.34 \pm 0.16 cm
Distancia de zanca pata delantera izquierda			
6.44 \pm 0.13 cm	6.83 \pm 0.23 cm	6.5 \pm 0.14 cm	6.33 \pm 0.18 cm
Distancia de zanca pata trasera derecha			
6.46 \pm 0.18 cm	6.93 \pm 0.12 cm	6.19 \pm 0.17 cm	6.3 \pm 0.33 cm
Distancia de zanca pata trasera izquierda			
6.32 \pm 0.20 cm	6.87 \pm 0.18 cm	6.31 \pm 0.18 cm	6.36 \pm 0.24 cm

Los datos representan la media \pm ESM de 5 ratones por grupo. Prueba de U de Mann-Whitney $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. (ANOVA Kruskal-Wallis, Puntaje malla invertida: $H_{(3,27)} = 6.030$, $P = 0.110$; Zanca delantera derecha: $H_{(3,27)} = 0.6107$, $P = 0.616$; Zancada delantera izquierda: $H_{(3,27)} = 0.6107$, $P = 0.833$; Zanca trasera derecha: $H_{(3,27)} = 0.432$, $P = 0.130$; Zanca trasera izquierda: $H_{(3,27)} = 0.5065$, $P = 0.205$).

5.3. La ausencia del TLR4 disminuye el daño neuronal después de la inyección estriatal con AQ

Para evaluar si el TLR4 contribuye al daño neuronal después de la inyección con AQ, grupos independientes de ratones TLR4-KO y WT fueron inyectados

estriatalmente con AQ. Tres días después de la inyección con AQ, se realizó la tinción de fluoro-jade B para determinar neurodegeneración (Fig. 10A, B, C, D y F). Los ratones WT inyectados con QA presentaron un mayor número de células positivas a fluoro-jade B en comparación con los ratones WT inyectados con SSI. De igual modo los ratones TLR4-KO inyectados con AQ presentaron un mayor número de células positivas en comparación con los ratones TLR4-KO inyectados con SSI. De manera interesante los ratones TLR4-KO inyectados con AQ presentaron un menor número de células positivas que los ratones WT inyectados con ese compuesto. Para confirmar la contribución del TLR4 en el daño neuronal inducido por AQ, en el grupo de ratones que fueron usados para evaluar los giros ipsilaterales se determinaron los niveles de GABA estriatal por HPLC (Fig. 10G), al día siguiente de la evaluación conductual. Los ratones WT inyectados con AQ presentaron una menor concentración de GABA estriatal respecto a los ratones WT inyectados con SSI. Los ratones TLR4-KO inyectados con AQ no mostraron diferencia significativa con los ratones TLR4-KO inyectados con SSI. Estos resultados muestran que la ausencia del TLR4 reduce el daño neuronal inducido por la inyección estriatal de AQ en ratones.

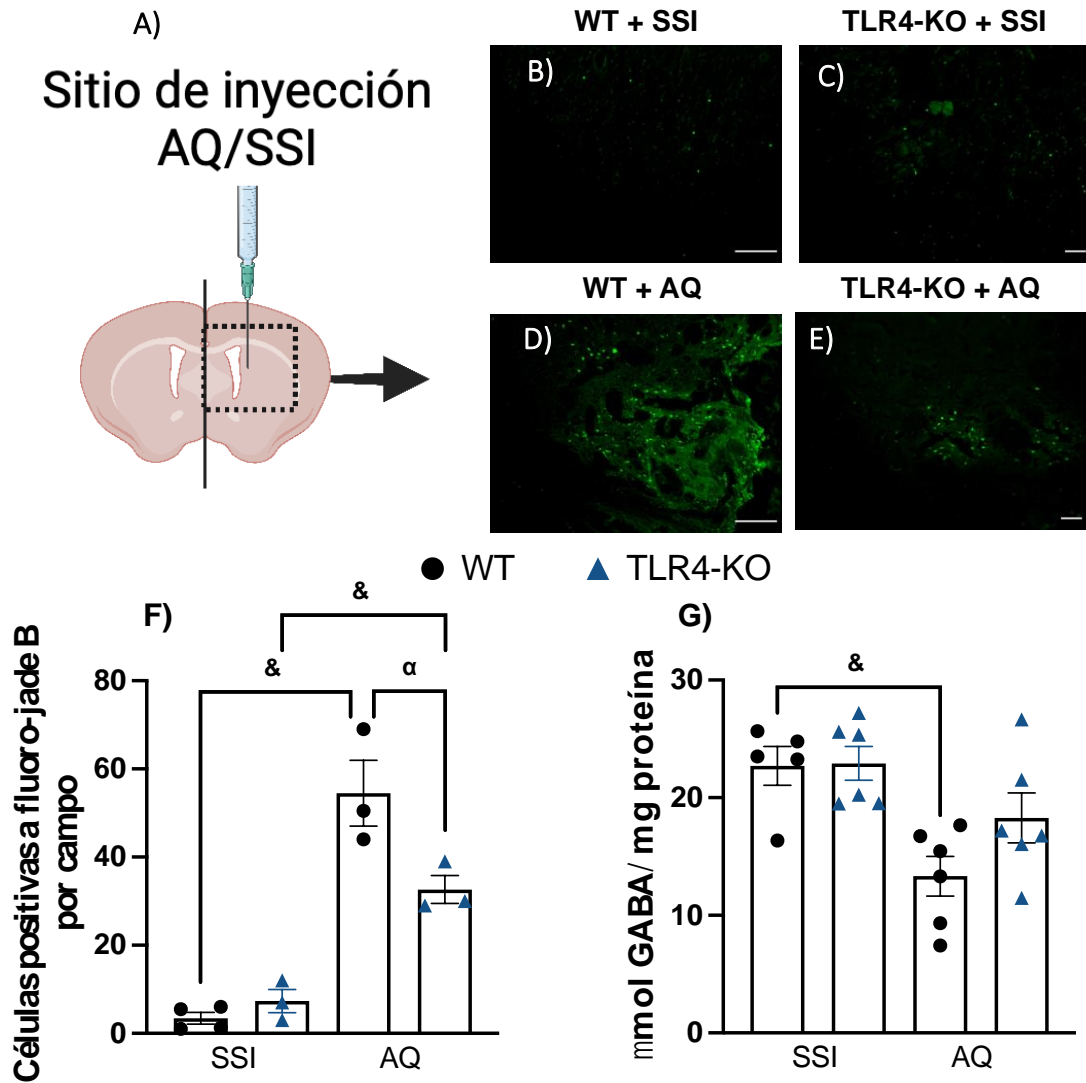


Figura 10. La ausencia del TLR4 reduce el daño neuronal en ratones inyectados estriatalmente con AQ. Ratones TLR4-KO y WT fueron inyectados en el estriado derecho con 1 μ L de AQ (30 nmol/ μ L) o 1 μ L de SSI. A) Esquema representativo del corte coronal del sitio lesionado. B y C) Imágenes representativas de los cortes coronales estriatales teñidos con fluoro-jade inyectados con SSI, D y E) imágenes representativas de estriado inyectados AQ, observados a 20x. F) número de células positivas a fluoro-jade B por campo. G) Muestra la concentración de GABA estriatal por HPLC. Los datos representan la media \pm ESM de 3-6 ratones por grupo. Prueba de Tukey $^{\&}$ P<0.05 vs SSI, $^{\alpha}$ P<0.05 vs TLR4-KO (ANOVA de una vía, Células positivas a fluoro-jade B: F (3,9) = 36.08, P<0.001; μ mol GABA: F(3,9) = 6.713, P=0.003).

5.4. La ausencia del TLR4 disminuye el daño oxidante después de la inyección estriatal con AQ

Para determinar si el TLR4 contribuye al daño oxidante después de la inyección estriatal de AQ, ratones TLR4-KO y WT fueron inyectados estriatalmente con AQ (Fig. 11A). Los ratones WT inyectados con AQ presentaron una mayor formación de ERO que los ratones WT inyectados con SSI. El mismo efecto se observó en los ratones TLR4-KO inyectados con AQ en comparación con los TLR4-KO inyectados con SSI. Ninguna diferencia significativa se observó entre los ratones WT y TLR4-KO inyectados con AQ. En el mismo tejido estriatal homogeneizado, se midió la cantidad de lípidos peroxidados (Fig. 11B). Los ratones WT inyectados con AQ aumentaron la cantidad de lípidos peroxidados en comparación con los ratones WT inyectados con SSI. En los ratones TLR4-KO inyectados con AQ de igual forma se observó un aumento en la cantidad de lípidos peroxidados en comparación con los ratones TLR4-KO inyectados con SSI. Algo interesante es que los niveles de lípidos peroxidados en los ratones TLR4-KO inyectados con AQ fue menor que el de los ratones WT inyectados con AQ (2.45 ± 0.21 vs 3.93 ± 0.29 U.F.). Estos resultados muestran que la ausencia del TLR4 disminuye la peroxidación de lípidos de manera independiente a la formación de ERO en ratones inyectados estriatalmente con AQ.

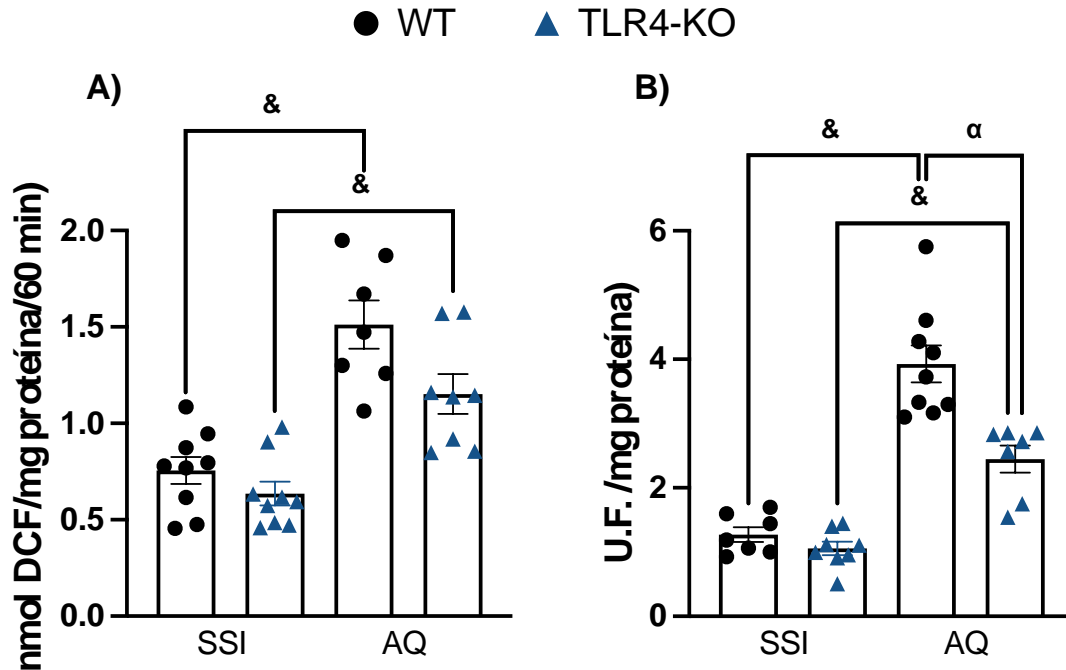
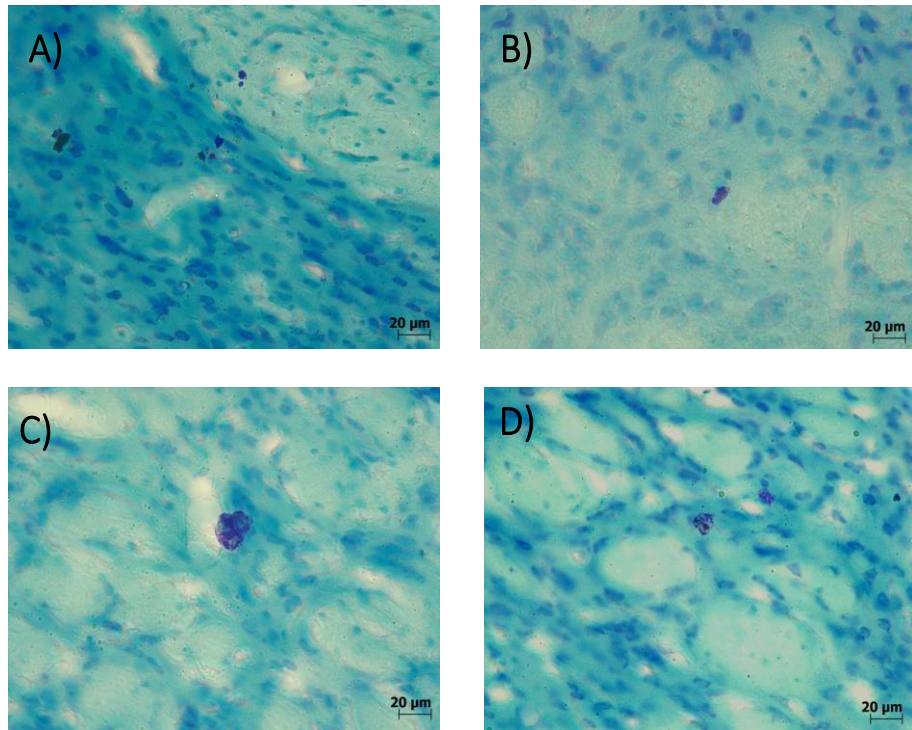


Figura 11. La ausencia del TLR4 reduce el daño oxidante en ratones inyectados estriatalmente con AQ. Ratones TLR4-KO y WT fueron inyectados en el estriado derecho con 1 μ L de AQ (30 nmol/ μ L) o 1 μ L de SSI (como control de ausencia de daño). Dos horas después de la inyección con AQ, se midió: A) formación de especies reactivas de oxígeno y B) peroxidación de lípidos en el estriado. Los datos representan la media \pm ESM de 7-9 ratones por grupo. Prueba de Tukey [&]P<0.05 vs SSI, ^αP<0.05 vs TLR4-KO (ANOVA de una vía, nmol DCF: F (3,33) = 21.03, P<0.001; U.F.: F(3,9) = 25.50, P<0.001).

5.5. La ausencia del TLR4 en las células cebadas no modifica el daño inducido por la inyección estriatal de AQ

Para determinar la participación del TLR4 presente en las CC en el daño ocasionado por la inyección estriatal con AQ, se realizó la reconstitución estriatal de ratones carentes de CC (Wsh) con CC derivadas de médula ósea (BMMC) de ratones WT o TLR4-KO y se evaluó el éxito de la reconstitución. Las BMMC fueron inyectadas i.c.v. y las CC se cuantificaron dos semanas después de la inyección. Se utilizaron ratones WT como referencia del número normal de CC presentes en el estriado de ratones (Fig. 12).



- E)
- WT
 - Wsh + BMMCs WT
 - Wsh
 - Wsh + BMMCs TLR4-KO

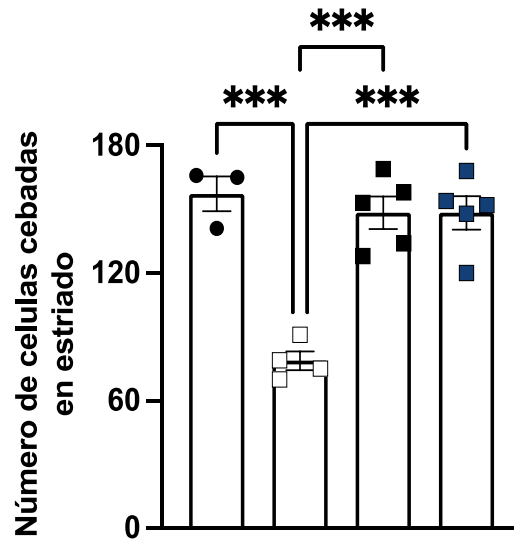


Figura 12. Reconstitución de las CC en el cerebro de ratones Wsh. Imágenes representativas de las rebanadas de estriado, A) WT, B) Wsh, C) Wsh + BMMC WT y D) Wsh + BMMC TLR4-KO, E) el número de CC fue determinado en todo el estriado de los ratones de manera bilateral. Los datos representan la media \pm ESM de 3-5 ratones por grupo. Prueba de Tukey *** $P < 0.05$ vs Wsh (ANOVA de una vía, Número de células cebadas: $F(3,13) = 22.70$, $P = 0.822$).

Dos semanas después de la inyección i.c.v. de BMMC WT o TLR4-KO, se obtuvieron cortes coronales del estriado de los ratones y se realizó tinción de azul de toluidina para identificar las CC. Los ratones Wsh presentaron un menor número de CC que los ratones WT. Cuando los ratones Wsh fueron reconstituidos con BMMC WT, el número de CC se incrementó en comparación con los ratones Wsh. De igual forma, en los ratones Wsh reconstituidos con BMMC TLR4-KO se observó un incremento en el número de CC en el estriado en comparación con los ratones Wsh. Ninguna diferencia significativa entre el número de CC en el estriado fue observada entre los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT y TLR4-KO, así como con los ratones WT. Estos resultados indican que la ausencia del TLR4, no afecta la capacidad de las CC para establecerse en el estriado de los ratones Wsh. Para determinar la participación del TLR4 presente en las células cebadas en el daño ocasionado por la inyección estriatal con AQ, ratones Wsh y ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT o TLR4-KO fueron inyectados estriatalmente con AQ. Tres días después de la administración del AQ, se administró apomorfina i.p. para inducir los giros ipsilaterales, los giros fueron contados durante 60 minutos (Fig. 13A). Los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT inyectados con AQ presentaron un mayor número de giros ipsilaterales que los ratones Wsh inyectados con AQ. De igual forma, los ratones Wsh reconstituidos con BMMC TLR4-KO e inyectados con AQ presentaron un mayor número de giros ipsilaterales que los ratones Wsh inyectados con AQ. No se encontró ninguna diferencia significativa en el número de giros ipsilaterales entre los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT o TLR4-KO inyectados con AQ. En un grupo independiente de ratones, dos horas después de la inyección con AQ, fue cuantificada la formación de ERO en el estriado usando DCFH-DA (Fig. 13B). Los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT inyectados con AQ presentaron una mayor formación de ROS que los ratones Wsh inyectados con AQ. De igual forma, los ratones Wsh reconstituidos con BMMC TLR4-KO e inyectados con AQ presentaron una mayor formación de ERO que los ratones Wsh inyectados con AQ. No se encontró ninguna diferencia significativa en la formación de ERO entre los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT o TLR4-

KO inyectados con AQ. En las mismas muestras de tejido estriatal homogenizado, se midió la cantidad de lípidos peroxidados (Fig. 13C). Los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT inyectados con AQ presentaron una mayor cantidad de lípidos peroxidados que los ratones Wsh inyectados con AQ. De igual forma, los ratones Wsh reconstituidos con BMMC TLR4-KO e inyectados con AQ presentaron una mayor cantidad de lípidos peroxidados que los ratones Wsh inyectados con AQ. No se encontró ninguna diferencia significativa en la cantidad de lípidos peroxidados entre los ratones Wsh reconstituidos con BMMC WT o TLR4-KO inyectados con AQ. Estos resultados indican que no es necesario el TLR4 en CC para establecer el daño inducido por la inyección estriatal de AQ en ratones Wsh.

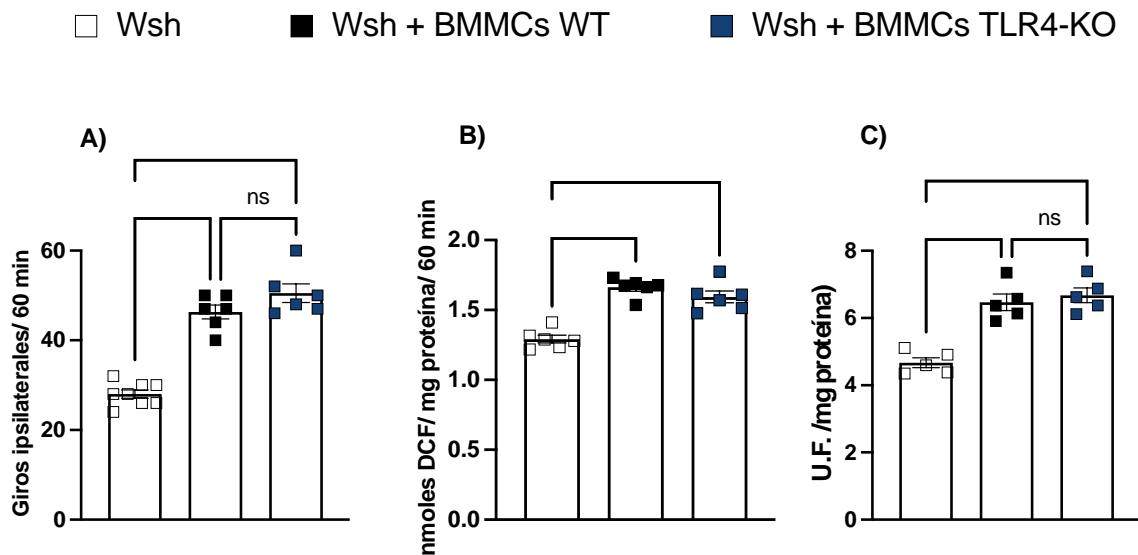


Figura 13. La ausencia del TLR4 en CC no modifica los giros ipsilaterales y daño oxidante en ratones inyectados estriatalmente con AQ. Ratones Wsh (carentes de células cebadas), fueron reconstituidos i.c.v. con células cebadas derivadas de medula ósea (BMMC) obtenidas de ratones WT (BMMC WT) o BMMC obtenidas de ratones TLR4-KO (BMMC TLR4-KO), dos semanas después fueron inyectados en el estriado derecho con 1 μ L de AQ (30 nmol/ μ L) o 1 μ L de SSI (como control de ausencia de daño). A) Tres días después de la administración del AQ, se administró apomorfina i.p. para inducir los giros ipsilaterales, los giros fueron contados durante 60 minutos. Dos horas después de la inyección con AQ en un grupo independiente de ratones se midió: B) formación de especies reactivas de oxígeno y C) peroxidación de lípidos en el estriado. Prueba de U de Mann-Whitney *** $P < 0.05$ vs Wsh. (ANOVA Kruskal-Wallis, Giros ipsilaterales: $H(2,17) = 9.02$, $P < 0.001$). Prueba de Tukey *** $P < 0.05$ vs Wsh (ANOVA de una vía, nmoles DCF: $F(2,15) = 27.95$, $P < 0.001$; U.F.: $F(2,15) = 34.87$, $P < 0.001$).

5.6. El TLR4 participa en la ganancia de peso corporal en ratones R6/1

Para probar si el TLR4 participa en la aparición del fenotipo característico de los ratones transgénicos de la EH (R6/1), ratones R6/1 y TLR4-KO fueron apareados, los ratones obtenidos de dicha cruce dieron como resultado dos grupos de ratones, ambos heterocigotos para el TLR4 y con el gen humano de la HD (mHtt) y sin él, estos grupos de ratones fueron nombrados como TLR4-Het/mHtt y TLR4-Het, respectivamente. Estos ratones fueron evaluados semanalmente desde la semana 15 a 25 de edad, y como referencia del fenotipo de cada uno se evaluaron a la par ratones R6/1 y TLR4-KO, así como los respectivos fondos genéticos B6 y C-57 respectivamente, únicamente los ratones macho de los diferentes grupos fueron evaluados.

El primer rasgo fenotípico evaluado fue la ganancia de peso corporal (Fig. 14). La prueba de ANOVA de dos vías reveló una interacción estadísticamente significativa entre el fondo genético de los grupos y la semana de evaluación ($F_{3,330} = 6.29$, $P = 0.0523$; Ceba $F_{3,330} = 15.09$, $P < 0.0001$; Tiempo $F_{3,330} = 21.90$, $P < 0.0001$) en la ganancia del peso corporal. El análisis post hoc mostró que el peso corporal de los ratones TLR4-KO, R6/1 y TLR4-Het/mHtt es diferente respecto al grupo C-57/B6. Así mismo el peso corporal de los ratones TLR4-Het/mHtt fue diferente respecto al grupo R6/1. Este resultado indica que el TLR4 tiene un papel en la ganancia del peso corporal en los ratones R6/1.

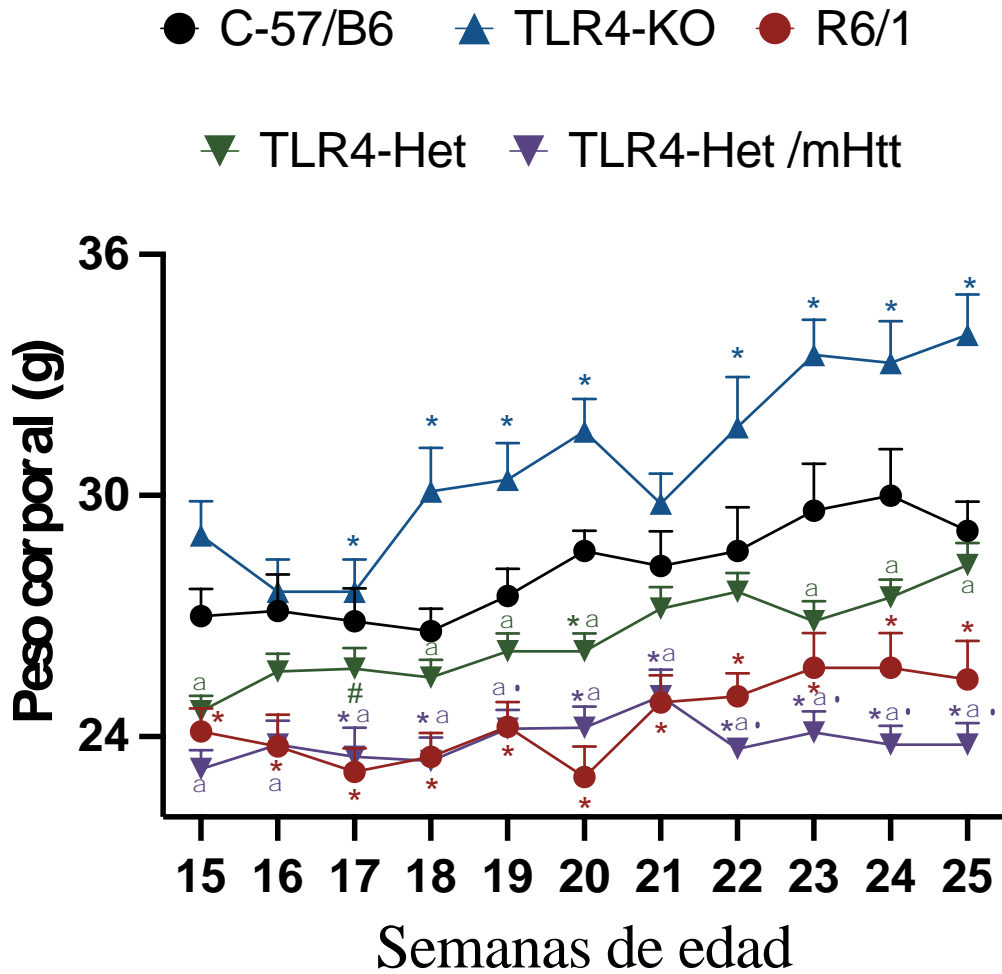


Figura 14. Efecto del TLR4 en la ganancia de peso corporal en ratones R6/1. Ratones R6/1 y TLR4-KO fueron puestos en cruce, los ratones obtenidos de la cruce (TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt) fueron pesados semanalmente. Como controles se usaron ratones R6/1 y TLR4-KO así como sus correspondientes fondos genéticos B6 y C-57 respectivamente. Los datos representan la media \pm ESM de 8-16 ratones por grupo. ANOVA de dos vías seguida de Tukey post hoc. $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. * Vs C-57/B6, α vs TLR4-KO, # vs R6/1, and \cdot vs TLR4-Het.

5.7. El TLR4 participa en la coordinación motora de los ratones R6/1

La segunda característica fenotípica evaluada fue la coordinación motora usando la prueba de rotarod (Fig. 15). La prueba de ANOVA de dos vías no reveló alguna interacción estadísticamente significativa entre el fondo genético de los grupos y la semana de evaluación ($F_{3,330} = 0.7276$, $P = 0.1433$; Ceba $F_{3,330} = 5.234$, $P = 0.0045$; Tiempo $F_{3,330} = 5.894$, $P = 0.0028$) en el tiempo en que los ratones caían del rotor. El análisis post hoc mostró que el tiempo en el rotor de los ratones TLR4-KO y R6/1 es diferente que el grupo C-57/B6. Al analizar la velocidad, la prueba de ANOVA de dos vías no reveló alguna interacción estadísticamente significativa entre el fondo genético de los grupos y la semana de evaluación ($F_{3,330} = 2.255$, $P = 0.0656$; Ceba $F_{3,330} = 4.718$, $P = 0.0025$; Tiempo $F_{3,330} = 14.37$, $P < 0.0001$). El análisis post hoc mostró que los ratones TLR4-KO y R6/1 fueron diferentes que el grupo C-57/B6, de igual forma la velocidad de caída de los ratones TLR4-Het/mHtt fue diferente del grupo R6/1. Estos resultados muestran que el TLR4 está involucrado en la coordinación motora de los ratones R6/1.

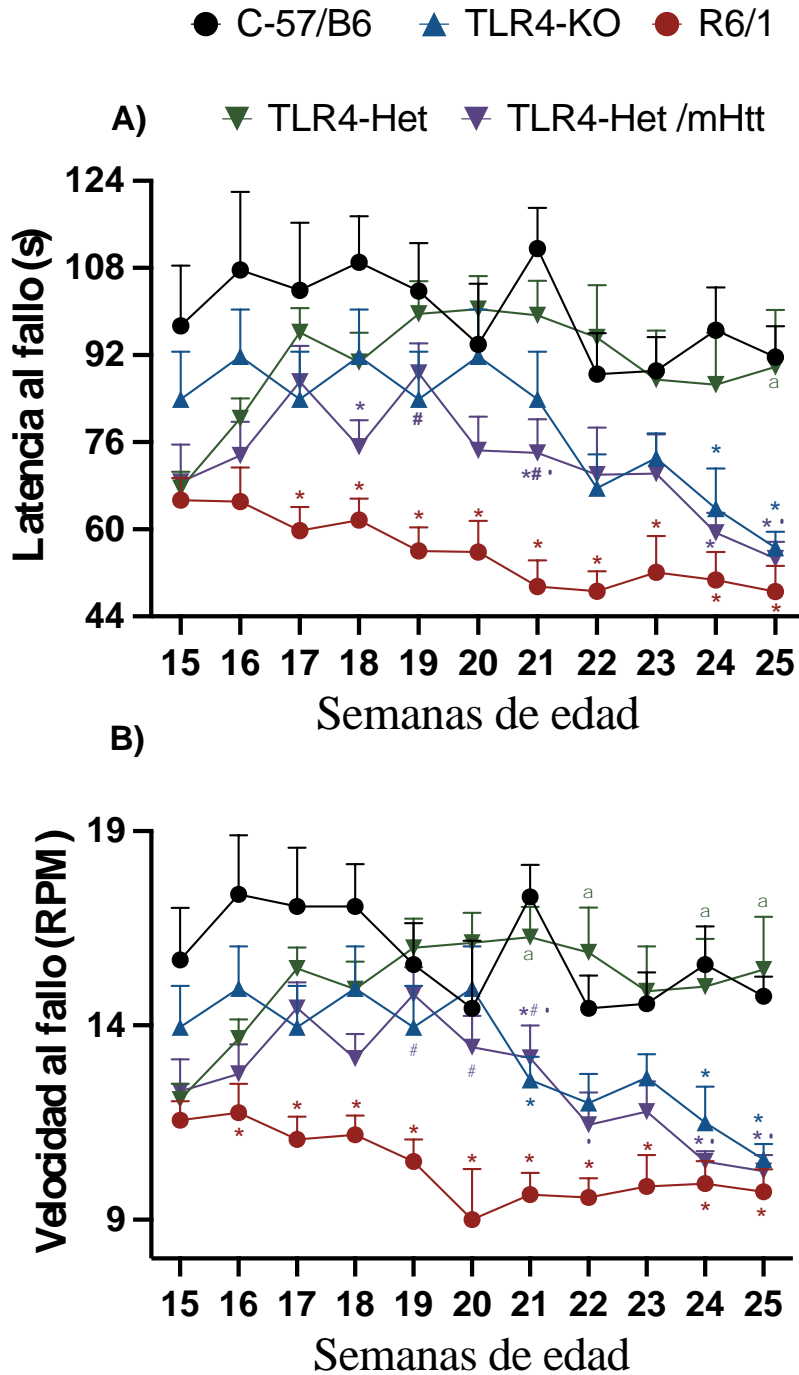


Figura 15. Efecto del TLR4 en la coordinación motora en ratones R6/1. Ratones R6/1 y TLR4-KO fueron puestos en cruce, los ratones obtenidos de la cruce (TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt) fueron evaluados semanalmente en la prueba de rotarod desde la semana 15 a 25 de edad. Como controles se usaron ratones R6/1 y TLR4-KO así como sus correspondientes fondos genéticos B6 y C-57 respectivamente. A) Tiempo de caída del rotor y B) velocidad en RPM fueron registrados por cada ratón. Los datos representan la media \pm ESM de 8-16 ratones por grupo. ANOVA de dos vías seguida de Tukey post hoc. $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. * vs C-57/B6, α vs TLR4-KO, # vs R6/1, and \cdot vs TLR4-Het.

5.8. El TLR4 participa en la conducta de feet clasping en los ratones R6/1

La última característica fenotípica evaluada fue la conducta de *feet clasping* (Fig. 16). La prueba de ANOVA de dos vías reveló una interacción estadísticamente significativa entre el fondo genético de los grupos y la semana de evaluación ($F_{3,330} = 0.7276$, $p < 0.0001$; Ceba $F_{3,330} = 85.24$, $p < 0.0001$; $F_{3,330} = 26.30$, $p < 0.0001$) en la escala de feet clasping. El análisis post hoc mostró que la escala de feet clasping de los ratones TLR4-KO, R6/1, TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt es diferente que el grupo C-57/B6. Así mismo la escala de feet clasping de los ratones TLR4-Het/mHtt fue diferente al del grupo R6/1. Estos resultados muestran que el TLR4 participa en la aparición de la conducta de *feet clasping* en ratones.

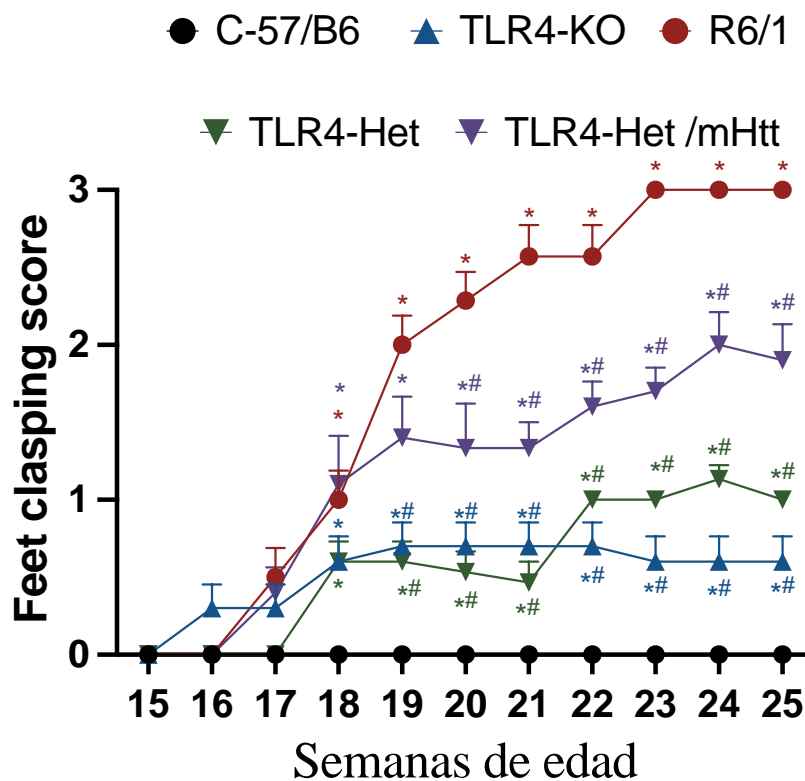


Figura 16. Efecto del TLR4 en la conducta de feet clasping en ratones R6/1. Ratones R6/1 y TLR4-KO fueron puestos en cruce, los ratones obtenidos de la cruce (TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt) fueron evaluados semanalmente desde la semana 15 a 25 de edad. Los datos representan la media \pm ESM de 8-16 ratones por grupo. ANOVA de dos vías seguida de Tukey post hoc test $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo. * vs C-57/B6, $^{\alpha}$ vs TLR4-KO, # vs R6/1, and · vs TLR4-Het.

6. Discusión

En este trabajo se evaluó la participación del receptor Toll-like 4 en las manifestaciones observadas en dos modelos de la EH. En el modelo de inyección estriatal de AQ, la administración estriatal de AQ no genera cambios en la conducta de ansiedad y coordinación motriz en el ratón. Sin embargo, sí ocasiona modificaciones a la actividad locomotora, el daño neuronal y la peroxidación de lípidos. En esos efectos, participa el receptor TLR4, ya que su ausencia disminuye los daños ocasionados por el AQ. A pesar de la participación de las CC en el modelo neuroquímico de la EH, la ausencia específica del TLR4 en las CC del estriado no tiene un efecto importante en el daño ocasionado por el AQ. Finalmente, la menor expresión del TLR4 modifica la aparición y desarrollo de manifestaciones fenotípicas (ganancia de peso corporal, coordinación motora y conducta de feet clasping) en el modelo transgénico de la EH (línea R6/1 de ratones).

6.1. Efecto de la ausencia del TLR4 en la actividad locomotora en el modelo de inyección de AQ

Los resultados de este trabajo muestran una disminución en el número de giros ipsilaterales en los ratones TLR4-KO en comparación con los ratones WT después de la inyección de AQ. La lesión unilateral con AQ es uno de los modelos más usados para estudiar alteraciones relacionadas con la EH (Sanberg et al., 1989). Este modelo permite el estudio de cambios en la actividad locomotora, como lo son los giros inducidos por la administración de apomorfina después de la lesión con AQ (Marrannes & Wauquier, 1988). La apomorfina activa la vía indirecta de los ganglios basales, la cual regula el paro de los movimientos voluntarios (Costaix et al., 1979). Noelker y colaboradores reportaron que los ratones TLR4-KO tienen mayores niveles de dopamina en el estriado y más células positivas a la tirosina hidroxilasa (TH, enzima limitante para la síntesis de dopamina) en comparación con los ratones WT (Noelker et al., 2013). Este hecho nos condujo a la hipótesis de que los ratones TLR4-KO podrían presentar más giros ipsilaterales, sin embargo, se

observó el efecto contrario. En el modelo de inyección estriatal con AQ, la disminución en el número de giros ipsilaterales obtenida por un tratamiento suele interpretarse como una señal de neuroprotección (Régulier et al., 2002), dado que la capacidad de cualquier tratamiento para permitir la disminución de esta alteración en este modelo experimental puede ayudar a disminuir los síntomas locomotores presentes en la EH. Hasta el momento de la realización de este proyecto, no existían reportes de cambios en la prueba de campo abierto después de la inyección con AQ en ratones, sin embargo, los resultados muestran una disminución en la actividad locomotora medida en la prueba de campo abierto. No obstante, Shear y colaboradores reportaron que ratas inyectadas con AQ en el estriado de manera bilateral lleva a un aumento en la actividad locomotora evaluada en la prueba de campo abierto dos y cuatro semanas después de la inyección con AQ y realizando la prueba en el ciclo nocturno de las ratas (Shear et al., 1998). Esto sugiere que factores como la especie (ratón o rata), el ciclo circadiano de evaluación (día o noche), tipo de lesión (unilateral o bilateral) y tiempo de evaluación después de la inyección de AQ (días o semanas) pueden afectar de manera diferencial la actividad locomotora espontánea. Este efecto observado en los ratones TLR4-KO después de la inyección estriatal de AQ (disminución en la actividad locomotora) provee información nueva acerca de un posible efecto modulador del cerebro en la actividad locomotora a través del receptor TLR4, en respuesta a un daño como el inducido por el AQ.

6.2. La inyección de AQ en las conductas de ansiedad y coordinación en ratones.

Los resultados muestran que la inyección con AQ no tiene efectos en la conducta de ansiedad en ratones. La conducta de ansiedad está asociada con alteraciones de la vía de la kinurenina en el estriado (Lago et al., 2017; Savitz et al., 2015). Se ha observado que la inyección de AQ en el estriado de rata reduce el nivel de Nrf2 lo cual se asocia a depresión y ansiedad (Bansal et al., 2019), sin embargo, en nuestro estudio no se observó que la lesión tuviera efectos en la conducta de

ansiedad en la prueba de luz-oscuridad. Por otro lado, el daño estriatal se asocia con alteraciones en la coordinación (Graybiel et al., 1994) y la inyección bilateral de AQ en el cerebro de ratas ocasiona alteraciones en la coordinación motora medidas con la prueba de rotarod a los 7, 14 y 21 días después de la administración (Gill et al., 2017). No obstante, en nuestras pruebas no logramos detectar ningún cambio en dicha conducta. Las diferencias entre nuestros resultados y los reportados en ratas podrían explicarse porque se ha reportado que el estriado caudal de los ratones consta de tres regiones claramente diferenciadas (la región media, la intermedia y la lateral) y que estas regiones difieren en la densidad de neuronas espinosas medianas (MSN) del tipo D1 y del tipo D2 (Miyamoto et al., 2019). De manera particular, se sabe que las MSN del tipo D1 son las responsables del control del movimiento (Kravitz et al., 2012). El sitio en el que nosotros administramos el AQ pudo ser parte de la región intermedia, donde las neuronas MSN del tipo D1 son poco abundantes y, por lo tanto, la lesión no afectó significativamente las conductas motoras. Otra explicación podría estar relacionada con la compensación de uno de los hemisferios cerebrales en el control de la coordinación, la especie o el tiempo de evaluación ya que el trabajo de Gill et al., 2017 se administró de manera bilateral AQ en el estriado de ratas, observando cambios en la coordinación en la prueba de malla invertida a los 21 días posteriores a la lesión. Futuros estudios analizando cuidadosamente la zona de administración y el tipo de administración (bilateral) de ese compuesto, y observando la densidad de MSN tipo D1 en esa región, ayudarán a obtener una explicación más adecuada para nuestros resultados.

6.3. Efecto de la ausencia del TLR4 en el daño neuronal inducido por la administración estriatal de AQ.

Los resultados muestran una disminución en el número de células positivas a la tinción de fluoro-jade B (marcador de neurodegeneración) en los ratones TLR4-KO en comparación con los ratones C-57 después de la inyección con AQ. La inyección de AQ en el estriado lleva a una degeneración selectiva de las neuronas

GABAérgicas (Schwarcz et al., 2010). Está reportado que la inyección estriatal de AQ activa vías de necrosis y apoptosis en distintas células (Silva-Islas et al., 2022). Al respecto, diferentes grupos de trabajo han reportado una reducción en el daño neuronal en ratones TLR4-KO en modelos agudos de la EP inducida por la administración de MPTP, una neurotoxina específica para neuronas nigroestriatales dopaminérgicas (Campolo et al., 2019a; Mariucci et al., 2018) y en un modelo crónico de la EP inducido por MPTP y probenecid (agente que disminuye los niveles de ácido úrico y potencia la pérdida de neuronas dopaminérgicas por la MPTP) (Shao et al., 2019). Por otro lado, Noelker y colaboradores reportaron niveles menores del ácido homovanílico (el principal metabolito de la degradación de la dopamina) en ratones deficientes del TLR4 después de la administración de MPTP, lo cual es interpretado como un menor daño en las vías nigroestriatales (Noelker et al., 2013). Está reportado que la inyección de AQ conlleva a una disminución en el contenido de GABA en el estriado (Beal et al., 1986), sin embargo, los resultados muestran que los ratones TLR4-KO inyectados con AQ tienen mayores concentraciones de GABA en comparación con los ratones WT inyectados con AQ y al mismo tiempo no presentan diferencias significativas con el contenido de GABA en los ratones TLR4-KO inyectados con SSI. Esto sugiere que el TLR4 podría modular el contenido de GABA estriatal, lo cual concuerda con el trabajo realizado por Yan y colaboradores, donde observaron que la activación del TLR4 reduce los sistemas GABAérgicos a través de la supresión en la síntesis y liberación de GABA (Yan et al., 2015), pudiendo sugerirse que la ausencia del receptor module de manera más efectiva los niveles de GABA tras la lesión con AQ.

6.4. Ausencia del TLR4 en el daño oxidante en el modelo de inyección de AQ.

Los resultados muestran una disminución en el contenido de lípidos peroxidados en los ratones TLR4-KO inyectados con AQ en comparación con los ratones WT sometidos al mismo tratamiento. El daño oxidante generado por el AQ puede ser inducido por la activación del receptor NMDA llevando a eventos de excitotoxicidad, sin embargo, otros mecanismos, como la formación de reacción de Fenton

(formación de complejos con Fe^{++}), pueden incrementar la formación de ERO y lípidos peroxidados. Esta reacción es independiente de la activación del receptor NMDA (Bansal et al., 2019). Se ha reportado que la ausencia del TLR4 reduce la respuesta inflamatoria y daño oxidante en modelos de la EP (Campolo et al., 2019a; Noelker et al., 2013; Shao et al., 2019). Algunas células inmunológicas necesitan ERO para activar diferentes vías de señalización (Abg Abd Wahab et al., 2019). Gill y colaboradores reportaron que la inyección estriatal de AQ en ratas produce un incremento en citocinas proinflamatorias ($TNF-\alpha$, IL-6 e IL-1 β), niveles de nitritos y lípidos peroxidados (Gill et al., 2017; Kalonia et al., 2011). Así mismo, Park y colaboradores reportaron que el dominio TIR del TLR4 tiene una interacción directa con el dominio COOH de la Nox4, y que la activación del TLR4 por LPS lleva a un aumento de ERO y producción de $TNF-\alpha$ en células HEK293T (Park et al., 2004). Algunos reportes puntualizan que el sistema de NADPH oxidasa (Nox) es el principal productor de ERO en las células de mamíferos (Haslund-Vinding et al., 2017). Campolo y colaboradores reportaron que la deficiencia del TLR4 disminuye la producción de ERO después del tratamiento con MPTP en ratones (Campolo et al., 2019b). Por otro lado, todos los TLR pueden activar diferentes isoformas de la Nox, lo cual lleva a un aumento en la producción de ERO (Haslund-Vinding et al., 2017). Como se había mencionado antes, la capacidad del AQ en llevar a cabo la reacción de Fenton, abre la posibilidad de que existan cambios en la peroxidación de lípidos de manera independiente en la formación de ERO, lo cual indica que el TLR4 tiene un mecanismo de acción selectivo en respuesta al daño oxidante inducido por la inyección estriatal de AQ en ratones.

6.5. Ausencia del TLR4 en las células cebadas en el modelo de inyección de AQ.

Los resultados muestran que la ausencia del receptor TLR4 no modifica el papel de las CC en el daño neuroquímico inducido por la inyección de AQ. Previamente nuestro equipo de trabajo reportó que las CC presentes en el cerebro de los ratones contribuyen de manera significativa al el daño neuronal y bioquímico ocasionado

por la administración de AQ (Martínez-Gopar et al., 2022). Hasta el momento, no se sabe si las CC son activadas directamente por el AQ o por algún producto de las células dañadas por ese compuesto. Por ejemplo, existen evidencias indirectas de que la activación de las CC por el AQ dependería de receptores distintos a los de NMDA, dado que las CC del peritoneo de ratas no expresan las subunidades NR1, NR2A, NR2B y NR2C (Daeffler et al., 1999). Sin embargo, el fenotipo de las CC de la cavidad peritoneal es de tipo conectivo y hasta el momento no se ha definido si las CC residentes en el parénquima cerebral son similares a las del peritoneo. Por otro lado, las CC de distintos tejidos expresan al receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) (Sick et al., 2010) y se sabe, por medio de estudios de docking molecular, que ese receptor puede reconocer al AQ mediante su dominio VC1 (Bongarzone et al., 2017). Si bien la participación de las CC en el daño inducido por el AQ está claro (Martínez-Gopar et al., 2022), el receptor TLR4 no parece ser una molécula involucrada en la activación de ese tipo celular en el modelo neuroquímico de la EH. Otros receptores de la inmunidad innata expresados en las CC pudieran ser los responsables de la activación de esas células después de la administración del AQ, al reconocer no solamente a esa molécula, sino a DAMP producidos por células dañadas.

6.6. Participación del TLR4 en la ganancia de peso corporal de ratones R6/1.

En el análisis de la ganancia de peso corporal en animales adultos se encontraron varios resultados de particular interés. En primer lugar, aquellos animales carentes del receptor TLR4 tuvieron una ganancia de peso mayor a la registrada en animales WT. Esto concuerda con lo reportado por Barron et al., 2017, donde se mostró el mismo fenómeno. La razón de este aumento de peso fue analizada por Li y colaboradores, quienes reportaron que la depleción del TLR4 en neuronas dopaminérgicas de ratones incrementa el consumo de alimento, y, por lo tanto, el peso corporal (Li et al., 2021). En segundo lugar, los animales TLR4-Het mostraron una menor ganancia de peso en comparación a los TLR4-KO, lo que permite hipotetizar que la restitución parcial de la expresión del TLR4 permite la

regularización del consumo de alimento en los ratones. En tercer lugar, observamos que los ratones R6/1 tienen una muy pobre ganancia de peso en comparación a los animales WT, lo que concuerda con datos ya reportados por otros grupos de investigación que observaron el mismo fenómeno (García-Lara et al., 2018). La razón parece estar relacionada a que en los animales R6/1 existen alteraciones en las vías metabólicas de la síntesis de glicolípidos y gangliósidos (Desplats et al., 2007), así como en las del colesterol (González-Guevara et al., 2020). Finalmente, los resultados de la presente tesis muestran una disminución en la ganancia de peso corporal en los ratones TLR4-Het/mHtt en comparación con los ratones R6/1 a partir de la semana 22, lo que sugiere fuertemente que la expresión disminuida del receptor TLR4 aumenta el daño metabólico inducido por la expresión de la mHtt. Nuestros datos coinciden con los de Griffioen y colaboradores, quienes reportaron una reducción del peso corporal en los ratones N171-82Q (otro modelo genético de la EH) que eran heterocigotos para el TLR4 (Griffioen et al., 2018).

6.7. Participación del TLR4 en la coordinación motora de ratones R6/1

Los resultados muestran un retraso en la aparición de las alteraciones en la coordinación motora en los ratones TLR4-Het/mHtt en comparación con los ratones R6/1. Se sabe que una característica fenotípica de los ratones R6/1 es una disminución en la coordinación motora evaluado mediante la prueba de rotarod (Angeles-López et al., 2021). La coordinación motora es regulada por el cerebelo, el cual se encuentra en constante comunicación con el estriado y la corteza (Lalonde & Strazielle, 2011). Zhu y colaboradores reportaron que los ratones TLR4-KO tienen un menor número de neuronas en el cerebelo (específicamente las células de Purkinje), así como también tienen un mejor desempeño en la prueba de rotarod en comparación con ratones WT (Zhu et al., 2016), sin embargo en este trabajo se observó el efecto contrario (un peor desempeño en el rotarod), lo cual concuerda con lo reportado por Somensi y colaboradores quienes observan un peor desempeño en la coordinación motora de los ratones TLR4-KO (Somensi et al., 2021). La discrepancia entre nuestros datos y los de Zhu y colaboradores podría

deberse a que, en nuestro estudio, los ratones WT fueron generados y mantenidos en una colonia diferente a la de los TLR4-KO, mientras que los utilizados por el mencionado grupo de investigación provenían de la cruce de los TLR4-Het directamente. Por otro lado, en el estudio de Somensi, los ratones (tanto TLR4-KO como los WT) fueron generados a partir de una colonia generada y mantenida por cruces consanguíneas por un tiempo prolongado. Esto sugiere fuertemente que el fondo genético de las cepas pudiera tener una influencia en el papel del TLR4 en la coordinación motora y este es un aspecto en el que debe profundizarse estudios futuros.

6.8. Efecto del TLR4 en la conducta de feet clasping de ratones R6/1.

Los resultados de este trabajo muestran una disminución en la severidad de la conducta de feet clasping en los ratones TLR4-Het/mHtt en comparación con los ratones R6/1. La conducta de feet clasping es un parámetro fenotípico más de las alteraciones observables en los ratones R6/1 (García-Lara et al., 2018). La conducta del feet clasping se ha asociado con diferentes estructuras cerebrales como el estriado y el cerebelo (Lalonde & Strazielle, 2011). Zhu y colaboradores proponen que esta conducta en los ratones TLR4-KO se encuentra asociada a un menor número de células de Purkinje en el cerebelo (Zhu et al., 2016), lo cual podría explicar por qué los ratones TLR4-KO, TLR4-Het y TLR4-Het/mHtt expresan esta conducta. La presencia de la conducta de feet clasping en los ratones TLR4-KO sugiere que la menor expresión del TLR4 en los ratones R6/1 adelantaría y agravaría la conducta de feet clasping, sin embargo, el efecto contrario se observó, probablemente por un efecto neuromodulador del TLR4, ya que se ha reportado una interacción entre la neuroinflamación y algunos neurotransmisores (como glutamato, GABA y dopamina) en el estriado y cerebelo en la modulación de conductas motoras (Abg Abd Wahab et al., 2019). Yan y colaboradores reportan que el TLR4 atenúa la síntesis de GABA y la actividad postsináptica del receptor GABA en el cuerno de la raíz dorsal (Yan et al., 2015) y Noelker y colaboradores reportan que el TLR4 regula los niveles de dopamina en el estriado (Noelker et al.,

2013). Adicionalmente, algunos estudios reportan que el TLR4 en el SNC está involucrado en la memoria y el aprendizaje (Qiang et al., 2018), en el decline cognitivo (Lu et al., 2015), en la modulación de la neurogénesis en el cerebro en respuesta al daño (Ye et al., 2017) y en distintos eventos de neuroplasticidad (Lewitus et al., 2016). Por otro lado, la expresión de la mHtt ha sido relacionada con procesos de neuroinflamación y daño neuronal (Crotti et al., 2014). Un incremento en el daño celular puede llevar a una elevada producción de DAMP los cuales pueden activar al TLR4, amplificando los efectos deletéreos de la respuesta inflamatoria. La ausencia del TLR4 o su expresión reducida puede limitar la respuesta inflamatoria y el consiguiente daño neuronal.

7. Conclusiones

El TLR4 es un receptor de reconocimiento de patrones que se ha estudiado recientemente en trastornos neurodegenerativos. Este trabajo muestra, por primera vez, que ese receptor participa en el desarrollo de las manifestaciones fenotípicas de la EH en dos modelos murinos de ese padecimiento. El receptor TLR4 está involucrado en el daño neuronal inducido por la administración intraestriatal de AQ, así como en los cambios en la producción de ERO, peroxidación de lípidos y las alteraciones en los niveles de GABA observados ese modelo neuroquímico de la EH. Además, el TLR4 participa en la aparición del feet clasping en el modelo genético R6/1 de la EH. Finalmente, aunque existe evidencia de que las CC participan en la neuroinflamación observada en el modelo del AQ, no son activadas a través del TLR4. El presente trabajo contribuye a la caracterización celular y molecular de los fenómenos que subyacen al daño producido en la EH, sugiriendo que el receptor TLR4 podría ser usado como un blanco para el tratamiento de algunos síntomas de esa patología (Figura 17).

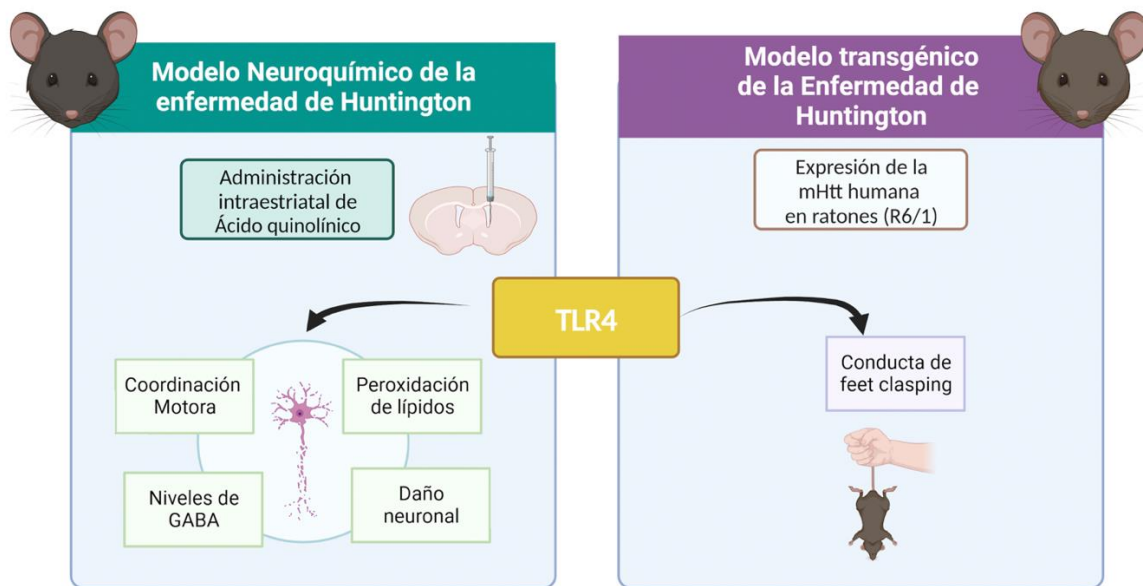


Figura 17. Conclusiones. El receptor TLR4 es una molécula central en la generación de daño por administración intraestriatal de AQ, así como en la manifestación de la conducta de feet-clasping en el modelo genético R6/1 de la EH. Imagen diseñada con Biorender.com

8. Perspectivas

- 1) Profundizar en el estudio de las distintas regiones del estriado afectadas en el modelo neuroquímico de la EH y la participación de las neuronas espinosas medianas D1 y D2 en los efectos motores de la administración unilateral del AQ.
- 2) Profundizar en el estudio del papel del TLR4 en la supresión de la síntesis y liberación de GABA en el estriado y otras estructuras cerebrales.
- 3) Analizar las vías de señalización que conectan la activación del receptor TLR4 con la peroxidación de lípidos de manera independiente a la formación de ERO, dado que no se ha reportado esa vía hasta el momento.
- 4) Caracterizar los mecanismos moleculares de activación de las CCs en el modelo de daño por AQ, dado que, aunque ese tipo celular participa en la manifestación del daño, el TLR4 no parece ser el receptor involucrado.

- 5) Identificar los principales tipos celulares en los cuales se activa el TLR4 y contribuye al daño neuronal después de la administración del AQ.
- 6) Evaluar la influencia del fondo genético de las cepas de los ratones en las funciones que el TLR4 tiene en la ganancia de peso y la coordinación motora en modelos murinos.
- 7) Evaluar la respuesta inflamatoria (síntesis de citocinas y otros mediadores inflamatorios) desencadenada por el TLR4 y averiguar si alguna citocina o mediador en particular contribuye de manera preponderante, a la manifestación de los síntomas de la EH, mediante antagonistas específicos.
- 8) Evaluar el efecto que un antagonista farmacológico del receptor TLR4 tiene sobre las manifestaciones fenotípicas de la EH en el modelo del AQ y el modelo R6/1.

9. Bibliografía

- Abg Abd Wahab, D. Y., Gau, C. H., Zakaria, R., Muthu Karuppan, M. K., A-Rahbi, B. S., Abdullah, Z., Alrafiah, A., Abdullah, J. M., & Muthuraju, S. (2019). Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the Mediation of Motor Behaviour. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). <https://doi.org/10.1155/2019/1767203>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 4, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Alfredo Silva-Islas, C., Velasco Suarez Ricardo Alberto Santana-Martinez, M., Velasco Suarez Juan Carlos León-Contreras, M., Barrera-Oviedo, D., Pedraza-Chaverri, J., Hernandez-Pando, R., & Maldonado, P. (2022). *Quinolinic acid induces alterations in neuronal subcellular compartments, blocks autophagy ux and activates necroptosis and apoptosis in rat striatum.* <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1443129/v1>

- Amor, S., & Woodroffe, M. N. (2014). Innate and adaptive immune responses in neurodegeneration and repair. In *Immunology* (Vol. 141, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/imm.12134>
- Anders, H. J., & Schaefer, L. (2014). Beyond tissue injury - Damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. In *Journal of the American Society of Nephrology* (Vol. 25, Issue 7). <https://doi.org/10.1681/ASN.2014010117>
- Angeles-López, Q. D., García-Lara, L., Aguirre-Pineda, N., Castañeda-Arellano, R., Elizondo-Azuela, G., Pérez-Severiano, F., & Segovia, J. (2021). The absence of the aryl hydrocarbon receptor in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease improves the neurological phenotype. *Behavioural Brain Research*, 408. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113230>
- Bansal, Y., Singh, R., Parhar, I., Kuhad, A., & Soga, T. (2019). Quinolinic acid and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in depression: Role in neuroprogression. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 10, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00452>
- Barron, L. K., Bao, J. W., Aladegbami, B. G., Colasanti, J. J., Guo, J., Erwin, C. R., & Warner, B. W. (2017). Toll-like receptor 4 is critical for the development of resection-associated hepatic steatosis. *Journal of Pediatric Surgery*, 52(6). <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.03.026>
- Beal, M. F. (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Annals of Neurology*, 31(2). <https://doi.org/10.1002/ana.410310202>
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J., & Martin, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, 321(6066). <https://doi.org/10.1038/321168a0>
- Becher, B., Fedorowicz, V., & Antel, J. P. (1996). Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system- derived microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 45(4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960815\)45:4<375::AID-JNR6>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960815)45:4<375::AID-JNR6>3.0.CO;2-6)

- Bennett, J. L., Blanchet, M.-R., Zhao, L., Zbytnuik, L., Antignano, F., Gold, M., Kubes, P., & McNagny, K. M. (2009). Bone Marrow-Derived Mast Cells Accumulate in the Central Nervous System During Inflammation but Are Dispensable for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 182(9). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801485>
- Blank, U., & Rivera, J. (2004). The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. In *Trends in Immunology* (Vol. 25, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.005>
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nrn2038>
- Bongarzone, S., Savickas, V., Luzi, F., & Gee, A. D. (2017). Targeting the Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE): A Medicinal Chemistry Perspective. In *Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 60, Issue 17). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00058>
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 463, Issues 1–3). [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3)
- Brennan, W. A., Bird, E. D., & Aprille, J. R. (1985). Regional Mitochondrial Respiratory Activity in Huntington's Disease Brain. *Journal of Neurochemistry*, 44(6). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1985.tb07192.x>
- Brouillet, E., Condé, F., Beal, M. F., & Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 59, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00005-2)
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M. K., Bird, E. D., & Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, 41(5). <https://doi.org/10.1002/ana.410410514>
- Browne, S. E., Ferrante, R. J., & Beal, M. F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathology*, 9(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00216.x>

- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 33, pp. 257–290). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112240>
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & Van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(11). <https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013>
- Butterworth, J., Yates, C. M., & Reynolds, G. P. (1985). Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and γ -glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *Journal of the Neurological Sciences*, 67(2). [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(85\)90112-1](https://doi.org/10.1016/0022-510X(85)90112-1)
- Campbell, I. L., Krucker, T., Steffensen, S., Akwa, Y., Powell, H. C., Lane, T., Carr, D. J., Gold, L. H., Henriksen, S. J., & Siggins, G. R. (1999). Structural and functional neuropathology in transgenic mice with CNS expression of IFN- α . *Brain Research*, 835(1). [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01328-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01328-1)
- Campolo, M., Paterniti, I., Siracusa, R., Filippone, A., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2019a). TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in Parkinson's diseases in vivo model. *Brain, Behavior, and Immunity*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.12.003>
- Campolo, M., Paterniti, I., Siracusa, R., Filippone, A., Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2019b). TLR4 absence reduces neuroinflammation and inflammasome activation in Parkinson's diseases in vivo model. *Brain, Behavior, and Immunity*, 76. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.12.003>
- Carta S., Castellani P., Delfino L, Tassi S, Venè R, Rubartelli A. (2009) *J Leukoc Biol.* 86(3):549-55. doi: 10.1189/jlb.1008598.
- Carter, R. J., Lione, L. A., Humby, T., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G. P., Dunnett, S. B., & Jennifer Morton, A. (1999). Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation.

- Journal of Neuroscience*, 19(8). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-08-03248.1999>
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, 13(4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4948>
- Choe, J., Kelker, M. S., & Wilson, I. A. (2005). Structural biology: Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309(5734). <https://doi.org/10.1126/science.1115253>
- Costaix, B., Naylor, R. J., & Nohria, V. (1979). Hyperactivity response to apomorphine and amphetamine in the mouse: the importance of the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31(1). <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1979.tb13494.x>
- Crotti, A., Benner, C., Kerman, B. E., Gosselin, D., Lagier-Tourenne, C., Zuccato, C., Cattaneo, E., Gage, F. H., Cleveland, D. W., & Glass, C. K. (2014). Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nature Neuroscience*, 17(4). <https://doi.org/10.1038/nn.3668>
- Daeffler, L., Nadra, K., Eichwald, V., Ohresser, S., & Landry, Y. (1999). Effect of NMDA receptor ligands on mast cell histamine release, a reappraisal. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 359(6). <https://doi.org/10.1007/PL00005384>
- Dahlin, J. S., & Hallgren, J. (2015). Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. In *Molecular Immunology* (Vol. 63, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.018>
- Dalpke, A. H., Schäfer, M. K.-H., Frey, M., Zimmermann, S., Tebbe, J., Weihe, E., & Heeg, K. (2002). Immunostimulatory CpG-DNA Activates Murine Microglia. *The Journal of Immunology*, 168(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.4854>
- Deacon, R. M. J. (2013). Measuring the strength of mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 76. <https://doi.org/10.3791/2610>

- Desplats, P. A., Denny, C. A., Kass, K. E., Gilmartin, T., Head, S. R., Sutcliffe, J. G., Seyfried, T. N., & Thomas, E. A. (2007). Glycolipid and ganglioside metabolism imbalances in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 27(3). <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.05.003>
- Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H., Wang, R-F. (2022). Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Frontiers in Immunology*. 13:81274. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>
- Eltzschig, H. K., & Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. *New England Journal of Medicine*, 364(7). <https://doi.org/10.1056/nejmra0910283>
- Ferrante, R. J. (2009). Mouse models of Huntington's disease and methodological considerations for therapeutic trials. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1792, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.04.001>
- Fleshner, M. (2013). Stress-evoked sterile inflammation, danger associated molecular patterns (dAMPs), microbial associated molecular patterns (MAMPs) and the inflammasome. *Brain Behavior Immunology* 27(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.08.012>
- Frenkel, D., Trudler, D., & Farfara, D. (2010). Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: Towards future therapeutic application. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2010). <https://doi.org/10.1155/2010/497987>
- García-Lara, L., Morales-Martínez, A., Angeles-López, Q. D., Pedraza-Espitia, H., Pérez-Neri, I., Rodríguez-Balderas, C. A., & Pérez-Severiano, F. (2018). Establishment and maintenance of an R6/1 transgenic mouse colony and validation of its progressive neurological phenotype to study huntington's disease. *Veterinaria Mexico*, 5(1). <https://doi.org/10.21753/vmoa.5.1.487>
- García-Lara, L., Pérez-Severiano, F., González-Esquivel, D., Elizondo, G., & Segovia, J. (2015). Absence of aryl hydrocarbon receptors increases endogenous kynurenic acid levels and protects mouse brain against excitotoxic insult and oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, 93(9). <https://doi.org/10.1002/jnr.23595>

- Gentek, R., Ghigo, C., Hoeffel, G., Bulle, M. J., Msallam, R., Gautier, G., Launay, P., Chen, J., Ginhoux, F., & Bajénoff, M. (2018). Hemogenic Endothelial Fate Mapping Reveals Dual Developmental Origin of Mast Cells. *Immunity*, *48*(6). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.025>
- Gill, J. S., Jamwal, S., Kumar, P., & Deshmukh, R. (2017). Sertraline and venlafaxine improves motor performance and neurobehavioral deficit in quinolinic acid induced Huntington's like symptoms in rats: Possible neurotransmitters modulation. *Pharmacological Reports*, *69*(2). <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.11.008>
- González-Guevara, E., Cárdenas, G., Pérez-Severiano, F., & Martínez-Lazcano, J. C. (2020). Dysregulated Brain Cholesterol Metabolism Is Linked to Neuroinflammation in Huntington's Disease. In *Movement Disorders* (Vol. 35, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/mds.28089>
- González-Scarano, F., & Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 22). <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.219>
- Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W., & Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, *265*(5180). <https://doi.org/10.1126/science.8091209>
- Greaves, D. R., & Gordon, S. (2002). Macrophage-specific gene expression: Current paradigms and future challenges. In *International Journal of Hematology* (Vol. 76, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/BF02982713>
- Gri, G., Frossi, B., D'Inca, F., Danelli, L., Betto, E., Mion, F., Sibilano, R., & Pucillo, C. (2012). Mast cell: An emerging partner in immune interaction. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00120>
- Griffioen, K., Mattson, M. P., & Okun, E. (2018). Deficiency of Toll-like receptors 2, 3 or 4 extends life expectancy in Huntington's disease mice. *Heliyon*, *4*(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00508>
- Grimbaldeston, M. A., Chen, C. C., Piliponsky, A. M., Tsai, M., Tam, S. Y., & Galli, S. J. (2005). Mast cell-deficient *W-sash* c-kit mutant *kit^{W-sh/W-sh}* mice as a

- model for investigating mast cell biology in vivo. *American Journal of Pathology*, 167(3). [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62055-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62055-X)
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Annals of Neurology*, 39(3). <https://doi.org/10.1002/ana.410390317>
- Harper, P. S. (1992). The epidemiology of Huntington's disease. In *Human Genetics* (Vol. 89, Issue 4). <https://doi.org/10.1007/BF00194305>
- Haslund-Vinding, J., McBean, G., Jaquet, V., & Vilhardt, F. (2017). NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 174, Issue 12). <https://doi.org/10.1111/bph.13425>
- Hato, T., & Dagher, P. C. (2015). How the innate immune system senses trouble and causes trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(8). <https://doi.org/10.2215/CJN.04680514>
- Hof, P. R. [Ed], & Mobbs, C. V. [Ed]. (2009). Handbook of the neuroscience of aging. In *Handbook of the neuroscience of aging*.
- Jones, S.P., Guillemin, G.J., Brew, B.J. (2013) The kynurenine pathway in Stem Cell Biology. *International Journal of Tryptophan Research* 6:57-66. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S12626>
- Kalonia, H., Kumar, P., & Kumar, A. (2011). Comparative neuroprotective profile of statins in quinolinic acid induced neurotoxicity in rats. *Behavioural Brain Research*, 216(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.040>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). Cell Death and Differentiation - TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5).
- Kielian, T. (2006). Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 83, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/jnr.20767>
- Kielian, T., Mayes, P., & Kielian, M. (2002). Characterization of microglial responses to *Staphylococcus aureus*: Effects on cytokine, costimulatory molecule, and Toll-like receptor expression. *Journal of Neuroimmunology*, 130(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00216-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00216-3)

- Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., & Soma, G. I. (2009). ROS and innate immunity. *Anticancer Research*, 29(3).
- Kravitz, A.V., Tye, L.D., Kreitzer, A. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15(6):816-818, 2012. <https://doi.org/10.1038/nn.3100>
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S. E., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Squitieri, F., Lin, B., Bassett, A., Almqvist, E., Bird, T. D., & Hayden, M. R. (1994). A Worldwide Study of the Huntington's Disease Mutation: The Sensitivity and Specificity of Measuring CAG Repeats. *New England Journal of Medicine*, 330(20). <https://doi.org/10.1056/nejm199405193302001>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 19, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Kumar, R. K., Herbert, C., & Foster, P. S. (2008). The “classical” ovalbumin challenge model of asthma in mice. *Current Drug Targets*, 9(6). <https://doi.org/10.2174/138945008784533561>
- Kumar, V. (2018). *Robbins patología humana*. Elsevier. <https://books.google.com.mx/books?id=MDZlswEACAAJ>
- Lago, T., Davis, A., Grillon, C., & Ernst, M. (2017). Striatum on the anxiety map: Small detours into adolescence. In *Brain Research* (Vol. 1654). <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.06.006>
- Lalonde, R., & Strazielle, C. (2011). Brain regions and genes affecting limb-clasping responses. In *Brain Research Reviews* (Vol. 67, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.02.005>
- Lambracht-Hall, M., Dimitriadou, V., & Theoharides, T. C. (1990). Migration of mast cells in the developing rat brain. *Developmental Brain Research*, 56(2). [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90077-C](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90077-C)
- Lee, S. J., & Lee, S. (2002). Toll-like receptors and inflammation in the CNS. In *Current drug targets. Inflammation and allergy* (Vol. 1, Issue 2). <https://doi.org/10.2174/1568010023344698>

- Lehnardt, S. (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: The role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. In *GLIA* (Vol. 58, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/glia.20928>
- Lewitus, G. M., Konefal, S. C., Greenhalgh, A. D., Pribiag, H., Augereau, K., & Stellwagen, D. (2016). Microglial TNF- α Suppresses Cocaine-Induced Plasticity and Behavioral Sensitization. *Neuron*, *90*(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.030>
- Li, Y., Chen, L., Zhao, W., Sun, L., Zhang, R., Zhu, S., Xie, K., Feng, X., Wu, X., Sun, Z., Shu, G., Wang, S., Gao, P., Zhu, X., Wang, L., & Jiang, Q. (2021). Food reward depends on TLR4 activation in dopaminergic neurons. *Pharmacological Research*, *169*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105659>
- Lu, S. M., Yu, C. J., Liu, Y. H., Dong, H. Q., Zhang, X., Zhang, S. S., Hu, L. Q., Zhang, F., Qian, Y. N., & Gui, B. (2015). S100A8 contributes to postoperative cognitive dysfunction in mice undergoing tibial fracture surgery by activating the TLR4/MyD88 pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*, *44*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.10.011>
- Manetz, T. S., Gonzalez-Espinosa, C., Arudchandran, R., Xirasagar, S., Tybulewicz, V., & Rivera, J. (2001). Vav1 Regulates Phospholipase C γ Activation and Calcium Responses in Mast Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(11). <https://doi.org/10.1128/mcb.21.11.3763-3774.2001>
- Mariucci, G., Pagiotti, R., Galli, F., Romani, L., & Conte, C. (2018). The Potential Role of Toll-Like Receptor 4 in Mediating Dopaminergic Cell Loss and Alpha-Synuclein Expression in the Acute MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*, *64*(4). <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1057-7>
- Marrannes, R., & Wauquier, A. (1988). Episodic barrel rotations induced by intrastratial injection of quinolinic acid in rats. Inhibition by anticonvulsants. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *31*(1). [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90327-9](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90327-9)

- Marshall, J. S., & Jawdat, D. M. (2004). Mast cells in innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.04.045>
- Martínez-Gopar, P. E., Pérez-Rodríguez, M. J., Rodríguez-Manzo, G., Garduño-Gutierrez, R., Tristán-López, L., Angeles-López, Q. D., González-Espinosa, C., & Pérez-Severiano, F. (2021). Mast cells and histamine are involved in the neuronal damage observed in a quinolinic acid-induced model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/jnc.15527>
- Martínez-Gopar, P. E., Pérez-Rodríguez, M. J., Rodríguez-Manzo, G., Garduño-Gutierrez, R., Tristán-López, L., Angeles-López, Q. D., González-Espinosa, C., & Pérez-Severiano, F. (2022). Mast cells and histamine are involved in the neuronal damage observed in a quinolinic acid-induced model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 160(2). <https://doi.org/10.1111/jnc.15527>
- Mattson, M. P. (2006). Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 8, Issues 11–12). <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1997>
- McCurdy, J. D., Olynych, T. J., Maher, L. H., & Marshall, J. S. (2003). Cutting Edge: Distinct Toll-Like Receptor 2 Activators Selectively Induce Different Classes of Mediator Production from Human Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 170(4). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1625>
- Mesa-Villanueva, M., & Patiño, P. J. (2006). Receptores tipo Toll: Entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. In *Inmunología* (Vol. 25, Issue 2).
- Meurer, S. K., Neß, M., Weiskirchen, S., Kim, P., Tag, C. G., Kauffmann, M., Huber, M., & Weiskirchen, R. (2016). Isolation of mature (Peritoneum-Derived) mast cells and immature (Bone Marrow-Derived) mast cell precursors from mice. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158104>
- Morales-Martínez, A., Sánchez-Mendoza, A., Martínez-Lazcano, J. C., Pineda-Farías, J. B., Montes, S., El-Hafidi, M., Martínez-Gopar, P. E., Tristán-López, L., Pérez-Neri, I., Zamorano-Carrillo, A., Castro, N., Ríos, C., & Pérez-Severiano, F. (2017). Essential fatty acid-rich diets protect against striatal

- oxidative damage induced by quinolinic acid in rats. *Nutritional Neuroscience*, 20(7). <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1147683>
- Morita, H., Saito, H., Matsumoto, K., & Nakae, S. (2016). Regulatory roles of mast cells in immune responses. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 38, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0566-0>
- Nautiyal, K. M., Liu, C., Dong, X., & Silver, R. (2011). Blood-borne donor mast cell precursors migrate to mast cell-rich brain regions in the adult mouse. *Journal of Neuroimmunology*, 240–241. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.09.003>
- Naver, B., Stub, C., Møller, M., Fenger, K., Hansen, A. K., Hasholt, L., & Sørensen, S. A. (2003). Molecular and behavioral analysis of the R6/1 Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience*, 122(4). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.053>
- Noelker, C., Morel, L., Lescot, T., Osterloh, A., Alvarez-Fischer, D., Breloer, M., Henze, C., Depboylu, C., Skrzydelski, D., Michel, P. P., Dodel, R. C., Lu, L., Hirsch, E. C., Hunot, S., & Hartmann, A. (2013). Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. *Scientific Reports*, 3. <https://doi.org/10.1038/srep01393>
- Ochoa, L. (1999). Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Nom-062-Zoo*.
- Olson, J. K., & Miller, S. D. (2004). Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *The Journal of Immunology*, 173(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3916>
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.250476497>
- Paschon, V., Honda T. S., Ikebara, J.M., Sousa, E., Raeisossadati, R., Ulrich, H., Kihara, A.H. (2016). The interplay between exosomes, microRNAs and Toll-like receptors in brain disorders. *Molecular Neurobiology* 53(3):2016-2028. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9142-1>

- Park, H. S., Jung, H. Y., Park, E. Y., Kim, J., Lee, W. J., & Bae, Y. S. (2004). Cutting Edge: Direct Interaction of TLR4 with NAD(P)H Oxidase 4 Isozyme Is Essential for Lipopolysaccharide-Induced Production of Reactive Oxygen Species and Activation of NF- κ B. *The Journal of Immunology*, 173(6). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.3589>
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd edition. In *Academic Press*.
- Pérez-Rodríguez, M. J., Ibarra-Sánchez, A., Román-Figueroa, A., Pérez-Severiano, F., & González-Espinosa, C. (2020). Mutant Huntingtin affects toll-like receptor 4 intracellular trafficking and cytokine production in mast cells. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01758-9>
- Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Pérez, M., Pedraza-Chaverrí, J., Maldonado, P. D., Medina-Campos, O. N., Ortiz-Plata, A., Sánchez-García, A., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Aguilera, P., & Santamaría, A. (2004). S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochemistry International*, 45(8). <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.06.008>
- Peterson, P. K., & Toborek, M. (2014). Neuroinflammation and neurodegeneration. In *Neuroinflammation and Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1071-7>
- Qiang, W., Cai, W., Yang, Q., Yang, L., Dai, Y., Zhao, Z., Yin, J., Li, Y., Li, Q., Wang, Y., Weng, X., Zhang, D., Chen, Y., & Zhu, X. (2018). Artemisinin B Improves Learning and Memory Impairment in AD Dementia Mice by Suppressing Neuroinflammation. *Neuroscience*, 395. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.10.041>
- Régulier, E., Pereira De Almeida, L., Sommer, B., Aebischer, P., & Déglon, N. (2002). Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of huntington's disease. *Human Gene Therapy*, 13(16). <https://doi.org/10.1089/10430340260355383>

- Russo, I., Barlati, S., & Bosetti, F. (2011). Effects of neuroinflammation on the regenerative capacity of brain stem cells. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 116, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07168.x>
- Sanberg, P. R., Calderon, S. F., Giordano, M., Tew, J. M., & Norman, A. B. (1989). The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor abnormalities. *Experimental Neurology*, *105*(1). [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(89\)90170-2](https://doi.org/10.1016/0014-4886(89)90170-2)
- Sandig, H., & Bulfone-Paus, S. (2012). TLR signaling in mast cells: Common and unique features. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue JUL). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00185>
- Savitz, J., Dantzer, R., Meier, T. B., Wurfel, B. E., Victor, T. A., McIntosh, S. A., Ford, B. N., Morris, H. M., Bodurka, J., Teague, T. K., & Drevets, W. C. (2015). Activation of the kynurenine pathway is associated with striatal volume in major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *62*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.07.609>
- Schett, G., & Sieper, J. (2009). Inflammation and repair mechanisms. In *Clinical and Experimental Rheumatology* (Vol. 27, Issue 4 SUPPL. 55).
- Schwarcz, R., Guidetti, P., Sathyasaikumar, K. V., & Muchowski, P. J. (2010). Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 90, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.005>
- Schwarcz, R., Whetsell, W. O., & Mangano, R. M. (1983). Quinolinic acid: An endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, *219*(4582). <https://doi.org/10.1126/science.6849138>
- Shao, Q. hang, Chen, Y., Li, F. fang, Wang, S., Zhang, X. ling, Yuan, Y. he, & Chen, N. hong. (2019). TLR4 deficiency has a protective effect in the MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, *40*(12). <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0280-2>
- Shear, D. A., Dong, J., Gundy, C. D., Haik-Creguer, K. L., & Dunbar, G. L. (1998). Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3- nitropropionic acid for use in animal models of huntington's disease. *Progress in Neuro-*

- Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 22(7).
[https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(98\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(98)00070-0)
- Sick, E., Brehin, S., André, P., Coupin, G., Landry, Y., Takeda, K., & Gies, J. P. (2010). Advanced glycation end products (AGEs) activate mast cells. *British Journal of Pharmacology*, 161(2). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00905.x>
- Silver, R., Silverman, A. J., Vitković, L., & Lederhendler, I. I. (1996). Mast cells in the brain: Evidence and functional significance. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 19, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)81863-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)81863-7)
- Somensí, N., Lopes, S. C., Gasparotto, J., Mayer Gonçalves, R., Tiefensee-Ribeiro, C., Oppermann Peixoto, D., Ozorio Brum, P., Pinho, C. M., Agnes, J. P., Santos, L., de Oliveira, J., Spiller, F., Fonseca Moreira, J. C., Zanotto-Filho, A., Prediger, R. D., & Pens Gelain, D. (2021). Role of toll-like receptor 4 and sex in 6-hydroxydopamine-induced behavioral impairments and neurodegeneration in mice. *Neurochemistry International*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105215>
- Sorolla, M. A., Reverter-Branchat, G., Tamarit, J., Ferrer, I., Ros, J., & Cabiscol, E. (2008). Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(5). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.014>
- Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182(C). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)
- Streit, W. J., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2004). Microglia and neuroinflammation: A pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation*, 1. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-14>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tampi, R. R., Weber, M., & Masterson, G. A. (2021). Early Warnings: Neuropsychiatric Manifestations of Huntington Disease. *Psychiatric Times*, 38(3).

- Tanzola, M. B., Robbie-Ryan, M., Gutekunst, C. A., & Brown, M. A. (2003). Mast Cells Exert Effects Outside the Central Nervous System to Influence Experimental Allergic Encephalomyelitis Disease Course. *The Journal of Immunology*, 171(8). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.8.4385>
- Taylor C. T. & Colgan S. P. (2017) Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol* 17(12):774-785. doi: 10.1038/nri.2017.103.
- Thameem Dheen, S., Kaur, C., & Ling, E.-A. (2007). Microglial Activation and its Implications in the Brain Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 14(11). <https://doi.org/10.2174/092986707780597961>
- Träger, U., Andre, R., Lahiri, N., Magnusson-Lind, A., Weiss, A., Grueninger, S., McKinnon, C., Sirinathsinghji, E., Kahlon, S., Pfister, E. L., Moser, R., Hummerich, H., Antoniou, M., Bates, G. P., Luthi-Carter, R., Lowdell, M. W., Björkqvist, M., Ostroff, G. R., Aronin, N., & Tabrizi, S. J. (2014). HTT-lowering reverses Huntington's disease immune dysfunction caused by NFκB pathway dysregulation. *Brain*, 137(3). <https://doi.org/10.1093/brain/awt355>
- Varadaradjalou, S., Féger, F., Thieblemont, N., Hamouda, N. Ben, Pleau, J. M., Dy, M., & Arock, M. (2003). Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *European Journal of Immunology*, 33(4). <https://doi.org/10.1002/eji.200323830>
- Varatharaj, A., MacK, J., Davidson, J. R., Gutnikov, A., & Squier, W. (2012). Mast cells in the human dura: Effects of age and dural bleeding. *Child's Nervous System*, 28(4). <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1699-7>
- Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., Manietta, N., Walter, J., Schulz-Schüffer, W., & Faßbender, K. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 20(6). <https://doi.org/10.1159/000110455>
- Wilkins, H. M., Weidling, I. W., Ji, Y., & Swerdlow, R. H. (2017). Mitochondria-derived damage-associated molecular patterns in neurodegeneration. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00508>

- Yan, X., Jiang, E., & Weng, H. R. (2015). Activation of toll like receptor 4 attenuates GABA synthesis and postsynaptic GABA receptor activities in the spinal dorsal horn via releasing interleukin-1 beta. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0222-3>
- Ye, Y., Yang, Y., Chen, C., Li, Z., Jia, Y., Su, X., Wang, C., & He, X. (2017). Electroacupuncture Improved Hippocampal Neurogenesis following Traumatic Brain Injury in Mice through Inhibition of TLR4 Signaling Pathway. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5841814>
- Yu, Y., Blokhuis, B. R., Garssen, J., & Redegeld, F. A. (2016). Non-IgE mediated mast cell activation. *European Journal of Pharmacology*, 778. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.07.017>
- Zheng, Z., & Diamond, M. I. (2012). Huntington disease and the huntingtin protein. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 107). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00010-2>
- Zhu, J. W., Li, Y. F., Wang, Z. T., Jia, W. Q., & Xu, R. X. (2016). Toll-like receptor 4 deficiency impairs motor coordination. *Frontiers in Neuroscience*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00033>