



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

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

“Caracterización del perfil transcripcional de citocinas expresadas en células cebadas estimuladas con la proteína S100B, un DAMP asociado a la neuroinflamación que se presenta en la enfermedad de Huntington”

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. GABRIELA SAAVEDRA LANUZA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directoras de tesis:

Dra. Claudia González Espinosa

Dra. Francisca Pérez Severiano

Ciudad de México

Agosto, 2023

El trabajo experimental de la presente tesis fue realizado en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Sede Sur y en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". La tesis fue realizada bajo la co-tutoría de las Dras. Claudia González Espinosa y Francisca Pérez Severiano. El desarrollo del trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) a través del Proyecto CF-2019-51488 y la beca de maestría No. 776274.

Sé divinidad

Agradecimientos

A mis tutoras: Dra. Claudia González Espinosa y Dra. Francisca Pérez Severiano, gracias por todo el apoyo, los conocimientos compartidos, por la paciencia y la buena disposición siempre. Gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y abrirme las puertas de sus laboratorios.

Al comité sinodal: Dra. Ana María Estrada Sánchez y Dra. Gabriela Rodríguez Manso, gracias por sus sugerencias y observaciones. Gracias por tomarse el tiempo de formar parte de este proyecto.

A todos los profesores que tomaron parte de mi formación académica durante mi estancia en la institución.

A mis compañeros de laboratorio, Marian, Pablo, Quetz, Diego, Dey, Monse, Frida, Paloma, Pao, Rodo gracias por toda su ayuda y disposición. Gracias por hacer mucho más amena la estancia.

Al M. en C. Pablo Eliasib Martínez Gopar, quien me instruyó en el uso del marco estereotáxico, manejo de animales de laboratorio, disección de tejido cerebral y perfusión transcárdica. Gracias por la paciencia y compartir conmigo tu experiencia.

Al M. en C. Alfredo Ibarra, quien me instruyó en el cultivo y manejo de células; así como en las técnicas de extracción de ARN y PCR de punto final, así como a la obtención de imágenes en el microscopio confocal. Alfred, muchas gracias por todo el apoyo, ayuda, experiencia y disposición, fue fundamental en el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. René Garduño, por toda su ayuda para llevar a cabo la técnica de inmunofluorescencia. René, muchas gracias por tu buena disposición a ayudar, por el tiempo y esfuerzo invertido en los experimentos, gracias por animarme a no rendirme, gracias por los consejos.

Al Dr. Omar Muñoz del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo e instrucción en la técnica de PCR en tiempo real.

A la Q.F.I. Paula Vergara de Cinvestav Zacatenco, gracias por compartir conmigo su experiencia y conocimiento, gracias por la buena disposición.

A mi familia:

A mi mamá, por apoyar mi formación académica desde siempre. Gracias por ser el pilar sobre el que se cimenta mi vida y mis logros. Gracias por siempre estar. Sin ti, nada sería posible.

A mi papá, hasta el cielo, siempre te haré sentir orgulloso.

A mis hermanos, Lety, Fabián y Pedro, su amor incondicional es la luz que guía mi camino y siempre me hace volver. Su compañía es mi lugar favorito.

A Brenda, sígueme acompañando siempre, te quiero al infinito y para siempre.

A Alonso, John, gracias por mostrarme el camino hacia donde guiar mis pasos, gracias por ayudarme a ver mi potencial y a encontrar mi lugar en el mundo.

A Grecia y a Juan, la vida se hizo ligera con ustedes, gracias por la mini familia que formamos.

A mis sobrinos Aquetzali, Vivi, Fabián, Ángel, Alondra, Cami, Ezequiel y José Manuel, todo mi amor es de ustedes, mi meta es siempre darles un buen ejemplo.

A mis padrinos Luz y Ray gracias por siempre creer en mí, apoyarme y acompañarme en cada aspecto de la vida.

A la porción de Dios que vive en ti, que vive en mí.

Índice	
Índice de figuras	I
Lista de abreviaturas	II
Resumen	III
Abstract	IV
1. Introducción.....	1
1.1 La Enfermedad de Huntington.....	1
1.2 Células Cebadas	6
1.2.1 Activación de las células cebadas	7
1.3 DAMPs.....	12
1.3.1 Proteína S100B.....	14
1.4 Modelos para estudiar la enfermedad de Huntington.....	17
2. Antecedentes	18
3. Justificación.....	18
4. Hipótesis.....	19
5. Objetivo general	19
5.1 Objetivos específicos.....	19
6. Diseño experimental.....	20
7. Metodología.....	22
7.1 Animales	22
7.2 Generación de BMMCs	22
7.3 RT-PCR de punto final.....	22
7.3.1 Extracción de ARNm.....	22
7.3.2 RT-PCR.....	23
7.4 Ensayo TaqMan.....	24
7.5 Lesión estriatal con ácido quinolínico	27
7.6 Disección del tejido cerebral.....	27
8. Resultados	29
8.1 Producción de mensajeros de TNF e IL-6 en BMMCs estimuladas con la proteína S100B.....	29

8.2 Participación de los receptores RAGE y TLR-4 en la producción de mensajeros de TNF e IL-6	30
8.3 Perfil transcripcional de proteínas de interés inmunológico	34
8.4 Expresión de ARNm de la proteína S100B en el cuerpo estriado de ratones lesionados con AQ.....	36
8.5 Efecto de la administración de AQ sobre la expresión de la proteína S100B en el estriado.	36
9. Discusión	41
9.1 La proteína S100B incrementa la producción de ARNm de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF en BMMCs.....	42
9.2 La producción de TNF e IL-6 en BMMCs estimuladas con S100B está mediada por los receptores TLR-4 y RAGE.	43
9.3 La proteína S100B podría ser un regulador importante en la transcripción de genes asociados a la respuesta inmune en BMMCs.....	45
9.4 La lesión estriatal con AQ no altera la producción de ARNm de S100B en el estriado de ratones.	45
9.5 El AQ incrementa la intensidad de la inmunorreactividad de la proteína S100B a las 2 h post lesión e incrementa la colocalización de la inmunorreactividad a S100B y GFAP a las 72 h post lesión.....	46
10. Conclusiones.....	47
11. Perspectivas.....	48
12. Bibliografía	48

Índice de figuras

Figura 1. Función dual de los receptores NMDA según su localización, sináptica o extrasináptica.	3
Figura 2. Barrera hematoencefálica.	5
Figura 3. Mediadores liberados por las células cebadas.	8
Figura 4. Vías de señalización del receptor TLR4.	11
Figura 5. El receptor RAGE.....	12
Figura 6. Mecanismos de liberación de DAMPS.	14
Figura 7. La proteína S100B induce la síntesis de citocinas proinflamatorias en BMMCs.....	29
Figura 8. La proteína S100B induce la síntesis de ARNm de TNF mediante la activación de los receptores RAGE y TLR4.	31
Figura 9. La proteína S100B induce la síntesis de ARNm de IL-6 mediante la activación de los receptores RAGE y TLR4.	33
Figura 10. Expresión de genes relacionados a la respuesta inmune.....	35
Figura 11. Expresión de ARNm de la proteína S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ.	36
Figura 12. Expresión de la proteína S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ.	39
Figura 13. Colocalización de GFAP y S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ.	40
Figura 14. Resultados obtenidos.....	41

Lista de abreviaturas

AQ	Ácido quinolínico
BHE	Barrera hematoencefálica
BMMS	Célula cebada procedente de la médula ósea
CC	Célula cebada
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HMGB1	La proteína de caja 1 del grupo de alta movilidad
HTT	Huntingtina
HTTm	Huntingtina mutante
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolisacárido
NEM	Neuronas espinosas medianas
NMDA	N-metil-D-aspartato
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RAGE	Receptor para productos de glicación avanzada
SNC	Sistema nervioso central
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
WT	Tipo silvestre
W-sh	Ratones c-Kit W-sh/W-sh

Resumen

La Enfermedad de Huntington (EH) es una patología neurodegenerativa causada por una mutación en el gen que codifica la proteína Huntingtina (Htt). Una de las características de esta afección es la neuroinflamación, que se desencadena por patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) liberados por las células dañadas. Esas moléculas, a su vez, activan las células inmunitarias que residen en el sistema nervioso central (SNC). Uno de esos DAMPs es la proteína S100B, un ligando de distintos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como el receptor tipo Toll (TLR)-4 y el receptor para productos de glicación avanzada (RAGE). Recientemente nuestro laboratorio reportó que las células cebadas (mastocitos, CCs) participan en la manifestación de los síntomas asociados a la EH en distintos modelos murinos, lo que sugiere que este tipo de células juega un papel en la neuroinflamación asociada a esa afección. El objetivo de este trabajo tuvo dos vertientes: 1) evaluar el efecto de la proteína S100B en el perfil de citocinas producido por las CCs; y 2) determinar la expresión de S100B en un modelo murino de la EH inducida por la administración de ácido quinolínico (AQ). Para lograrlo, se diferenciaron CCs a partir de médula ósea (BMMC) de ratones C57BL/6J y se expusieron a la proteína S100B (1 μ g/mL). La síntesis del ARNm de citocinas se determinó mediante RT-PCR y un ensayo multiplex qRT-PCR. Los resultados mostraron que S100B promueve un cambio importante en la expresión de citocinas en las CCs, induciendo la producción de TNF e IL-6 y reprimiendo la activación de la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune, como Smad7. Utilizando el inhibidor de TLR-4 TAK242 y el antagonista de RAGE FPS-ZM1, se descubrió que las acciones de S100B sobre las CCs dependen de la activación de los receptores de TLR-4 y RAGE. Finalmente, utilizando el modelo de EH inducido por AQ *in vivo*, se detectó la producción de S100B y cambios importantes en la distribución de esta proteína en los animales lesionados con AQ, pero no en los controles. Nuestros datos sugieren que la proteína S100B y sus receptores en MC podrían ser un objetivo terapéutico para la neuroinflamación observada en la EH.

Abstract

Huntington Disease (HD) is a neurodegenerative pathology caused by a mutation in the gene encoding the protein Huntingtin (Htt). One of the hallmarks of this condition is neuroinflammation, which is triggered by damage-associated molecular patterns (DAMPs) released by damaged cells. Those molecules, in turn, activate immune cells that reside in the central nervous system (CNS). One of those DAMPs is S100B protein, a ligand for distinct pattern recognition receptors (PRRs), such as the Toll-like receptor (TLR) 4 and the receptor for advanced glycation products (RAGE). We recently reported that mast cells (MCs) participate in the manifestation of HD-associated symptoms in distinct murine models of the disease, suggesting that this cell type plays a role in the neuroinflammation associated to that condition. The aim of this work was twofold: 1) to evaluate the effect of S100B protein on the cytokine profile produced by MCs and 2) to determine the production of S100B in a murine model of HD induced by the administration of quinolinic acid (QA). Bone marrow-derived mast cells (BMMCs) from C57BL/6J mice were exposed to S100B and cytokine mRNA production was determined by RT-PCR and a multiplex qRT-PCR assay. Results showed that S100B promotes an important change in cytokine expression in MCs, inducing TNF and IL-6 production and repressing immune response-related genes, such as Smad7. Utilizing the TLR-4 inhibitor TAK242 and the RAGE antagonist FPS-ZM1, it was found that S100B actions on MCs depend on both TLR-4 and RAGE receptor triggering. Finally, the production of S100B was detected in the HD model induced by QA *in vivo*, with important changes in the distribution of this protein observed in the AQ-lesioned animals but not in the control groups. Our data suggest that S100B and its receptors on MCs could be a therapeutic target for the neuroinflammation observed in HD.

1. Introducción

1.1 La Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es una patología neurodegenerativa, hereditaria, de carácter autosómico dominante. Es causada por una mutación en el primer exón del brazo corto del cromosoma 4 del gen que codifica para la proteína huntingtina (HTT). Dicha mutación trae consigo la expansión anormal del trinucleótido CAG que lleva a la síntesis de la huntingtina mutante (HTTm), que contiene una serie de repeticiones de glutamina (Q) en el extremo N-terminal, llamado “cola de poliQ” (Bates et al., 2015; Ross et al., 2014).

A pesar de la vasta información existente, la función de la HTT en la fisiología de las neuronas y otras células no se conoce completamente. Se sabe que se expresa en casi todas las células del organismo. Sin embargo, es en el sistema nervioso central (SNC) donde se encuentra en mayor cantidad (Sousa & Humbert, 2013). La HTT es una proteína de 3114 aminoácidos y se localiza a nivel nuclear y citoplasmático (Cisbani & Cicchetti, 2012). En el citoplasma, la HTT interactúa con la maquinaria motora, controlando el transporte de organelos, el transporte de vesículas, tráfico endosomal e incluso, en la división celular (Saudou & Humbert, 2016). En muestras *post-mortem* de pacientes con EH se han podido detectar agregados de HTTm (Poirier et al., 2005). Estos agregados afectan funciones celulares como la traducción, la transcripción, el transporte axonal, la función mitocondrial y reciclaje de vesículas sinápticas, entre otras (McColgan & Tabrizi, 2018).

En individuos sanos la HTT tiene hasta 35 repeticiones de glutamina. Sin embargo, los individuos que presentan > 36 repeticiones suelen desarrollar la EH. El número de repetidos de glutamina es inversamente proporcional a la edad de aparición de los síntomas de la EH; individuos que presentan ≤ 35 repeticiones usualmente no desarrollan la enfermedad, mientras que en aquellos que presentan de 36 a 40 repetidos, la progresión de la enfermedad suele ser muy lenta. Por otro lado, en pacientes con 40-70 repeticiones los síntomas tienden a presentarse en la edad adulta (entre 40 y 50 años) y cuando se presentan ≥ 70 repetidos, los síntomas

suelen aparecer en la infancia o adolescencia, aunque esto no es muy común (Bates et al., 2015).

Las neuronas espinosas medianas (NEM) localizadas en los núcleos caudado y putamen, mejor conocidos como cuerpo estriado, son particularmente susceptibles a la expresión de la HTTm cuya presencia lleva a neurodegeneración en dichas regiones (Huang et al., 1998). En estadios más avanzados afecta regiones como en el globo pálido y el núcleo *accumbens*. La patología de la EH se clasifica en cuatro grados según las regiones cerebrales afectadas: El grado 0 se refiere a la presencia de evidencia clínica de la enfermedad, pero sin anomalías visibles o a nivel microscópico que puedan estar asociadas con la enfermedad; el grado 1, donde no se observan anomalías en el caudado o en el putamen; en el grado 2, se presentan afecciones macroscópicas en el caudado y el putamen pero no en el globo pálido o el núcleo *accumbens*; mientras que en el grado 3, el segmento lateral del globo pálido presenta astrocitosis fibrilar y por último, en el grado 4, se observa el ensanchamiento del ventrículo lateral y disminución del tamaño del núcleo *accumbens* (Vonsattel et al., 1985). Es en los grados 3 y 4 en los que también se presentan anomalías en regiones como el tálamo, el cerebelo, la sustancia blanca del estriado y la corteza cerebral (McColgan & Tabrizi, 2018; Plotkin & Surmeier, 2015).

Uno de los mecanismos a los que se le atribuye la degeneración estriatal en la EH, es la excitotoxicidad causada por la expresión aumentada de receptores a glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) en las NEM. Los receptores NMDA son una familia de receptores ionotrópicos permeables a Ca^{2+} localizados en el SNC. Son heterodímeros formados por dos tipos de unidades GluN1 y dos tipos de unidades GluN2. La composición de estos receptores es variable debido a que pueden estar conformados por distintos tipos de subunidades NMDAR 1-3 (NAR1-3) y esto genera diferentes subtipos de receptores NMDA con función y localización diferentes. La subunidad NAR 1 se encuentra en todos los subtipos de receptores, es esencial para su funcionamiento; la subunidad NAR2 tiene diferentes isoformas (A-D), su distribución es específica en el cerebro y contribuyen a las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores NMDA; la subunidad NAR3 (A-B), cuyo descubrimiento es más reciente, se diferencia de las subunidades NAR2 en estructura y función (Zhou & Sheng, 2013). Cuya función y sensibilidad a ligandos va a depender de las subunidades que lo conforman.

Desde hace varios años se conoce la acción dual de los receptores a NMDA según su ubicación, ya sea sináptica o extrasináptica. Por un lado, los receptores sinápticos activan vías que conducen a la supervivencia neuronal, mientras que los receptores extrasinápticos conducen a vías apoptóticas, y es el equilibrio en la expresión de ambos lo que influye en la supervivencia o muerte neuronal (Fig. 1). Está reportado que en algunos modelos murinos de la EH existe un desequilibrio en la cantidad de receptores extracelulares expresados en las NEM. Dicho desequilibrio lleva a la excitotoxicidad en NEM que desencadena alteraciones en el metabolismo mitocondrial y estrés oxidante (Levine et al., 2010).

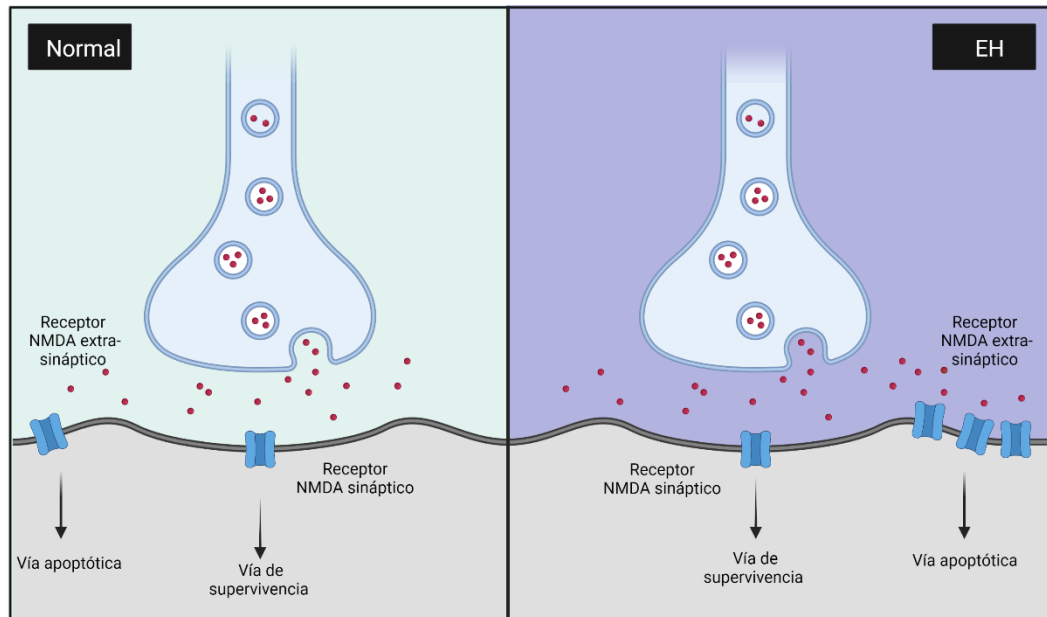


Figura 1. Función dual de los receptores NMDA según su localización, sináptica o extrasináptica. Los receptores sinápticos activan vías que conducen a la supervivencia neuronal, mientras que los extrasinápticos, conducen a vías apoptóticas y es el equilibrio en la expresión de ambos lo que influye en la supervivencia o muerte neuronal. Modificado de (Levine et al., 2010). Imagen realizada con Biorender.

La EH afecta regiones relacionadas con la función motora. La disfunción motora tiene dos componentes, el primero de ellos está conformado por movimientos involuntarios coreiformes que son el síntoma característico de los pacientes con EH. El segundo componente se manifiesta como la alteración de los movimientos voluntarios, caracterizada por bradicinesia, descoordinación y rigidez. Estos síntomas son más frecuentes en etapas iniciales de la EH de inicio temprano. Además de las

alteraciones en el movimiento, los pacientes con EH también presentan déficits cognitivos y alteraciones neuropsiquiátricas que deterioran su calidad de vida. Se sabe que los pacientes con EH comienzan a desarrollar deterioro cognitivo varios años antes de que comiencen los primeros síntomas motores. Entre los síntomas cognitivos más comunes están la dificultad para aprender y retener información nueva, ralentización cognitiva, disminución de atención y disminución de la flexibilidad mental. Por otra parte, las alteraciones psiquiátricas son diferentes en cada paciente, sin embargo, la depresión, la apatía y la irritabilidad son afecciones comunes en los pacientes con EH (Ross et al., 2014; Thompson et al., 2012).

La EH cursa con neuroinflamación, la cual podría estar participando activamente en la patogénesis de la enfermedad. La neuroinflamación es un término utilizado para describir al proceso inflamatorio que sucede a nivel del SNC (cerebro y médula espinal). La neuroinflamación difiere de la inflamación periférica principalmente por los elementos que participan en ella (células como los astrocitos, neuronas y microglía) y estructuras como la barrera hematoencefálica (BHE) (Shabab et al., 2016). La BHE es una estructura multicelular encargada de limitar el intercambio de moléculas, iones y células entre el parénquima cerebral y la periferia. La BHE está conformada por células endoteliales, pericitos, astrocitos, neuronas y lámina basal (Fig. 2). Los pericitos se encuentran embebidos en la membrana basal, la cual separa a las células endoteliales del resto de los elementos de la BHE. Las células endoteliales son la unidad fundamental de la BHE; constituyen una barrera entre la sangre y el parénquima cerebral y se encuentran unidas por caderinas y cateninas endoteliales que dan estabilidad al tubo vascular. Las terminales de los astrocitos se encuentran rodeando por el lado abuminal (dentro del parénquima cerebral) a los vasos cerebrales, recubriendo la vasculatura cerebral casi en su totalidad (Obermeier et al., 2016; Profaci et al., 2020).

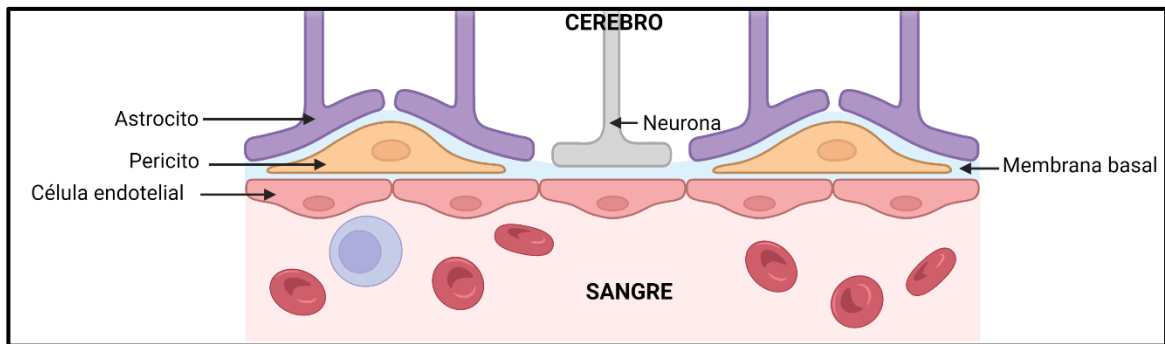


Figura 2. Composición de la barrera hematoencefálica (BHE). La BHE está compuesta por células endoteliales, pericitos, astrocitos, neuronas y lámina basal que restringen el paso de células y moléculas provenientes de la periferia al parénquima cerebral. Figura realizada con Biorender.

La neuroinflamación es una respuesta fisiológica cuya principal función es la de proteger al SNC de posibles estímulos dañinos, así como la reparación tisular. Sin embargo, si el estado inflamatorio se prolonga, los componentes del sistema nervioso se pueden ver afectados por mediadores producidos por células de la respuesta inmune innata y adaptativa (Dong et al., 2014; Skaper et al., 2014).

En la neuroinflamación asociada a enfermedades neurodegenerativas como la EH, se han observado cambios en la morfología de las células gliales, acompañados del incremento de mediadores inflamatorios en el parénquima cerebral y también a nivel sistémico, como es el caso de la interleucina (IL)-6 (Crotti & Glass, 2015). De hecho, varios estudios han mostrado una posible correlación positiva entre la concentración de IL-6 en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) con la progresión de la enfermedad (Björkqvist et al., 2008).

La microglía es el principal tipo celular responsable de los procesos asociados a la neuroinflamación. Sin embargo, ahora se sabe que células del sistema inmune innato residentes del SNC o incluso, reclutadas desde la periferia, como las células cebadas (CCs), podrían estar contribuyendo de manera relevante a la neuroinflamación (Traina, 2017).

1.2 Células Cebadas

Las células cebadas (CCs) pertenecen al sistema inmune innato. Son células cuya característica principal es la de contener gránulos citoplasmáticos cargados de mediadores inflamatorios que, al liberarse pueden regular respuestas innatas y adaptativas (Graham et al., 2015). En organismos adultos, se derivan de la médula ósea, a partir de células troncales mieloides. Así, viajan por el torrente sanguíneo como precursores inmaduros, migran a las mucosas y tejido conectivo donde terminan su proceso de maduración y diferenciación; pueden adquirir diferentes fenotipos dependiendo de las señales estimulantes o inhibitoras provenientes del microambiente tisular (Dahlin & Hallgren, 2015; Theoharides, 2017).

Las CCs tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular, pero también intervienen en procesos patológicos. Ayudan a la defensa contra agentes infecciosos, parásitos, venenos; también participan en la presentación de antígenos y el reclutamiento de leucocitos, así como en la reparación de tejidos. Pero, por otro lado, se sabe que también contribuyen al desarrollo y progresión de patologías como alergias, aterosclerosis, enfermedades autoinmunes y crecimiento tumoral (Forsythe, 2018).

Las CCs se localizan en mayor proporción en órganos y tejidos que se encuentran en contacto con el medio externo, como las vías aéreas, el tracto gastrointestinal o la piel, constituyendo así una de las primeras líneas de defensa del organismo contra amenazas provenientes del exterior. Sin embargo, su distribución es amplia y se han logrado identificar en prácticamente todo el organismo (Atiakshin et al., 2019; Hendriksen et al., 2017).

En el cerebro, las CCs entran como precursores inmaduros a través de las leptomeninges, en etapas tempranas del desarrollo y residen SNC en cantidades limitadas. Se encuentran en el parénquima cerebral a lo largo de los vasos sanguíneos (Traina, 2017) y en regiones como el tálamo y el hipotálamo. La estructura cerebral con el mayor número de CCs conocida es la habénula (Drop, 1979; Zhuang et al., 1999). Se sabe que las CC también son capaces de migrar desde el torrente sanguíneo hacia el cerebro (Silverman et al., 1999). Las CCs participan también en la disrupción de la BHE y en la degradación de la lámina basal, por mecanismos que

incluyen la liberación de sustancias vasoactivas y degradantes, así como la expresión de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), la cual favorece la infiltración de leucocitos al sitio afectado promoviendo estados de neuroinflamación (Dong et al., 2014).

1.2.1 Activación de las células cebadas

Las CCs pueden ser activadas por una amplia gama de estímulos, siendo los complejos de IgE/Antígeno (IgE/Ag), a través de su receptor FcεRI, el más estudiado, por su participación en el inicio y mantenimiento de procesos de alergia. Sin embargo, también agentes físicos como la presión o la temperatura, o la unión de diversas moléculas a receptores específicos pueden llevar a la activación de las CCs (Dahlin & Hallgren, 2015).

Al ser activadas, las CCs pueden responder en dos fases. La primera de ellas consiste en la liberación de mediadores preformados, entre los que se encuentran aminas biogénicas (histamina, serotonina), citocinas (TNF), algunos factores de crecimiento (VEGF), peptidoglicanos, etc. Dichos mediadores se encuentran almacenados en los gránulos citoplasmáticos. Estos mediadores pueden ser liberados en cuestión de segundos, después de la llegada del estímulo. Por otro lado, la segunda fase consiste en la secreción de moléculas que se sintetizaron *de novo* en respuesta a un estímulo determinado. Entre estas moléculas se encuentran diversos mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas, neuropéptidos y factores de crecimiento (Fig. 3) (Forsythe, 2018; Graham et al., 2015).

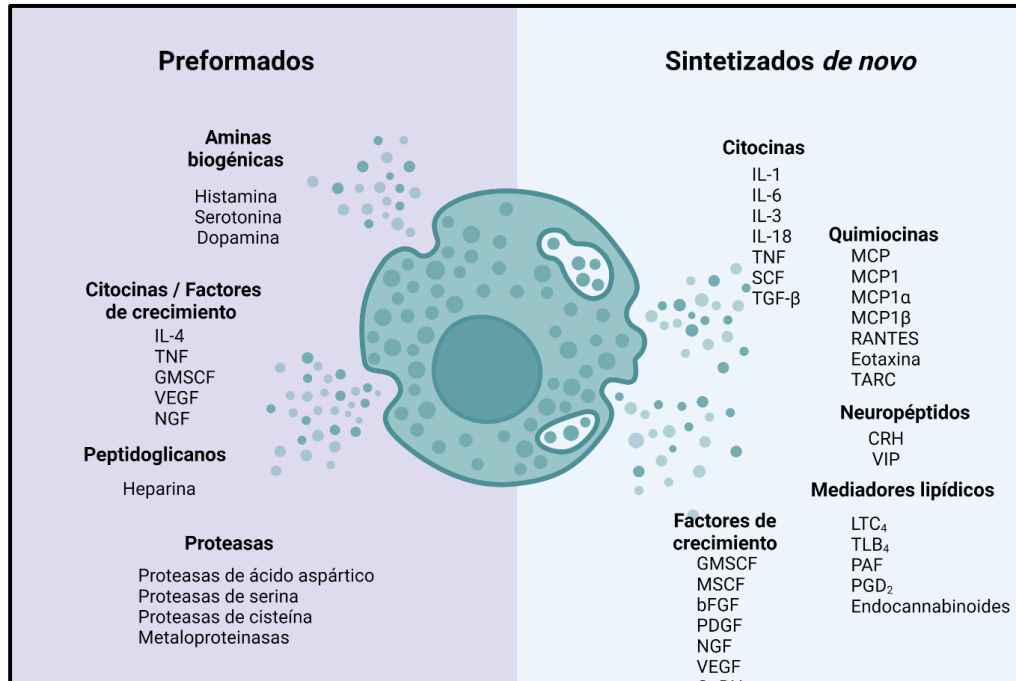


Figura 3. Mediadores liberados por las CCs. Las CCs liberan una amplia variedad de mediadores, los cuales están preformados y almacenados en gránulos citoplasmáticos y pueden ser liberados de inmediato, o bien, los producen en respuesta a un estímulo específico y son liberados a distintos tiempos de estimulación. Modificado de (Forsythe, 2018). Figura elaborada en Biorender.

Las CCs se activan frente a una amplia variedad de estímulos, como alérgenos, sustancias derivadas de microorganismos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs), factores del sistema del complemento, neuropéptidos, fármacos o patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMPs), responden de manera específica mediante la liberación de moléculas mediadoras preformadas o recién sintetizadas, las cuales pueden participar en funciones proinflamatorias, antiinflamatorias y/o inmunosupresoras. Para ello, las CCs cuentan con un amplio repertorio de receptores que incluyen al Fc ϵ RI para anticuerpos IgE, el Fc γ R para anticuerpos IgG, receptores para patrones moleculares (PRRs) y receptores del complemento, entre otros (Atiakshin et al., 2019; Hendriksen et al., 2017). En la Tabla 1 se muestra el resumen de los principales tipos de receptores encontrados en las CCs, sus ligandos, sus principales mensajeros y los efectos que causan en la célula después de su activación (Sick et al., 2010; Singh et al., 2016).

Tabla 1. Principales tipos de receptores descritos en células cebadas después de su activación.

Tipo de receptor	Nombre del receptor	Ligando	Mensajeros	Efectos
GPCR (Receptores acoplados a proteínas G)	1) CXCR 1,2 2) H4 3) CRTH2	1) Eotaxina 2) Histamina 3) PGD ₂	1) PLCβ, PIP ₃ 2) PLCβ, cAMP 3) Ca ²⁺	-Desgranulación -Incremento de estrés oxidante -Muerte celular - Movimiento del citoesqueleto -Migración
LGILC (Canales iónicos activados por ligando)	1) TRPV2 2) Canales de K ⁺ activados por Ca ²⁺ 3) Canales de Cl ⁻ activados por Ca ²⁺ 4) P2X	1) Estímulos físicos 2) Ca ²⁺ 3) Ca ²⁺ 4) DAMP	1) Ca ²⁺ 2) Ca ²⁺ 3) Ca ²⁺ 4) Ca ²⁺	Desgranulación
PRR (Receptores de reconocimiento de patrones)	1) TLR (Receptores tipo toll) TLR2-5 y TLR9	1) Flagelina, peptidoglicano, zymosan, LPS, dSRNA, DAMP	1) NFκB	1) Citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión
Inmunoglobulinas	1) FcεR1 2) RAGE	1) IgE 2) AGE, DAMPS	1) LT, PG 2) NFκB	1) LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ y PGD ₂ 2) Citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión

Dentro de los PRRs se encuentran el receptor Toll like 4 (TLR-4) y el receptor de productos de glicación avanzada (RAGE), los cuales, una vez activados inician o promueven la secreción de mediadores en las CCs y el proceso inflamatorio.

1.2.1.1 Receptor TLR-4

Los receptores “toll” son una familia de receptores que fueron descritos por primera vez en *Drosophila melanogaster*. En este organismo tienen funciones en el desarrollo y en la defensa contra parásitos. En 1997 Medzhitov y colaboradores (Medzhitov et al., 1997) descubrieron el primer análogo de este tipo de receptores en mamíferos y, hoy se le conoce como receptor tipo toll 4 (TLR-4) (Takeda & Akira, 2007).

El TLR-4 es un receptor de un solo dominio transmembranal, con una región extracelular rica en repeticiones de leucina y una región intracelular con un dominio TIR. El principal ligando de este receptor es el lipopolisacárido bacteriano (LPS). El proceso de activación del TLR-4 por LPS comienza cuando la proteína de unión a lípidos (LBP) extrae un monómero de LPS de los agregados micelares extracelulares y lo transfiere a un co-receptor llamado (grupo de diferenciación 14, CD14) que, posteriormente, lo une a otra molécula co-receptora llamada MD-2 (asociada al TLR-4). Al unirse al complejo TLR4 / MD2, el LPS facilita la formación de dímeros de los complejos TLR-4 / MD-2. La dimerización de TLR-4 facilita el reclutamiento de dos pares de proteínas adaptadoras al dominio TIR del receptor; TIRAP / MyD88 en una *vía pro-inflamatoria* o TRAM / TRIF, en el caso de otra vía de señalización llamada *vía endocítica* (Bates et al., 2015; Ross et al., 2014).

La vía de señalización mediada por MyD88 recluta a las cinasas IRAK4 e IRAK2 y desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación temprana del factor de transcripción NFκB y otros factores, como AP-1. El resultado de la activación de esta vía es la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y quimiocinas, entre otros (Lim & Staudt, 2013).

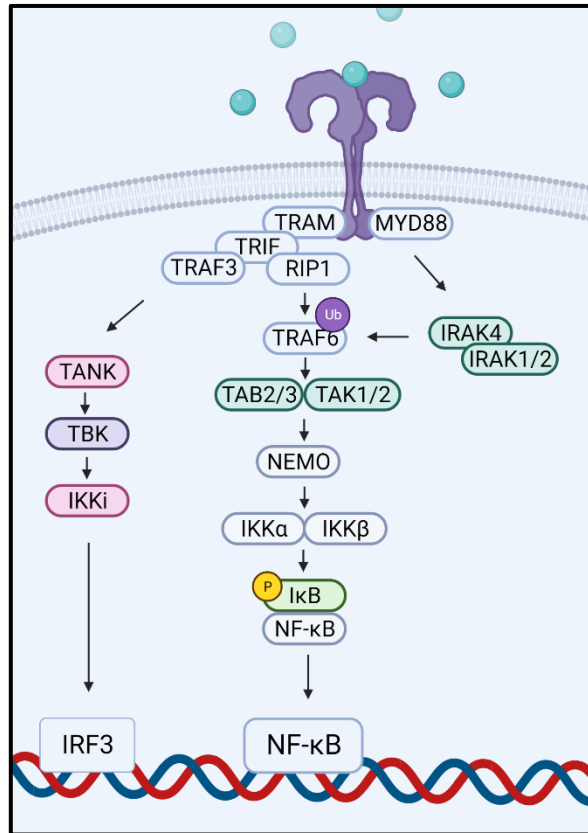


Figura 4. Vías de señalización del receptor TLR-4. Al estimular al receptor TLR-4 se activan 2 vías principales: la primera, dependiente de MYD88; la segunda, dependiente de las proteínas TRIF y TRAM. Modificado de (Ayaz, 2014). Figura elaborada en Biorender.

1.2.1.2 Receptor RAGE

Otro PRR presente en las CC es el receptor RAGE, que es un receptor multiligando perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas. Es una proteína con un peso molecular de 45 kD. Se compone de 3 regiones: una región extracelular que contiene tres dominios de inmunoglobulina (V, C1 y C2) que interactúa con diferentes tipos de ligandos; una región transmembranal y; una región intracelular con un dominio TIR similar a los TLR, que puede desencadenar cascadas de señalización que culminan con la activación de vías pro-inflamatorias y pro-oxidantes (Vanhooren et al., 2015).

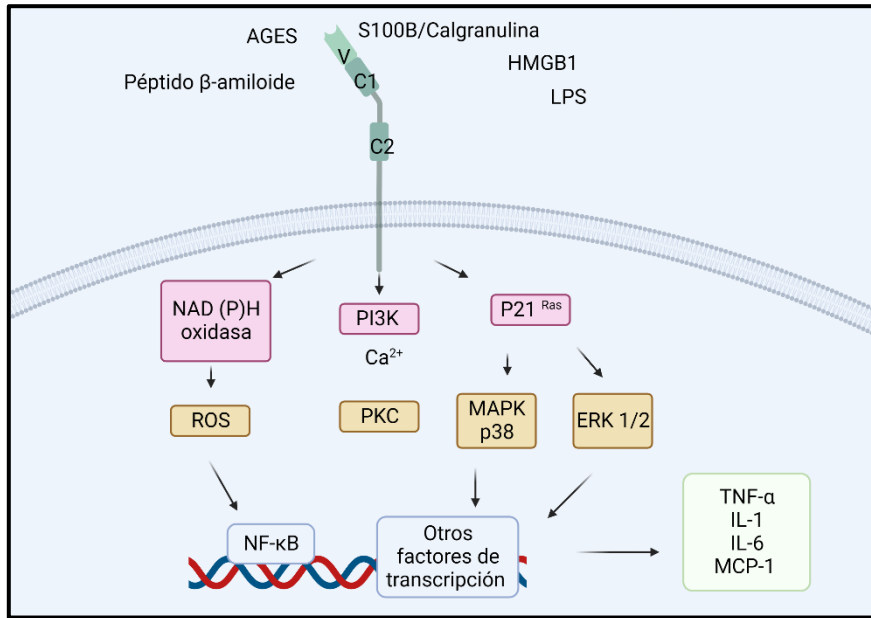


Figura 5. El receptor RAGE. El receptor RAGE es un receptor multiligando, su estimulación conduce a la activación de vías pro-inflamatorias y pro-oxidantes. Modificado de (Vanhooren et al., 2015). Imagen realizada en Biorender.

El TLR-4 y el RAGE son receptores que reconocen a PAMPs y DAMPs, iniciando y manteniendo las respuestas inflamatorias.

1.3 DAMPs

Los DAMPs son moléculas endógenas capaces de inducir una respuesta inmune en el organismo. En condiciones fisiológicas los DAMPs se encuentran dentro de las células. Sin embargo, su incremento en el medio extracelular puede darse en respuesta a algún tipo de daño.

Los DAMPs son liberados por diversos mecanismos (Fig. 6), que pueden ser pasivos o activos. Se les llama mecanismos pasivos a aquellos en que los DAMPs son liberados debido a la muerte celular. Entre estos mecanismos se encuentra la necrosis, un tipo de muerte celular no programada, en la cual hay ruptura de la membrana celular debido a condiciones químicas y físicas poco favorables para la célula (Feoktistova & Leverkus, 2015). La hipoxia y la isquemia tisular pueden causar muerte celular por necrosis y llevan a la liberación de una gran variedad de DAMPs, ARN extracelular, organelos, ATP, histonas, entre otros (Murao et al., 2021a).

Otro mecanismo pasivo es la apoptosis o muerte celular programada, que es un tipo de muerte celular en la que no hay ruptura de la membrana celular. En la apoptosis se da condensación citoplasmática y nuclear tras la activación de proteasas de cisteína (Caspasas) y endonucleasas. La apoptosis genera que algunas moléculas como histonas, ARN extracelular o moléculas nucleares sean liberadas al medio extracelular y actúen como DAMPS (Murao et al., 2021a).

La piroptosis, o también conocida como muerte celular programada pro-inflamatoria, es otro tipo de muerte celular. Es mediada por la actividad del inflammasoma y de la Caspasa-1, mecanismo que lleva a lisis, algunos de los DAMPs liberados por este tipo de muerte celular son el ATP, ADN circulante en plasma (ADNcf) o la proteína de alta movilidad B1 (HMGB1) (Bergsbaken et al., 2009; Murao et al., 2021a).

Otro mecanismo de liberación de DAMPs es la ferroptosis, que es un mecanismo de muerte celular programada debida a la acumulación de hierro y a la peroxidación lipídica desencadenada por la inactivación del sistema de defensa antioxidante dependiente de glutatión (GSH), lo que conduce a la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática. Un DAMP producido por este mecanismo es la proteína HMGB1 (Cao & Dixon, 2016).

Finalmente, las trampas extracelulares de DNA son estructuras formadas de proteínas citosólicas y granulares ensambladas en cromatina descondensada que conforman redes extracelulares, su función es la de neutralizar microorganismos patógenos. Al ser activado este mecanismo también se liberan al medio extracelular DAMPs como histonas, enzimas antimicrobianas, ADN circulante en plasma, mieloperoxidasa, entre otros (Murao et al., 2021; Papayannopoulos, 2018).

La liberación de DAMPs no se da únicamente por la muerte celular, también existen mecanismos activos, en los cuales son liberados por medio de exocitosis, como es el caso de la liberación de lisosomas secretores y exosomas. Entre las moléculas que pueden ser liberadas por estos mecanismos podemos encontrar ADN circulante, ATP, HMGB1, histonas, proteínas de choque térmico, RNA extracelular, entre otros (Murao et al., 2021a).

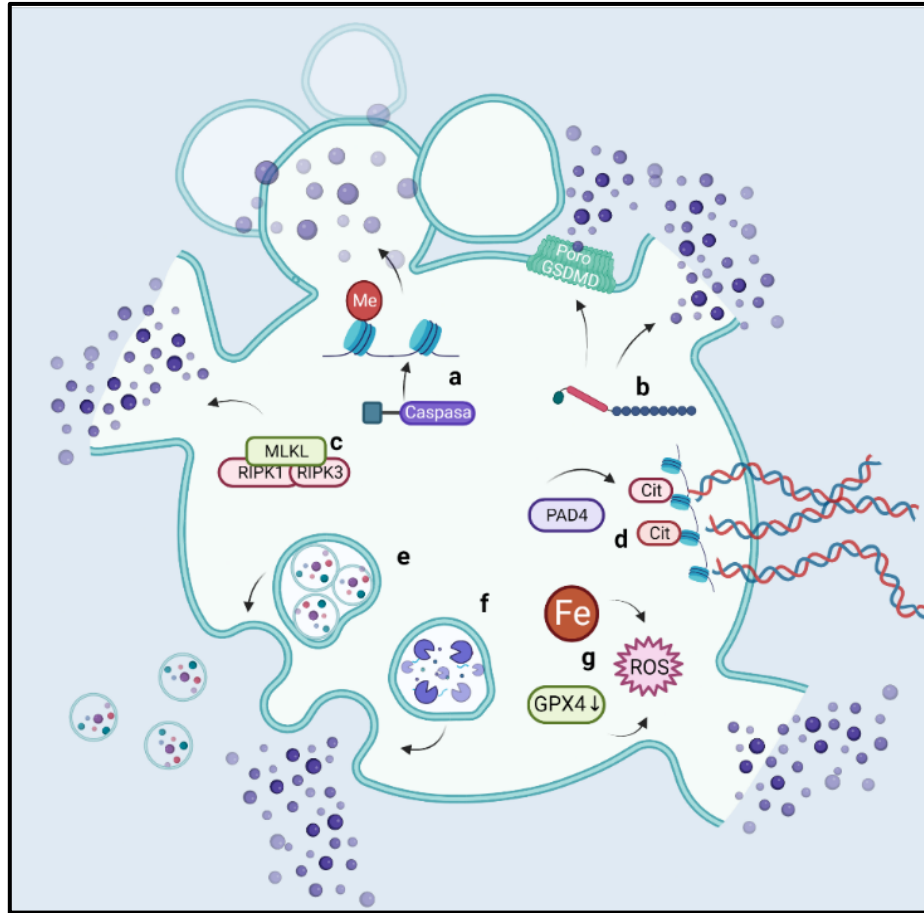


Figura 6. Mecanismos de liberación de DAMPS. Los DAMPS pueden ser liberados por diversos mecanismos, entre ellos están: a. Apoptosis, b. Piroptosis, c. Necrosis, d. Trampas extracelulares, e. Exosomas, f. Lisosomas y g. Ferroptosis. Modificado de (Muraio et al., 2021). Figura elaborada en Biorender.

Los DAMPs pueden tener diversos orígenes y ser de naturaleza protéica o no protéica. Entre los de naturaleza no protéica se encuentran el ATP, el ácido úrico y el ADN, entre otros. Los DAMPs de origen proteico incluyen a las proteínas de choque térmico (HSPs), fragmentos de ácido hialurónico, y proteínas de unión a calcio, como las de la familia S100 (Thundyil & Lim, 2015).

1.3.1 Proteína S100B

1.3.1.1 Estructura y funciones de la proteína S100B

Las proteínas S100 son una familia de proteínas multifuncionales que se expresan en un amplio número de tejidos y están involucradas en procesos celulares

como contracción, motilidad, crecimiento y diferenciación celular, progresión del ciclo celular, transcripción, organización estructural de las membranas, dinámica de los componentes del citoesqueleto, protección contra daño celular oxidativo y fosforilación de proteínas. Los niveles de expresión alterados de las proteínas S100 están relacionadas con varios tipos de patologías, entre las que destacan enfermedades neoplásicas, cardíacas, inflamatorias y cerebrales (Michetti et al., 2019).

La S100B es una proteína homodimérica con un peso aproximado de 10.5 kDa que tiene una estructura de hélice-bucle-hélice y 2 regiones de unión a calcio del tipo "mano EF". La S100B es un sensor de calcio y su función principal es regular la actividad de proteínas intracelulares (Yardan et al., 2011). Dentro de la célula, la proteína S100B estimula la proliferación y la migración celular. También, interactúa con una amplia variedad de proteínas y esa interacción regula un gran número de funciones como la transcripción, degradación de proteínas y homeostasis de calcio (Donato et al., 2009).

La proteína S100B se libera al espacio extracelular principalmente por dos mecanismos: exocitosis y por liberación asociada a muerte celular. A nivel extracelular, las funciones de esta proteína dependen de su concentración. Está reportado que en concentraciones nanomolares estimula el crecimiento de neuritas y mejora la supervivencia neuronal. También, disminuye la pérdida de la función mitocondrial y la muerte neuronal. Sin embargo, cuando las concentraciones de S100B llegan al rango micromolar, esta proteína puede comenzar a tener efectos nocivos a nivel cerebral, induciendo apoptosis neuronal y puede contribuir a los cambios patológicos en procesos neurodegenerativos (Donato et al., 2010; Yardan et al., 2011).

En el SNC la proteína S100B es producida de forma principal, aunque no exclusiva, por los astrocitos. La expresión aumentada de la proteína S100B en el SNC representa un sello distintivo de la activación astrocítica, que promueve estados de neuroinflamación o incluso, neurodegeneración. Al respecto, está reportado que los niveles de la proteína S100B y su distribución en el tejido nervioso, tanto de pacientes como en modelos experimentales de diferentes desórdenes neurológicos, pueden ser usados como un biomarcador y podrían también estar relacionados directamente con el progreso de enfermedades, tales como las de daño agudo al

cerebro (accidente cerebrovascular isquémico/hemorrágico, lesión traumática) y de enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple y Huntington) (Michetti et al., 2019).

1.3.1.2 La proteína S100B en algunas enfermedades neurodegenerativas

1.3.1.2.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa cuya principal característica es la pérdida progresiva de funciones cognitivas como la memoria. Los principales signos patológicos de la EA son la formación de ovillos intracelulares de proteínas tau fosforiladas y la presencia extracelular de agregados de proteína β -amiloide, lo que conduce al deterioro neuronal progresivo en regiones como el hipocampo (Soria Lopez et al., 2019).

A través de los años se ha demostrado una asociación entre la expresión de la proteína S100B y la EA. En modelos animales se logró observar la sobreexpresión de la proteína S100B en regiones gravemente afectadas, así como la presencia de astrocitos marcados con S100B cerca de agregados de proteína tau. Además, en experimentos *in vitro*, cultivos de astrocitos tratados con el péptido β -amiloide sobreexpresaron a la proteína S100B (Chow et al., 2010). Por otra parte, en algunos modelos de EA en ratones transgénicos como el Tg2576, se encontraron niveles incrementados de la proteína S100B y una gran susceptibilidad a la neuroinflamación (Mori et al., 2010).

1.3.1.2.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la región cerebral conocida como *sustancia nigra*, lo que lleva a los pacientes que la padecen a sufrir alteraciones motoras graves.

Estudios realizados por Sathe y colaboradores (Sathe et al., 2012) mostraron que la proteína S100B se encuentra sobreexpresada en regiones como la *sustancia nigra* y el estriado, en un modelo experimental de la EP. Mientras tanto, también se ha

reportado que ratones transgénicos que sobreexpresan a la proteína S100B, manifiestan anomalías motoras, similares a las de la EP (Liu et al., 2011).

1.3.1.2.3 Esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune del SNC, caracterizada por la desmielinización inflamatoria axonal crónica (Loma & Heyman, 2011). Está reportado que la proteína S100B se sobreexpresa en las regiones de lesión y se cree que podría contribuir a la activación de astrocitos y microglía, y con esto, al incremento de mediadores de la inflamación y de especies reactivas de oxígeno (Barateiro et al., 2016).

1.4 Modelos para estudiar la enfermedad de Huntington

Para el estudio de la EH y los procesos relacionados a esta patología, como lo es la neuroinflamación, se han desarrollado diversos modelos experimentales que permiten estudiar el origen, desarrollo y mecanismos de esta enfermedad. Estos modelos experimentales están clasificados en neurotóxicos agudos y genéticos. Los modelos genéticos se pueden subdividir en transgénicos y *knock in*. Los transgénicos son resultado de la inserción al azar de partes del alelo mutado de la EH humana. Un ejemplo de este modelo es el ratón R6/1, al cual se le fue insertado el exón 1 del gen humano de la HTT y expresa aproximadamente 116 repetidos de CAG (Ramaswamy et al., 2007). Por su lado, la generación de modelos *knock in*, implica la sustitución de una porción del gen *htt* del ratón por una copia mutante humana que contiene una región CAG expandida (Serrano Sánchez et al., 2011). Por otro lado, los modelos de neurotoxicidad aguda están basados en la excitotoxicidad producida por la sobreestimulación de receptores de aminoácidos excitadores como el receptor a N-Metil-D-Aspartato (NMDA), lo que produce alteraciones serias en la fisiología de las neuronas produciéndoles la muerte. Las toxinas que se utilizan en este tipo de modelos son: el ácido kaínico (AK), el ácido iboténico (IBO) y el ácido quinolínico (AQ) (Serrano Sánchez et al., 2011).

El AQ es un metabolito neuroactivo del triptófano. Es un agonista de los receptores de glutamato tipo NMDA, lo que produce un incremento en la cantidad de calcio intracelular. El AQ tiene la capacidad de reproducir algunos cambios bioquímicos y neuropatológicos similares a los observados en la EH, afecta principalmente a las NEM y reduce severamente la cantidad del neurotransmisor inhibitorio GABA en el estriado. Por otro lado, produce cambios en la actividad locomotora y altera las capacidades de aprendizaje y memoria (Serrano Sánchez et al., 2011).

2. Antecedentes

Estudios realizados por Martínez-Gopar en el 2018 demostraron que las CCs tienen un papel importante en la neuroinflamación observada en el modelo de neurotóxico de la EH, inducido con AQ. Utilizando un ratón que es deficiente de células cebadas (W-sh), se demostró que el daño inducido por la inyección intraestriatal de AQ, evaluado por la aparición de la conducta de giros ipsilaterales, estaba disminuida en animales W-sh y que dichos efectos se restablecían luego de reconstituir a los animales con CCs, demostrando así la participación de éstas en el daño cerebral inducido por el AQ. Por otro lado, en los animales W-sh también se previno la reducción de las concentraciones de GABA, resultante del daño con AQ, en comparación con los animales WT. La participación de las CCs en este daño se comprobó al reconstituir a los animales W-sh con CCs y observar nuevamente la disminución de los niveles de GABA ocasionada por el AQ (Martínez-Gopar et al., 2022).

3. Justificación

Las CCs han sido ampliamente reconocidas por su papel en las respuestas alérgicas. Sin embargo, se sabe poco acerca de su papel en respuestas de la inmunidad innata como la neuroinflamación. Por lo tanto, conocer los efectos de algunos DAMPs y sus receptores en ese tipo celular es un área de gran interés. En este proyecto nos propusimos: 1) estudiar los efectos de la proteína S100B sobre la producción de citocinas proinflamatorias en una preparación *in vitro* de CCs; 2) identificar a los receptores involucrados en tales acciones; y 3) analizar si el DAMP S100B es producido en el modelo de la EH, inducido con AQ.

4. Hipótesis

1. La proteína S100B inducirá la producción de RNAm de citocinas proinflamatorias a través de los receptores RAGE y TLR-4 en CCs derivadas de BMMCs.

2. La administración intraestriatal de AQ ocasionará un aumento en la expresión de la proteína S100B en el cuerpo estriado de ratones.

5. Objetivo general

1. Determinar el perfil transcripcional de citocinas proinflamatorias en CCs estimuladas con la proteína S100B y caracterizar la participación de los receptores RAGE y TLR-4 en los efectos observados.

2. Determinar si aumenta la síntesis de la proteína S100B en el estriado de ratón después de la administración intraestriatal de AQ.

5.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la producción de ARNm de citocinas proinflamatorias en CCs estimuladas con la proteína S100B.

2. Evaluar la participación de los receptores TLR-4 y RAGE en la producción de ARN mensajero de citocinas proinflamatorias en CCs estimuladas con la proteína S100B, utilizando herramientas farmacológicas.

3. Evaluar la expresión de mensajeros de la proteína S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ.

4. Evaluar la expresión de la proteína S100B en cortes cerebrales de ratones lesionados con AQ.

6. Diseño experimental

6.1 Objetivo 1

Para cumplir con el objetivo 1, se realizó un curso temporal de estimulación en cultivos de CCs derivadas de médula ósea (BMMC) de ratón con 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de la proteína S100B, dejando a las células en contacto con el estímulo por 0, 1, 2 y 4 h. Por otro lado, como control positivo, se realizó otro curso temporal con 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de LPS a los mismos tiempos (0, 1, 2 y 4 h) de estimulación. En ambos casos se utilizaron 2×10^6 BMMC (previamente sensibilizadas con IgE por 24h) en 1 mL de medio RPMI. Finalmente se extrajo el ARNm y se realizaron experimentos de RT-PCR para las citocinas TNF e IL-6. También se realizó el ensayo TaqMan® Para la identificación del perfil de expresión de citocinas por parte de las CCs. Con estos experimentos se evaluó el efecto de la proteína S100B en la expresión de RNAs mensajeros en una respuesta inflamatoria en una preparación *in vitro* de CCs (BMMC).

6.2 Objetivo 2

Para evaluar la participación de los receptores RAGE y TLR-4 en las acciones de la proteína S100B sobre las BMMCs se realizaron ensayos de estimulación de las células con la proteína S100B en presencia de inhibidores específicos de los receptores RAGE y TLR-4, como se describe a continuación:

6.2.1 Evaluación de la participación del receptor TLR-4

Para evaluar la participación del receptor TLR-4 en la activación de las BMMCs con la proteína S100B se utilizó el antagonista farmacológico TAK-242 (1 μM). Para ello, 2×10^6 células previamente sensibilizadas con IgE, fueron incubadas por 15 minutos con el fármaco TAK-242 y posteriormente se llevó a cabo un curso temporal de estimulación con la proteína S100B (como ya se indicó anteriormente) a 0, 1, 2 y 4 h. Finalizando el curso temporal se realizó la extracción del ARN y RT-PCR para evaluar la producción de citocinas proinflamatorias.

6.2.2 Evaluación de la participación del receptor RAGE

Para evaluar la participación del receptor RAGE en la activación de las CCs con la proteína S100B se utilizó el antagonista farmacológico FPS-ZM1 (1 mM) (Abcam 235552). Para ello 2×10^6 células previamente sensibilizadas con IgE, fueron incubadas por 15 minutos con el fármaco y posteriormente se llevó a cabo un curso temporal de estimulación con la proteína S100B (como se indicó previamente) a 0, 1, 2 y 4 h. Finalizando el curso temporal se realizó la extracción del ARN y RT-PCR para evaluar la producción de citocinas proinflamatorias.

6.3 Objetivo 3

Para poder cumplir con el objetivo 3 y analizar la expresión del RNAm de S100B en el estriado de animales sometidos al modelo de la EH inducido con AQ, se utilizaron 15 ratones hembra de la cepa C57BL6/J de entre 25-30 g de peso que fueron distribuidos en 5 grupos de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: el grupo 1 fue lesionado con 1 μ L SSI e inmediatamente después fue sacrificado. Los grupos 2-4 fueron sacrificados a distintos tiempos después de la lesión con AQ: 30 min, 2 h, 24 h y 72 h respectivamente. Finalmente, fueron sacrificados por decapitación y se realizó la disección del estriado y posteriormente se realizó RT-PCR para evaluar la expresión del mensajero de la proteína S100B en dicho tejido.

6.4 Objetivo 4

Para cumplir con el objetivo 4, se utilizaron 9 ratones C57BL6/J de entre 25-30 g de peso que fueron divididos en 3 grupos (n=3). Todos los ratones fueron sometidos a cirugía estereotáxica. Al grupo 1 se le administró 1 μ L de SSI inmediatamente después y aún bajo sedación profunda fue sometido a perfusión transcardiaca para obtener el tejido cerebral. Los grupos 2 y 3 fueron lesionados con 1 μ L de AQ (30 nmol/ μ L) y una vez transcurridas 2 h y 72 h después de la cirugía, respectivamente y bajo sedación profunda fueron sometidos a perfusión transcardiaca, se extrajo el tejido cerebral y fue preservado para posteriormente detectar la expresión de la proteína S100B mediante la técnica de inmunofluorescencia.

7. Metodología

7.1 Animales

Para los cultivos de BMMC y para la lesión estriatal con AQ se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6J.

Los animales se mantuvieron en condiciones óptimas, con ciclos de luz/oscuridad, con una temperatura de 24°C, con agua y comida a libre consumo, en la Unidad para la Producción y Uso de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN). Los protocolos de generación de BMMCs y experimentos *in vivo* fueron sometidos a aprobación del Comité de Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

7.2 Generación de BMMCs

Después de someter a los animales a eutanasia en una cámara de CO₂, se extrajo la médula ósea de las tibias de los ratones C57BL/6J. Se colocaron en medio de cultivo RPMI enriquecido con IL-3 (20 ng/mL), SCF (10 ng/mL), 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 UI/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 50 µM de mercaptoetanol (2-ME) y aminoácidos no esenciales 1X. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 5% de CO₂ y se dejaron crecer por aproximadamente 5 semanas antes de ser utilizados para las distintas condiciones experimentales.

7.3 RT-PCR de punto final

7.3.1 Extracción de ARNm

Las células y el tejido cerebral fueron homogenizados con 500 µL de TRI-reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), posteriormente se adicionaron 100 µL de cloroformo y fueron centrifugadas a 28,000xg, por 10 min a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo que contenía 3 µL de glucógeno, se le agregaron 250 µL de isopropanol, se dejó precipitar a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 28,000x g durante 10 min a 4°C. Se desecharon los sobrenadantes y el pellet fue lavado con 500 µL de etanol/agua tratada con DEPC al

75% y una vez más se centrifugó a 28,000xg, por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 10 min. Finalmente, se le añadieron 7.5 µL de RNA-secure y se incubó a 60°C durante 15 min. La cantidad de ARNm obtenida fue cuantificada en un NANODROP 2000 de (Thermo Scientific MA, USA).

7.3.2 RT-PCR

Para la síntesis de ADNc se empleó el kit RevertAid First Strand cDNA synthesis kit de Thermo Scientific (MA, USA). A cada muestra se le adicionó 1 µL de oligo, 1-5 µg de ARN y agua/DEPC hasta ajustar un volumen de 12 µL y se incubó a 65°C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 4 µL buffer de reacción 5X, 1 µL de inhibidor de RNasa RiboLock RNase inhibitor (20 µg/µL), 2 µL de dNTP 10 mM y 1 µL de transcriptasa reversa RevertAid Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µL), y se incubaron a 42°C durante 60 min. Para detener la reacción, las muestras se calentaron a 70°C durante 10 min. Finalmente se añadió la cantidad necesaria para 130 µL de agua/DEPC y se almacenó a -80°C.

Para la amplificación del ADNc, a cada muestra se le agregaron 3.7 µL de ADNc, 2.5 µL de buffer PCR 10X con MgCl₂, 0.5 µL de dNTP 10 mM, 0.2 µL de Taq polimerasa 5U/µL, 17 µL de agua/DEPC, 1 µL de oligo sentido y 1 µL de oligo antisentido (ver tabla 2). Posteriormente se colocaron en un termociclador y las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 94°C (5 min), desnaturalización 94°C (1 min), alineación 60°C (2 min) y extensión 72°C (4 min). El número de ciclos para cada citocina fue de 25-30 ciclos. Finalmente, los productos de la PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un equipo Bio-Imaging Systems (Thorlabs, NJ, USA) y el programa GelCapture. Para el análisis densitométrico de las bandas fue empleado el programa Gel QuantExpress.

Tabla 2. Condiciones para la amplificación del ADNc por PCR.

Gen	Secuencia 5'-3' (sentido)	Secuencia 3'-5' (antisentido)	Tamaño del amplicón (pb)
IL-6	ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAG AC	CACTAGGTTGCCGAGTAGATCTC	640
TNF-α	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGG TGATCGGTCC	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGA CGGTGTGGG	380
S100B	ATGGAATCCTGTGGCATCCA	CGTCAGGAGGAGCAATGAT	129
β-Actina	TGAAGGTCGGTGTGAACGGAT TTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCACC AC	200
GAPDH	TGAAGGTCGGTGTGAACGGAT TTGGC	CATGTAGGCCATGAGGTCCACC AC	800

7.4 Ensayo TaqMan ®

Para la identificación del perfil de expresión de citocinas por parte de las CCs, se utilizó la matriz para ensayos múltiples de expresión génica TaqMan® Mouse Immune Array from Applied Biosystems® (Thermo Scientific MA, USA). Los genes analizados, la proteína para la que codifican y la o las funciones principales de dicha proteína se muestran en la tabla 3. Para llevar a cabo la reacción se utilizaron 100 ng de ADNc se utilizó el equipo de PCR en tiempo real QuantStudio™3. El análisis de datos se realizó con el programa QuantStudio™ Desing & Analysis Software v1.4.

Tabla 3. Genes analizados, proteínas para las que codifican y funciones principales de dichas proteínas.

Gen	Proteína	Función
Ccl2	Quimiocina 2 con motivo C-C	Induce movilización de calcio intracelular y quimiotaxis en células inmunes
Ccl5	Quimiocina 3 con motivo C-C	Quimioatrayente para monocitos circulantes, células T y eosinófilos
Cd68	Molécula CD68	Juega un papel importante en las actividades fagocíticas de macrófagos tisulares
Cd80	Molécula CD80	Participa en la señal co-estimuladora esencial para la activación de los linfocitos T
Cd86	Molécula CD86	Involucrado en la señal co-estimuladora esencial para la proliferación de células T
Csf2	Factor estimulador de colonias 2	Citocina que estimula el crecimiento y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas
Cxcl10	Quimiocina 10 con motivo C-X-C	Involucrada en procesos de quimiotaxis, diferenciación y activación de células inmunes periféricas
H2-Ea	Antígeno E del complejo mayor de histocompatibilidad clase II	Implicada en el reconocimiento antigénico
Icos	Co-estimulador inducible de células T	Mejora las respuestas de las células T frente a un antígeno
Il10	Interleucina 10	Citocina antiinflamatoria, limitando el daño tisular
Il15	Interleucina 15	Estimula la proliferación de linfocitos T
Il18	Interleucina 18	Citocina involucrada en la reparación de la barrera epitelial
Il2	Interleucina 12	Citocina que puede actuar como factor de crecimiento para células T y NK activadas
Il4	Interleucina 14	Estimula la proliferación de linfocitos B
Il6	Interleucina 16	Citocina pleiotrópica involucrada en mecanismos relacionados a la inmunidad, regeneración de tejidos y metabolismo.
Ly96	Antígeno linfocitario 96	Se une al LPS y coopera con el TLR-4
Bax	X asociado a BCL2	Implicada en apoptosis mitocondrial
Bcl2	Regulador de apoptosis bcl2	Regulador apoptosis
Bcl2l1	BCL2 como 1	Regulador apoptosis
C3	Complemento C3	Complemento
Ccl3	Quimiocina 3 con motivo C-C	Quimiocina implicada en la tolerancia inmune
Ccr2	Receptor de quimiocina CCL2	Receptor de la quimiocina CCL2
Ccr7	Receptor de quimiocina CCL7	Receptor de la quimiocina CCL7
Cd28	Molécula CD28	Activación de células T y proliferación
Cd34	Molécula CD24	Molécula de adhesión
Cd38	Molécula CD38	Síntesis de los segundos mensajeros: cADPR y NADP
Cd40	Molécula CD40	Inducción de la secreción de inmunoglobulinas
Csf1	Factor estimulante de colonias 1	Factor de crecimiento para fagocitos mononucleares
Ctla4	Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos	Receptor inhibitorio Regulador de células T

Cxcl11	Quimiocina 11 con motivo C-X-C	Quimiotáctico para células T activadas
Edn1	Endotelina 1	Vasoconstrictor
Fas	Receptor de muerte de superficie celular Fas	Implicada en el mecanismo de apoptosis
Fasl	Ligando de Fas	Implicada en el mecanismo de apoptosis
Fn1	Fibronectina 1	Adhesión celular
Gzmb	Granzima B	Implicada en el mecanismo de piroptosis
H2-Eb1	Antígeno E del complejo mayor de histocompatibilidad clase II	Elemento del complejo mayor de histocompatibilidad
Hmox1	Hemoxigenasa	Enzima metabólica
Ikbkb	Inhibidor de la subunidad beta de la quinasa del factor kappa B nuclear	Participa en la activación de NF-kappa-B
Il12a	Interleucina 12a	Regulador de células T y células natural Killer, induce la producción de INF gamma
Il12b	Interleucina 12b	Regulador de células T y células natural Killer, induce la producción de INF gamma
Il13	Interleucina 13	Estimula la proliferación de células B y la activación de eosinófilos basófilos y CCs
Il1a	Interleucina 12 alfa	Actúa como DAMP
Il1b	Interleucina 12 beta	Induce síntesis de prostaglandinas, proliferación de fibroblastos, activación de células T
Il2ra	Receptor de interleucina 12	Receptor de interleucina 12
Nfkb1	Factor nuclear kappa B subunidad 1	Factor de transcripción implicado en procesos de inflamación, diferenciación celular, crecimiento celular, tumorigénesis
Nfkb2	Factor nuclear kappa B subunidad 2	Factor de transcripción implicado en procesos de inflamación, diferenciación celular, crecimiento celular, tumorigénesis
Nos2	Óxido nítrico sintasa 2	Produce óxido nítrico
Ptgs2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2	Ciclooxigenasa y peroxidasa en la biosíntesis de prostanoïdes
Ptprc	Receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C	Activación de células T y proliferación
Sele	Selectina E	Inmunoadhesión
Ski	Proto onco gen SKI	Supresor de la señalización de TGF-β
Smad7	Miembro 7 de la familia SMAD	Supresor de la señalización de TGF-β
Socs1	Supresor de la señalización de citocinas 1	Supresor de la señalización de INF
Socs2	Supresor de la señalización de citocinas 2	Regulador negativo de la vía de señalización de la hormona de crecimiento/IGF1
Stat1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1	Transductor de señales y activador de la vía de INF
Stat3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3	Transductor de señales
Stat4	Transductor de señal y activador de la transcripción 4	Transductor de señales

Stat6	Transductor de señal y activador de la transcripción 6	Transductor de señales
Tgfb1	Transformador del factor de crecimiento beta 1	Reclutamiento y activación de factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión genética
Tnfrsf18	Miembro 18 de la superfamilia de receptores de TNF	Proteína involucrada en la interacción entre linfocitos T activados y células endoteliales
Vegfa	Factor de crecimiento endotelial vascular A	Factor de crecimiento activo en la angiogénesis, vasculogénesis, crecimiento de células endoteliales. Induce migración celular, inhibe la apoptosis.
Icam1	Molécula de adhesión intracelular	Interviene en la migración transendotelial de los leucocitos
Lif	Citocina de la familia de interleucina 6 LIF	Induce la diferenciación terminal en células leucémicas

7.5 Lesión estriatal con ácido quinolínico

La lesión estriatal se llevó a cabo mediante cirugía estereotáxica. Para ello, ratones de la cepa C57BL/6J fueron sometidos a anestesia general con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg, posteriormente se colocaron en el marco estereotáxico, se realizó una incisión en la piel para dejar expuesto el cráneo, se localizaron las siguientes coordenadas: +0.6 mm anterior y -2.0 mm lateral a bregma y -2.7 mm ventral a la duramadre de acuerdo con el atlas para ratón de Paxinos y Franklin (Paxinos & Franklin, 2001). Se realizó un pequeño orificio en el cráneo. Se inyectó 1 µL de AQ (30 nmol/µL) o SSI en el cuerpo estriado del hemisferio derecho a un flujo controlado de 0.5 µL/min. Se esperó un minuto antes de retirar la jeringa y posteriormente la piel fue suturada.

7.6 Disección del tejido cerebral

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente después se extrajo el cerebro. Se diseccionó el cuerpo estriado el cual fue inmediatamente almacenado a -70°C para su posterior análisis.

7.7 Inmunofluorescencia

La perfusión transcardiaca fue realizada con PBS 0.01 M/NaCl 0.9 % pH 7.4 (50 mL) y posteriormente con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS 0.01M / NaCl 0.9% pH 7.4 (100 mL). Se extrajo el cerebro y se colocó en sacarosa al 30% en PBS 0.01M / NaCl 0.9%. Se realizaron cambios de solución de sacarosa al 30% cada 12 h por 2 días. Una vez transcurrido el tiempo se realizaron cortes coronales de 30 µm en un crióstato. Los cortes fueron almacenados en PBS 0.1M pH 7.4. Para la inmunofluorescencia se utilizaron 3 cortes por cada cerebro y las siguientes

combinaciones de anticuerpo primario y secundario: anticuerpo primario hecho en conejo anti ratón anti-S100B (1:1500, Sigma, HPA015768) en combinación con el anticuerpo secundario hecho en burro anti-conejo Alexa fluor 555 (1:900, Thermo Fisher, A11055) y un anticuerpo primario hecho en cabra anti ratón anti-GFAP (1:600, Abcam, Ab53554) en combinación con el anticuerpo secundario hecho en burro anti-cabra Alexa fluor 488 (1:900, Thermo Fisher, A11055). Para la técnica de inmunofluorescencia, primero se realizaron 2 lavados de 15 min. con sacarosa al 30% en PBS 0.1M, después 4 lavados de 10 min. con PBS 0.1 M. Posteriormente, se llevó a cabo el bloqueo, para ello se utilizó albúmina de suero bovino BSA al 2%, suero de burro al 5%, gelatina de pescado al 1% y T-x100 al 0.3% en PBS 0.1M. Transcurrida 1 h se añadió el anticuerpo primario anti-S100B, dejando incubar a temperatura ambiente, una hora más tarde se añadió el anticuerpo primario anti-GFAP, una hora más tarde se dejó incubar por 72 h a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de dejó incubar 1 h a temperatura ambiente, posteriormente, se realizaron 4 lavados de 15 min. con PBS 0.1M, T-x100 0.3% y gelatina de pescado al 1%, después se añadieron los anticuerpos secundarios, se dejó incubar por 2 h a temperatura ambiente, finalmente se realizaron 4 lavados de 15 min, con T-X100 0.3% en PBS 0.1M seguidos de 2 lavados de 10 min. con PBS 0.1M.

Para la obtención de las imágenes confocales se utilizó el microscopio confocal (Carl-Zeiss LSM-800 con Airyscan de Zeiss, BW. Alemania) y el software Zen 2.3 SP1 Blue edition.

El análisis de las imágenes se realizó en el software ImageJ y para el análisis de colocalización se utilizó el plugin JACoB para realizar la cuantificación. Los datos fueron expresados en valores de coeficiente de Pearson, que es una medida de dependencia lineal que determina la correlación entre 2 variables. Valores superiores a 1, indican que dos variables correlacionan, entre más cercano es dicho valor a 1 más fuerte es esta correlación.

8. Resultados

8.1 Producción de mensajeros de TNF e IL-6 en BMDCs estimuladas con la proteína S100B

Con el fin de observar el efecto de la proteína S100B sobre la síntesis de citocinas proinflamatorias en las CCs, se evaluó la producción de ARNm de TNF e IL-6. Para ello, se estimularon 2×10^6 BMDCs con $1 \mu\text{g/mL}$ de la proteína S100B por tiempos de 1 y 2 h, utilizando LPS en una concentración de 500 ng/mL con los mismos tiempos de estimulación como control positivo. Como se observa en la figura 7, paneles A y B, se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control en la producción de mensajeros de TNF e IL-6 en células estimuladas con la proteína S100B. Como se puede apreciar, esta estimulación produjo una cantidad de estas citocinas similar a la obtenida por la estimulación con LPS, lo que indica que esta proteína es un inductor de la síntesis de citocinas proinflamatorias.

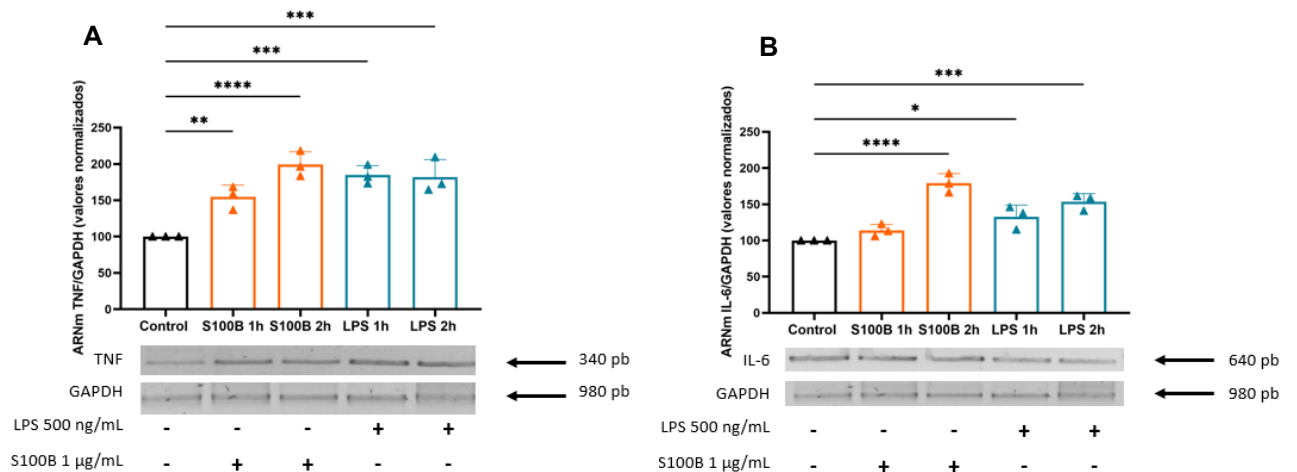


Figura 7. La proteína S100B induce la síntesis de citocinas proinflamatorias en BMDCs. (A) ARNm de TNF de BMDCs estimuladas con la proteína S100B ($1 \mu\text{g/mL}$) a 2 y 4 h (barras color naranja) y con LPS (500 ng/mL) a 2 y 4 h (barras color azul). (B) ARNm de IL-6 de BMDCs estimuladas con la proteína S100B ($1 \mu\text{g/mL}$) a 2 y 4 h (barras color naranja) y con LPS (500 ng/mL) a 2 y 4 h (barras color azul). Valores normalizados. Los valores representan el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

8.2 Participación de los receptores RAGE y TLR-4 en la producción de mensajeros de TNF e IL-6

Para evaluar la participación de los receptores RAGE y TLR-4 en la producción de ARNm de citocinas proinflamatorias en BMMCs estimuladas con la proteína S100B, se utilizaron los fármacos FPS-ZM1 y TAK-242, antagonistas de los receptores RAGE y TLR4, respectivamente. Las células fueron pre-incubadas con los inhibidores 15 min antes de ser estimuladas con 500 ng/mL de LPS a distintos tiempos: 0, 1, 2 y 4 h, y otro grupo con 1 µg/mL de S100B durante 0, 1, 2 y 4 h. En la figura 8 se representa la expresión de ARNm de TNF. En el panel A se muestra que TAK-242 previno la producción de mensajero de TNF en las BMMCs estimuladas tanto con S100B como con LPS, indicando que la activación del TLR-4 induce la producción de mensajeros de TNF. Por otro lado, en el panel B se muestra que el FPS-ZM1 suprimió la producción de ARNm de TNF en células estimuladas con S100B, pero no en las estimuladas con LPS, lo que sugiere la participación del receptor RAGE en la síntesis de mensajeros de TNF en respuesta a la proteína S100B, pero no en la inducida por LPS.

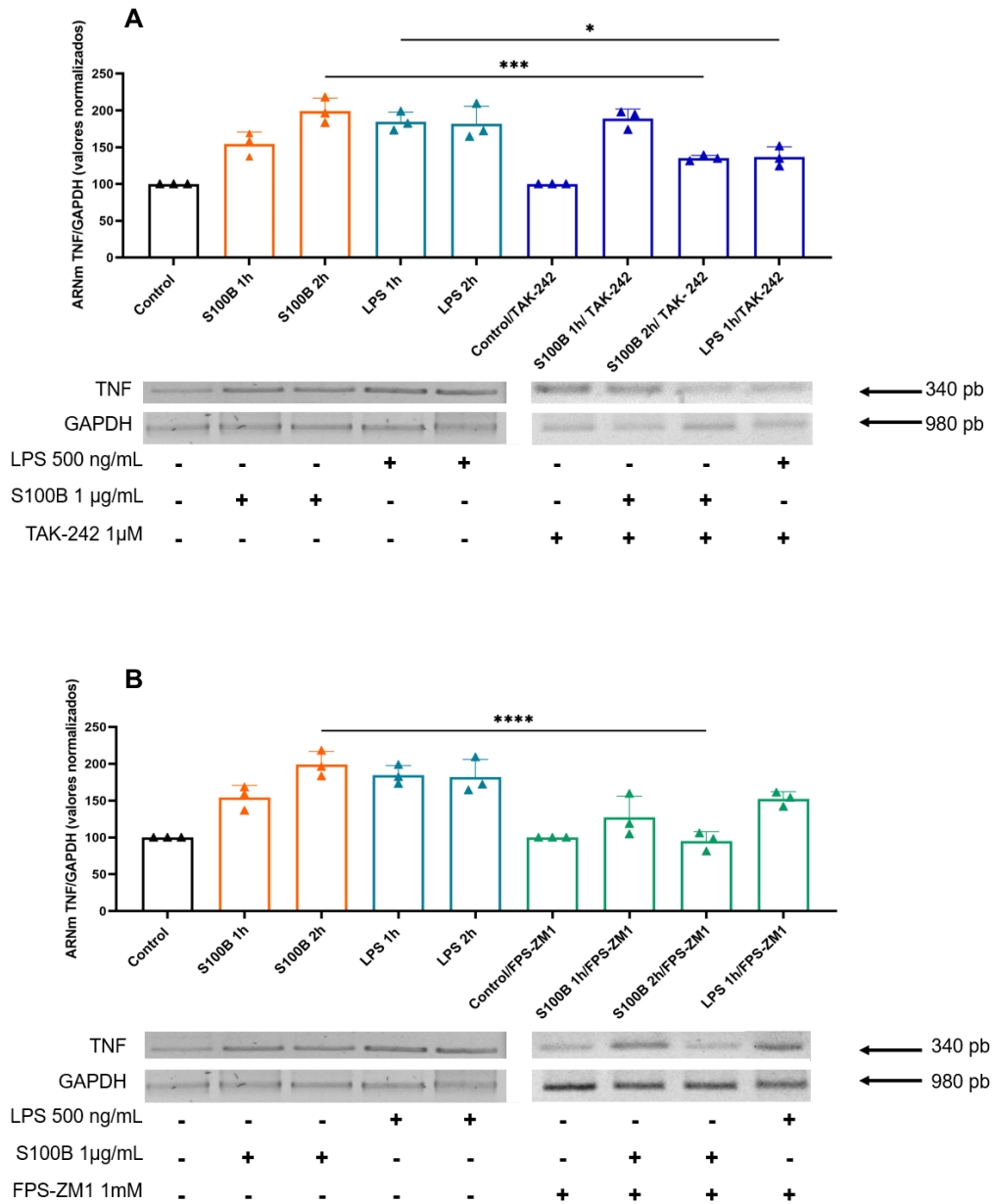


Figura 8. La proteína S100B induce la síntesis de ARNm de TNF mediante la activación de los receptores RAGE y TLR4. (A) ARNm de TNF de BMDCs estimuladas con la proteína S100B (1 µg/mL) por 2 y 4 h, y con LPS (500 ng/mL) por 1 h, previa incubación con el inhibidor del receptor TLR4 (TAK-242) (barras color morado). (B) ARNm de TNF de BMDCs estimuladas con la proteína S100B (1 µg/mL) por 2 y 4 h, y con LPS (500 ng/mL) por 1 h, previa incubación con el inhibidor del receptor RAGE (FPS-ZM1) (barras color verde) Valores normalizados. Los valores representan el promedio ± DE de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía prueba post hoc de Tukey * $p < 0.05$ **** $p < 0.001$

Por otro lado, se analizó la producción de mensajeros de IL-6, otra citocina con actividad proinflamatoria. La figura 9 muestra la expresión de ARNm de IL-6 en BMMCs estimuladas con la proteína S100B y con LPS. Como se observa en el panel A, el bloqueo del receptor TLR-4 afecta de manera significativa la producción del mensajero de IL-6 respecto al grupo que fue estimulado con la S100B bajo las mismas condiciones, pero en ausencia del antagonista. De igual manera, en el panel B se aprecia que el uso del antagonista del receptor RAGE FPS-ZM1 inhibió el aumento de la producción del RNAm de IL-6 respecto al grupo tratado sólo con S100B, lo cual indica la participación de dicho receptor en la producción de ARNm de IL-6 inducida por S100B. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la producción de mensajeros de IL-6 en las células que fueron tratadas con FPS-ZM1 y posteriormente con LPS, lo que indica que el LPS no ejerce su efecto sobre la producción de mensajeros de IL-6 a través del receptor RAGE.

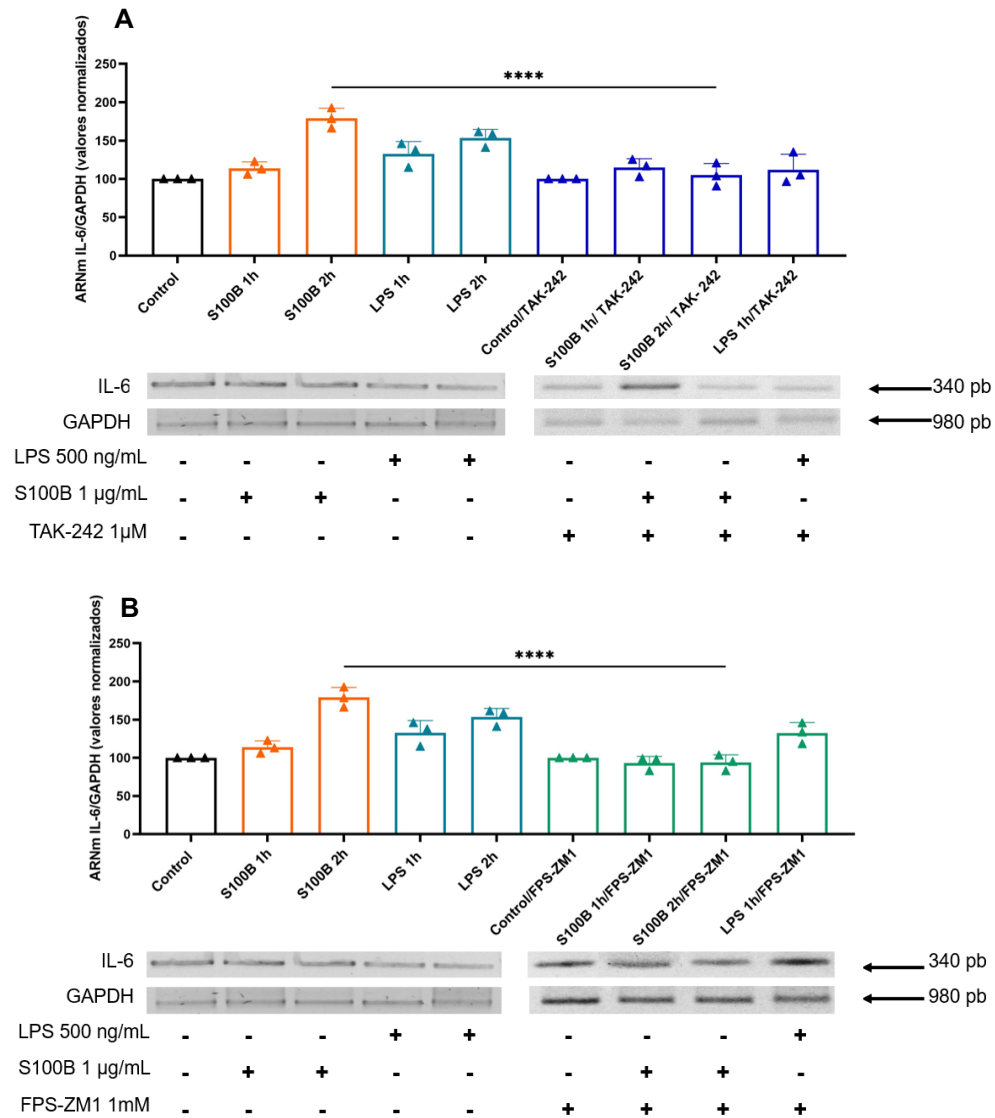


Figura 9. La proteína S100B induce la síntesis de ARNm de IL-6 mediante la activación de los receptores RAGE y TLR4. (A) ARNm de IL-6 de BMMCs estimuladas con la proteína S100B (1 µg/mL) por 2 y 4 h, y con LPS (500 ng/mL) por 1 h, previa incubación con el inhibidor del receptor TLR-4 (TAK-242) (barras color morado). (B) ARNm de TNF de BMMCs estimuladas con la proteína S100B (1 µg/mL) por 2 y 4 h, y con LPS (500 ng/mL) por 1 h, previa incubación con el inhibidor del receptor RAGE (FPS-ZM1) (barras color verde). Valores normalizados. Los valores representan el promedio ± DE de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía prueba post hoc de Tukey ****p<0.001

Con los resultados mostrados anteriormente se puede concluir que, bajo estas condiciones experimentales, la proteína S100B ejerce sus efectos en la producción de mensajeros de TNF e IL-6 a través de la activación de ambos receptores: RAGE y TLR-4. Por otro lado, el receptor RAGE no participa de manera importante en la producción de mensajeros de TNF e IL-6 en BMMCs estimuladas con LPS.

8.3 Perfil transcripcional de proteínas de interés inmunológico

Con el fin de ampliar el análisis del efecto de la proteína S100B en BMMCs, se utilizó la matriz para ensayos múltiples de expresión génica TaqMan® Mouse Immune Array from Applied Biosystems®. Para ello, 2×10^6 BMMC fueron estimuladas con $1 \mu\text{g/mL}$ de S100B por 1h, posteriormente se realizó RT-qPCR para la evaluación de la expresión de genes relacionados a la respuesta inmune. Como se observa en la figura 10, se logró la amplificación de mensajeros de diferentes proteínas relacionadas con la respuesta inmune, entre las que se encuentran citocinas, factores de transcripción, moléculas de adhesión, proteínas pertenecientes a las vías de señalización entre otros. Cabe mencionar que, debido a problemas que se presentaron para la importación y la estandarización del kit utilizado, derivados de las condiciones de la pandemia de COVID 19, los resultados que se muestran provienen de un solo experimento en donde resultaron adecuados todos los controles correspondientes.

En el eje de las Y de la figura 10 se muestran los genes analizados. En el eje de las X se muestra el cambio en la expresión de los ARNm de los genes respectivos representado como el logaritmo en base 2 del número de veces de cambio con respecto al grupo control. Los valores positivos representan genes que fueron sobreexpresados, los valores negativos muestran a los genes suprimidos.

De manera general, en la figura 10 puede verse que un gran número de genes muestran una disminución importante en su expresión, mientras que los RNAm para citocinas con actividades reguladoras, como la IL-4 y la IL-10 mostraron un ligero aumento. A pesar de que es necesario incrementar el número de experimentos cabe destacar que es la primera vez que se realiza un acercamiento al papel de la proteína S100B como un regulador de la expresión genética en las CCs y que, de manera interesante, puede observarse un aumento de citocinas reguladoras (y no pro-inflamatorias) en respuesta a un DAMP en este tipo celular.

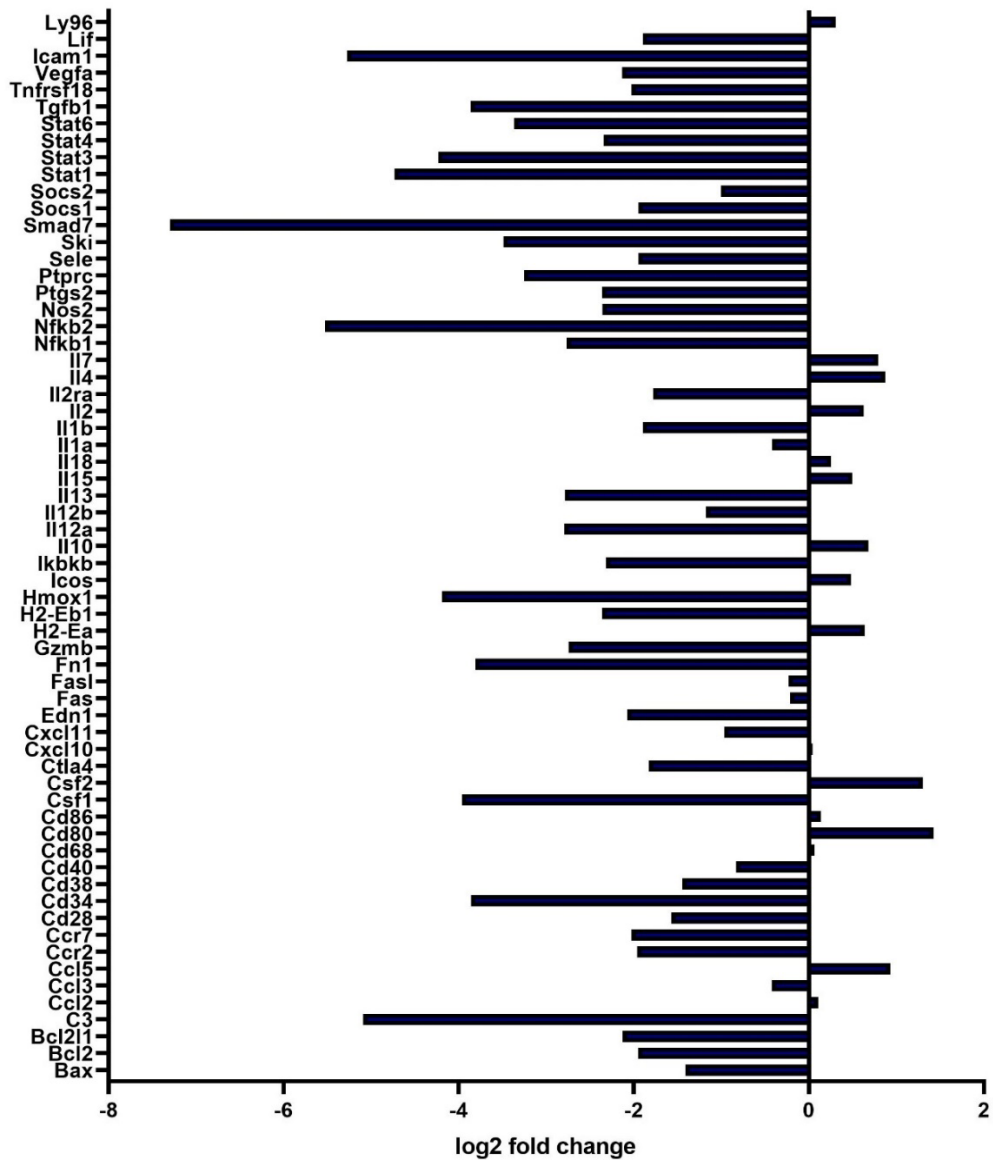


Figura 10. Expresión de genes relacionados a la respuesta inmune. Los datos fueron normalizados a 18s y son relativos al grupo control. El eje de las Y representa los genes analizados. En el eje de las X representado como *log2 fold change*, muestra el cambio en la expresión de los mensajeros de los genes analizados luego de la estimulación con S100B respecto al grupo control. Los valores positivos representan genes que fueron sobre expresados, los valores negativos muestran a los genes suprimidos. Los resultados mostrados representan un solo experimento. n=1

8.4 Expresión de ARNm de la proteína S100B en el cuerpo estriado de ratones lesionados con AQ.

Para evaluar la expresión de la proteína S100B en un modelo de EH *in vivo*, se lesionó el cuerpo estriado de ratones de la cepa C57BL6/J con AQ, que se sacrificaron 30 min, 2, 24 o 72 horas post lesión para la extracción del RNAm del estriado y la amplificación del RNAm de S100B. Como se muestra en la figura 11, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de ARNm de S100B entre los grupos.

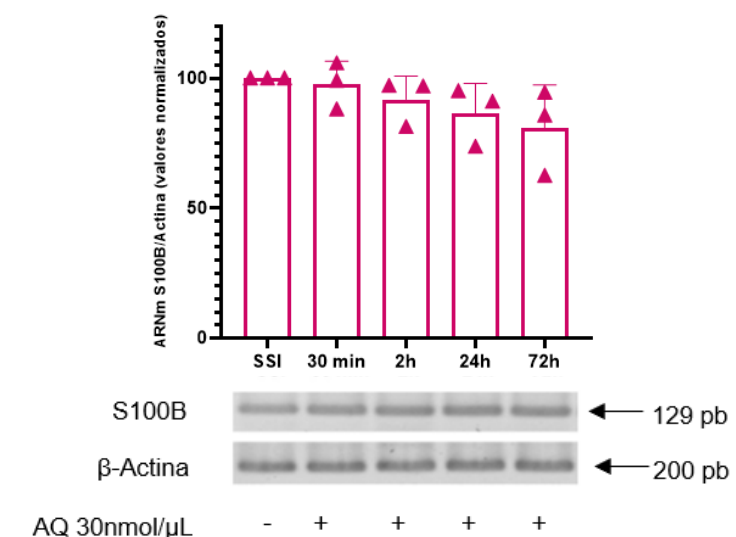


Figura 11. Expresión de ARNm de la proteína S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ. Los valores representan el promedio \pm DE de 3 animales por grupo. ANOVA de una vía n.s.

8.5 Efecto de la administración de AQ sobre la expresión de la proteína S100B en el estriado.

Con el fin de analizar cambios en la expresión del DAMP S100B en un modelo *in vivo* de la EH, se realizó la inyección intraestriatal con AQ en ratones de cepa C57BL6/J. Los tiempos de estimulación con AQ fueron 2 y 72 h. Posteriormente, se realizó perfusión transcardíaca con PFA para preservar el tejido cerebral y poder realizar inmunotinciones. Se utilizó un anticuerpo anti S100B para analizar la

expresión de esta proteína en el estriado. También se detectó a la proteína ácida fibrilar (GFAP), un marcador de reactividad astrocítica, con el fin de encontrar evidencia de que la producción de S100B en modelos de enfermedades neurodegenerativas como la EH *in vivo* está asociada a los astrocitos.

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos. En el panel A se muestra la zona cerebral en donde se realizó la inyección de AQ o salina y de donde se tomaron las muestras de tejido. En el panel B se muestra la inmunorreactividad a la proteína S100B, utilizando un anticuerpo acoplado a un fluoróforo rojo, en el tejido analizado. Como puede apreciarse, la marca inmunorreactiva se encuentra cerca de los núcleos celulares marcados con DAPI (azul), sugiriendo que la S100B se encuentra dentro de las células. Debido a que el aumento en la expresión de GFAP es indicador de daño neuronal y activación astrocítica, en los cortes cerebrales de animales lesionados con AQ se registró el incremento en la intensidad media de inmunofluorescencia asociada a la proteína ácida fibrilar (GFAP), para ello, se utilizó un anticuerpo acoplado a un fluoróforo verde, a las 72 h post-lesión debido a que el aumento en la expresión de esta proteína es indicador de daño neuronal y activación astrocítica. De manera interesante, el AQ también indujo un aumento en la intensidad media de la inmunofluorescencia de S100B, pero sólo a las 2 horas posteriores a la lesión. Estos datos muestran que la administración de AQ lleva a la expresión del DAMP S100B en el estriado de los ratones. Las cuantificaciones de la intensidad media de las distintas marcas de fluorescencia por campo pueden observarse en la figura 12 panel C.

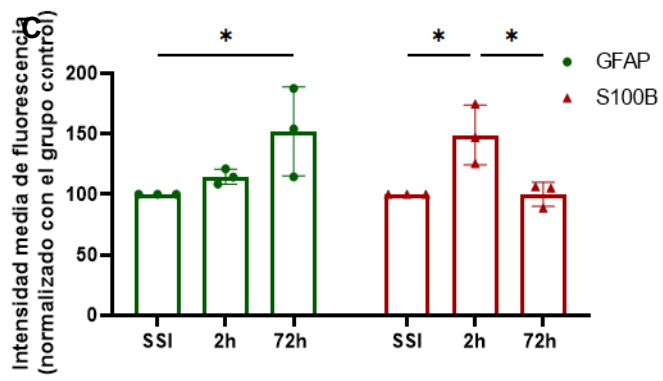
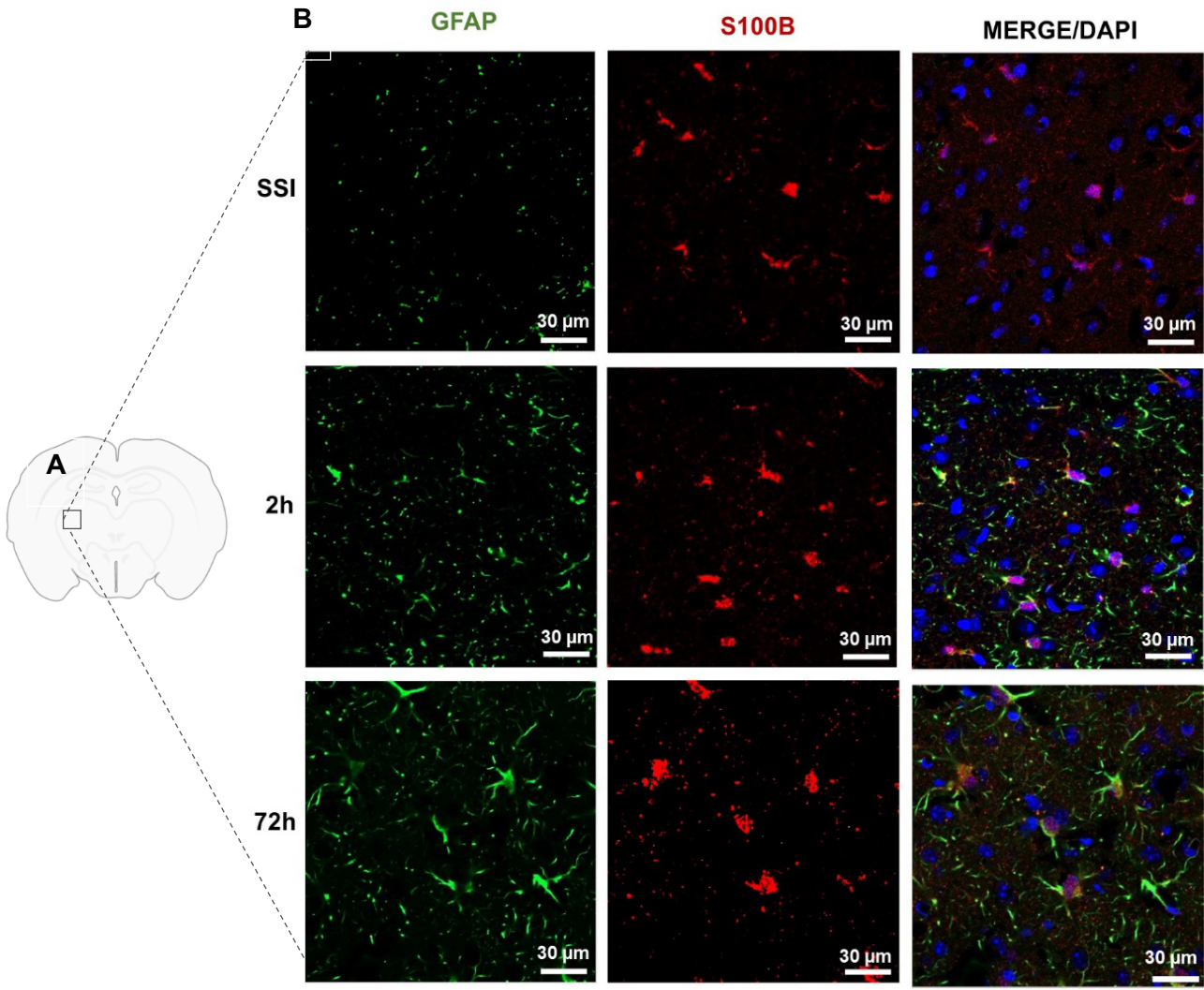


Figura 12. Expresión de la proteína S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ. A) Imagen representativa de la región analizada. B) Imágenes representativas de fluorescencia obtenidas con microscopio confocal a 40x. Se muestra la expresión de la inmunorreactividad asociada a las proteínas GFAP (verde) y S100B (rojo) en tejido cerebral a 2 y 72h post lesión con AQ; se utilizó SSI como grupo control. C) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia por campo. Datos normalizados con el grupo SSI. Los valores representan el promedio \pm DE de 3 animales por grupo. ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey $p < 0.05$.

Utilizando muestras de los mismos grupos experimentales también se realizó el análisis de colocalización de las marcas inmunorreactivas de GFAP y de S100B. Como se observa en la figura 13, panel A, en el grupo tratado con SSI no hay una gran colocalización de estas marcas (color amarillo), aunque dicha colocalización puede verse a los tiempos de 2 y 72 h. En el grupo SSI se observa la inmunorreactividad de S100B cerca de los núcleos celulares, sin embargo, parece no coincidir con la de GFAP. En cambio, en las muestras tomadas dos horas después del tratamiento con AQ se puede apreciar colocalización de las dos marcas inmunorreactivas en lo que parecen ser pies terminales de los astrocitos. De manera interesante, dicha colocalización fue más evidente en las muestras obtenidas 72 h después de la lesión. A ese tiempo, la marca en amarillo, que indica colocalización de ambas marcas inmunorreactivas, aparece en gran parte de la célula. En el panel B se muestra la cuantificación de la colocalización de la inmunorreactividad a GFAP y S100B en los 3 grupos.

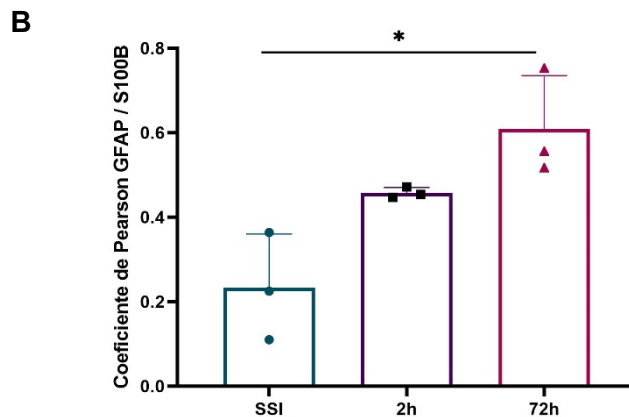
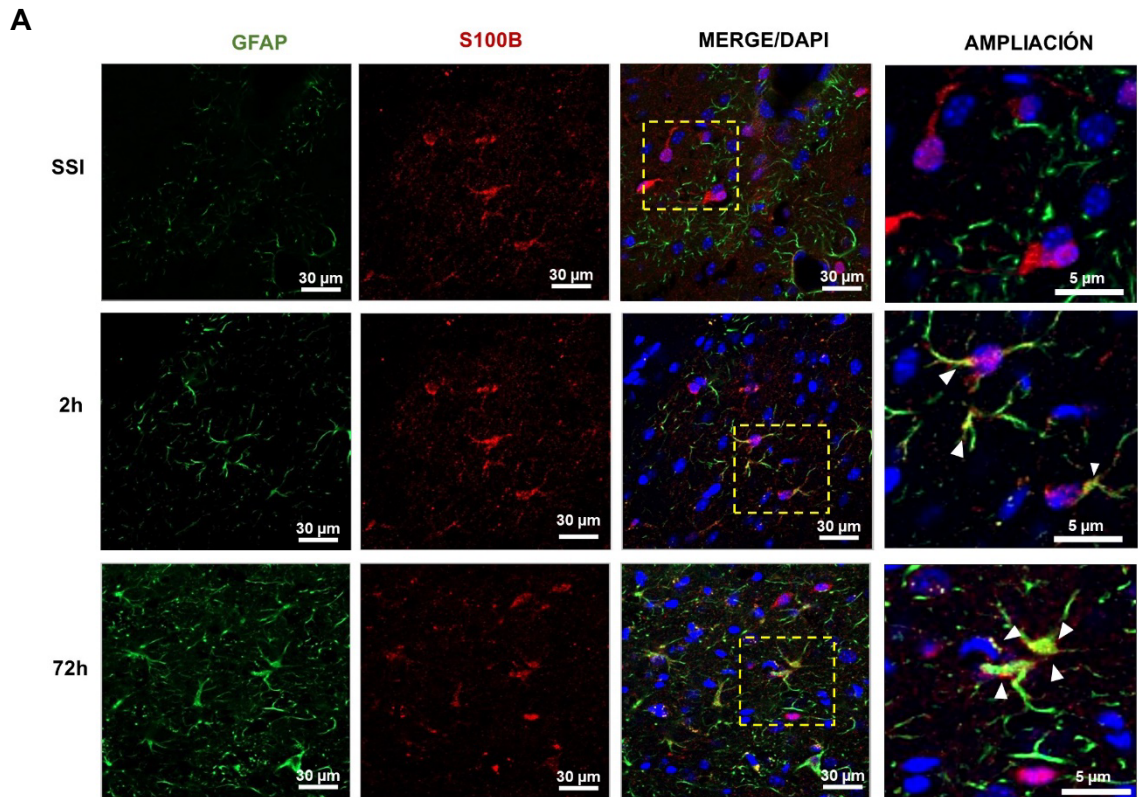


Figura 13. Colocalización de GFAP y S100B en el estriado de ratones lesionados con AQ. A) Micrografías representativas de microscopio confocal (40x). Se muestra la colocalización de las marcas inmunorreactivas de las proteínas GFAP y S100B en tejido cerebral a las 2 h y 72 h post lesión con AQ; se utilizó SSI como grupo control. B) Cuantificación del grado de colocalización utilizando el coeficiente de correlación Pearson. Los valores representan el promedio \pm DE de 3 animales por grupo. ANOVA de una vía, prueba post hoc de Tukey $p < 0.05$.

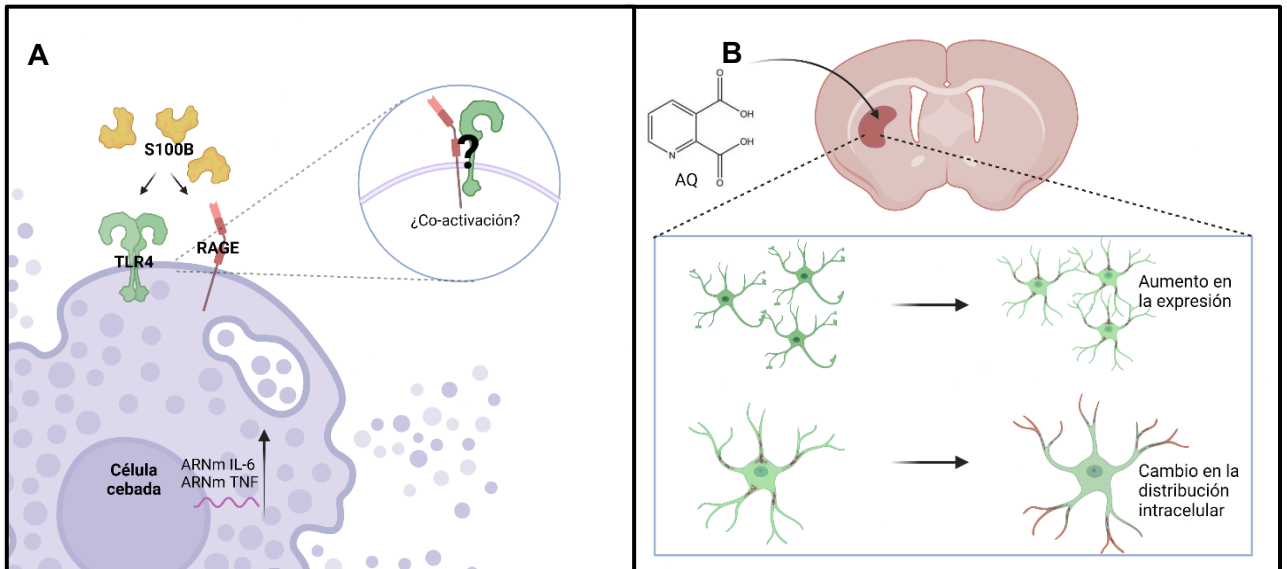


Figura 14. Resumen de resultados. En el panel A se esquematizan los resultados obtenidos *in vitro*, que muestran que la proteína S100B induce el incremento en la producción de ARNm de IL-6 y TNF, mediante la activación de los receptores RAGE y TLR4. Se sugiere la idea de una posible co-activación entre ambos receptores. El panel B muestra los resultados obtenidos *in vivo*, en los que la lesión estriatal con AQ induce cambios en la expresión y distribución intracelular de la proteína S100B en astrocitos. Figura realizada en Biorender.

9. Discusión

Las CCs son un tipo celular de linaje mielóide y están involucradas en respuestas alérgicas e inflamatorias. Son capaces de responder de manera rápida y eficaz ante estímulos nocivos externos como lo son los PAMPs, o ante señales de alerta asociada a daño como los DAMPs. Las CCs pueden ser activadas por una amplia variedad de moléculas, entre las que se encuentra la proteína S100B. La proteína S100B, es un miembro de la familia de proteínas que unen calcio. Ha sido ampliamente estudiada por su papel como alarmina, e incluso, como un biomarcador de procesos

inflamatorios en patologías como la enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, Parkinson y osteoartritis, entre otras (Chaves et al., 2010; Netto et al., 2005; Zhu et al., 2018).

Previamente se demostró que las CCs tienen un papel importante en el daño producido por la inyección intraestriatal de AQ, en un modelo de la EH (Martínez-Gopar et al., 2022). En el presente trabajo, se realizó un acercamiento a los mecanismos a través de los cuales las CCs pueden ser activadas en este modelo, a nivel cerebral. Dicha aproximación se realizó desde 2 perspectivas: por un lado, se utilizó un modelo *in vitro* para explorar la capacidad de la proteína S100B para inducir la producción de mediadores inflamatorios en las CCs e indagar acerca de los receptores involucrados en dicha respuesta, comparándola con respuestas canónicas, como lo es la activación de CCs por LPS a través del receptor TLR4. Por otra parte, se utilizó un modelo de la EH *in vivo* para analizar si la lesión estriatal con AQ induce cambios en la producción de S100B en el estriado.

Los principales hallazgos de este trabajo fueron los siguientes: 1) La proteína S100B es capaz de incrementar la producción de ARNm de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF en BMMCs; 2) Participan ambos receptores, TLR4 y RAGE, en la producción de ARNm de IL-6 y TNF en BMMCs estimuladas con S100B; 3) la proteína S100B podría ser un regulador importante de la transcripción de genes asociados a la respuesta inmune en BMMCs; 4) la lesión estriatal con AQ no altera la producción del ARNm de S100B en el estriado de ratones de la cepa C57BL6/J; 5) la cantidad de la proteína S100B se incrementa en el estriado a las 2 h post-lesión; 6) la lesión estriatal con AQ incrementa la colocalización de S100B con GFAP a las 72 h post-lesión.

9.1 La proteína S100B incrementa la producción de ARNm de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF en BMMCs

La IL-6 y el TNF son citocinas proinflamatorias ampliamente estudiadas por su papel en procesos patológicos. El TNF es un potente iniciador de la respuesta inmune y la IL-6 está involucrada en el proceso inflamatorio de numerosas enfermedades.

Las CCs son capaces de producir ambas citocinas y dicha producción puede estar mediada por mecanismos similares (Azzolina et al., 2003). En el presente trabajo se demostró que la proteína S100B puede inducir el incremento en la producción de mensajeros de TNF e IL-6 en BMMCs. En concordancia con nuestros resultados, Fujiya y colaboradores en 2014 mostraron en condiciones *in vitro* que la proteína S100B, en una concentración de 100 ng/mL, incrementa la expresión de mensajeros de diferentes citocinas, entre ellas TNF e IL-6 en la línea celular RAW 264.7, una línea inmortalizada de macrófagos (Fujiya et al., 2014), lo que apoya nuestro hallazgo de que la proteína S100B es capaz de inducir respuestas proinflamatorias en células de linaje mieloide. Piazza y colaboradores en el 2013, observaron un incremento en la producción de estas citocinas de manera dependiente de la dosis en una línea celular de células alveolares de tipo-1 (R3/1) utilizando concentraciones que iban de 2 a 500 µg/mL, mostrando que S100B induce la producción de estos mediadores también en células no pertenecientes al sistema inmune (Piazza' et al., 2013).

9.2 La producción de TNF e IL-6 en BMMCs estimuladas con S100B está mediada por los receptores TLR-4 y RAGE.

Con ayuda de herramientas farmacológicas se logró demostrar que los receptores RAGE y TLR4 participan en la activación de las CCs por la proteína S100B. Por un lado, la proteína S100B es un ligando bien estudiado del receptor RAGE, sin embargo, poco se conoce de la expresión de este receptor en CCs y de su participación en respuestas inmunes. Nuestros resultados muestran que el receptor RAGE participa en la producción de ARNm de mediadores inflamatorios en BMMCs. En concordancia con nuestros hallazgos, Sick y colaboradores en el 2010, demostraron que la activación del receptor RAGE con Glu-BSA (un AGE), en una concentración de 10 µM en células cebadas provenientes del peritoneo de ratas, induce la producción y secreción de ROS, histamina y diversas citocinas, lo que apoya nuestros hallazgos de que la activación de RAGE en CCs induce una respuesta proinflamatoria (Sick et al., 2010).

Por otro lado, el receptor TLR4 es ampliamente conocido por su papel en respuestas relacionadas al sistema inmune y tiene ligandos bien estudiados como el LPS. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que el TLR4 también puede ser activado por DAMPs como la S100B (Liang et al., 2021). Esposito y cols., en 2014,

utilizando un modelo experimental de colitis en ratones, mostraron mediante inmunofluorescencia la sobreexpresión y colocalización de la proteína S100B y el receptor TLR4 en glía entérica, sugiriendo una interacción del tipo ligando/receptor (Esposito et al., 2014). En el 2015 Chen y colaboradores estimularon a células mononucleares de sangre periférica con varios subtipos de proteínas S100 (S100A8, S100A9, S100A12, S100A16 y S100B) y encontraron un incremento en la producción de IL-6. Al utilizar un anticuerpo neutralizante del TLR-4 la producción de esta citocina se inhibió, demostrando que las proteínas S100B pueden activar al receptor TLR4 e inducir la producción de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica humana y en macrófagos murinos (Chen et al., 2015).

Como se mostró en los resultados, el bloqueo farmacológico de los receptores RAGE y TLR4 de forma independiente, no logró inhibir por completo la producción de mensajeros de TNF e IL-6 cuando las células fueron estimuladas con S100B, lo que quiere decir que para que la proteína S100B incremente la producción de TNF e IL-6 en BMMCs requiere la participación de TLR4 y RAGE, lo anterior indica una posible coactivación de ambos receptores. Se necesitarían más experimentos para el abordaje de esta interacción. Sin embargo, se sabe que RAGE y TLR4 comparten algunos elementos en sus vías de señalización. Estudios realizados por Park y colaboradores en el 2004, utilizando la línea celular de macrófagos RAW 264, demostraron que para que RAGE y TLR4 sean activados con el DAMP HMGB-1 se requería la participación de elementos como MyD88, TIRAP, IRAK-1, IRAK-2, TRAF6, IKK α e IKK β , todos ellos elementos clave en la vía de señalización de TLR-4 (Park et al., 2004; Prantner et al., 2020).

Por otro lado, NF- κ B, es un factor de transcripción proinflamatorio presente en la vía de señalización tanto del TLR4 como de RAGE. Se ha demostrado que el receptor RAGE es capaz de inducir la síntesis *de novo* de NF- κ Bp65, el cual es una subunidad del heterodímero p50/p65, una de las formas más abundantes de NF- κ B. De esta forma, la activación de RAGE podría alargar la respuesta proinflamatoria también de otros receptores cuya vía de señalización desencadene la activación de NF- κ B, como es el caso del TLR-4 (Bierhaus et al., 2001). En el presente trabajo se muestra evidencia de la participación de ambos receptores en la síntesis de mensajeros de TNF e IL-6 en CCs estimuladas con la proteína S100B. Serían necesarios más

experimentos para evidenciar que se requiere la participación de ambos receptores en la síntesis de estas citocinas.

9.3 La proteína S100B podría ser un regulador importante en la transcripción de genes asociados a la respuesta inmune en BMMCs.

En el presente trabajo se demostró por primera vez que la proteína S100B es capaz de activar a las CCs y regular su expresión génica. En el 2010 Bernardini y colaboradores, realizaron el perfil transcripcional de células de neuroblastoma estimuladas con la proteína S100B con una concentración de 5 μ M, demostrando que esta proteína modifica la expresión de genes relacionados con el metabolismo, el transporte intracelular, el ciclo celular y la transducción de señales, entre otros. En concordancia con lo observado en esta tesis, fue evidente la tendencia a la baja en la síntesis de mensajeros de una gran porción de los genes analizados (Bernardini et al., 2010). Sin embargo, faltaría replicar los resultados del experimento para poder sugerir que la proteína S100B reprime una cantidad importante de genes asociados a la respuesta inmune.

9.4 La lesión estriatal con AQ no altera la producción de ARNm de S100B en el estriado de ratones.

El AQ es un metabolito neuroactivo de la vía de las kinureninas y es un agonista de los receptores tipo NMDA. El AQ microinyectado en el estriado de roedores, ha sido utilizado desde hace varios años, como un modelo de la EH. La inyección intraestriatal de esta molécula induce cambios bioquímicos agudos similares a los que se presentan en los pacientes con EH (Foster et al., 1983). Este modelo fue utilizado en el presente trabajo para analizar el efecto del daño producido por AQ en el estriado sobre la expresión del DAMP S100B. Como se mostró, el daño con AQ no causó un efecto sobre la producción de mensajeros de S100B bajo las condiciones de este estudio. Sin embargo, este experimento no es determinante para descartar la sobreproducción de S100B en el estriado luego de la lesión con AQ, debido a que distintos mecanismos post-transcripcionales pudieran haber ocasionado un aumento en la proteína sin que se detecten cambios importantes en su RNAm.

9.5 El AQ incrementa la intensidad de la inmunorreactividad de la proteína S100B a las 2 h post lesión e incrementa la colocación de la inmunorreactividad a S100B y GFAP a las 72 h post lesión.

Los astrocitos son células residentes del SNC. Su papel es importante en el mantenimiento del microambiente tisular, ya que desempeñan funciones de soporte, ayudan en la recaptura iones y regulan el metabolismo de neurotransmisores como GABA y glutamato (Porter & Mccarthy, 1995).

En el presente trabajo se logró detectar inmunorreactividad asociada a las proteínas de S100B y de GFAP. Luego del tratamiento con AQ, se pudo observar un incremento en la inmunorreactividad de S100B a las 2 h post lesión. Nuestros resultados son congruentes con los obtenidos por Himeda y colaboradores en el 2006, quienes empleando un modelo de la enfermedad de Parkinson inducido con Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), realizaron un doble marcaje de S100B y GFAP en el estriado a diferentes tiempos post lesión: 5 h, 1, 3, 5 y 7 días. Estos autores encontraron que la proporción de células inmunorreactivas a S100B, pero no a GFAP, disminuyó del día 1 al día 7. Es decir, aumentó la inmunorreactividad a GFAP, pero no la de S100B. Por otro lado, la proporción de células con doble marcaje S100B/GFAP aumentó del día 1 al día 7, sugiriendo la presencia de una subpoblación de astrocitos negativos a GFAP, pero positivos a S100B en el cuerpo estriado después de la lesión con MPTP (Himeda et al., 2006).

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína perteneciente al citoesqueleto y es un tipo de filamento intermedio presente en los astrocitos maduros. Su función es la de regular la motilidad y dar forma a estas células. En presencia de algún tipo de daño, o agente estresor, los astrocitos cambian su fenotipo a un fenotipo “reactivo” o “activado” y a este proceso se le llama “astroglisis”. La síntesis de GFAP se incrementa en situaciones donde se ve perturbada la homeostasis celular, por lo tanto, el incremento de GFAP es indicador de astroglisis. Sin embargo, existen 2 subtipos básicos de astrocitos en ratones: los protoplásmicos y los fibrilares. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran ampliamente distribuidos en la materia gris y el marcaje con GFAP en algunas ocasiones sólo se logra en los pies astrocíticos

que se encuentran adosados a los vasos sanguíneos (Tabata, 2015). El aumento de la expresión de esta proteína a las 2h ha sido interpretado como un aumento transitorio de astrocitos positivos para S100B, pero disminuye luego de 72 h por lo que los cambios inducidos por el AQ podrían indicar que en la instauración del daño con AQ los astrocitos podrían expresar diferente fenotipo y que este cambio podría ser debido a los cambios en el microambiente. Se requieren investigaciones posteriores para analizar el papel de esta proteína en condiciones de daño neuronal en el estriado.

Por otro lado, también se observó un incremento en la colocalización de la inmunofluorescencia de S100B con la de GFAP a las 72 h, respecto al grupo de 2 h post lesión. Estos cambios pueden ser abordados desde dos perspectivas: la primera es que las marcas corresponden a diferentes subpoblaciones de astrocitos (protoplásmicos o fibrilares). La segunda es que la distribución de las marcas cambia debido a diferencias en la severidad del daño ocasionado por la lesión. En 2018 Gil y colaboradores, utilizando el modelo de la enfermedad de Parkinson inducido con MPTP, encontraron cambios en la distribución de la colocalización de las proteínas S100B y GFAP luego del daño con MPTP y que la extensión de dicha colocalización fue menor en el grupo al que se le administró un antioxidante. Es decir, cuando se redujo el daño causado por AQ con el uso de un antioxidante, la colocalización de S100B y GFAP disminuyó lo que podría indicar que el cambio en la distribución y colocalización de estas proteínas podría variar dependiendo el grado de daño al tejido. (Gil-Martínez et al., 2018).

10. Conclusiones

La proteína S100B induce la producción de RNA mensajero de citocinas proinflamatorias en CCs a través de la activación de los receptores RAGE y TLR-4. Además, la S100B podría ser un regulador importante de la transcripción de genes relacionados con la respuesta inmune en estas células.

La inyección de ácido quinolínico en el estriado de ratones modifica la distribución y colocalización de las proteínas GFAP y S100B.

11. Perspectivas

Es necesario aumentar el número de experimentos encaminados a evaluar el perfil transcripcional de genes asociados a la respuesta inmune de CCs estimuladas con la proteína S100B para poder sacar conclusiones robustas de sus efectos.

También se propone analizar la expresión de citocinas reguladoras como la IL-10 y la participación de los receptores RAGE y TLR4 en las acciones de la S100B en las CCs para conocer su efecto sobre la producción de mensajeros de mediadores que regulan los procesos inflamatorios.

Evaluar la expresión de la proteína S100B en otro modelo animal de la EH, por ejemplo, los ratones R6/1, que expresan de manera constitutiva a la HTTm.

12. Bibliografía

Atiakshin, D., Buchwalow, I., & Tiemann, M. (2019). Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 152, Issue 4, pp. 253–269). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01803-6>

Azzolina, A., Bongiovanni, A., & Lampiasi, N. (2003). Substance P induces TNF- α and IL-6 production through NF κ B in peritoneal mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1643(1–3), 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.09.003>

Barateiro, A., Afonso, V., Santos, G., Cerqueira, J. J., Brites, D., van Horssen, J., & Fernandes, A. (2016). S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 53(6), 3976–3991. <https://doi.org/10.1007/S12035-015-9336-6>

Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 1, Issue 1, p. 15005). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>

Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: Host cell death and inflammation. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 7, Issue 2, pp. 99–109). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>

Bernardini, C., Lattanzi, W., Businaro, R., Leone, S., Corvino, V., Sorci, G., Lauro, G., Fumagalli, L., Donato, R., & Michetti, F. (2010). Transcriptional effects of S100B on neuroblastoma cells: Perturbation of cholesterol homeostasis and interference on the cell cycle. *Gene Expression*, 14(6), 345–359. <https://doi.org/10.3727/105221610X12718619643013>

Bierhaus, A., Schiekofer, S., Schwaninger, M., Andrassy, M., Humpert, P. M., Chen, J., Hong, M., Luther, T., Henle, T., Klö, I., Morcos, M., Hofmann, M., Tritschler, H., Weigle, B., Kasper, M., Smith, M., Perry, G., Schmidt, A.-M., Stern, D. M., ... Nawroth, P. P. (2001). *Diabetes-Associated Sustained Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor-B*.

Björkqvist, M., Wild, E. J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R. v., Benn, C. L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M. W., Brundin, P., Bates, G. P., ... Tabrizi, S. J. (2008). A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(8), 1869–1877. <https://doi.org/10.1084/jem.20080178>

Cao, J. Y., & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issues 11–12, pp. 2195–2209). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2194-1>

Chaves, M. L., Camozzato, A. L., Ferreira, E. D., Piazenski, I., Kochhann, R., Dall'Igna, O., Mazzini, G. S., Souza, D. O., & Portela, L. V. (2010). Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-6/TABLES/3>

Chen, B., Miller, A. L., Rebelatto, M., Brewah, Y., Rowe, D. C., Clarke, L., Czapiga, M., Rosenthal, K., Imamichi, T., Chen, Y., Chang, C. S., Chowdhury, P. S., Naiman, B., Wang, Y., Yang, D., Humbles, A. A., Herbst, R., & Sims, G. P. (2015). S100A9 Induced inflammatory responses are mediated by distinct

damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115828>

Chow, S. K., Yu, D., MacDonald, C. L., Buibas, M., & Silva, G. A. (2010). Amyloid β -peptide directly induces spontaneous calcium transients, delayed intercellular calcium waves and gliosis in rat cortical astrocytes. *ASN Neuro*, 2(1), 15–23. <https://doi.org/10.1042/AN20090035>

Cisbani, G., & Cicchetti, F. (2012). *An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.121>

Crotti, A., & Glass, C. K. (2015). The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. In *Trends in Immunology* (Vol. 36, Issue 6, pp. 364–373). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.04.007>

Dahlin, J. S., & Hallgren, J. (2015). Mast cell progenitors: Origin, development and migration to tissues. In *Molecular Immunology* (Vol. 63, Issue 1, pp. 9–17). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.018>

Donato, R., Sorci, G., Bianchi, R., Riuzzi, F., Tubaro, C., Arcuri, C., & Giambanco, I. (2010). S100B protein, a damage-associated molecular pattern protein in the brain and heart, and beyond. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/656481>

Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C., & Giambanco, I. (2009). S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1793, Issue 6, pp. 1008–1022). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.009>

Dong, H., Zhang, X., & Qian, Y. (2014). Mast Cells and Neuroinflammation. *Medical Science Monitor Basic Research*, 20, 200. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.893093>

Drop, J. J. (1979). Mast cells in the human brain. In *Acta anal* (Vol. 105).

Esposito, G., Capoccia, E., Turco, F., Palumbo, I., Lu, J., Steardo, A., Cuomo, R., Sarnelli, G., & Steardo, L. (2014). Palmitoylethanolamide improves

colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- α activation. *Gut*, 63(8), 1300–1312. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2013-305005>

Feoktistova, M., & Leverkus, M. (2015). Programmed necrosis and necroptosis signalling. In *FEBS Journal* (Vol. 282, Issue 1, pp. 19–31). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.13120>

Forsythe, P. (2018). *Mast Cells in Neuroimmune Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.09.006>

Foster, A. C., Collins, J. F., & Schwarcz I, R. (1983). ON THE EXCITOTOXIC PROPERTIES OF QUINOLINIC ACID, 2,3-PIPERIDINE DICARBOXYLIC ACIDS AND STRUCTURALLY RELATED COMPOUNDS. In *Neuropharmacology* (Vol. 22, Issue 12A).

Fujiya, A., Nagasaki, H., Seino, Y., Okawa, T., Kato, J., Fukami, A., Himeno, T., Uenishi, E., Tsunekawa, S., Kamiya, H., Nakamura, J., Oiso, Y., & Hamada, Y. (2014). The role of S100B in the interaction between adipocytes and macrophages. *Obesity*, 22(2), 371–379. <https://doi.org/10.1002/OBY.20532>

Gil-Martínez, A. L., Cuenca, L., Sánchez, C., Estrada, C., Fernández-Villalba, E., & Herrero, M. T. (2018). Effect of NAC treatment and physical activity on neuroinflammation in subchronic Parkinsonism; is physical activity essential? *Journal of Neuroinflammation*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1357-4>

Graham, A. C., Temple, R. M., & Obar, J. J. (2015). Mast cells and influenza A virus: Association with allergic responses and beyond. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00238>

Hendriksen, E., van Bergeijk, D., Oosting, R. S., & Redegeld, F. A. (2017). Mast cells in neuroinflammation and brain disorders. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 79, pp. 119–133). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.05.001>

Himeda, T., Watanabe, Y., Tounai, H., Hayakawa, N., Kato, H., & Araki, T. (2006). Time dependent alterations of co-localization of S100 β and GFAP in the MPTP-treated mice. *Journal of Neural Transmission*, 113(12), 1887–1894. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0482-x>

Huang, C. C., Faber, P. W., Persichetti, F., Mittal#, V., Vonsattel, J.-P., Macdonald, M. E., & Gusella, J. F. (1998). Amyloid Formation by Mutant Huntingtin: Threshold, Progressivity and Recruitment of Normal Polyglutamine Proteins. In *Somatic Cell and Molecular Genetics* (Vol. 24, Issue 4).

Levine, M. S., Cepeda, C., & André, V. M. (2010). Location, Location, Location: Contrasting Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Huntington's Disease. *Undefined*, 65(2), 145–147. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2010.01.010>

Liang, B., Shen, X., Lan, C., Lin, Y., Li, C., Zhong, S., & Yan, S. (2021). Glycolipid toxicity induces osteogenic dysfunction via the TLR4/S100B pathway. *International Immunopharmacology*, 97, 107792. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2021.107792>

Lim, K. H., & Staudt, L. M. (2013). Toll-Like receptor signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011247>

Liu, J., Wang, H., Zhang, L., Xu, Y., Deng, W., Zhu, H., & Qin, C. (2011). S100B transgenic mice develop features of Parkinson's disease. *Archives of Medical Research*, 42(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2011.01.005>

Loma, I., & Heyman, R. (2011). Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment. *Current Neuropharmacology*, 9(3), 409. <https://doi.org/10.2174/157015911796557911>

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), 256–270. <https://doi.org/10.1111/jnc.15527>

McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. In *European Journal of Neurology* (Vol. 25, Issue 1, pp. 24–34). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997 388:6640, 388(6640), 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>

Michetti, F., D'Ambrosi, N., Toesca, A., Puglisi, M. A., Serrano, A., Marchese, E., Corvino, V., & Geloso, M. C. (2019). The S100B story: from biomarker to active factor in neural injury. *Journal of Neurochemistry*, 148(2), 168–187. <https://doi.org/10.1111/JNC.14574>

Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J., & Town, T. (2010). Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58(3), 300–314. <https://doi.org/10.1002/GLIA.20924>

Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021a). Release mechanisms of major DAMPs. In *Apoptosis* (Vol. 26, Issues 3–4, pp. 152–162). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>

Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021b). Release mechanisms of major DAMPs. In *Apoptosis* (Vol. 26, Issues 3–4, pp. 152–162). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>

Netto, C. B. O., Portela, L. V., Ferreira, C. T., Kieling, C., Matte, U., Felix, T., Da Silveira, T. R., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Giugliani, R. (2005). Ontogenetic changes in serum S100B in Down syndrome patients. *Clinical Biochemistry*, 38(5), 433–435. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2004.12.014>

Obermeier, B., Verma, A., & Ransohoff, R. M. (2016). The blood-brain barrier. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 133, pp. 39–59). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7>

Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 2, pp. 134–147). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>

Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J. Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., & Abraham, E. (2004). Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular

Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7370–7377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306793200>

Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). *Paxinos and Franklin's The mouse brain in stereotaxic coordinates* (2nd edn). Academic Press.

Piazza', O., Leggier⁰², E., De Benedictis, G., Pastore², L., Salvatorp, F., Tufan⁰³, R., & De Robertis³, E. (2013). S100B INDUCES THE RELEASE OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN ALVEOLAR TYPE I-LIKE CELLS. In *INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOPATHOLOGY AND PHARMACOLOGY* (Vol. 26, Issue 2).

Plotkin, J. L., & Surmeier, D. J. (2015). Corticostriatal synaptic adaptations in Huntington's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 33, 53–62. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2015.01.020>

Poirier, M. A., Jiang, H., & Ross, C. A. (2005). A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. *Human Molecular Genetics*, 14(6), 765–774. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDI071>

Porter, J. T., & McCarthy, K. D. (1995). GFAP-Positive Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamatergic Neuroligands With Increases in [Ca²⁺]. In *GLIA* (Vol. 13).

Prantner, D., Nallar, S., & Vogel, S. N. (2020). The role of RAGE in host pathology and crosstalk between RAGE and TLR4 in innate immune signal transduction pathways. In *FASEB Journal* (Vol. 34, Issue 12, pp. 15659–15674). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1096/fj.202002136R>

Profaci, C. P., Munji, R. N., Pulido, R. S., & Daneman, R. (2020). The blood–brain barrier in health and disease: Important unanswered questions. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 217, Issue 4). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20190062>

Ramaswamy, S., McBride, J. L., & Kordower, J. H. (n.d.). *Animal Models of Huntington's Disease*. <https://academic.oup.com/ilarjournal/article/48/4/356/644156>

Ross, C. A., Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., Scahill, R. I., Leavitt, B. R., Stout, J. C., Paulsen, J. S., Reilmann, R., Unschuld, P. G., Wexler, A., Margolis, R. L., & Tabrizi, S. J. (2014). Huntington disease: Natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature Reviews Neurology*, *10*(4), 204–216. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.24>

Sathe, K., Maetzler, W., Lang, J. D., Mounsey, R. B., Fleckenstein, C., Martin, H. L., Schulte, C., Mustafa, S., Synofzik, M., Vukovic, Z., Itoharu, S., Berg, D., & Teismann, P. (2012). S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. *Brain*, *135*(11), 3336–3347. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWS250>

Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, *89*(5), 910–926. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2016.02.003>

Serrano Sánchez, T., Blanco Lezcano, L., García Minet, R., Alberti Amador, E., Díaz Armesto, I., Pavón Fuente, N., Lorigados Pedre, L., Elena González Fraguera, M., Felipe Montero León, J., Martínez Martí, L., Los Angeles Robinson Agramonte, M. DE, & Francis Turner, L. (2011). ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: MODELOS EXPERIMENTALES Y PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS Huntington'disease: Experimentals Models and Therapeutic Perspectives. *Acta Biol. Colomb*, *16*(1), 21–42.

Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S. Z., Kadir, H. A., & Mohan, G. (2016). Neuroinflammation pathways: a general review. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/00207454.2016.1212854>, *127*(7), 624–633. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>

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), 442. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2010.00905.X>

Silverman, A.-J., Sutherland, A. K., Wilhelm, M., & Silver, R. (1999). *Mast Cells Migrate from Blood to Brain*.

Singh, J., Shah, R., & Singh, D. (2016). *Targeting mast cells: Uncovering prolific therapeutic role in myriad diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.09.019>

Skaper, S. D., Facci, L., & Giusti, P. (2014). Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology*, *141*(3), 314–327. <https://doi.org/10.1111/IMM.12170>

Soria Lopez, J. A., González, H. M., & Léger, G. C. (2019). Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, *167*, 231–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3>

Sousa, C. M., & Humbert, S. (2013). Huntingtin: Here, There, Everywhere! *Journal of Huntington's Disease*, *2*, 395–403. <https://doi.org/10.3233/JHD-130082>

Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114>

Takeda, K., & Akira, S. (2007). Toll-like receptors. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, Chapter 14, 1–13. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s77>

Theoharides, T. C. (2017). Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Experimental Dermatology*, *26*(9), 751–759. <https://doi.org/10.1111/EXD.13288>

Thompson, J. C., Harris, J., Sollom, A. C., Stopford, C. L., Howard, E., Snowden, J. S., & Craufurd, D. (2012). Longitudinal evaluation of neuropsychiatric symptoms in Huntington's disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *24*(1), 53–60. <https://doi.org/10.1176/APPI.NEUROPSYCH.11030057>

Thundyil, J., & Lim, K. L. (2015). DAMPs and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, *24*, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.11.003>

Traina, G. (2017). Mast cells in the brain - Old cells, new target. *Journal of Integrative Neuroscience*, *16*(s1), S69–S83. <https://doi.org/10.3233/JIN-170068>

Vanhooren, V., Navarrete Santos, A., Voutetakis, K., Petropoulos, I., Libert, C., Simm, A., Gonos, E. S., & Friguet, B. (2015). Protein modification and maintenance systems as biomarkers of ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, *151*, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.03.009>

Vonsattel, J.-P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). *Neuropathological Classification of Huntington's Disease* (Vol. 44, Issue 6). <http://jnen.oxfordjournals.org/>

Yardan, T., Kemal, A., Baydin, A., Aydin, K., & Cokluk, C. (2011). *Usefulness of S100B Protein in Neurological Disorders*.

Zhou, Q., & Sheng, M. (2013). NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology*, *74*, 69–75. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2013.03.030>

Zhu, L., Weng, Z., Shen, P., Zhou, J., Zeng, J., Weng, F., Zhang, X., & Yang, H. (2018). S100B regulates inflammatory response during osteoarthritis via fibroblast growth factor receptor 1 signaling. *Molecular Medicine Reports*, *18*(6), 4855–4864. <https://doi.org/10.3892/MMR.2018.9523/HTML>

Zhuang, X., Silverman, A.-J., & Silver, A. R. (1999). Distribution and Local Differentiation of Mast Cells in the Parenchyma of the Forebrain. In *J. Comp. Neurol* (Vol. 408).