



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PROTOCOLO DE SERVICIO SOCIAL:

“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEURONALES
(Neu-N) Y GLIALES (IBA-1 y GFAP) EN UN MODELO DE LESIÓN
CEREBRAL INDUCIDA POR ÁCIDO QUINOLÍNICO EN RATONES
C57BL/6J”

DURÁN TRUJILLO DIANA ANDREA MATRÍCULA: 2202032560

ASESORES:

Dra. Edith González Guevara
CP: 12322269

Dra. Laura Estela Castrillón Rivera
Num. económico: 8140

Lugar de realización: Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y
Nanotecnología, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“MVS”

1. RESUMEN:

Existen diversas enfermedades neurodegenerativas que han aumentado su prevalencia en los últimos años, las cuales se consideran con un alto impacto socioeconómico. Dentro de estas enfermedades se encuentran la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, donde la inflamación se presume como un componente etiológico importante. La neuroinflamación en estas enfermedades, es desencadenada por diversos factores, dando inicio a mecanismos de defensa que, pueden contribuir a contrarrestar algunos procesos neurodegenerativos.

En el Sistema Nervioso Central (SNC) existen reguladores de la respuesta inflamatoria, la microglía y astrocitos, los cuales desempeñan diversas funciones en los procesos de inflamación, éstos presentan dos fenotipos: proinflamatorio/ neurotóxico y antiinflamatorio/ neuroprotector. En el modelo de lesión con ácido quinolínico, se asemejan varias características de la enfermedad de Huntington, en las cuales parece existir un componente inflamatorio, sin embargo, no se ha determinado la participación de los marcadores neuronales (Neu-N) y gliales (IBA-1 y GFAP) en este modelo de enfermedad por lo cual, es importante el estudio de estas células en el SNC, denotando si estos marcadores presentan un estado activo o inactivo en el modelo de la enfermedad neurodegenerativa de Huntington.

Palabras clave: neurodegeneración, neuroinflamación, microglía, astrocitos, proinflamatorio, antiinflamatorio.

2. PLANTEAMIENTO:

La enfermedad de Huntington (EH) es una patología neurodegenerativa caracterizada por la muerte progresiva de neuronas en regiones del SNC, tales como el estriado y la corteza cerebral. Esta degeneración está asociada con la activación de células gliales, incluyendo la microglía y los astrocitos, los cuales tienen un papel crucial tanto en la respuesta inflamatoria como en la progresión del daño neuronal. En modelos experimentales de la EH, como el inducido por AQ, se ha observado un aumento de la activación glial y cambios en la población neuronal.

Para determinar la participación de estos tipos celulares, es esencial contar con métodos para la detección de proteínas clave tales como Iba-1, GFAP y Neu-N, que son marcadores de microglía, astrocitos y neuronas, respectivamente. La técnica de western blot permite cuantificar estos marcadores, pero su eficacia depende de la optimización de las concentraciones de los anticuerpos primarios, secundarios y de la correcta interpretación de los niveles de expresión en diferentes condiciones experimentales.

Este análisis proporcionará información para establecer la relación entre los niveles de expresión de estos marcadores, con la progresión del daño neuronal y glial, lo que aportará información sobre los mecanismos patológicos que suceden en la EH y otros trastornos neurodegenerativos.

3. INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH) han aumentado su prevalencia, siendo consideradas como enfermedades epidémicas con alto impacto socioeconómico, estas enfermedades se caracterizan por la disfunción progresiva de poblaciones neuronales¹. La enfermedad de Huntington (EH) es una patología neurodegenerativa autosómica dominante descrita por George Huntington en 1872². Se caracteriza por la degeneración selectiva de neuronas de proyección del cuerpo estriado, responsables de los movimientos coreicos propios de la enfermedad³. Estas neuronas, en condiciones normales, juegan un papel crucial en la regulación de la actividad motora y el procesamiento de la información relacionada con el movimiento, garantizando la integridad y el funcionamiento adecuado de estos procesos⁴, la EH es causada por la expansión de trinucleótidos de CAG que codifica al aminoácido glutamina (Gln o Q) cerca del extremo 5' en el exón 1⁵, el cual genera una serie de conjuntos denominados cola de poliglutamina (poliQ)² del gen huntingtina (HTT) en el cromosoma 4p16.3⁶, a partir del residuo 17⁵, la cual es inestable y puede aumentar su longitud en las generaciones posteriores, siendo así que los individuos sanos tienen menos de 36 repeticiones de CAG, mientras que los portadores del gen HTT mutante (mHTT) tienen más de 36 repeticiones (a menudo 40 o más)⁶. Asimismo, las repeticiones CAG patológicas dan lugar a un tracto poliQ expandido y por consiguiente el plegamiento incorrecto de la proteína HTT. La forma mutante del gen (mHTT) contiene fragmentos solubles y agregados que pueden ser neurotóxicos².

Por otro lado, la respuesta inflamatoria que ocurre dentro del cerebro y la médula espinal, se denominan "neuroinflamatoria", donde los aspectos de la neuroinflamación tienen una variación según la enfermedad, lesión, infección o estrés y esta es desencadenada por diversos factores, como lo es la acumulación de proteínas por conformaciones anómalas o por señales que emanan de neuronas lesionadas², en otras palabras, es un mecanismo de defensa que contrarresta diversas agresiones, eliminando o inhibiendo agentes nocivos, reduciendo sus efectos perjudiciales. Esta inflamación está mediada por la producción de citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ERO) y mensajeros secundarios³. En las enfermedades neurodegenerativas, la expresión alterada de diferentes factores inflamatorios puede promover o contrarrestar los procesos neurodegenerativos. La neuroinflamación, es un factor importante que dará lugar a la activación de dos categorías de células en el SNC: neuronas y células gliales⁴. Estas últimas son los reguladores clave de las respuestas inflamatorias en el SNC, y las cuales incluyen a la microglía, astrocitos y oligodendrocitos⁵. Asimismo, la relación entre las células gliales y su distribución fenotípica puede cambiar, dependiendo de la progresión de las enfermedades neurodegenerativas correspondientes. Dando el enfoque a la microglía y los astrocitos, estos cumplen diversas funciones y se clasifican en dos fenotipos: neurotóxico (M1/A1) y neuroprotector (M2/A2)⁶, ambos linajes celulares pueden producir mediadores proinflamatorios o inmunorreguladores según el fenotipo de activación en el que se encuentren⁴.

Como se mencionó anteriormente, la expresión alterada de factores inflamatorios puede propiciar los procesos neurodegenerativos, lo cual promueve la activación de neuronas y células gliales, por lo que, en la EH las neuronas con mayor afectación son las de los ganglios basales (GB), que es una estructura profunda del cerebro que participa en la regulación de comportamientos como control del movimiento, coordinación, control cognitivo, etc⁷. Dentro de los GB, las neuronas que sufren mayor daño son las de:

1. Estriado: Implicado en la planificación y coordinación del movimiento, forma parte de los GB dónde está el principal receptor de las conexiones de la corteza cerebral y también es una de las estructuras que se encuentran afectadas en EH, tienen degeneración progresiva, llevando a problemas de movimiento y coordinación⁸.
2. Núcleo accumbens: involucrado en el sistema de recompensa y regulación del comportamiento.

Existen proteínas para la identificación y evaluación del daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la EH⁹, los cuales se dividen de acuerdo a las células en el SNC, en caso de las neuronas, hay diversos marcadores con distintas funciones y objetivos (Anexos **Tabla 1**), los cuales pueden ser:

1. NeuN: Identifica células neuronales en secciones de tejido cerebral y regulan el empalme alternativo de pre-ARNm, donde su objetivo son en neuronas maduras¹⁰.
2. MAP2: Encargada del ensamblaje, nucleación y estabilización de microtúbulos, así como el estudio de morfología neuronal¹¹.
3. GAD67: Asociada a la identificación de neuronas GABAérgicas cruciales en la regulación de la inhibición en el SNC, su objetivo es en la síntesis del neurotransmisor GABA¹².

De los marcadores anteriormente mencionados, se hace énfasis en el marcador NeuN, ya que es una proteína altamente específica que se encuentra en la mayoría de las células neuronales del SNC¹³, es utilizada para identificar la pérdida neuronal debido a la neurodegeneración, así como, para cuantificar el número total de neuronas en diferentes regiones del cerebro, facilitando la evaluación de daños en enfermedades neurodegenerativas¹⁴.

Por otro lado, en cuanto a las células gliales, la microglía, se distribuye de manera ubicua en el cerebro y es la principal célula inmune innata¹⁵. Su forma ramificada, con cuerpos celulares pequeños y procesos extendidos, le permite responder rápidamente a agresiones patológicas¹⁶, también representa una población especializada de células similares a los macrófagos del SNC y se presentan en alrededor del 10% de la población celular, con una densidad media de 70 células/mm² en el tejido cerebral del ratón¹⁷, siendo así que, dependiendo de la región anatómica, la microglía representará entre el 5 al 12% en el cerebro del ratón y entre el 0.5 y 16.6% de la población celular en el cerebro humano¹⁸. En cuanto a su clasificación, anteriormente se utilizaba una terminología M1/M2, la cual refleja la nomenclatura de los macrófagos periféricos, donde M1 dictaba ampliamente el fenotipo proinflamatorio y M2 al fenotipo antiinflamatorio¹⁹.

Cuando hay una lesión neuronal u otra agresión, dependiendo del tipo y la magnitud de los estímulos, la microglía se activa para secretar factores proinflamatorios que aumentan la citotoxicidad o factores neuroprotectores antiinflamatorios que ayudan a diversos padecimientos⁵. Cuando se activa, la microglía se comunica con el entorno a través de la liberación de citocinas²⁰, reconociendo patógenos y cambios sutiles en el microambiente con sus receptores de superficie que detectan fragmentos de complemento, inmunoglobulinas, moléculas de adhesión, receptores de quimiocinas y receptores tipo Toll (TLR)²¹.

A su vez, la microglía tiene dos principales estados que dependen de las necesidades del tejido, siendo estos: reposo y activación. Donde el reposo será en estados saludables y normales, mientras que, la activación es detectando moléculas potencialmente peligrosas como patógenos extraños, células apoptóticas, o una falta de señalización normal proveniente de neuronas y otras células gliales²², esta es caracterizada por un cambio radical de morfología altamente ramificada a una forma ameboide⁴, en otras palabras, morfológicamente, la microglía se denominará ramificada (reposo) o ameboide (activa)²³. Cuando se activa, se comunica con su entorno a través de la liberación de citocinas, cuya naturaleza varía según la agresión. Del mismo modo, la activación excesiva de la microglía, puede dañar el tejido neuronal sano circundante y los factores secretados por neuronas muertas, a su vez, exacerbaban la activación crónica de la microglía, lo que puede llegar a causar la pérdida progresiva de neuronas⁴. Tai (2007) señala que la activación microglial puede desempeñar un papel en la patogénesis de la EH, en estudios como la tomografía por emisión de positrones (PET), observaron que la activación microglial fue significativa en las regiones cerebrales afectadas por la EH, llegando a niveles mayores en casos más graves de la EH y también se detectó su activación en pacientes con EH antes de la manifestación de la enfermedad²⁴. Siendo así que estos estudios indican que la activación microglial es una parte integral de la patogénesis de la EH²⁵.

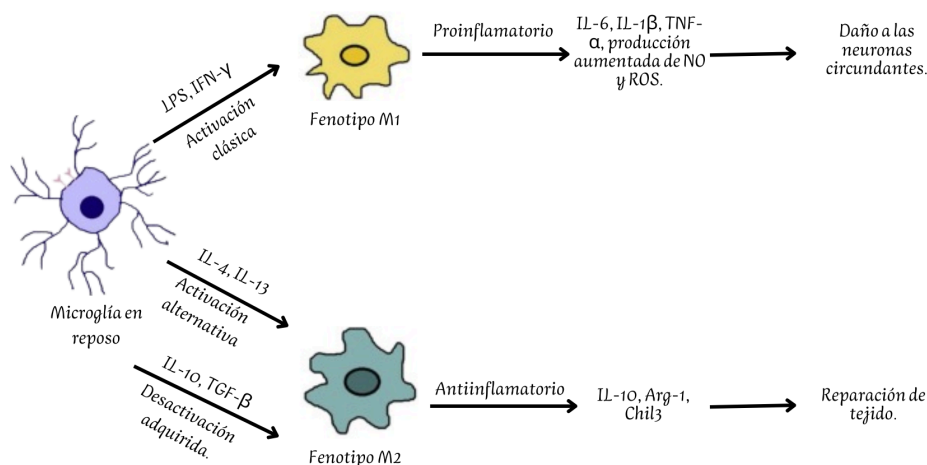


Figura 1. Según el tipo de estímulo, la microglía puede activarse y dirigirse hacia distintos fenotipos. Las células en fase M1 suelen expresar citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores neurotóxicos, mientras que la microglía en fase M2 generalmente produce factores antiinflamatorios, neuroprotectores y cicatrizantes.

Fuente modificada al español: Subhramanyam CS et al., *Semin Cell Dev Biol.* 2019.

Se ha documentado ampliamente que la microglía se activa en estos trastornos y expresa una gran familia de mediadores inmunitarios que pueden actuar para tratar el cambio normal de neuronas y ayudar a limpiar los restos de las neuronas necróticas, pero la microglía crónicamente activada en enfermedades neurodegenerativas podría exacerbar la afección al liberar demasiado factores citotóxicos⁵². Por lo tanto, la activación crónica de la microglía, se ha convertido en un foco principal de investigación y desarrollo farmacéutico para tratar trastornos neurodegenerativos⁵³.

Para el reconocimiento de amenazas, es necesario la ubicación de marcadores que funcionen como herramientas ante estas situaciones. Estos marcadores incluyen receptores tipo *Toll* TLR, receptores similares a dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NLR), complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), así como la activación de vías de señalización intracelular. Además, son fundamentales en la producción y liberación de

factores inflamatorios, citotóxicos y en la fagocitosis²⁶ (Anexos **Tabla 2**), los cuales se pueden situar los siguientes:

1. IBA-1 (Subunidad β de la β -hexosaminidasa): Responsable de la degradación de los gangliósidos GM2 y otras moléculas que contienen N-acetil hexosaminas terminales²⁶.
2. CD11B (grupo de diferenciación): Involucrado en procesos de adhesión y captación de moléculas recubiertas de complemento²⁷.
3. CD14 (grupo de diferenciación 14): Co-receptor para TLR4 transmembrana y TLR7/9 endosómico que les presenta antígenos²⁸.
4. CD16 (grupo de diferenciación 16): Receptor Fc que detecta anticuerpos de inmunoglobulina gamma (IgG); participa en procesos de fagocitosis²⁹.
5. CD163 (grupo de diferenciación 163): Procesos de endocitosis mediante la detección de glicoproteínas patógenas y cadenas de polisacáridos³⁰.

El marcador IBA-1, es de vital importancia en EH, debido a que se expresa predominantemente en la microglía activada y en regiones afectadas como el estriado³¹, siendo un reflejo de la activación de las células inmunitarias en el SNC.

Por otra parte, en lo que respecta a las células gliales, los astrocitos representan aproximadamente el 30% de las células del SNC de los mamíferos, que son parte integral de la fisiología del cerebro y la médula espinal, desempeñando funciones importantes³², donde una de las principales es la regulación crucial de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en el SNC lesionado, que a su vez, al activarse puede incrementar las reacciones inflamatorias y el daño tisular, o promover la inmunosupresión y reparación tisular³³, también regulan el flujo sanguíneo, mantienen la barrera hematoencefálica (BHE) y modulan la actividad sináptica³⁴. Tal como se mencionó previamente, los astrocitos desempeñan funciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias, de manera similar a la microglía, estos dependen del tipo de lesión que está presente, siendo denominados como A1/A2 respectivamente³⁵. Los astrocitos reactivos proinflamatorios regulan positivamente varios genes e inducen la producción de factores proinflamatorios, agravando la respuesta inmune, contribuyendo al daño neuronal. Por otro lado, los astrocitos reactivos neuroprotectores regulan positivamente numerosos factores neurotróficos, promoviendo la supervivencia neuronal y la reparación del tejido dañado³⁵. Esta dualidad en la función de los astrocitos es crucial para el equilibrio entre la inflamación y la neuroprotección en el SNC.

No obstante, la activación astrocítica constituye una respuesta celular ante las alteraciones del SNC, regulada por la diversidad de vías de señalización, por la cual los astrocitos se vuelven reactivos³⁶. Durante la activación, los astrocitos exhiben cambios morfológicos notables, incluyendo aumentos en el número y longitud de sus ramas radiales primarias³⁷, donde el grado y duración de la activación de los astrocitos depende del tipo e intensidad de los estímulos de SNC, que pueden ser desde cambios morfológicos leves y transitorios, hasta una astrogliosis y formación de cicatrices³⁴. En la EH, la activación de astrocitos es un factor clave en la progresión de la misma, se caracteriza por cambios morfológicos (aumento de tamaño y ramificación de sus prolongaciones, así como en la expresión de los marcadores como GFAP). En los cerebros post mortem de pacientes con EH, se observó una mayor densidad de astrocitos y una regulación positiva de la proteína GFAP³⁸ y la muerte progresiva de neuronas en el estriado y la corteza cerebral, está asociada con altos

niveles de expresión de GFAP en los astrocitos reactivos, lo que indica la presencia de astrogliosis.

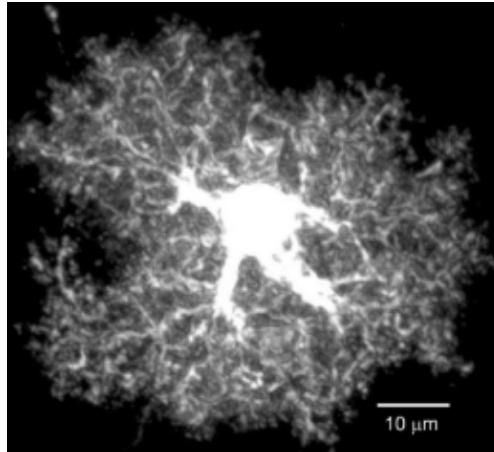


Figura 2. Los astrocitos son células gliales de morfología compleja, caracterizadas por un soma central del que se extienden múltiples prolongaciones principales, las cuales se ramifican en numerosos procesos finos y folículos terminales.

Fuente: Khakh BS, Goldman SA. *J Neurosci.* 2023.

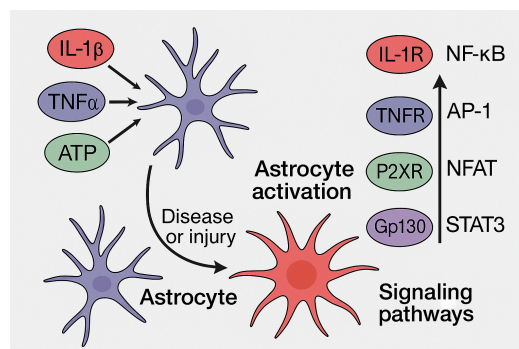


Figura 3. Esquema de las vías de activación astrocítica que incluyen señales proinflamatorias y rutas como NF-κB y JAK/STAT3, resultando en una respuesta reactiva con expresión de GFAP y liberación de citocinas.

Fuente: Fuente: Khakh BS, Goldman SA. *J Neurosci.* 2023.

Al igual que la microglía, los astrocitos contarán con marcadores que serán utilizados para la investigación e identificación de amenazas en diversas patologías neurológicas y estos son clasificados de forma general de acuerdo a su función, etapa de desarrollo o localización en el cerebro (Anexos **Tabla 3**), los cuales son:

1. Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP): Proteína de filamento intermedio; asegura la estabilidad estructural de la célula; regula la morfología y las funciones de los astrocitos³⁹.
2. S100β: Regula la proliferación y diferenciación de células⁴⁰.
3. Vimentina: Proteína implicada en la regulación de diferenciación celular y respuesta al estrés celular en células diferenciadas⁴¹.
4. Aldolasa C: Enzima involucrada en la glucólisis de los astrocitos (lactato como fuente de energía neuronal)⁴².

El marcador GFAP es de importancia, ya que es ampliamente reconocido como la proteína de filamento intermedio en astrocitos maduros y un componente en el desarrollo de los astrocitos³⁹. Además, su expresión regulada sirve como un marcador adecuado para

identificarlos. Los cambios en la expresión molecular y la morfología de los astrocitos, medidos a través de GFAP pueden indicar la gravedad de la astrogliosis reactiva, la cual refleja la presencia de alguna patología del SNC³⁴.

Además de los marcadores neuronales y de células gliales, los modelos experimentales juegan un papel clave para comprender los mecanismos involucrados en la patogénesis de la EH. Estos modelos incluyen la inyección intracerebral de neurotoxinas en modelos animales, lo que genera lesiones neuronales que imitan las lesiones histológicas observadas en la EH. Existen dos tipos principales de modelos experimentales para la EH: los modelos tóxicos y los modelos transgénicos⁸. Como modelos experimentales de la EH basados en la excitotoxicidad, se tiene la administración de ácido quinolínico (AQ), el cual es un derivado del ácido quinurénico, que reproduce parte de los cambios bioquímicos y neuropatológicos de la EH. Este modelo es capaz de inducir lesiones neuronales que incluyen la reducción de las concentraciones de GABA en las células estriatales y gliosis estriatal. Además, el modelo de AQ, genera niveles de somatostatina, neuropéptido Y, vasopresina y dopamina similares a los observados en pacientes con EH⁴⁴. Estos cambios pueden influir en la progresión de la enfermedad y están relacionados con la respuesta inflamatoria.

Considerando la importancia de los procesos neuroinflamatorios en las enfermedades neurodegenerativas, en este estudio se utilizará el modelo del ácido quinolínico (AQ) para desarrollar la enfermedad de Huntington y determinar los diferentes marcadores inflamatorios por el método de western blot.

4. OBJETIVOS:

❖ OBJETIVO GENERAL:

En el modelo de Huntington inducido con AQ y en otro modelo de neuroinflamación con la administración de LPS en ratones, se determinarán los cambios en la expresión de marcadores de microglía (Iba-1), astrocitos (GFAP) y neuronas (Neu-N) por el método de western blot.

❖ OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Definir las concentraciones de anticuerpos primarios y secundarios para la detección de marcadores gliales y neuronales (Iba-1, GFAP y Neu-N) por el método de western blot.

- Determinar los niveles de expresión de marcadores neuronales y gliales en tejido cerebral de ratones control y lesionados con AQ.

- Evaluar si hay cambios en la expresión de los niveles de Iba-1, GFAP y Neu-N después de la administración de lipopolisacáridos (LPS).

5. METODOLOGÍA:

❖ OBTENCIÓN DE MUESTRAS:

1.1. ANIMALES:

Los ratones macho de la cepa C57BL/6J, fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco Suárez (INNN "MVS"), para su posterior traslado en grupos al laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología. Se mantuvieron en condiciones estables de temperatura, humedad y ciclos de 12:12 h, con agua estéril y alimento *ad libitum*. Todos los estudios con animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de laboratorio (NIH) y la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" y el reglamento interno del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "MVS". Las muestras fueron obtenidas de los animales por medio de decapitación con guillotina, para posteriormente extraer el cuerpo estriado y almacenar las muestras a -70°C.

1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se utilizaron diez ratones macho C57BL/6J para determinar valores de marcadores neuronales y gliales en el modelo de la EH, a cuatro de ellos, se les realizó una lesión estereotáxica intraestriatal, donde se les administró una solución al 30 [nM] de AQ por ratón por el método de lesión estereotáxica intraestriatal. A tres ratones se les administró 2 ug/g del peso total del ratón de LPS intraperitoneal, para la detección del marcador Iba1. Los tres ratones restantes fueron utilizados como grupo control, permitiendo comparar los efectos de los tratamientos sobre los marcadores neuronales y gliales evaluados.

1.2.1. INYECCIÓN DE AQ ESTRIATAL:

Para producir el modelo inducido por AQ de EH, se colocan ratones macho C57BL6/J bajo anestesia general con pentobarbital sódico en un aparato estereotáxico para ratones. Posteriormente, se frota la cabeza del ratón con una solución de yodopovidona al 10% para esterilización y se realiza un corte sagital (1,5–2,0 cm) desde la línea de los ojos para exponer el cráneo. Sucesivamente, se inyecta 1 µL al 30 [nM] de AQ en el cuerpo estriado derecho (coordenadas: + 0,6 mm anterior y -2,0 mm lateral a bregma y -2,7 mm ventral a duramadre)⁴⁹. Posterior a la lesión se deja a los ratones dos días en condiciones estables de temperatura, humedad y ciclos de 12:12 h, con agua estéril y alimento *ad libitum*.

1.2.2 ADMINISTRACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS) INTRAPERITONEAL:

Para producir una respuesta inflamatoria, se administraron LPS que son un componente principal de la membrana externa de bacterias gram-negativas y las proteínas de la envoltura viral. En la neurodegeneración, la microglía son las principales células sensibles a LPS⁵⁴. En animales, la administración intraperitoneal de LPS estimula la inmunidad innata y la producción de citoquinas proinflamatorias, proporcionando un estímulo inflamatorio que activa el sistema neuroinmunológico, lo que da como resultado un conjunto de respuestas denominadas conductas de enfermedad.

Para la preparación, primero se diluyó el stock de LPS *Escherichia coli* de 1 mg/mL en suero fisiológico, dando los siguientes datos:

Concentración final deseada	Volumen de LPS (1 mg/mL)	Volumen de PBS/Suero Fisiológico	Volumen total
100 µg/mL	180 µL	720 µL	900 uL

Tabla 4. Volumen total de LPS diluidos en suero fisiológico.

1.2.3 INYECCIÓN INTRAPERITONEAL

1. Primero se pesaron los ratones macho C57BL/6J para calcular la cantidad de LPS a administrar, la cantidad que se inyectó fue la siguiente: 10 uL (2 uL)/g de peso corporal. Por ejemplo, si un ratón pesa 26 g, se debe inyectar $26 \text{ g} \times 10 \text{ uL} = 260 \text{ uL}$ del stock de LPS. Tabla de peso y volumen administrado en (Anexos **Tabla 5**).

Para la concentración final, se dividió el volumen de LPS entre el volumen final, dando como resultado 0.2 ug/uL final de LPS, por lo tanto, la concentración final de LPS para cada ratón se obtuvo multiplicando la concentración final de LPS por el volumen administrado a cada ratón. Por ejemplo, si pesa 26 g, se multiplica $0.2 \text{ ug/uL} \times 260 \text{ uL} = 52 \text{ ug}$ (Anexos **Tabla 5**).

1.2.4 VIGILIA DE RATONES

Se realiza un monitoreo a los ratones durante la administración y posterior a la misma para detectar la aparición y gravedad de la endotoxemia, donde se observan distintos parámetros como lo son: Pelaje erizado, actividad del ratón y revisión de ojos. Tomando en cuenta el avance de estos parámetros, se realizó el sacrificio de cada ratón.

1.2.5 OBTENCIÓN DE MUESTRA

Posterior a la administración de LPS y vigilia, se sacrificaron por medio de decapitación en 3 tiempos distintos: 6, 24 y 30 horas. Después del sacrificio, se extrajo el cuerpo estriado y se almacenó a -70°C .

❖ TÉCNICA WESTERN BLOT (WB):

WB es una técnica de laboratorio utilizada para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido⁵⁰, donde los pasos a seguir son los siguientes:

1. Preparación de la muestra.
2. Cuantificación de proteínas por ensayo de BCA.
3. Desnaturalización de muestras.
4. Electroforesis SDS-PAGE.
5. Transferencia de proteínas en membranas.
6. Incubación de membrana con anticuerpo primario y secundario.

7. Inmunodetección por el efecto de quimioluminiscencia por anticuerpo secundario.

1.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Las muestras tienen que ser preparadas con una solución que contenga agente de lisis (detergentes) para correcta ruptura de membranas. Para esta investigación se utilizó un tampón de lisis "RIPA" a 100 mL, con los siguientes agentes:

- Tris HCl 50mM pH 7.4
- NaCl 150 mM
- NP-40%
- Inhibidores de proteasas y fosfatasa "Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)".

Para procesar las muestras se tomó en cuenta la cantidad de muestras totales (10) y se agregó 150 uL a cada muestra, dando un total de 1515 uL (1500 uL de buffer y 15 uL de inhibidores). Al finalizar el procesamiento se reservaron en eppendorf de 1.5 uL y fueron almacenados a -70.C.

2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR ENSAYO DE BCA

El ensayo de ácido bicinconínico (BCA), es un método colorimétrico que se emplea comúnmente para estimar la concentración de proteínas en una muestra y va a depender de la conversión de Cu^{2+} a Cu^+ . Se realiza en tubos de ensayo o placas de 96 pocillos, donde la relación entre la concentración de proteína y la absorbancia es casi lineal en un amplio rango de trabajo y da como resultado el desarrollo de un color púrpura intenso con una absorbancia máxima de 562 nm⁵¹. Para este protocolo se tomó una absorbancia a 540 nm y se realizaron los siguientes pasos:

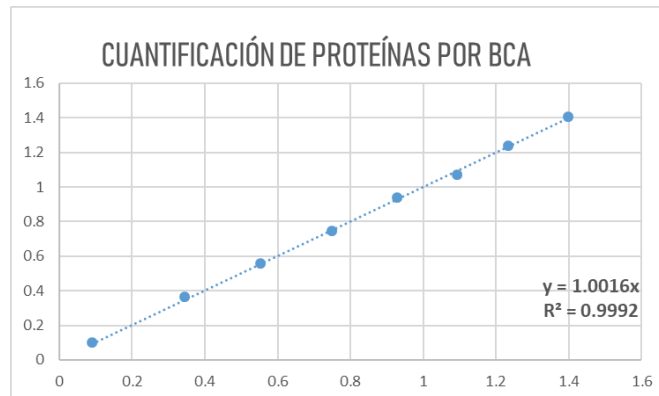
1. Stock de albúmina de suero bovino (BSA) 1 mg/mL.
2. En una placa de 96 pozos transparentes, se tomaron los primeros 16 pozos para la curva de calibración, agregando por duplicado agua desionizada (descendente) y albúmina (ascendente) de la siguiente forma:

	1	2
A	100 uL + 0 uL.	100 uL + 0 uL.
B	98 uL + 2 uL.	98 uL + 2 uL.
C	96 uL + 4 uL.	96 uL + 4 uL.
D	94 uL + 6 uL.	94 uL + 6 uL.
E	92 uL + 8 uL.	92 uL + 8 uL.
F	90 uL + 10 uL.	90 uL + 10 uL.
G	88 uL + 12 uL.	88 uL + 12 uL.
H	86 uL + 14 uL.	86 uL + 14 uL.

Tabla 6. Carga de agua desionizada y albúmina por duplicado en la primera y segunda columna de la placa.

3. Para la cuantificación de las proteínas, se cargaron por duplicado los pozos con 95 uL de agua desionizada y 5 uL de las muestras previamente procesadas.
4. Después se adiciona 100 uL de BCA con CuSO₄ a cada pozo.
5. Finalmente se coloca la placa en el equipo "SYNERGY HTX multi-mode reader" y se lee en el programa GENZ a una longitud de onda de 540 nm.

Para terminar la cuantificación, se realizan los cálculos en excel para obtener el total de proteína que se deberá separar para desnaturalizar y posteriormente cargar en los geles de poliacrilamida.



Gráfica 1. Gráfica de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración de proteínas obtenidas.

La ecuación de la recta obtenida por regresión lineal es $y = 1.0016x$, con un coeficiente de determinación $R^2 = 0.9992$, lo cual indica una alta linealidad y precisión del método en el rango analizado. Esta curva permite interpolar la concentración de proteínas desconocidas a partir de sus valores de absorbancia. La cuantificación de proteínas mediante el ensayo de BCA facilitó una normalización precisa de las muestras, lo que otorga validez y fiabilidad de los resultados obtenidos.

3.1 DESNATURALIZACIÓN DE MUESTRAS.

Posterior a la cuantificación, se hizo una relación 1:1 de muestra y buffer de carga "Laemmli", tomando primero del eppendorf 100 uL de cada muestra para un nuevo eppendorf de 0.6 uL y de igual forma 100 uL del buffer de carga con el fin de poder observar la migración de proteínas en la electroforesis.

Una vez que tenemos nuestro eppendorf con la muestra y el buffer de carga, procedemos a colocar los tubos en un termoblock precalentado a 100 °C por 5 minutos y posteriormente se colocan en hielo por 5 minutos y finalmente se resguardan a -70°C.

4.1 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

En la electroforesis se utilizaron vidrios de 1.5 mm y fueron ensamblados en minicámaras previamente limpias con alcohol isopropílico, verificando que no tengan fugas con agua desionizada. Para el gel separador se utilizó una concentración de acrilamida al 15% con un total de reactivos de la siguiente forma:

→ Agua desionizada: 4.6 mL.

- Acrilamida 30%: 10.0 mL.
- Buffer Tris pH 8.8 SDS 10%: 5.2 mL.
- PSA 10%: 0.2 mL.
- TEMED: 0.008 mL.

Una vez agregado el gel separador se deja unos minutos para su polimerización y se agregan las siguientes cantidades para el gel concentrado:

- Agua desionizada: 2.8 mL.
- Acrilamida 30%: 0.670 mL.
- Buffer Tris pH 8.8 SDS 10%: 0.540mL.
- PSA 10%: 0.04 mL.
- TEMED: 0.004 mL.

Cuando los geles se han polimerizado, se ensamblan los vidrios en las cámaras de electroforesis colocando buffer de corrida y se cargan las muestras. Para el inicio de las mismas, se tomó como primera fase a 70 voltios por 15 minutos y de segunda fase a 170 voltios por 1 hora con 20 minutos.

5.1 TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A MEMBRANAS:

Para la transferencia de proteínas se utilizó membranas de nitrocelulosa, con un ensamble correcto para su transferencia, iniciando con una fase a 0.20 amperios por una hora y como segunda fase a 0.02 amperios por 20 minutos. Una vez terminada la transferencia, se realiza un bloqueo de membrana por una hora con leche baja en grasa al 5% por una hora.

6.1 INCUBACIÓN DE ANTICUERPOS PRIMARIO Y SECUNDARIOS:

Posterior al bloqueo, se realiza la incubación de anticuerpo primario monoclonal para cada membrana (Anti-NeuN MAB377, GFAP ga-5 sc-58766 e Iba1 1022-5 sc-32725) durante 12 horas, en refrigeración y al término de las mismas se realizan tres enjuagues con una solución de leche baja en grasa al 1% y 0.01% de tween 20 por 10 minutos cada uno.

Una vez terminados los enjuagues, se realizó la incubación del anticuerpo secundario de ratón monoclonal m-IgGk Bp-HRP sc 516102, a una disolución 1:1000 para cada membrana, dejando incubar por una hora en agitación orbital y al término de esta, se realizan nuevamente los enjuagues con leche baja en grasa al 1% y 0.01% de tween 20.

7.1 INMUNODETECCIÓN

Al término de enjuague, se realiza la detección de bandas en el fotodocumentador "Fusion Solo S". Para este paso, se dejan las membranas con luminol Radiance ECI Chemiluminescent HRP substrate de la marca "Azure biosystems", este debe ser previamente preparado con una relación 1:1 de ambas soluciones y se deja la membrana en la placa del fotodocumentador para iniciar con la lectura por el efecto de quimioluminiscencia para la detección de las proteínas.

8.1 STRIPPING LEVE Y FUERTE

Cuando la inmunodetección termina, se realiza un stripping leve a la membrana de la siguiente forma:

1. Membranas colocadas en agitación orbital por 10 minutos en PBS con Tween 20 al 0.25% por 10 minutos.
2. Se realizan 5 lavados rápidos con agua desionizada y 2 lavados rápidos con PBS.
3. Terminados los lavados rápidos, se dejan en agitación orbital con PBS por 10 minutos.
4. Se repite el bloqueo por una hora con leche baja en grasa al 5%.

Al término del bloqueo, se realiza una incubación con un anticuerpo para control de carga monoclonal Cat No. AC043 HRP-conjugated β -Actin Mouse a una dilución de 1:1000, después de la incubación del control de carga, se repiten los lavados con solución de enjuague al 1%, incubación del anticuerpo secundario de ratón monoclonal m-IgGk Bp-HRP sc 516102 a 1:1000 junto con los tres últimos enjuagues y se repite el paso 7.1.

9.1 DENSIDAD ÓPTICA

La densidad óptica representa la intensidad de la señal contenida dentro de una banda en las membranas, constituyendo un valor clave para la cuantificación de proteínas. En el presente informe, se midió la densidad óptica de las bandas correspondientes a los tres anticuerpos analizados, seguida de la medición de la densidad óptica del control de carga β -Actin.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS:

El presente protocolo, se determinaron las condiciones necesarias para poder detectar los marcadores gliales y neuronales que se manifiestan en la EH, en un modelo experimental murino inducido por AQ, donde se determinaron las condiciones de: 1. Dilución de anticuerpos, 2. Correlación de activación glial y neuronal y 3. Cuantificación de proteínas por ImageJ software.

1. DILUCIÓN DE ANTICUERPOS

Se emplearon anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas específicas con el objetivo de revelar adecuadamente las bandas en membranas de western blot. Las diluciones aplicadas para cada anticuerpo fueron cuidadosamente seleccionadas (**Anexo *Tabla 7***) y demostraron ser condiciones óptimas para la revelación clara de las bandas proteicas en el caso de NeuN y GFAP.

- **Anti-NeuN, clon A60 (Merck, 46 kDa):**
Se utilizó a una dilución de **1:500**, la cual permitió detectar la proteína neuronal NeuN sin generar señales inespecíficas ni saturación en la membrana (Figura 1).
- **Anti-GFAP, clon GA-5 (Santa Cruz, 50 kDa):**
Con una dilución de **1:50**, fue adecuada para revelar la expresión de GFAP, que es una proteína estructural característica de los astrocitos (Figura 2).
- **Anticuerpo secundario m-IgGk BP-HRP (Santa Cruz):**
Empleado a una dilución de **1:1000**, fue efectivo para amplificar la señal generada

por los anticuerpos primarios sin contribuir a un aumento de fondo. Esta dilución estándar permitió una revelación quimioluminiscente nítida y específica.

- **Control de carga: anti- β -actina HRP-conjugado (AB-Clonal, 45 kDa):**
Este anticuerpo fue utilizado con una disolución **1:1000**, la cual fue adecuada para una señal constante y uniforme, sirviendo como referencia para la normalización de la densidad óptica de las proteínas evaluadas.

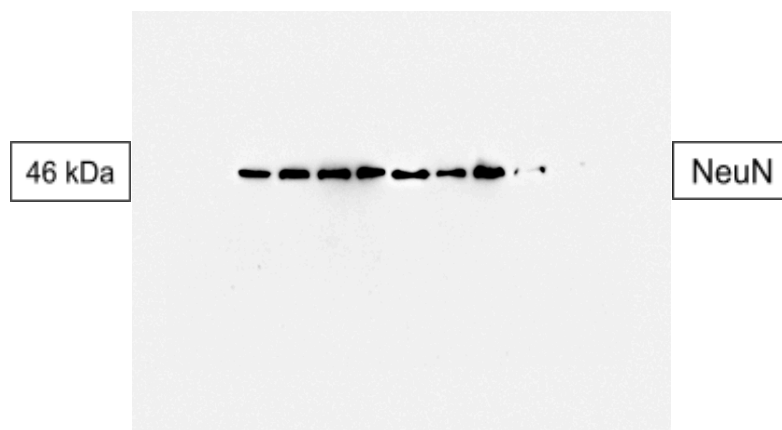


Figura 1. Detección de la proteína NeuN mediante Western blot". Se muestran los carriles correspondientes a las muestras detectadas como una banda específica alrededor de los 46 kDa utilizando un anticuerpo monoclonal anti-NeuN a una dilución de 1:500.

La presencia de bandas en la mayoría de los carriles indica que la dilución del anticuerpo anti-NeuN (1:500) fue adecuada para revelar la proteína de forma específica. La variabilidad en la intensidad entre carriles puede deberse a factores como la cantidad de proteína cargada por pozo y los carriles con señal baja o ausente pueden expresar dificultades como pérdida de muestra, problemas de transferencia.



Figura 2. Detección de la proteína GFAP. Membrana evaluada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFAP a una dilución 1:50. Se observó una banda específica alrededor de los 50 kDa, correspondiente al peso molecular estimado de la proteína.

En cuanto a GFAP, se pueden observar bandas únicas y alineadas horizontalmente en la zona de ~50 kDa, por otro lado, la intensidad de las bandas es variable entre carriles, donde en los carriles intermedios y finales, las señales son visiblemente más débiles o en algunos casos ausentes, lo que puede indicar una menor carga de la muestra. También, no se

observan señales de fondo, lo cual refleja una buena especificidad del anticuerpo y una dilución adecuada.

Además de las detecciones individuales de NeuN y GFAP, se realizó una revelación simultánea en una misma membrana para evaluar la coexpresión de ambos marcadores en las mismas muestras.

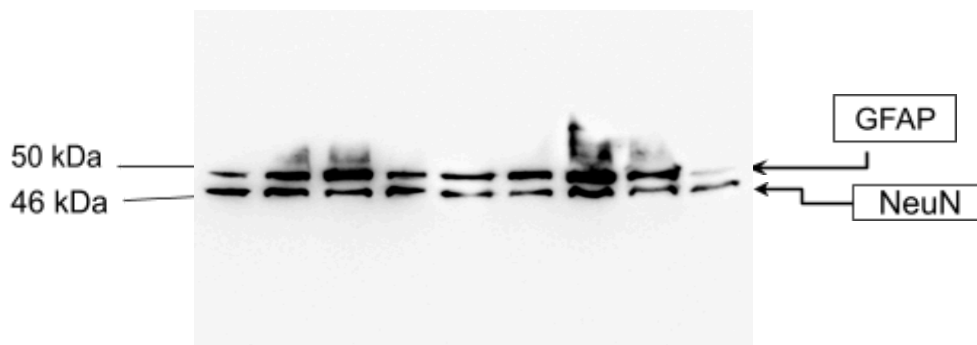


Figura 3. Detección simultánea de las proteínas NeuN y GFAP en una misma membrana". Se utilizó anticuerpo monoclonal anti-NeuN a una dilución 1:500, y anti-GFAP a una dilución 1:50. Las bandas correspondientes a ambas proteínas fueron reveladas en cada carril.

En esta membrana se realizó la detección conjunta de las proteínas NeuN y GFAP siendo reveladas simultáneamente. En ambas bandas se muestra un alineamiento horizontal correspondiente a los pesos moleculares estimados de ~46 kDa y ~50 kDa, respectivamente, sin embargo, la intensidad de las bandas varía entre los carriles, lo que sugiere diferencias en la expresión relativa de GFAP y NeuN entre las muestras y, por último, no se detectan señales de fondo significativas dando las condiciones óptimas de revelado.

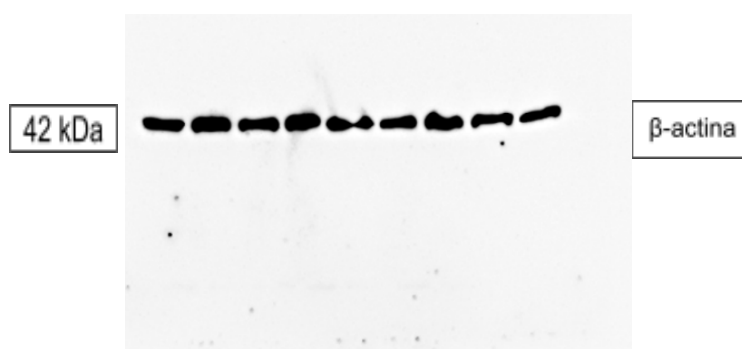


Figura 4. Detección de la proteína β -actina como control de carga en membrana de Western Blot. Detección de una banda alineada con una dilución 1:1000.

En la membrana se observan bandas definidas y alineadas horizontalmente en los carriles, indicando una expresión uniforme de β -actina entre las muestras analizadas. La ausencia de bandas inespecíficas o señales de fondo sugiere que la dilución del anticuerpo, fueron adecuados y específicos, lo cual en la detección permite que la densidad óptica de β -actina pueda usarse confiablemente para la normalización en la cuantificación relativa de proteínas objetivo (NeuN, GFAP e Iba1).

En cuanto a la proteína Iba1, a pesar de haber empleado una dilución concentrada (1:50) del anticuerpo anti-Iba1, no fue posible detectar una señal específica correspondiente a esta proteína en las membranas analizadas. Esta dilución, que en condiciones estándar suele ser suficiente para revelar la presencia de Iba1 en tejidos con expresión activada, no generó bandas visibles en el presente reporte. Incluso tras la administración de LPS, que es conocido como por inducir la activación de microglía y aumentar la expresión de marcadores como Iba1, no se logró detectar señal alguna, esto podría deberse a diversas variables que se discutirán más adelante.

6.2 CORRELACIÓN DE ACTIVACIÓN GLIAL Y NEURONAL

Respecto a la segunda condición, los resultados obtenidos nos permiten establecer que la expresión de NeuN, se detectó de forma consistente en la mayoría de los carriles de las membranas, lo cual sugiere que no hubo una pérdida significativa de población neuronal en las muestras analizadas. En la expresión de GFAP, se mostró cierta variabilidad entre carriles de las membranas reveladas, donde la señal fue más débil o incluso ausente, lo cual podría reflejar una activación glial moderada. Y finalmente, la no detección de Iba1, incluso tras la administración de LPS, sugiere que la activación microglial fue limitada o en otros casos inexistente, donde se pueden considerar otros factores que pueden afectar en el presente reporte como lo son: factores técnicos o biológicos.

Estos resultados sugieren que, tanto la administración de LPS como la de AQ (respuestas inflamatorias y neurotóxicas respectivamente) no generaron una activación glial generalizada ni una pérdida neuronal aparente en los tiempos y condiciones del presente reporte. Es posible que los efectos de ambos compuestos fueron leves, transitorios, o que la metodología de detección no haya sido lo suficientemente sensible para captar cambios sutiles en la microglía o el entorno neuronal.

6.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR IMAGEJ SOFTWARE

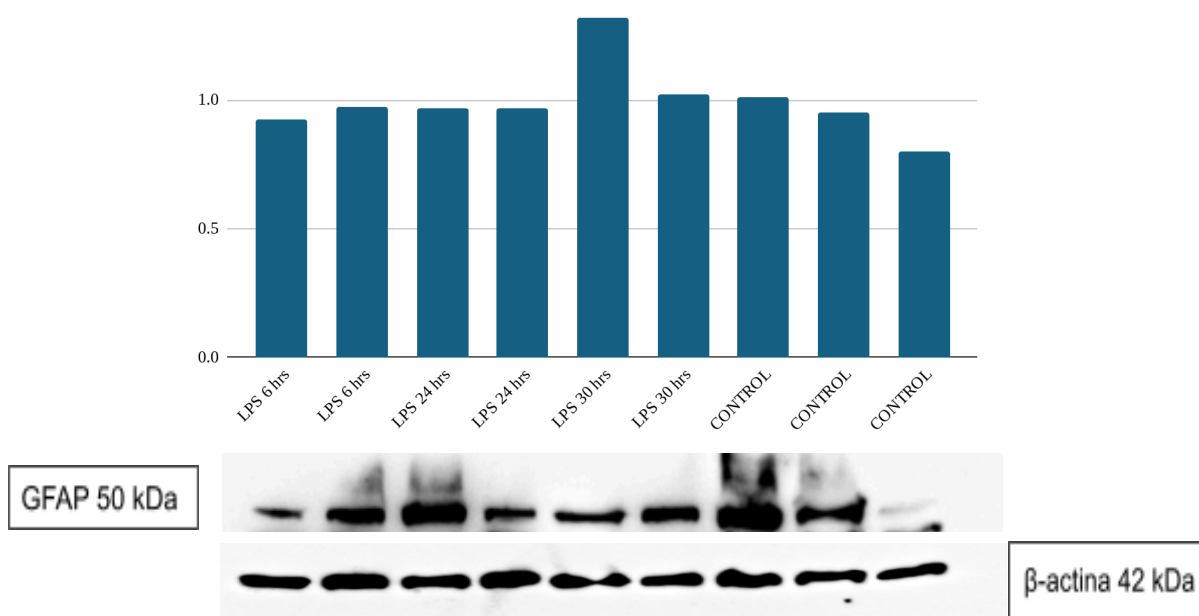


Figura 5. Cuantificación de la proteína GFAP normalizada con β -actina mediante análisis de densidad óptica usando el software ImageJ. Se muestran membranas representativas (parte superior) y la gráfica

correspondiente a la relación GFAP/ β -actina (parte inferior) en muestras tratadas con LPS a diferentes tiempos (6, 24 y 30 h) y controles.

La figura anterior muestra densidad óptica relativa por el programa ImageJ con la división de la proteína de interés entre la proteína de carga (GFAP/ β -actina respectivamente) para cada muestra experimental. Se incluyen distintos grupos tratados con LPS (lipopolisacárido) a diferentes dosis y tiempos (6, 24 y 30 horas), así como varios controles sin tratamiento. Se puede notar un aumento marcado en la expresión de GFAP en el grupo LPS 30 h, lo que sugiere una posible activación astrocítica en respuesta al estímulo inflamatorio. Los demás grupos tratados presentan niveles similares entre sí y ligeramente mayores a los controles, lo cual podría indicar una activación moderada o transitoria. En contraste, los controles muestran valores estables y más bajos, consistentes con una expresión basal de GFAP en condiciones normales.

Respecto a la proteína NeuN, la *figura 6* muestra el análisis de expresión de la proteína neuronal, en la parte superior se observa la membrana con la detección de ambas proteínas y en la parte inferior, la gráfica de barras los tratamientos con LPS a diferentes tiempos y controles, donde los resultados indican que los niveles de NeuN se mantienen relativamente estables en la mayoría de las condiciones, con ligeras variaciones y no se aprecia una disminución marcada que indique pérdida neuronal.

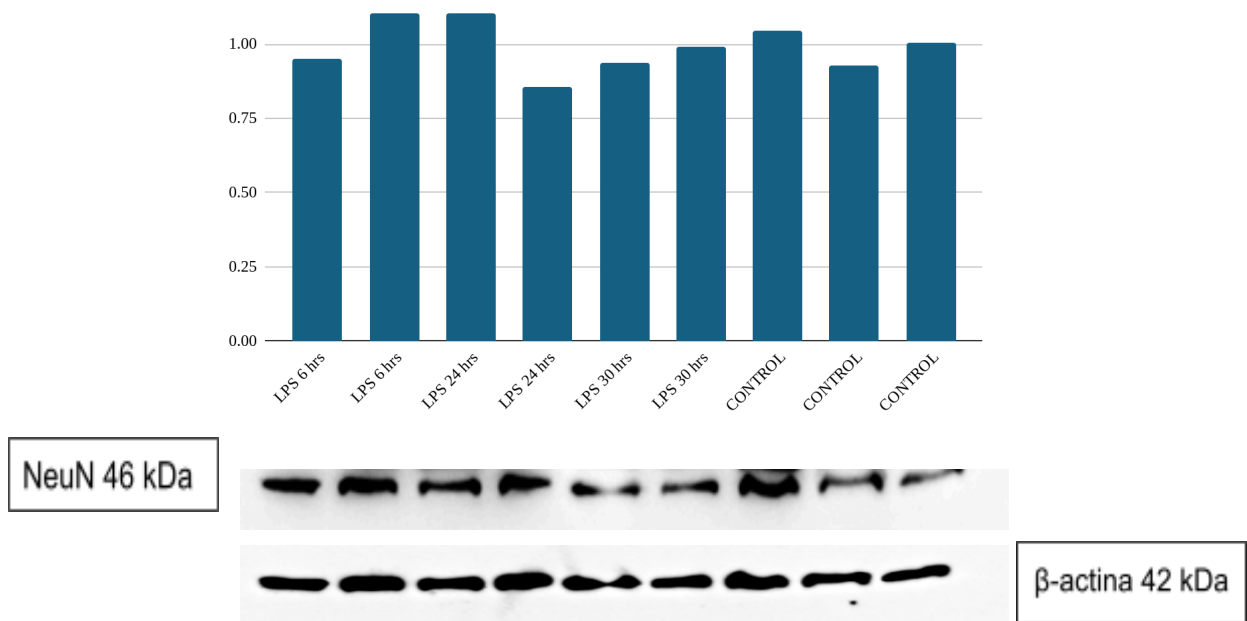


Figura 6. Cuantificación de la expresión de la proteína neuronal NeuN normalizada con β -actina mediante análisis de densidad óptica con el software ImageJ. La gráfica muestra la relación NeuN/ β -actina para cada condición experimental.

7. CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente protocolo, se evaluaron la expresión de los marcadores gliales (Iba1 y GFAP) y neuronales (NeuN) en un modelo murino de lesión cerebral inducida por AQ, así como la respuesta inflamatoria provocada por LPS. Particularmente, se administró LPS por vía intraperitoneal en una dosis de 2 μ g/g de peso corporal, correspondiente a un rango individual de 48–54 μ g por ratón, con el objetivo de inducir una activación microglial sistémica y central.

Pese a que dicha dosis ha demostrado ser efectiva en múltiples modelos experimentales para activar la microglía a través de la vía TLR4, los resultados obtenidos en este reporte, evidenciaron una ausencia de señal específica para Iba1 mediante western blot, incluso en las muestras obtenidas a las 6, 24 y 30 horas post-administración. Esta ausencia de detección podría explicarse por diversas razones. A nivel técnico, podría atribuirse a una baja sensibilidad del anticuerpo utilizado, a una carga proteica insuficiente o a limitaciones en la transferencia proteica. A nivel biológico, es posible que la dosis y vía de administración del LPS no hayan generado una activación microglial sostenida o suficientemente intensa en el sistema nervioso central, particularmente en el cuerpo estriado, que fue la región de interés del presente reporte.

Cabe destacar que, si bien no se observó expresión detectable de Iba1, el análisis de expresión con el marcador GFAP mostró una activación astrocítica moderada, donde se observó un aumento en la densidad óptica relativa (GFAP/ β -actina) en el grupo tratado con LPS a las 30 horas, lo que podría sugerir una respuesta glial parcial o transitoria en el tiempo tardío post-estímulo, lo cual indica que la activación astrocítica puede variar en intensidad. Por su parte, la expresión de NeuN se mantuvo constante en todos los grupos experimentales, lo cual indica que no hubo una pérdida neuronal significativa en las condiciones evaluadas, al menos en términos de expresión proteica de este marcador.

En conjunto, estos resultados, evidencian una falta de correspondencia entre la activación glial y la neuronal, caracterizada por una respuesta astrocítica parcial, una actividad microglial no detectable y neuronas aparentemente íntegras. Esto sugiere que, en el contexto experimental y técnico de este estudio, la dosis de LPS utilizada no fue suficiente para inducir una activación microglial detectable mediante western blot, mientras que sí podría inducir una activación astrocítica moderada y transitoria.

A partir de los resultados anteriores, se pueden sugerir ajustes en la metodología para la optimización de los resultados, como el uso de concentraciones mayores de anticuerpos, inclusión de diferentes tiempos de sacrificio, técnicas más sensibles como inmunofluorescencia o RT-qPCR, así como el empleo de dosis más altas o esquemas repetidos de administración de LPS para evaluar con mayor precisión los efectos neuroinflamatorios inducidos.

ANEXOS:

MARCADORES NEURONALES	OBJETIVO	FUNCIÓN
NeuN (Neuronal Nuclei, o Núcleo Neuronal)	Neuronas maduras	Identificar células neuronales en secciones de tejido cerebral y regula el empalme alternativo de pre-ARNm
MAP2 (proteína asociada a microtubulo 2)	Asocia con los microtúbulos	Ensamblaje, nucleación y estabilización de microtúbulos y estudio de morfología neuronal.
GAD67 (Ácido Glutámico Decarboxilasa 67)	Síntesis del neurotransmisor GABA	Identificación de neuronas GABAérgicas cruciales en la regulación de la inhibición en el SNC.

Tabla 1. Marcadores neuronales generales con relevancia, así como sus objetivos y funciones respectivas (Fuente: elaboración propia)

MARCADORES DE MICROGLÍA	SINÓNIMOS	FUNCIÓN
CD11B (grupo de diferenciación)	subunidad alfa M de integrina, ITGAM; receptor 3 alfa del complemento, CR3A	Subunidad alfa de la parte 3 del receptor del complemento de integrina (MAC-1); involucrada en procesos de adhesión y captación de moléculas recubiertas de complemento.
<i>CD14 (grupo de diferenciación 14)</i>	glicoproteína rica en leucina específica de las células mieloides, antígeno de diferenciación de monocitos CD14	Correceptor para TLR4 transmembrana y TLR7/9 endosómico que les presenta antígenos
<i>CD16 (grupo de diferenciación 16)</i>	receptor III de la región Fc de inmunoglobulina gamma de baja afinidad, Fc-gamma RIII	Receptor Fc que detecta anticuerpos de inmunoglobulina gamma (IgG); participa en procesos de fagocitosis
<i>IBA-1 (Subunidad β de la β-hexosaminidasa)</i>	Subunidad beta de la N-acetil-beta-glucosaminidasa	Responsable de la degradación de los gangliósidos GM2 y otras moléculas que contienen N-acetil hexosaminas terminales

<i>CD163 (grupo de diferenciación 163)</i>	Receptor de manosa de macrófagos 1 (MRC-1), miembro D de la familia de dominios de lectina de tipo C 13	Procesos de endocitosis mediante la detección de glicoproteínas patógenas y cadenas de polisacáridos.
--	---	---

Tabla 2. Marcadores en microglía, así como sus sinónimos y funciones respectivas (Fuente: elaboración propia).

MARCADORES DE ASTROCITOS	ROL FUNCIONAL	EXPRESIÓN CELULAR
Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)	Proteína de filamento intermedio; asegura la estabilidad estructural de la célula; regula la morfología y las funciones de los astrocitos	Astrocitos maduros, glía radial, células madre neurales
S100β	Regula la proliferación y diferenciación de células.	Astrocitos, glía de Bergmann, oligodendrocitos, linfocitos y neuronas.
Vimentina	Proteína implicada en la regulación de diferenciación celular y respuesta al estrés celular en células diferenciadas.	Astrocitos, glía de Bergmann y células madre neurales adultas.
Aldolasa C	Enzima involucrada en la glucólisis de los astrocitos (lactato como fuente de energía neuronal).	Astrocitos y neuronas del cerebelo.

Tabla 3. Marcadores de astrocitos, rol funcional relacionado con proteínas y su expresión celular respectivo (Fuente: elaboración propia)

RATÓN	PESO DE RATÓN	VOLUMEN A ADMINISTRAR	DOSIS DE LPS RECIBIDA
RATÓN 1	27 gramos	270 uL	54 ug
RATÓN 2	24 gramos	240 uL	48 ug
RATÓN 3	26 gramos	260 uL	52 ug

Tabla 5. Cantidad de volumen final administrado de LPS con relación al peso de ratón. (Fuente: elaboración propia)

ANTICUERPO	MARCA	PESO MOLECULAR	CATÁLOGO	DILUCIÓN
Anticuerpo primario: anti-NeuN, clon A60 (monoclonal)	Merck	46 kDa	MAB377	1:500

Anticuerpo primario: GFAP (GA-5) (monoclonal)	Santa Cruz	50 kDa	sc-58766	1:50
Anticuerpo primario: Iba1 (1022-5) (monoclonal)	Santa Cruz	17 kDa	sc-32725	1:50
Anticuerpo secundario: m-IgGk BP-HRP (monoclonal)	Santa Cruz	-	sc-51602	1:1000
Anticuerpo control de carga: HRP-conjugate d β -Actin Mouse (monoclonal)	AB-Clonal	45 kDa	AC043	1:1000

Tabla 7. Condiciones de anticuerpos monoclonales correspondientes para cada membrana.

Fuente: Elaboración propia

BIBLIOGRAFÍA

1. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010 Jan;14(3).
2. Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in Neurodegenerative Disease—A Double-Edged Sword. *Neuron*. 2002 Aug;35(3):419–32.
3. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the Devil Is in the Details. *Journal of Neurochemistry* [Internet]. 2016 May 4;139:136–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5025335/>
4. Subhramanyam CS, Wang C, Hu Q, Dheen ST. Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [Internet]. 2019 Oct 1;94:112–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31077796/>
5. Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim SS, Lynch G, Nave KA, et al. Glial Biology in Learning and Cognition. *The Neuroscientist*. 2013 Oct 11;20(5):426–31.
6. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration* [Internet]. 2020 Nov 26;9(1). Available from: <https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-020-00221-2>
7. Riva D, Taddei M, Bulgheroni S. The neuropsychology of basal ganglia. *European Journal of Paediatric Neurology* [Internet]. 2018 Mar;22(2):321–6. Available from: [https://www.ejpn-journal.com/article/S1090-3798\(17\)31833-0/pdf](https://www.ejpn-journal.com/article/S1090-3798(17)31833-0/pdf)
8. Serrano Sánchez T, Blanco Lezcano L, García Minet R, Alberti Amador E, Díaz Armesto I, Pavón Fuente N, et al. Enfermedad de Huntington: modelos experimentales y perspectivas terapéuticas. *Acta Biológica Colombiana* [Internet]. 2011 Apr 1;16(1):21–42. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2011000100002
9. Reddy DS, Abeygunaratne HN. Experimental and Clinical Biomarkers for Progressive Evaluation of Neuropathology and Therapeutic Interventions for Acute and Chronic Neurological Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2022 Oct 3;23(19):11734. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9570151/>
10. Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Aug 27;284(45):31052–61.
11. Shafit-Zagardo B, Kalcheva N. Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Molecular Neurobiology*. 1998 Apr;16(2):149–62.
12. Yang Z, Wang KKW. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences* [Internet]. 2015 Jun 1;38(6):364–74. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4559283/#:~:text=Glial%20fibrillary%20acidic%20protein%20\(GFAP](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4559283/#:~:text=Glial%20fibrillary%20acidic%20protein%20(GFAP)
13. Ünal-Çevik I, Kılınç M, Gürsoy-Özdemir Y, Gurer G, Dalkara T. Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Research*. 2004 Jul;1015(1-2):169–74.
14. Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1996 Oct;44(10):1167–71.
15. Carvey PM, Hendeby B, Monahan AJ. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *Journal of Neurochemistry*. 2009 Oct;111(2):291–314.
16. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*. 2005 May 15;8(6):752–8.

17. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, et al. Microglia in Neurological Diseases: a Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018 Dec 18;12(488).
18. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990 Jan;39(1):151–70.
19. Field SE, Curle AJ, Barker RA. Inflammation and Huntington's disease- a neglected therapeutic target? *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2024 May 3;33(5):451–67.
20. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*. 2016 Aug;19(8):987–91.
21. Du L, Zhang Y, Chen Y, Zhu J, Yang Y, Zhang HL. Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target.
22. Das Sarma S, Chatterjee K, Dinda H, Chatterjee D, Das Sarma J. Cytomorphological and Cytochemical Identification of Microglia. *ISRN Immunology*. 2013 Aug 27;2013:1–10.
23. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation*. 2004;1(1):14.
24. Tai YF, Pavese N, Gerhard A, Tabrizi SJ, Barker RA, Brooks DJ, et al. Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*. 2007 May 29;130(7):1759–66.
25. Yang HM, Yang S, Huang SS, Tang BS, Guo JF. Microglial Activation in the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017 Jun 19;9.
26. Boche D, Perry VH, Nicoll JAR. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 2013 Jan 22;39(1):3–18.
27. Jeong HK, Ji K, Min K, Joe EH. Brain Inflammation and Microglia: Facts and Misconceptions. *Experimental Neurobiology [Internet]*. 2013;22(2):59.
28. Baumann CL, Aspalter IM, Sharif O, Pichlmair A, Blüml S, Grebien F, et al. CD14 is a coreceptor of Toll-like receptors 7 and 9. *Journal of Experimental Medicine*. 2010 Nov 15;207(12):2689–701.
29. Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. Iba1 Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages/Microglia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001 Aug;286(2):292–7.
30. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013 Jun 10;18(17):2352–63.
31. Wilton DK, Stevens B. The contribution of glial cells to Huntington's disease pathogenesis. *Neurobiology of Disease*. 2020 Sep;143:104963.
32. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017 Jun;46(6):957–67.
33. Colombo E, Farina C. Astrocytes: key regulators of neuroinflammation. *Trends Immunol*. 2016;37:608–20.
34. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*. 2009 Dec;32(12):638–47.
35. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature [Internet]*. 2017 Jan;541(7638):481–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5404890/>
36. Yang C, Shervin Rahimpour, Albert, Lonser RR, Zhuang Z. Regulation and dysregulation of astrocyte activation and implications in tumor formation. *Cellular and molecular life sciences [Internet]*. 2013 Feb 19;70(22):4201–11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11113190/>
37. Sun D, Jakobs TC. Structural Remodeling of Astrocytes in the Injured CNS. *The Neuroscientist*. 2011 Oct 7;18(6):567–88.

38. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015 Feb;32:121–30.
39. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurología (English Edition)* [Internet]. 2015 Mar 1;30(2):119–29. Available from: <https://www.elsevier.es/en-revista-neurologia-english-edition--495-articulo-astrocytes-in-neurodegenerative-diseases-i--S2173580814001631>
40. Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, et al. Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC neuroscience* [Internet]. 2007 Jan 2;8:2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17199889/>
41. Battaglia RA, Delic S, Herrmann H, Snider NT. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research*. 2018 Nov 15;7:1796.
42. Buono P, D'Armiento FP, Terzi G, Alfieri A, Salvatore F. *Journal of Neurocytology*. 2001;30(12):957–65.
43. Jia Q, Li S, Li XJ, Yin P. Neuroinflammation in Huntington's disease: From animal models to clinical therapeutics [Internet]. Jia Q, editor. *Frontiers*. 2022. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2022.1088124/full>
44. Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*. 1986 May;321(6066):168–71. *Molecular Neurobiology* [Internet]. 2016 Nov 9 [cited 2019 Nov 5];54(10):7567–84. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12035-016-0245-0>
45. Li S, Li XJ. Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2006;1(1):19.
46. Martín A, Calvigioni D, Tzortzi O, Fuzik J, Wärnberg E, Meletis K. A Spatiomolecular Map of the Striatum. *Cell Reports*. 2019 Dec;29(13):4320-4333.e5.
47. Owens GE. Biochemical and Biophysical Characterization of Huntingtin - Caltech THESIS. Caltechedu [Internet]. 2016 [cited 2024 Sep 20]; Available from: <https://thesis.library.caltech.edu/9270/>
48. Alberch J, Pérez-Navarro E, Canals JM. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*. 2002 Apr;57(6):817–22.
49. Pablo Eliasib Martínez-Gopar, Marian Jesabel Pérez-Rodríguez, Quetzalli Denisse Angeles-López, Tristán-López L, González-Espinosa C, Pérez-Severiano F. Toll-Like Receptor 4 Plays a Significant Role in the Biochemical and Neurological Alterations Observed in Two Distinct Mice Models of Huntington's Disease. 2023 Jan 26;60(5):2678–90.
50. Western Blot | NHGRI [Internet]. Genome.gov. Available from: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Western-Blot#:~:text=Western%20blot%20es%20una%20t%C3%A9cnica>.
51. Bainor A, Chang L, McQuade TJ, Webb B, Gestwicki JE. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical Biochemistry*. 2011 Mar;410(2):310–2.
52. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia*. 1993 Jan;7(1):111–8.
53. Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*. 2010 Mar 16;6(4):193–201.
54. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *The Journal of Immunology*. 1999 Apr 1;162(7):3749–52.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES:

OBJETIVO	ACTIVIDAD	SEP 2024	OCT 2024	NOV 2024	DIC 2024	ENE 2025	FEB 2025
Búsqueda de bibliográfica	Recabar información en base de datos como PubMed, Scielo, Elsevier, Google Scholar y Nature acerca de enfermedades neurodegenerativas, EH, microglia, astrocitos y sus marcadores.						
Aprendizaje de método WB	Familiarizarse con el método de Western Blot, así como sus bases y funciones específicas						
Estandarización del método WB	Búsqueda de Co de anticuerpos 1 ^{ro} y 2 ^{ro} , así como determinación de los niveles de expresión de marcadores Iba-1, GFAP y Neu-N						
Toma de muestras en tejido cerebral	Recolección de muestras en ratones control y lesionados con ácido quinolínico						
Aplicación de WB con las muestras de tejido cerebral	Utilizar la información anterior para estandarizar y aplicar WB con las muestras de tejido cerebral de ratones control y lesionados por ácido quinolínico.						
Elaboración de reporte final	Ratificación y análisis de datos obtenidos en los meses previos, elaborando conclusiones del presente trabajo.						
Entrega de proyecto final	Elaboración de reporte final a asesores (externo e interno)						



Dra. Edith González Guevara
CP: 12322269



Dra. Laura Estela Castrillón Rivera
Num. económico: 8140