



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICA

S

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO
PRODUCIDAS POR LA NOX EN EL PROCESO
NEUROINFLAMATORIO INDUCIDO POR EL DAÑO EXCITOTÓXICO

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

DIEGO ROLANDO HERNÁNDEZ ESPINOSA

TUTOR PRINCIPAL

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. MARIA DE LOURDES MASSIEU TRIGO
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
Facultad de Medicina, UNAM

(CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, SEPTIEMBRE 2019)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Nombre: Hernández Espinosa Diego Rolando
Teléfono: 56461589
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular
División de Neurociencias
311106802

2. Datos del tutor

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Teléfono: 56225616
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular
División de Neurociencias

3. Datos del sinodal 1

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Teléfono: (55) 5622 9178
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Investigaciones Biomédicas

4. Datos del sinodal 2

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Teléfono: 56225616
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Fisiología Celular
División de Neurociencias

5. Datos del sinodal 3

Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez
Teléfono: (55) 56 06 38 22 Ext. 2070
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Laboratorio de Patología Vasculare Cerebral

6. Datos del sinodal 4

Dra. Leonor Pérez Martínez
Teléfono: (777) 32 91 777 Ext. 38310
Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Biotecnología-UNAM
Centro de Ciencias Genómicas

7. Datos del sinodal 5

Dra. Anahí Chavarría Krauser
Teléfono: (55) 56232682
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina

8. Datos del trabajo escrito

Papel de las especies reactivas de oxígeno producidas por la NOX en el proceso neuroinflamatorio inducido por el daño excitotóxico

Tutoría y apoyo

- Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Julio E. Morán Andrade en el laboratorio BL-301 del Departamento de Neuropatología Molecular, en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México y con el financiamiento de CONACYT (Proyecto 285184) y DGAPA (Proyecto IN212019).
- El presente trabajo contó con el invaluable apoyo técnico de la M. en C. Guadalupe Domínguez Macouzet y la Biol. Teresa Montiel Montes
- Agradecemos el apoyo del Dr. Héctor Alfonso Malagón Rivero y la Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo, en la asistencia, reproducción y cuidado de los animales en el bioterio, así como de Sandra Daniela Rodríguez Montañón por el procesamiento de muestras en la Unidad de Histología del I.F.C.
- Esta tesis también contó con las valiosas correcciones y aportaciones de los miembros del jurado: Dra. María Eugenia Gonsebatt, Dra. Leonor Pérez Martínez, Dra. Perla Maldonado Jiménez y Dra. Anahí Chavarría Krauser.

Abreviaciones

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico	NLR	Receptor tipo Nod
BHE	Barrera hematoencefálica	NLRP3	Receptor tipo Nod con un dominio pirina 3
Ca²⁺	Calcio	NOS	Oxido nítrico sintasa
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio	NOX	NADPH oxidasa
CLR	Receptores de lectinas tipo C	NOX-2	NADPH oxidasa 2
CS1	Supresor de la señalización de citocinas 1	NOX-2 KO	NADPH oxidasa Knock Down
DAMP	Patrones asociados a daño	PDZ	Densidad postsináptica
DHE	Dihidroetidio	PKC	Proteína cinasa C
Et	Etidio	PVDF	Membrana de difluoruro de poli vinilideno
ERO	Especies reactivas de oxígeno	SDS	Dodecilsulfato sódico
JAK	Cinasas Janus	SNC	Sistema nervioso central
FJB	Flurojade B	TBS	Amortiguador Tris-salino
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	TGFβ	Factor de crecimiento transformante β
Glu	Glutamato sódico	TLR	Receptores tipo Toll
GLUT	Transportador de glucosa	TNFα	Factor de necrosis tumoral α
GluR	Receptor de Glutamato	URF	Unidades relativas de fluorescencia
IFNγ	Interferón γ	WT	Wild type (Silvestre)
IL-1β	Interleucina 1 beta	XO	Xantina oxidasa
IL-4	Interleucina 4		
IL-6	Interleucina 6		
IL-10	Interleucina 10		
IL-12	Interleucina 12		
IL-1β	Interleucina 1 β		
LPS	Lipopolisacárido		
NDS	Score de deficit neurológico		
NMDA	N-metil D-aspartato		
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B		
NGC	Neuronas granulares de cerebelo		

ÍNDICE

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Marco teórico	8
3.1. Anatomía y fisiología del núcleo estriado.....	8
3.2. Tipos celulares del estriado.....	11
3.3. Glutamato, receptores y sinapsis glutamatergica.....	13
3.4. Excitotoxicidad.....	18
3.5. Relevancia del daño excitotóxico en patologías del sistema nervioso.....	20
3.6. Participación de las NOX en la fisiología del SNC.....	21
3.7. Participación de las NOX en el daño excitotóxico.....	24
3.8. Respuesta inflamatoria secundaria al proceso excitotóxico.....	27
3.9. Relación entre las NOX y la neuroinflamación secundaria al evento excitotóxico.....	31
4. Antecedentes	33
5. Planteamiento del problema	34
6. Pregunta experimental	34
7. Hipótesis	34
8. Objetivos	34
8.1. Objetivo general.....	35
8.2. Objetivos particulares.....	35
9. Materiales y métodos	35
9.1. Reactivos.....	35
9.2. Animales.....	36
9.3. Modelo de daño excitotóxico.....	37
9.4. Grupos y tratamientos	37
9.5. Obtención y procesamiento del tejido.....	38
9.6. Análisis del volumen de lesión.....	39

9.7. Cuantificación de las células en degeneración (Fluorojade B)	39
9.8. Actividad enzimática de la NOX.....	39
9.9. Cuantificación de las proteínas por inmuno blot.....	40
9.10. Actividad enzimática de la caspasa 3.....	40
9.11. Inmunoanálisis de la concentración de citocinas.....	41
9.12. Pruebas de conducta motriz	41
9.12.1. Prueba del cilindro.....	41
9.12.2. Prueba de la remoción del adhesivo.....	42
9.12.3. Prueba de la rejilla invertida.....	42
9.12.4. Determinación del score de disfunción neurológica.....	43
9.13. Análisis estadístico.....	43
10. Resultados.....	43
10.1. La lesión excitotóxica del estriado y la degeneración neuronal son menores en los ratones NOX-2 KO.....	43
10.2. La actividad de NOX-2 aumenta durante el daño excitotóxico.....	44
10.3. La resistencia de los ratones KO NOX-2 al daño excitotóxico implica una disminución en la activación de la caspasa-3.....	47
10.4. Los ratones NOX-2 KO muestran una mejor recuperación motora que los ratones WT después del daño excitotóxico.....	48
10.5. El patrón de producción de citocinas en respuesta al daño excitotóxico depende de NOX-2.....	51
10.6. La administración de IL-4 previene parcialmente la lesión excitotóxica.....	54
10.7. La IL-4 regula la actividad de NOX y la activación de caspasa-3 en el proceso excitotóxico.....	56
10.8. La administración de IL-10 reduce la lesión inducida por daño excitotóxico.....	57
10.9. La IL-10 regula negativamente a la actividad de las NOX y la activación de caspasa-3.....	59
10.10. La administración de IL-10 mejora la recuperación motora en ratones después del daño excitotóxico.....	61
11. Discusión.....	63
12. Conclusiones.....	70
13. Bibliografía referida.....	72

1. Resumen

Antecedentes: Durante el daño excitotóxico, la muerte neuronal ocurre por a un aumento de calcio intracelular, la inducción de estrés oxidante y una respuesta inflamatoria posterior. Las NADPH oxidasas (NOX) son fuentes relevantes de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante el daño excitotóxico. La NADPH oxidasa-2 (NOX-2) se ha relacionado particularmente con el daño neuronal y la muerte, así como con la resolución de la respuesta inflamatoria posterior, sin embargo, aún se desconoce el nivel exacto de su participación y el mecanismo fino por el cual regula dicha respuesta. Como las ERO son componentes cruciales de la respuesta inflamatoria, en este trabajo, evaluamos el papel de NOX-2 en la progresión de la inflamación resultante del daño excitotóxico inducido por el glutamato en el estriado de ratón en un modelo *in vivo*.

Métodos: Se administró glutamato monosódico solo o en combinación con IL-4 ó IL-10 por inyección estereotáxica en el estriado de ratones C57BL/J6 de tipo silvestre y NOX-2 KO (^{gp91Cybbtm1Din/J}). El daño se evaluó a las 24 h en cortes histológicos teñidos con violeta de cresilo y FluoroJade B (FJB). También se midió la actividad enzimática de la caspasa-3 y NOX. Además, el perfil de citocinas se identificó mediante ELISA y la actividad motora se verificó mediante las pruebas del cilindro, la remoción de la cinta adhesiva y la rejilla invertida.

Resultados: Observamos un efecto neuroprotector en ratones NOX-2 KO asociado a la respuesta diferencial contra el daño excitotóxico, caracterizado por la producción de citocinas antiinflamatorias. Los animales NOX-2 KO presentaron menos muerte neuronal apoptótica y una lesión en el estriado de menor tamaño, asociado al aumento de la producción de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10). Para probar si la producción de estas interleucinas podrían contribuir a la reducción del daño observado en los animales NOX2 KO, evaluamos el tratamiento con IL-4 e IL-10 en animales silvestres tratados con glutamato y encontramos que ambas condiciones disminuyen la actividad de las NOX y protegen del daño excitotóxico.

Conclusiones: La liberación de citocinas proinflamatorias durante el evento excitotóxico promueve la muerte apoptótica de las neuronas que sobrevivieron al daño inicial. Durante la respuesta inflamatoria posterior al daño excitotóxico, las ERO generadas por la NOX-2 desempeñan un papel decisivo en la extensión de la lesión y, en consecuencia, en la gravedad del compromiso funcional, probablemente regulando la producción de citocinas antiinflamatorias. La ausencia de ERO generadas por la NOX2 durante el daño excitotóxico promueve la generación de IL-4 que podría

inducir a su vez la producción de IL-10. Ambas citocinas contribuyen a una reducción en la muerte neuronal excitotóxica.

2. Introducción

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente sensible al daño, debido tanto a sus características anatómicas como funcionales. La poca capacidad de neurogénesis en el tejido adulto y la cronicidad de la respuesta inflamatoria son factores que también facilitan la pérdida de la función después de un evento nocivo en el tejido nervioso. Entre los tipos celulares que conforman al sistema nervioso, las neuronas son especialmente susceptibles al daño oxidativo debido a la alta tasa metabólica requerida para mantener la producción de potenciales de acción (Wang *et al.*, 2013).

El daño excitotóxico promueve el aumento de las ERO, las cuales favorecen la muerte neuronal por medio de diversos mecanismos directos (necrosis) e indirectos (apoptosis, autofagia y piroptosis). Se han propuesto diversos tratamientos antioxidantes con el fin de limitar el daño excitotóxico, sin embargo, la participación de las ERO en diversos procesos fisiológicos y la falta de especificidad de dichos tratamientos han limitado la obtención de resultados positivos en modelos de isquemia y trauma encefálico (Bedard y Krause, 2007).

Por lo anterior, es necesario caracterizar los mecanismos por los cuales las ERO producidas durante el evento excitotóxico, influyen sobre la muerte neuronal, con la finalidad de plantear estrategias terapéuticas que limiten el avance del daño y promuevan la respuesta del tejido hacia la recuperación tisular.

3. Marco teórico

3.1 Anatomía y fisiología del núcleo estriado

El estriado (“cuerpo estriado” en la Nomenclatura Anatómica Ilustrada) forma parte de los núcleos subcorticales o ganglios basales, que son agregados de cuerpos neuronales. En principio, se creyó que estos núcleos tenían la única función de transmitir información desde unas zonas corticales a otras, sin embargo, diversos hallazgos han demostrado su participación en funciones cognitivas, emotivas y motoras (Rolls, 1994).

Los ganglios basales tienen cuatro componentes principales: el estriado, el globo pálido, la sustancia negra y el núcleo subtalámico. Algunos autores añaden otras estructuras subcorticales como la formación reticular parabraquial de la protuberancia, el tubérculo olfatorio, la sustancia innominada, el núcleo basal de Meynert, o el núcleo tegmental pedunculopontino. El estriado a su vez está compuesto por una porción dorsal conocida como neostriado y una región ventral denominada núcleo accumbens (Lanciego *et al.*, 2012).

El estriado dorsal se compone de dos núcleos de composición celular idéntica: el núcleo caudado y el putamen. Ambos están separados por la cápsula interna, aunque en el tercio anterior quedan unidos por puentes de tejido estriatal. El núcleo caudado es una estructura alargada en forma de “c” que sigue el recorrido del ventrículo lateral. En el cerebro humano, su longitud es de aproximadamente 8 cm y su grosor es variable en los distintos niveles del eje anteroposterior (Figura 1).

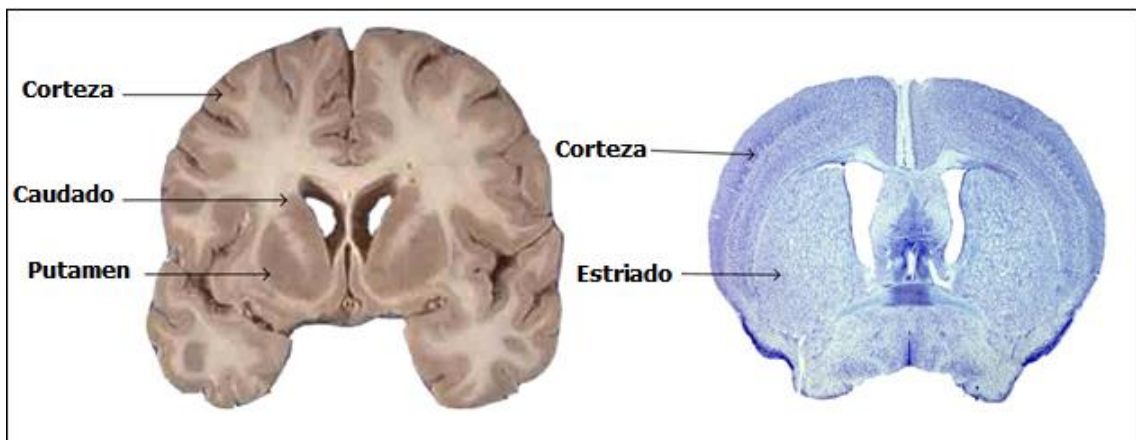


Figura 1. Anatomía del núcleo estriado. Corte coronal de un cerebro humano (panel izquierdo) que muestra la corteza, el caudado y el putamen por separado. Cuando se combinan el caudado y el putamen forman el cuerpo estriado. El panel derecho muestra para comparación un corte caudal de un cerebro de ratón teñido con violeta de cresilo que muestra la corteza y el cuerpo estriado, como una sola estructura (Evans *et al.*, 2012)

El putamen es un núcleo ovoide en su región anterior, y que una vez superada la comisura se alarga en el eje dorsoventral y se estrecha en el medio-lateral. Su zona ventral postcomisural es una región de difícil análisis anatómico, ya que se fusiona con otros núcleos adyacentes como el complejo amigdalino, formando la transición estriadoamigdalina. La comisura anterior ha sido empleada clásicamente para dividir tanto al núcleo caudado como al putamen

en dos regiones topográficamente diferenciadas, la zona precomisural y la postcomisural (Kreitzer, 2009).

El cuerpo estriado recibe vías aferentes de la corteza cerebral, tálamo óptico y de la sustancia negra del mesencéfalo. Participa en el relevo de vías relacionadas con los movimientos de grupos musculares que se producen a través de vías descendentes directas y cruzadas hacia el tronco del encéfalo y a la médula espinal, mediante los haces corticonucleares y corticoespinales (Buot y Yelnik, 2012).

Las conexiones del cuerpo estriado a través de sus fibras aferentes son: 1) fibras córticoestriadas, en la cual los segmentos de la corteza cerebral envían axones al núcleo caudado y al putamen. 2) fibras talamoestriadas, donde los núcleos intralaminares del tálamo óptico envían un gran número de axones al núcleo caudado y al putamen; 3) fibras nigroestriadas, por la cual las neuronas de la sustancia negra envían axones al núcleo caudado y al putamen (Buschman y Miller, 2014).

Las conexiones del cuerpo estriado a través de sus fibras eferentes son: 1) fibras estriatopalidales, las cuales se dirigen desde el núcleo caudado y el putamen hacia el globo pálido, 2) fibras estriatonígricas que se dirigen desde el núcleo caudado y el putamen hacia la sustancia negra (Chuhma *et al.*, 2011). La actividad del cuerpo estriado tiene inicio con la integración de la información recibida proveniente de la corteza sensitiva, el tálamo óptico y el tronco del encéfalo. La eferencia del cuerpo estriado es canalizada a través del globo pálido, que luego participa en las actividades de las áreas motoras de la corteza cerebral u otros centros motores del tronco del encéfalo. Por lo tanto, el cuerpo estriado puede controlar los movimientos musculares al influir sobre el control de la corteza cerebral (Figura 2).

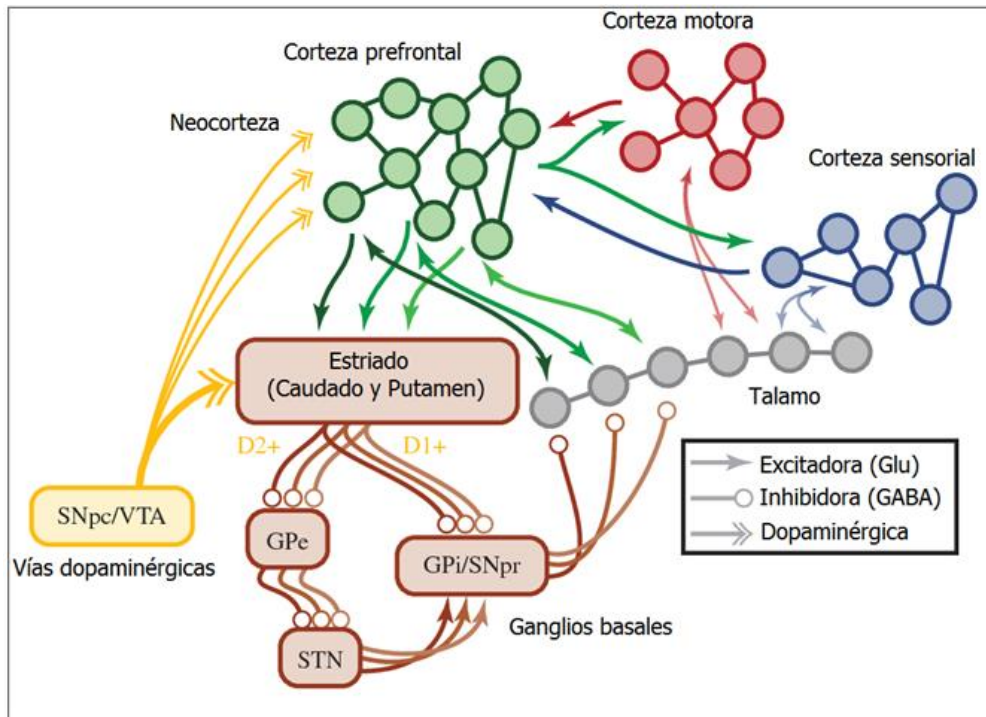


Figura 2. Anatomía del neocórtex y los ganglios basales (GB). Las proyecciones corticales ingresan a los GB a través del cuerpo estriado y se cree que mantienen la separación a lo largo de los ganglios (que se muestra en diferentes tonos). La ruta "directa" libera la inhibición en el tálamo (etiquetada como D1+); La ruta 'indirecta' aumenta la inhibición (D2-). Sustancia negra, pars compacta (SNpc), área tegmental ventral (VTA), globus pallidus lateral (GPe), núcleo subtalámico (STN), globus pallidus interno (GPi), Sustancia negra, pars reticular (SNpr) y estriado. (Modificado de Buschman y Miller, 2014)

El globo pálido desempeña un papel importante en el control de los movimientos axiales, tales como los movimientos de la cintura del cuerpo y de la posición de los segmentos proximales de las extremidades. De igual manera se sabe que participa en el movimiento voluntario de los músculos distales de los miembros del aparato locomotor y ésta importante función permite ubicar el tronco y la raíz de los miembros (grupos musculares proximales) en posiciones apropiadas, antes que la vía motora voluntaria active los movimientos de grupos musculares distales (da Silva *et al.*, 1984).

3.2 Tipos celulares del estriado

Neuronas

El estriado cuenta con dos tipos distintos de neuronas, según las dianas de sus axones sean el propio estriado u otros núcleos. Así, aquellas neuronas cuyo axón abandona el estriado e

inerva a otras estructuras del sistema nervioso son conocidas como neuronas de proyección, mientras que aquéllas cuyo axón no sale del estriado e inerva a otras neuronas estriatales son nombradas interneuronas, además presentan características químicas y morfológicas distintas. Ramón y Cajal (1904) observó la presencia de estos tipos neuronales distintos, clasificándolas en neuronas de axón corto y largo (Ramón y Cajal, 1904). Uno de los aspectos más llamativos acerca de estas dos poblaciones de neuronas estriatales es la variación de su proporción según se asciende en la escala filogenética. Así, mientras el porcentaje de las neuronas de proyección es de alrededor del 95% en roedores, en humanos esta cifra cae hasta el 75% (Graveland y DiFiglia, 1985).

Astroцитos

En cuanto a los astroцитos, los localizados en el estriado, exhiben usualmente una morfología en forma de estrella, con muchos procesos que se extienden desde el soma. Los astroцитos realizan una gran cantidad de funciones, tales como el soporte bioquímico de las neuronas y otros tipos de células, la formación de la barrera hematoencefálica (BHE), así como la reparación y cicatrización del cerebro después de lesiones. Al igual que la microglia, la astroglía es capaz de responder a lesiones o infecciones por medio de la producción diferencial de citocinas, las cuales contribuyen de manera importante a la regulación de la respuesta inmune. Cabe mencionar, que la astroglía es también capaz de polarizarse en fenotipos, proinflamatorios(A1) e antiinflamatorios (A2) (Zamanian et al., 2012)

Oligodendrocitos

Como en el resto del SNC, los oligodendrocitos son una variedad de células de la neuroglia dentro del estriado. En comparación con los astroцитos, los oligodendrocitos son más gráciles y forman menos ramificaciones celulares. El cuerpo celular de los oligodendrocitos existe predominantemente en la materia blanca, y menos frecuentemente en la materia gris (McCollum *et al.*, 2013).

Microglia

Las células microgliales en el estriado se encuentran en un estado llamado ramificado, en el que se han descrito como inmunológicamente “inactivas”. Sin embargo, estas pueden activarse por disparadores de diversa naturaleza (algún tipo de lesión cerebral) tales como

niveles elevados de citocinas proinflamatorias, presencia de lipopolisacárido bacteriano (LPS) o moléculas producidas por el sistema inmune (TNF- α e IFN- γ). La activación de la microglia se puede constatar por cambios morfológicos (conformación ameboide) y funcionales (producción de citocinas) observados en patologías neurodegenerativas y lesiones mecánicas. Una vez activada, la microglia asume un comportamiento similar a los macrófagos, actuando como células presentadoras de antígenos, fagocíticas y citotóxicas, características que son un sello distintivo de las células del sistema inmunológico (Grabert *et al.*, 2016).

3.3 Glutamato, receptores y sinapsis glutamatérgica

El ácido glutámico (glutamato en su forma ionizada) es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas. Pertenece al grupo de los aminoácidos ácidos, o con carga negativa a pH fisiológico, debido a que presenta un segundo grupo carboxilo en su cadena lateral y se considera un aminoácido no esencial para el ser humano ya que puede ser sintetizado en diversos tejidos (Bergles *et al.*, 1999).

A nivel sistémico, el glutamato es sustrato para la síntesis de proteínas y un precursor del metabolismo anabólico en el músculo; también participa en el equilibrio ácido-base en el riñón y en la producción de urea en el hígado. Así mismo interviene en el equilibrio y transporte de nitrógeno entre los diferentes órganos. Finalmente, el ácido glutámico es precursor para la síntesis de glutatión, metabolito con alto potencial antioxidante (Zhou y Danbolt, 2014).

En el SNC, aparte de su papel como neurotransmisor, el glutamato participa en actividades consideradas como no sinápticas en el sistema nervioso. La principal de éstas es su participación en el metabolismo energético de las células. Su papel está determinado parcialmente por el tipo celular, por ejemplo, en las células gliales se convierte en glutamina, mientras que en las neuronas gabaérgicas sirve como sustrato para la formación de ácido gamma-aminobutírico (Bergles *et al.*, 1999).

La glucosa es el sustrato principal para la síntesis de glutamato en el SNC, ya que, tras su ingreso, rápidamente atraviesa el endotelio vascular y la interfase formada por la BHE. La captura de glucosa se realiza por la acción de los transportadores de la familia GLUT, los cuales se expresan tanto en las células endoteliales como en astrocitos, microglia y neuronas.

Además, se ha comprobado que los astrocitos transforman la glucosa en lactato, el cual se libera en el espacio extracelular, donde las neuronas lo captan para usarlo como sustrato energético (Zhou y Danbolt, 2014).

En los astrocitos que se localizan en la sustancia gris y en los oligodendrocitos, el glutamato se convierte en glutamina por la enzima glutamina sintetasa. Con la intervención de transportadores localizados en los astrocitos o en las neuronas, la glutamina puede ser transferida de la glía a las neuronas. En condiciones normales la enzima glutaminasa se localiza en la membrana mitocondrial interna, pero, en caso de lesión neuronal, ésta puede trasladarse al medio extracelular y, de manera aberrante, convertir la glutamina en glutamato lo que a su vez eleva la concentración de glutamato provocando daño celular (Pitts y McClure, 1967).

Posterior a su recaptura, el glutamato es transaminado por medio de la enzima alanina aminotransferasa o desaminado por acción de la glutamato deshidrogenasa para obtener α -cetoglutarato, que a su vez es oxidado sucesivamente a succinato, fumarato y malato. Este último puede ser descarboxilado a lactato, de manera que el glutamato recapturado puede ser utilizado como sustrato energético (Gallo y Grham, 2000).

El ciclo de síntesis y degradación del glutamato requiere energía en varias de sus etapas, por ejemplo, su almacenamiento en vesículas, la fusión de la vesícula con la membrana presináptica, su recaptura y la acción de la glutamina. Se calcula que el ciclo del glutamato consume alrededor del 3% del total de la energía obtenida del metabolismo de la glucosa (Dager *et al.*, 1977).

En cuanto a su papel en la conducción del impulso nervioso, el glutamato cumple con los criterios básicos para ser considerado como un neurotransmisor clásico, ya que se localiza en vesículas presinápticas, las cuales se fusionan con la membrana presináptica cuando se presenta un potencial de acción, se une a receptores específicos y posteriormente es removido de la hendidura sináptica por mecanismos específicos. El ácido glutámico es el neurotransmisor excitador más abundante y su participación en la transmisión nerviosa está mediada por la estimulación de receptores específicos, denominados receptores de glutamato

(GluR), los cuales se acoplan a canales iónicos (ionotrópicos) o a proteínas G (metabotrópicos) (Gallo y Grham, 2000).

Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos son canales iónicos que se abren al ser fijado el ligando, permitiendo el paso de Na⁺ o Ca²⁺ por su centro. Este flujo de iones produce la despolarización de la membrana plasmática con generación de una corriente eléctrica que se propaga hasta la siguiente célula. Los receptores ionotrópicos de glutamato son complejos formados por 4 o 5 subunidades y se dividen en grupos según su comportamiento farmacológico en: 1) receptores para AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), 2) receptores para NMDA (N-metil-D-aspartato), 3) receptores para Kainato (ácido 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina) y, 4) receptores para Quisqualato (ácido α -amino-3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidina-2-propanoico) (Willard y Koochekpoor 2013).

Las subunidades de todos los receptores ionotrópicos de glutamato comparten la misma estructura básica. Al igual que otros canales que permiten el paso de iones, el receptor ionotrópico para glutamato posee cuatro partes hidrofóbicas en la parte central de la secuencia denominadas TM-I, II, III y IV. Sin embargo, a diferencia de otras subunidades de otros receptores, la parte TM-II forma un asa que se extiende en la bicapa fosfolipídica de tal forma que produce un -NH₂ terminal extracelular y un -COOH terminal intracelular. Además, en estos receptores para glutamato la parte entre TM-III y TM-IV es extracelular y constituye parte del dominio de reconocimiento del ligando. En algunas de estas partes hidrofóbicas, en particular en la TM-II, se sitúan los denominados puntos de edición de RNA, en los cuales se producen cambios de aminoácidos, lo cual conlleva a un cambio significativo en la conductancia iónica de la subunidad (Willard y Koochekpoor 2013).

Los receptores ionotrópicos para glutamato constituyen un grupo muy diverso de receptores. Esta diversidad se debe a que provienen de la transcripción de diferentes genes y a la modificación mediante *splicing alternativo*, lo que produce variaciones, particularmente en las proximidades del -NH₂ y del -COOH terminal. Esta última región es importante ya que en ella se producen las interacciones proteína-proteína (Traynelis *et al.*, 2010).

Receptores para NMDA

Los receptores de NMDA están compuestos por las subunidades NR1 y NR2. Estos receptores presentan dos áreas características de reconocimiento del ligando: el lugar de fijación del glutamato y el lugar de reconocimiento de la glicina. Además del glutamato, para que el receptor funcione correctamente, se requiere que la glicina se fije a su punto de unión situado en la subunidad NR1 (Figura 3A). Cuando la célula está en reposo, los receptores para NMDA se encuentran inactivos debido a un bloqueo dependiente de voltaje mediante iones magnesio. Cuando un impulso despolariza la célula postsináptica, el magnesio es removido y el canal queda libre para que el receptor sea activado. Las variaciones en estos receptores se deben a pequeños cambios en las secuencias de aminoácidos, sobre todo en la región COOH⁻ terminal, lo que modifica su capacidad de unión a las proteínas del dominio PDZ (Vyklicky *et al.*, 2014).

Receptores para AMPA

Los receptores para AMPA regulan la transmisión sináptica rápida en el sistema nervioso central. Están compuestos por las subunidades GluR1-4 que son transcritas a partir de diferentes genes (Figura 3A). Los receptores para AMPA nativos son impermeables al Ca²⁺ debido a la subunidad GluR2. El cambio de un aminoácido de glutamina por una arginina en la región TM-II de la subunidad GluR2 hace que el receptor se vuelva permeable a dicho ion. Este hecho, junto con la posibilidad que tienen las subunidades GluR2 de unirse a otras proteínas intracelulares, hace que sean consideradas como los constituyentes más importantes de los receptores (Gouaux, 2004).

Receptores para Kainato

Los receptores para Kainato constituyen un grupo diferentes a los receptores para NMDA y AMPA, aunque comparten con estos una serie de propiedades estructurales. Están formados por tres subunidades GluR5-7, KA1 y KA2. Estas subunidades se pueden clasificar en subunidades de baja afinidad (GluR5, GluR6 y GluR7) y subunidades de alta afinidad (KA1 y KA2). En estos receptores, los dominios transmembranales TM-I y TM-II forman parte del poro

del canal iónico y, como en el caso de otras subunidades, son un punto de edición de RNA. Los receptores para Kainato son necesarios para la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo y juegan un papel importante en la plasticidad sináptica de la corteza somatosensorial (Frerking y Nicoll, 2000).

Receptores metabotrópicos para glutamato

Además de la activación de los receptores ionotrópicos, el glutamato también actúa sobre receptores acoplados a proteína G modulando la producción de segundos mensajeros intracelulares, es decir que los receptores metabotrópicos median los efectos lentos del glutamato. Existen 8 subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato, y estos a su vez se clasifican en tres grupos distintos, con base en su homología, farmacología y acoplamiento a mecanismos de señalización intracelular. El primer grupo está integrado por el subtipo mGluR1 y mGluR5, el cual activa a la fosfolipasa C, mientras que los miembros del segundo (mGluR2 y mGluR3) y el tercer grupo (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están acoplados negativamente a la adenilatociclasa, mientras que el receptor mGluR6 esta acoplado a la activación de la GMPc fosfodiesterasa (Figura 3B). Los receptores metabotrópicos en las neuronas juegan un papel vital para la inducción y el mantenimiento de los potenciales de larga duración (LTP), la regulación de los receptores de NMDA/AMPA y la excitabilidad postsináptica. Estos receptores también se localizan en células gliales en donde regulan su activación y respuesta a estímulos nocivos (Nicoletti *et al.*, 2011).

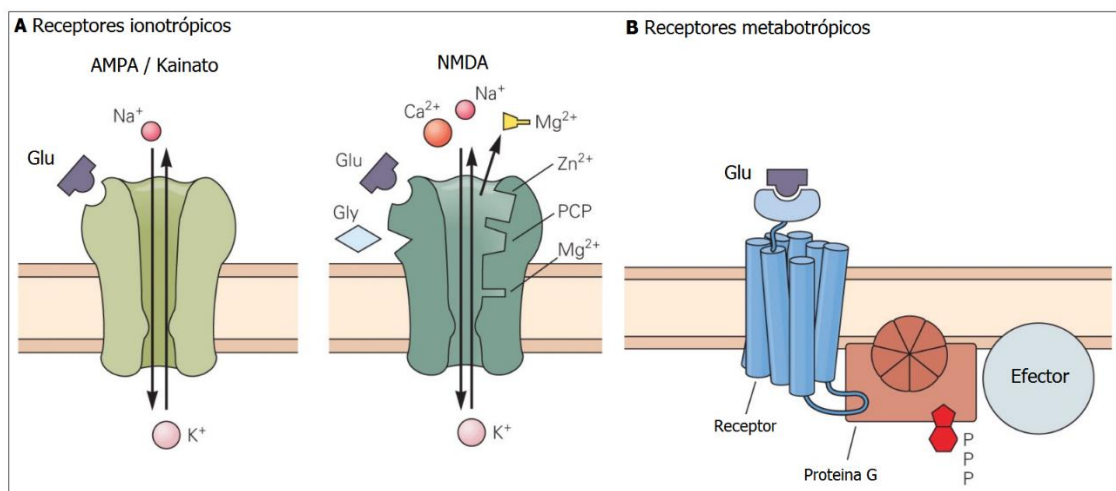


Figura 3. Tipos de receptores para glutamato. (A) Receptores ionotrópicos tipo AMPA y NMDA. (B) Esquema general de los receptores metabotrópicos. La activación de los receptores ionotrópicos permite la entrada de iones, mientras que la activación de los metabotrópicos está acoplada a la fosforilación de proteínas G. Glicina (Gly), fenciclidina (PCP) y glutamato (Glu), (modificado de Yates, 2013).

3.4 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un fenómeno observado en numerosas enfermedades del sistema nervioso central (SNC), tales como el traumatismo cerebral, la isquemia y los desórdenes neurodegenerativos (Araujo *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Farooqui *et al.*, 2008). Como ya se comentó previamente, el glutamato es el neurotransmisor excitador por excelencia y su regulación es crítica, no solo por las propiedades de señalización, sino debido a que su desregulación se asocia a la muerte celular (Wang y Qin, 2011).

La teoría excitotóxica, postula que los niveles excesivos de glutamato, o bien la hiperactivación de sus receptores, se relacionan con la muerte neuronal (Olney, 1985, Figura 4). Inicialmente se describió que la muerte celular inducida por la excitotoxicidad presentaba únicamente características de muerte necrótica (Fujikawa *et al.*, 2000), sin embargo, posteriormente se observó la presencia de cuerpos apoptóticos y la activación de la caspasa-3, por lo que también se reconoció un componente apoptótico (Dong *et al.*, 2009; Liou *et al.*, 2003). En la actualidad se sugiere que tanto la piroptosis como la autofagia también podrían ser mecanismos de muerte celular no apoptótica inducidas por la excitotoxicidad (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta tales evidencias, se puede considerar entonces, que la muerte excitotóxica no es un evento uniforme, sino un proceso dinámico y progresivo.

Aunque el mecanismo de muerte neuronal por excitotoxicidad no está del todo esclarecido, se sabe que está mediado por el aumento de Ca^{2+} intracelular, la formación de especies reactivas (oxígeno y nitrógeno) y la subsecuente respuesta inflamatoria. Después de la sobre activación de los receptores glutamatérgicos, se da una entrada excesiva de cationes a la célula; cuando los mecanismos amortiguadores son superados se produce un incremento del Ca^{2+} mitocondrial, lo que a su vez promueve la disfunción metabólica y la despolarización de la membrana mitocondrial, esto debido al abatimiento del potencial quimiosmótico y la

activación del poro de transición mitocondrial (Nicholls y Ward, 2000; Murchison y Griffith, 2000).

El aumento sostenido de las concentraciones de Ca^{2+} promueve la generación de radicales libres de oxígeno por parte de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, y la activación de vías de señalización que culminan en la regulación positiva de sistemas enzimáticos generadores de especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como la xantina oxidasa (XO) y las NADPH oxidasas (NOX). El aumento en las ERO, aunado al agotamiento de las barreras antioxidantes, promueven daño oxidante a membranas y ácidos nucleicos, lo cual contribuye de manera significativa en la muerte neuronal (Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

Cabe destacar que no solo las ERO participan en el daño oxidante, ya que durante el daño excitotóxico hay un aumento en la producción de ON, resultado de la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), (Figura 4). El ON puede potenciar el efecto excitotóxico del glutamato al aumentar su liberación desde las terminales presinápticas (Almeida *et al.*, 1998) o reaccionar con el anión superóxido y formar peroxinitrito, especie reactiva que induce la nitración de la membrana, la activación de enzimas involucradas en el catabolismo de biomoléculas y la inhibición de la síntesis de proteínas (Brown, 2010).

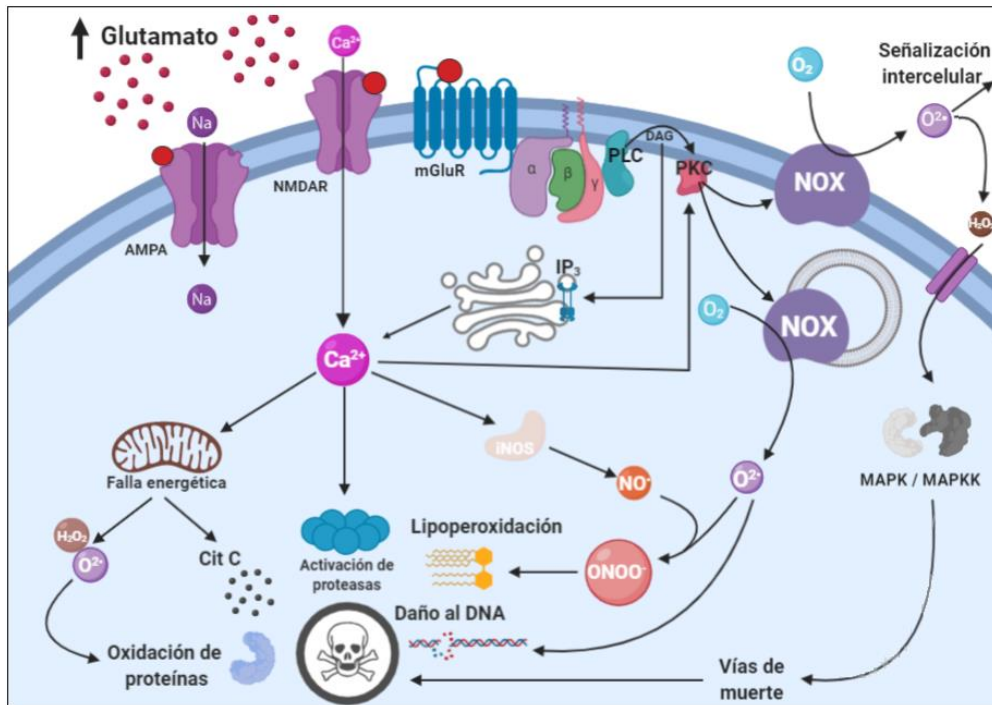


Figura 4. Mecanismo de muerte neuronal por excitotoxicidad. La estimulación de los receptores glutamatérgicos (AMPA, NMDAR, mGluR) promueve la activación de vías de señalización tales como la vía de la fosfolipasa C (PLC) y proteína cinasa C (PKC), las cuales activan a las NOX. La activación de NOX, junto con la producción de ERO mitocondrial y óxido nítrico (NO) promueven la muerte neuronal.

3.5 Relevancia del daño excitotóxico en patologías del sistema nervioso

Diversas patologías del SNC cursan con daño excitotóxico como parte de su historia natural; la muerte neuronal secundaria al daño excitotóxico se observa en eventos agudos tales como la isquemia cerebral, el traumatismo encefálico y las crisis epilépticas, entre otros (Páramo *et al.*, 2013; Hirano *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2017). En procesos crónicos, se observan datos de daño excitotóxico de menor intensidad, pero de manera continua en patologías como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple (Amani *et al.*, 2019; Amaal *et al.*, 2014; Valko *et al.*, 2019).

Aunque los mecanismos de lesión excitotóxica son comunes en todos los procesos mencionados, las condiciones en las que se desarrolla el daño y su peso específico en la muerte neuronal son variables. Por ejemplo, durante la isquemia cerebral, el aumento extracelular de glutamato es resultado de la disminución de su recaptura, debido a que este

proceso depende de energía (Páramo *et al.*, 2013). En el traumatismo encefálico, la fuerza mecánica del impacto disrumpe la continuidad de la BHE, lo que provoca que las grandes concentraciones de glutamato en la sangre sobrepasen los mecanismos de recaptura y estimulen los receptores neuronales (Hirano *et al.*, 2015). En el caso de las crisis epilépticas, la despolarización desregulada de un grupo neuronal y la pérdida de la inhibición de las sinapsis excitadoras, promueven el rápido aumento del glutamato extracelular, lo que provoca la sobre estimulación de los receptores de glutamato (Ma *et al.*, 2017). En los procesos agudos, el daño excitotóxico contribuye a la temprana muerte por necrosis, así como con la posterior pérdida neuronal en la zona de penumbra secundaria a la muerte apoptótica (Tehse y Taghibiglou, 2018).

En patologías neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer, el daño excitotóxico promueve un estado inflamatorio crónico al participar en la activación desregulada de la glía, lo cual se ha asociado con la muerte neuronal progresiva (Amani *et al.*, 2019). Por otro lado, durante la muerte de neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson, la liberación de glutamato al espacio extracelular promueve una mayor muerte neuronal secundaria al estrés oxidante característico del proceso excitotóxico (Amaal *et al.*, 2014). En la esclerosis múltiple evidencia reciente señala que el daño responsable de la pérdida axonal y la muerte neuronal podría estar asociado con la disminución del transporte de glutamato (Valko *et al.*, 2019). En las patologías neurodegenerativas crónicas, el proceso excitotóxico contribuye al daño tisular, principalmente al favorecer un estado proinflamatorio que puede culminar en la muerte neuronal por piroptosis, un tipo de muerte promovido principalmente por el aumento de IL-1 β (Dzialo *et al.*, 2013).

3.6 Participación de las NOX en la fisiología del SNC

A pesar de que clásicamente la mitocondria se considera como la principal fuente de ERO en la mayoría de las células (Atlante *et al.*, 2001), actualmente se sabe de la existencia de sistemas enzimáticos productores de especies reactivas que tienen relevancia en procesos fisiológicos y patológicos en el SNC (Hua *et al.*, 2008). Por ejemplo, a nivel fisiológico las ERO provenientes de enzimas como la acil CoA oxidasa, la urato oxidasa, la xantina oxidasa, la citocromo p450 y

las NOX, se asocian a la regulación de procesos tales como la producción y secreción de citocinas, la interacción de proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, la regulación de los transportadores y la dinámica de diversos canales iónicos (Cheeseman et al., 1993; Gross et al., 2006; Scheader et al., 2006).

En cuanto a procesos patológicos, se ha demostrado la participación de las ciclooxigenasas y las monoaminoxidasas en la generación de ERO durante el daño excitotóxico producido por la administración de NMDA (Boldyrev *et al.*, 1999) y de la xantina oxidasa en neuronas tratadas con kainato (Dykens *et al.*, 1987). Cabe destacar que, entre estos sistemas enzimáticos, las NOX se han descrito como fuente primordial de ERO en diversos modelos de muerte neuronal tanto *in vitro* como *in vivo* (Guemez *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Las NOX pertenecen a una familia de enzimas formada por 7 homólogos (NOX-1,2,3,4 y 5, DUOX-1 y 2), cuya única función descrita hasta el momento es la producción de ERO (Figura 5). Esta característica las diferencia de otros sistemas generadores, en los cuales las especies reactivas constituyen un producto secundario a su función metabólica principal. Las NOX se describen como un grupo de flavocitocromos membranales, que se encuentran presentes en la mayoría de las células de algas, hongos, plantas y animales, aunque también se han descrito en protistas (Inupakutika *et al.*, 2016).

En cuanto a su localización celular, las NOX presentan una distribución diferencial; por ejemplo, en el SNC de mamíferos, las neuronas tienen mayor expresión de NOX-1 y NOX-4, mientras que la glía muestra mayor cantidad de NOX-2, 3 y 4. De igual manera, su localización dentro de las neuronas es diferencial, por ejemplo, NOX-2 se encuentra preferentemente localizada en la membrana citoplasmática, NOX-4 en la membrana mitocondrial interna y NOX-3 en la membrana del retículo endoplásmico (Canton and Grinstein, 2014; Laurindo *et al.*, 2014).

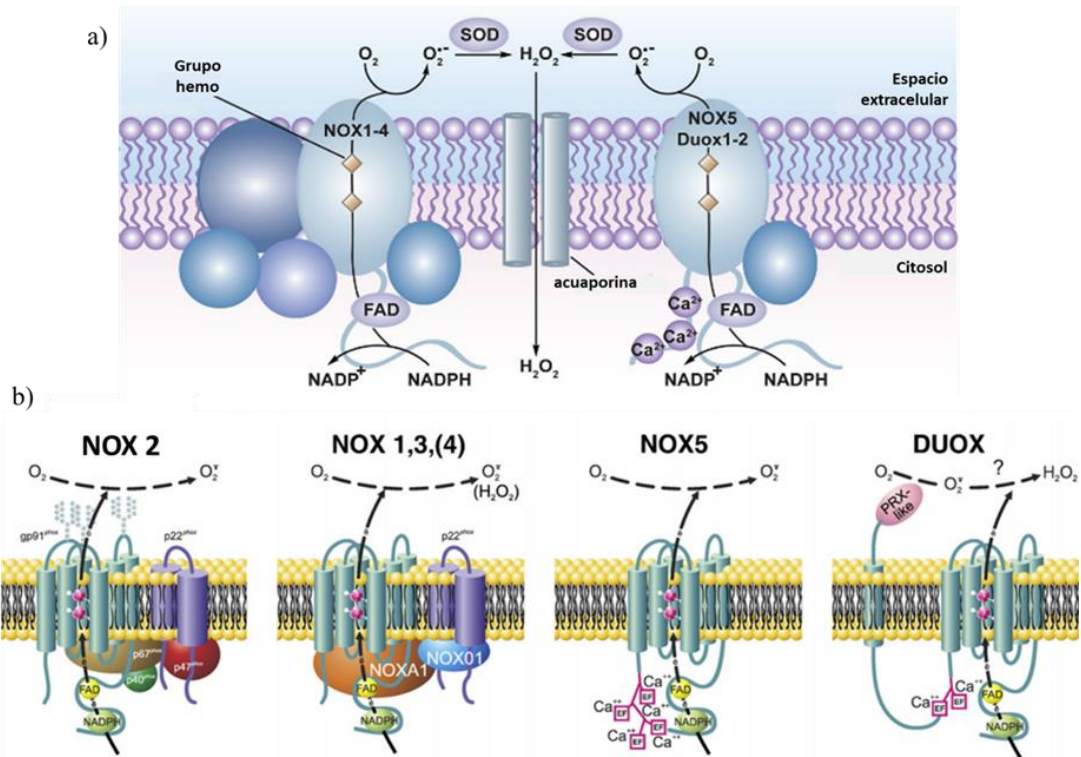


Figura 5. NADPH oxidasas como fuente de ERO. Una vez ensamblados/activos, estos complejos se encargan de canalizar electrones del citosol a partir de NADPH a través de la coenzima FAD (flavín-adenín-dinucleótido) y cofactores como el grupo hemo a través de la membrana para generar $O_2^{\cdot-}$, mismo que puede dismutarse a H_2O_2 espontáneamente o por la acción de la SOD (superóxido dismutasa); y translocar por difusión o a través de acuaporinas al espacio intracelular (Paulsen y Carroll, 2013). En b) se observa a detalle las diferencias estructurales entre los 7 homólogos de esta familia de flavoproteínas (Nauseef, 2013).

En cuanto a su estructura, los 7 homólogos presentan seis α -hélices transmembranales que albergan dos grupos hemo, así como con un extremo C-terminal citoplásmico que contiene los sitios de unión a NADPH y FAD (Segal, 2016). A su vez, los miembros de la familia NOX tienen características estructurales particulares, que permite agruparlas en dos clases: los que requieren de la subunidad p22phox, como sitio de unión de los componentes citoplasmáticos (NOX1-4) y aquellos homólogos que poseen motivos EF de unión a Ca^{2+} que regulan su activación, como son la NOX5 y las DUOX1-2 (Figura 5). En cuanto a las DOUX, se ha descrito que poseen un motivo similar a la peroxidasa, lo que sugiere que el H_2O_2 es su producto final (Segal, 2016; Paulsen y Carroll, 2013).

Las NOX se encargan de catalizar la transferencia de dos electrones a través de una membrana (plasmática, reticular, mitocondrial), usando al NADPH como donador y al O_2 como aceptor final. En el caso de las NOX-1, 2, 3 y 5, que poseen subunidades citoplasmáticas y

transmembranales, es necesario que el complejo se encuentre ensamblado para que el transporte de electrones comience. El paso de los electrones inicia en el dominio de unión a NADPH, posteriormente sigue a la flavoproteína FAD, para después dirigirse a los dos grupos hemo y finaliza en las moléculas de O_2 ; el producto principal de la reacción es $O_2^{\cdot-}$, aunque existe evidencia de la producción directa de H_2O_2 en algunos homólogos, como se comentó previamente (Nayernia *et al.*, 2014).

La activación de la NOX genera ERO como parte de diversas vías de señalización de factores de crecimiento, citocinas, receptores glutamatérgicos y en respuesta al aumento de calcio intracelular (Lambeth, 2004; Brennan *et al.*, 2009). Cabe destacar que algunos homólogos solo se activan en respuesta a estímulos específicos (NOX1-3, DUOX2), mientras otros se encuentran constitutivamente activos (NOX4, DUOX1) (Nauseef, 2013; Sorce *et al.*, 2012).

Al igual que en otros tejidos, las NOX en el SNC cumplen funciones importantes en condiciones fisiológicas y patológicas. En neuronas, su actividad ha sido ligada a fenómenos como la plasticidad neuronal, neurogénesis, diferenciación, desarrollo neuronal, polarización y crecimiento axonal (Wilson *et al.*, 2017; Lelli *et al.*, 2013).

Con relación a la participación de las ERO en modelos de muerte neuronal y enfermedades neurodegenerativas, se ha reportado que tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* las ERO provenientes de las NOX son determinantes en el establecimiento y progresión de patologías como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, el evento vascular cerebral, glioblastomas, la esquizofrenia y el trastorno de ansiedad (Sorce *et al.*, 2012; Nayernia *et al.*, 2014). Es por ello, que se ha evaluado en muchas de estas condiciones la inhibición de la actividad de las NOX como posible herramienta terapéutica (Sorce *et al.*, 2012), mostrando algunos resultados positivos; sin embargo, la falta de especificidad y la participación de las NOX en eventos fisiológicos, han dificultado su implementación clínica.

3.7 Participación de las NOX en el daño excitotóxico

El estrés oxidante es uno de los mecanismos más relevante de la muerte neuronal secundaria al daño excitotóxico. A pesar de que la falla energética mitocondrial y el desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones genera un aumento en la formación de $O_2^{\cdot-}$, se sabe

que la administración de antioxidantes específicos mitocondriales no es suficiente para prevenir la muerte neuronal (Brennan *et al.*, 2009). La ineficacia para prevenir la muerte neuronal al bloquear la producción de ERO mitocondrial sugirió la participación de otras fuentes, tales como las NOX, enzimas caracterizadas como productoras “profesionales” de ERO (Bedard y Krause, 2007).

El peso específico de la activación de NOX en el daño excitotóxico depende del tipo celular en el que se lleve a cabo. La activación de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA en la glía, se asocia a un aumento en la actividad de las NOX, lo cual incide sobre la supervivencia de las neuronas. En modelos de daño excitotóxico, la activación de los receptores tipo NMDA en la microglia, promueve un aumento de la expresión de la NOX-2 y NOX-4, lo cual a su vez regula su activación y el desarrollo de un fenotipo proinflamatorio (M1), caracterizado por la secreción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Savchenko, 2013). En los astrocitos, el aumento de la actividad de NOX-2 se asocia a una astrogliosis sostenida con aumento en la actividad de metaloproteasas y remodelación de la matriz extracelular (Reinehr *et al.*, 2007). En cuanto a su efecto en oligodendrocitos, la activación de la NOX-4 se asocia al daño oxidante de lípidos, lo que favorece a la muerte por apoptosis (Choi *et al.*, 2015).

La activación proinflamatoria de la microglia, la astrogliosis sostenida y la desmielinización, son eventos que contribuyen a la muerte neuronal y se asocian a la activación de las NOX durante el daño excitotóxico. Sin embargo, se sabe que las ERO producidas por los homólogos neuronales participan directamente en la muerte, ya sea por medio del daño directo a biomoléculas o a través de la regulación de vías de señalización que influyen sobre la supervivencia (Lai *et al.*, 2014).

En diversos modelos de daño excitotóxico, se asocia a la activación de las NOX con la activación de los receptores tipo NMDA (Maldonado *et al.*, 2010; Guemez *et al.*, 2011); la entrada de cationes producida por la activación de estos receptores produce un aumento en la formación de O₂⁻ el cual se previene con la administración de apocinina, un inhibidor farmacológico de las NOX (Suh *et al.*, 2008; Maldonado *et al.*, 2010; Pamerter *et al.*, 2012;). Otro indicio de la participación de las NOX se constató al bloquear farmacológicamente la vía de las pentosas y

con esto la regeneración de NADPH (sustrato común de las NOX), lo que a su vez provoca una disminución en la formación de $O_2^{\cdot-}$. (Suh *et al.*, 2007).

La asociación entre las NOX y la activación de receptores glutamatérgicos, particularmente de la NOX-2, está ampliamente caracterizada; en diversos modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, el aumento de Ca^{2+} intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC), se asocia a la traslocación membranal de las subunidades citoplasmáticas y a la fosforilación de la subunidad p47phox, eventos que preceden a la activación de la NOX-2 tras la activación de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos (Dang *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

La NOX-2 tiene un papel fundamental en el daño excitotóxico, ya que existe evidencia de que su inhibición mediante fármacos específicos o por modificaciones genéticas, previene la formación de $O_2^{\cdot-}$ y la muerte neuronal ligada al aumento del estrés oxidante (Reyes *et al.*, 2012; Brennan-Minnella *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que la deficiencia genética de NOX-2 en modelos *in vivo*, de isquemia y traumatismo encefálico, se asocia al desarrollo de lesiones de menor tamaño y menor pérdida de neuronas corticales (Bell *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2016).

La producción de $O_2^{\cdot-}$ por la NOX-2 neuronal participa en diferentes niveles de la progresión del daño excitotóxico; en cultivos primarios de neuronas corticales tratados con NMDA, se ha descrito que las ERO provenientes de la NOX-2 localizada en la membrana citoplásmica, contribuye con la transmisión intercelular de ERO, lo cual promueve el estrés oxidante y la muerte de neuronas vecinas (Reyes *et al.*, 2012). Así mismo, en modelos murinos sometidos a isquemia transitoria, se constató que la activación de la NOX-2 contribuye a la muerte de neuronas en la zona de penumbra (Shen *et al.*, 2019).

La activación de la NOX-2 no solo influye en la respuesta al daño inicial, sino también en la perpetuación de este, ya que existe evidencia que señala que las ERO provenientes de la NOX-2 de astrocitos y microglia contribuyen a la pérdida neuronal observada durante la respuesta inflamatoria secundaria al daño excitotóxico, fenómeno que puede observarse días o incluso meses después del evento agudo y que es de gran relevancia en la recuperación funcional del tejido lesionado (Brait *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2016).

3.8 Respuesta inflamatoria secundaria al proceso excitotóxico

A pesar de ser considerado como un tejido inmunológicamente privilegiado, el SNC dañado desarrolla un proceso inflamatorio como parte de la respuesta inmune innata. Dicha respuesta tiene como fin limitar el daño y recuperar la homeostasis (Dantzer *et al.*, 2003). La microglia es la orquestadora de la respuesta inflamatoria en el SNC, sin embargo, no se puede hacer a un lado la participación de la astrogliá, la oligodendroglía y de las mismas neuronas (Hong *et al.*, 2016).

El inicio de la respuesta inflamatoria depende de la activación microglial, fenómeno asociado a un cambio morfológico y funcional. Los cambios morfológicos se describen como un aumento y acortamiento de sus procesos, así como un aumento en el tamaño del soma (Kaur y Ling, 1991; Ransohoff y Perry, 2009). En cuanto a los parámetros funcionales, la microglia cambia el patrón de expresión de sus marcadores de superficie a un patrón MHC tipo II (CD40, B7 e ICAM-1), lo cual aumenta su capacidad fagocítica y de presentación de antígenos; a la par del cambio de expresión de marcadores, la microglia activa aumenta la producción y liberación de citocinas, moléculas pleiotropicas que fungen como mensajeros y coordinan la respuesta conjunta del tejido (Benvenisten *et al.*, 2001).

La activación de la microglia no es un fenómeno homogéneo y estático; al contrario, esta activación puede presentarse como un espectro de diversos fenotipos, que a su vez son modificables por las características del microambiente (Figura 6). El fenotipo predominante es definido por las características del estímulo nocivo (intensidad y duración), así como por la suma de las señales pro y antiinflamatorias que presente el tejido (Mills *et al.*, 2000).

De manera clásica, anteriormente se definían dos tipos de respuesta microglial: El fenotipo M1, caracterizado por un aumento en la capacidad fagocítica y la secreción de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α ; y el fenotipo M2 responsable de la remodelación del tejido y la liberación de citocinas antiinflamatorias, entre ellas IL-4, IL-10, IL-18 y TGF- β . Actualmente se sabe que la activación microglial puede presentar características del fenotipo M1 como del M2 al mismo tiempo, lo que le confiere un perfil funcional bastante heterogéneo (Franco *et al.*, 2015; Morganti *et al.*, 2016) (Figura 6).

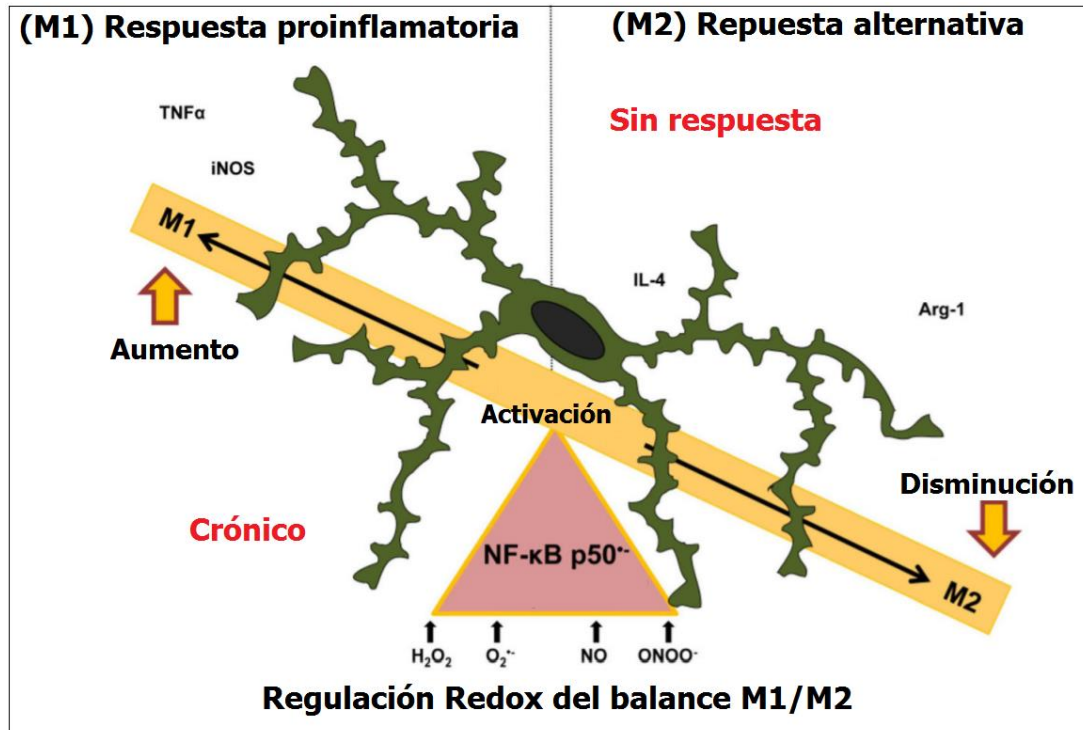


Figura 6. Activación y polarización microglial. Estos centinelas detectan y responden a una amplia gama de estímulos, el estado de activación se define tradicionalmente en un espectro de respuestas proinflamatorias (M1) o alternativas (M2). La activación de M1 se caracteriza por la regulación positiva de los mediadores proinflamatorios (por ejemplo, TNF α e iNOS) y en la fisiología normal es seguido por la respuesta de M2 (por ejemplo, Arg-1 e IL-4) que es importante para la cicatrización de heridas, la resolución del proceso inflamatorio y la recuperación de la homeostasis (Taetzsch et al., 2015).

En el caso particular del daño excitotóxico, el proceso inflamatorio inicia con la liberación de moléculas nucleares y citoplasmáticas al medio extracelular resultado de la muerte neuronal, a las cuales junto con los fragmentos de la matriz extracelular y detritos celulares se les denomina colectivamente como DAMP's (patrones moleculares asociados a daño). Los DAMP's son reconocidos por una gran variedad de receptores localizados en todos los tipos celulares del SNC, tales como los receptores tipo Toll (TLR's), tipo NOD (NLR's) y de lectina tipo C (CLR's) (Jeannin et al., 2008). Estos receptores señalizan para la activación de varias vías, entre ellas la del NF- κ B, las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la del interferón tipo I (Zitvogel et al., 2010). La activación de estas vías regula a su vez, la expresión de citocinas, moléculas coestimuladoras, la actividad fagocítica de la microglia y la remodelación de la matriz extracelular por la astrogliá (Lyman et al., 2014).

Al inicio del proceso excitotóxico prevalece la muerte neuronal de carácter necrótico, debido a la intensidad del estímulo glutamatérgico; en cuestión de minutos las señales de daño

promueven la activación microglial de tipo M1, caracterizada inicialmente por la liberación de TNF- α y de especies reactivas (Mills *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2015). La señalización autocrina y paracrina del TNF- α estimula la producción y secreción de IL-1 β , IL-6 e IL-12 en la microglia y astrocitos, lo cual a su vez promueve una mayor producción de dichas interleucinas como parte de un mecanismo de retroalimentación positiva (Kim *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2015). El aumento de la producción y liberación de interleucinas proinflamatorias se acompaña de la regulación positiva de los sistemas enzimáticos productores de especies reactivas (NOS y NOX), lo que promueve la capacidad fagocítica de la microglia (Palwinder y Guy, 2005; Boddaert *et al.*, 2018).

La producción de mediadores proinflamatorios durante el daño excitotóxico no es exclusiva de la microglia; existe evidencia de que las citocinas, producidas en principio por la microglia, estimulan receptores en los astrocitos y neuronas, lo que a su vez promueve la producción de interleucinas por medio de la activación de NF κ B. Por ejemplo, la estimulación de astrocitos mediante la administración de IL-1 β se asocia a la producción de metaloproteasas, interleucinas proinflamatorias y al aumento en la permeabilidad de la BHE debido al cambio en la expresión de moléculas de adhesión (Lawrence *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2015). En cuanto a los oligodendrocitos, se sabe que el tratamiento con IL-4 promueve la producción de factores antiinflamatorios y disminuye la producción de eicosanoides en modelos de daño excitotóxico (Paintlia *et al.*, 2006).

La liberación de citocinas proinflamatorias no solo estimula al resto de la glía para incrementar la respuesta, sino que también tiene un importante efecto sobre las neuronas supervivientes al daño inicial por el evento excitotóxico (Hickman *et al.*, 2018). En modelos *in vitro* se ha observado un aumento en la muerte de neuronas hipocampales sometidas a daño excitotóxico y tratadas posteriormente con IL-1 β (Bernardino *et al.*, 2008); en modelos *in vivo*, la administración de IL-6 se asocia a la muerte de neuronas de la retina que cursan con daño excitotóxico (Fischer *et al.*, 2015).

El aumento de la muerte neuronal en cultivos primarios de neuronas hipocampales y el desarrollo de lesiones más grandes en ratones que cursan con daño excitotóxico, correlaciona espacial y temporalmente con el aumento en la liberación de interleucinas proinflamatorias,

lo cual sugiere que su liberación sostenida puede promover la muerte de neuronas supervivientes al daño inicial (Lawrence *et al.*, 1998; Gouveia *et al.*, 2014). Diversos grupos postulan que la muerte observada durante la respuesta inflamatoria presenta predominantemente características de muerte por apoptosis y piroptosis (Gordon *et al.*, 2012; Frakes *et al.*, 2014; Heckmann *et al.*, 2019). Existe evidencia que sugiere que el aumento en la liberación de IL-6 e IL-12 se asocia con el aumento del estrés oxidante neuronal y la activación de la caspasa 3, eventos estrechamente ligados a la muerte apoptótica (Harms *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha determinado que en algunos modelos *in vitro*, la producción de IL-1 β se asocia con la muerte por piroptosis mediante la activación del inflamasoma NLRP3 (Yang *et al.*, 2014).

La evolución del proceso inflamatorio depende de la intensidad y persistencia del estímulo excitotóxico; si el estímulo se limita exitosamente, la liberación de interleucinas antiinflamatorias aumenta, lo que cambia la dinámica de la respuesta tisular al daño (Pepe *et al.*, 2017). Por ejemplo, el aumento de TGF- β se asocia a la disminución en la translocación de NF κ B al núcleo (Liao *et al.*, 2012), lo que regula negativamente la producción de IL-6 e IL-12, mientras promueve el aumento de IL-4 e IL-10 en microglia y astrocitos (Kim *et al.*, 2017; Fang *et al.*, 2018). La unión de IL-4 a sus receptores en la microglia, promueve la transición a un fenotipo antiinflamatorio, caracterizado por la producción de IL-10 y la disminución en la formación de especies reactivas (Loke *et al.*, 2002). A su vez, la IL-10 liberada por la microglia actúa sobre los astrocitos para disminuir la remodelación de la matriz extracelular y la permeabilidad de la BHE, lo que limita la migración de células del sistema inmune al SNC (Zhang *et al.*, 2018; Mayo *et al.*, 2018).

La adquisición de un fenotipo antiinflamatorio, promovido por el aumento de la IL-10, conduce a la resolución del proceso inflamatorio y a la recuperación funcional del tejido (Mikita *et al.*, 2011). Tanto en cultivos primarios como en modelos *in vivo*, la IL-10 promueve la supervivencia neuronal, mediante la inhibición de la activación de la caspasa 3 y la disminución del estrés oxidante. Aunque aún no se ha caracterizado del todo su efecto, se sugiere que las vías de señalización activadas por la IL-10 también participan en la regulación del metabolismo energético y la estabilización del potencial mitocondrial, lo que contribuye a

la disminución de la muerte, la limitación del daño y la recuperación funcional (Nitahara-Kasahara *et al.*, 2017).

Por otro lado, si el evento excitotóxico no se limita, el proceso inflamatorio puede establecerse de forma crónica, lo que a su vez provoca un daño secundario mediado principalmente por la producción de especies reactivas, la liberación sostenida de IL-1 β e IL-6 y la acción citotóxica de los leucocitos provenientes de la circulación sistémica (Hinson *et al.*, 2015; Hill *et al.*, 2017). Se sabe que la activación sostenida de la microglia y la astrogliá durante la respuesta inflamatoria provoca a su vez un aumento de la liberación de glutamato, lo que aunado a la disminución en su recaptura contribuye a la pérdida neuronal.

Aunque el proceso agudo se resuelva, existe evidencia que señala que la glía mantiene ciertas características que la vuelven más susceptible a la activación proinflamatoria, lo cual se traduce en la posibilidad de presentar respuestas inflamatorias más exacerbadas a estímulos nocivos menores durante procesos patológicos (Réus *et al.*, 2015).

3.9 Relación entre las NOX y la neuroinflamación secundaria al evento excitotóxico

La activación de las NOX está estrechamente relacionada con el proceso inflamatorio, tanto como parte de la respuesta de la glía como de las neuronas (Wang *et al.*, 2017). La activación de la NOX-2 en la microglia es promovida por el daño excitotóxico y se considera un parámetro de activación proinflamatoria, debido a que se relaciona con el estallido respiratorio y el aumento de la actividad fagocítica, condiciones necesarias para la remoción de detritos celulares (Klegeris y McGeer, 1994). Sin embargo, durante la respuesta inflamatoria, la activación de las NOX microgliales también es capaz de promover la muerte neuronal mediante el aumento del estrés oxidante. En modelos *in vivo*, la inhibición farmacológica de la NOX-2 disminuye la liberación de ERO por la microglia, lo que a su vez limita el daño oxidante en neuronas durante la respuesta inflamatoria (Sorce *et al.*, 2017). En cuanto a la producción de citocinas, el aumento de actividad de la NOX-2 regula positivamente la producción de factores proinflamatorios, lo que promueve un estado de inflamación crónico y el daño neuronal secundario. Por el contrario, la inhibición de la NOX-2 promueve un fenotipo antiinflamatorio relacionado con la resolución del proceso (Xia *et al.*, 2015).

En astrocitos, el aumento en la actividad de las isoformas de la NOX, particularmente NOX-2 y NOX-4, se asocia con la liberación de glutamato y la disminución de su recaptura, lo que amplifica el daño inicial y promueve una respuesta sostenida por la microglia (Sheng *et al.*, 2013). A pesar de que la liberación de citocinas no es la actividad primordial del astrocito, se sabe que este tipo celular participa activamente en la producción de IL-10 durante el daño neuronal; en estudios *in vivo*, la activación de la NOX en el astrocito correlaciona con la disminución en la producción de esta citocina antiinflamatoria, lo que podría limitar su participación como neuroprotector (Ravelli *et al.*, 2019).

Durante el daño excitotóxico, los mediadores inflamatorios producidos por la microglia y la astrogliía promueven el aumento en la actividad de NOX-4 en los oligodendrocitos, lo que provoca la muerte apoptótica en este tipo celular, por medio del daño oxidante en los lípidos y el DNA. Se sabe que la inhibición de las NOX en oligodendrocitos aumenta su supervivencia, lo que podría formar parte de la estrategia de neuroprotección tras el daño excitotóxico (Johnstone *et al.*, 2013).

En neuronas, la inhibición de la NOX-2 durante el daño excitotóxico se asocia a la adquisición de un fenotipo predominantemente antiinflamatorio. Aunque no se han caracterizado del todo el mecanismo por el cual dicha inhibición promueve este cambio se propone que la disminución en la muerte y en el patrón de moléculas de señalización liberadas por las neuronas condicionan una respuesta inflamatoria limitada (Morganti *et al.*, 2016).

La disminución de la muerte neuronal también significa una disminución en los DAMP's censados por la microglia, lo que se asocia a la adquisición de un fenotipo productor de IL-10 y TGF- β , citocinas que promueven a la vez la supervivencia neuronal. Así mismo, la inhibición genética de la NOX-2 en neuronas sometidas a daño excitotóxico promueve la producción de IL-4, la cual activa vías de señalización que promueven la producción de IL-10 por la microglia (Park *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2018).

El aumento de IL-10 secundario a la producción neuronal de IL-4 se asocia a la activación de vías tales como JAK1/STAT3 en neuronas sometidas a isquemia y traumatismo encefálico. Se sabe que dichas vías regulan negativamente blancos relacionados con moléculas

proapoptóticas, lo que, junto con la disminución del estrés oxidante, aumenta la supervivencia neuronal (Dinarello, 2007; Lobo-Silva *et al.*, 2016).

4. Antecedentes

Durante el evento excitotóxico, el aumento de las ERO se asocia con la muerte neuronal secundaria al estrés oxidante. En el pasado se postulaba a la mitocondria como el principal sitio de origen de ERO durante el daño excitotóxico; sin embargo, recientemente se ha caracterizado a las NOX, particularmente a NOX-2, como una fuente de ERO determinante durante la instauración y el desarrollo del daño excitotóxico (Cheng *et al.*, 2012; Brown, 2007).

Se sabe que, la inhibición farmacológica o genética de NOX-2 promueve la neuroprotección en diversos modelos de excitotoxicidad (isquemia, hipoglucemia, traumatismo), evidenciada por la disminución en la muerte neuronal y el volumen de lesión (Páramo *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2017). En nuestro grupo de trabajo se caracterizó la participación de las NOX en la muerte apoptótica inducida por estaurosporina y la disminución de potasio extracelular, en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo (NGC) (Coyoy *et al.*, 2008). Por medio de cultivos primarios de NGC deficientes de NOX-2 se demostró la participación de este particular homólogo en la muerte apoptótica secundaria a la administración de estaurosporina (Gomez-Gamboa y Morán, 2009). En un modelo de daño excitotóxico, reportamos que la administración de glutamato en animales deficientes de NOX-2 produce lesiones más pequeñas que las comparadas con sus contrapartes silvestres, así como menor muerte neuronal y daño oxidante. En este mismo modelo, se encontró que la microglia de animales NOX-2 KO tratados con glutamato presentaba características morfológicas diferentes a las observadas en los animales silvestres, lo que planteó la posibilidad de la participación de NOX-2 no solo en el evento excitotóxico, sino en el establecimiento de la respuesta inflamatoria posterior (Gomez *et al.*, 2011).

La lesión tisular, producto del evento excitotóxico, provoca una respuesta inflamatoria que tiene como objetivo la limitación del daño; sin embargo, si dicha respuesta no es regulada

adecuadamente, es capaz de provocar un daño secundario y de esta forma aumentar la muerte neuronal. El daño secundario al proceso inflamatorio es promovido por la liberación sostenida de citocinas proinflamatorias principalmente por la microglia (Olmos y Lladó, 2014; Chamorro *et al.*, 2016; Schimmel *et al.*, 2017).

5. Planteamiento del problema

En diversas patologías del SNC se ha asociado el daño excitotóxico como una de las causas de muerte neuronal y daño tisular; este mecanismo de daño se encuentra frecuentemente relacionado a la instauración de una respuesta inflamatoria, que en ciertas condiciones puede promover el aumento de muerte neuronal y ocasionar un daño secundario.

Existe evidencia de la participación de las ERO provenientes de NOX-2 tanto en el daño excitotóxico, como en el proceso inflamatorio, por lo que es de vital importancia conocer los mecanismos y la asociación temporal de ambos eventos con las ERO provenientes de la NOX-2. Esto con el fin de plantear estrategias terapéuticas que promuevan la neuroprotección y favorezcan la recuperación funcional.

6. Pregunta experimental

¿Qué papel desempeña la NOX-2 en la respuesta inflamatoria resultante del daño excitotóxico en el estriado de ratón?

7. Hipótesis

La actividad de NOX-2 durante el daño excitotóxico propicia un ambiente proinflamatorio que promueve la muerte neuronal.

8. Objetivos

8.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de la activación de la NOX-2 en la progresión del daño excitotóxico y la subsecuente instauración de la respuesta inflamatoria en el núcleo estriado de ratón.

8.2 *Objetivos particulares*

- Determinar el impacto de la NOX-2 en la muerte neuronal resultado del evento excitotóxico.
- Caracterizar la participación de la actividad de la NOX-2 en la instauración de la respuesta inflamatoria secundaria al evento excitotóxico.
- Determinar si la NOX-2 promueve la muerte neuronal a través de la regulación en la producción de citocinas proinflamatorias.
- Caracterizar la relación entre la actividad de las NOX y la producción de citocinas antiinflamatorias.

9. *Materiales y métodos*

9.1 *Reactivos*

Glutamato monosódico (Sigma, G1626), solución salina (Sigma, 793566), IL-4 (Cell Signaling no. 5208) o IL-10 (Cell Signaling no.5261), reactivo de Bradford (Sigma, B6916), paraformaldehído (Sigma, no. P6148), FjB (Merck no. AG310), NADPH (Sigma, no.10107824001), DHE (Sigma, no. 810253P), DNA de esperma de Salmon (Sigma, no. D1626), SDS (Sigma no. 862010), anti-NOX2 / gp91phox (Abcam, ab80508), anti-GAPDH (Cell Signaling no. 14C10), anti-mouse conjugado con fosfatasa alcalina (Abcam, Ab80508), sustrato Ac-VDVAD-AMC (BD Pharmingen, no. 556449), ELISA para IL-1 β (Abcam, ab100704), IL-4 (Abcam, ab100710), IL-6 (Abcam, ab100712), IL-10 (Abcam, ab46103), IL-12 p40 / 70 (Abcam, ab100699), TNF- α (Abcam, 100747) y TGF- β (Abcam, 119557).

9.2 *Animales*

Para este trabajo se utilizaron ratones C57BL/6 adultos (8 semanas) provistos por el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y ratones adultos NOX-2 KO (gp91^{Cybbtm1Din/J}) provenientes de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los NOX-2 KO fueron generados en un fondo C57BL/6 mediante un fragmento genómico de Ncol de 4.8 Kpb que contenía el segundo y tercer exones del gen Cybb. Para construir un vector de direccionamiento, se colocó un casete de expresión para resistencia

a la neomicina en el tercer exón unido a un gen de timidina cinasa. Como resultado se obtienen ratones machos hemizigotos que carecen de la producción de superóxido por parte de la NOX-2 (Pollock *et al.*, 1995).

Ambas colonias fueron establecidas en el vivario del Instituto de Fisiología Celular bajo condiciones controladas de temperatura (20-22°C) y ciclos de luz/obscuridad de 12 h, así como con agua y alimento estándar *ad libitum*. Los ratones utilizados fueron divididos de la siguiente manera: 40 animales se emplearon para pruebas histológicas, 30 para determinaciones bioquímicas y 30 más para el análisis de citocinas.

Todos los procedimientos en animales fueron realizados de acuerdo con lo estipulado en el National Institutes of Health Guide para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH publication no. 8023, revisado en 1978) y el Comité para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio de nuestra institución (CICUAL, protocolo autorizado JMA72-15), con el fin de minimizar el dolor y el número de individuos utilizados.

9.3 Modelo de daño excitotóxico

Los ratones C57BL/6 silvestres (WT) y gp91^{Cybbtm1Din/J} (NOX-2 KO) fueron anestesiados con isoflurano 3%, en una mezcla de 95% O₂ y 5% de CO₂ para después colocarse en un marco estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Posteriormente una aguja de acero inoxidable se posicionó en el núcleo estriado derecho de acuerdo con las siguientes coordenadas: anteroposterior +0.8 mm a partir de bregma, lateral +2.2 mm de la línea media y vertical -3.2 mm de la duramadre (Athos y Storm, 2001). Posteriormente, con la ayuda de una bomba de inyección (Modelo 55; Harvard, South Natick, MA, USA) se administraron 0.5 µL de una solución de glutamato monosódico (Sigma A, G1626; 1 M) o de solución salina (Sigma A, 793566; 0.9%) a una velocidad de 0.175 µL/minuto. Un segundo y tercer grupo de ratones WT fueron tratados con IL-4 (Cell Signaling no. 5208) o IL-10 (Cell Signaling no.5261) respectivamente, junto con la misma solución de glutamato monosódico. Las concentraciones de IL-4 e IL-10 utilizadas fueron calculadas a partir de las observadas en los ratones NOX-2 Después de la inyección (5 min), la aguja fue retirada

cuidadosamente y se suturó con nylon. Para finalizar, los ratones se recuperaron de la anestesia en una jaula individual con agua y alimento *ad libitum*.

9.4 Grupos y tratamientos

Los ratones NOX-2 KO fueron tratados con glutamato, mientras que al grupo control se le administró solución salina. Adicionalmente, algunos ratones WT fueron tratados con glutamato en combinación con IL-4 o IL-10 (tabla 1).

Ratón	Clave	Grupo	Tratamiento
C57BL/6 Silvestre	WT	Control	Solución salina (0.9%)
		Experimental	Glutamato monosódico (1M)
			Glutamato + IL-4 (0.7 ng/mL)
			Glutamato + IL-10 (0.4 ng/mL)
gp91 ^{Cybbtm1Din/J}	NOX-2 KO	Control	Solución salina (0.9%)
		Experimental	Glutamato monosódico (1M)

Tabla 1. Grupos y tratamientos. Los animales fueron tratados con glutamato y a los grupo control se les administró solución salina. Posteriormente a otros dos grupos de animales WT se les administró IL-4 e IL-10.

9.5 Obtención y procesamiento del tejido

Posterior a la cirugía se les administró a los animales una dosis letal de pentobarbital sódico a diferentes tiempos (1, 6, 12 y 24 h) y se procedió a la extracción del cerebro (Figura 7). Algunos de los animales se sacrificaron por dislocación cervical para la disección y homogenización del estriado. Para la disección del estriado, el bulbo olfatorio y el cerebelo fueron removidos para realizar un corte sagital sobre la línea media y separar ambos hemisferios. Al separar los hemisferios es posible delimitar al estriado como un tejido ligeramente más transparente que se encuentra rodeado por la corteza (Estrada-Sánchez *et al.*, 2009). El tejido obtenido (15-20 mg) se homogeneizó (Homogeneizador OMNI TC) en amortiguador de lisis adicionado con inhibidor de proteasas a 4°C. Posteriormente se

centrifugó a 5,000 g por 5 min para remover restos celulares (Figura 7). Para finalizar, se cuantificó la cantidad de proteína en el tejido homogeneizado por el método de Bradford (Schmidt *et al.*, 2012).

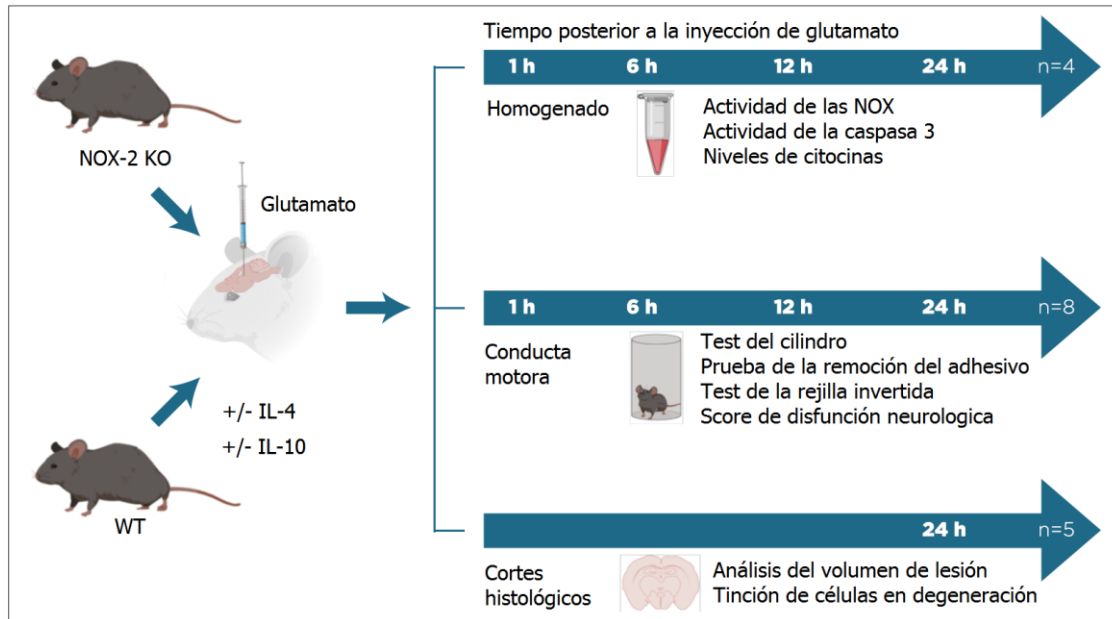


Figura 7. Ilustración de la línea temporal del diseño experimental. Se administró glutamato monosódico a ratones silvestres (WT) y NOX-2 KO sin tratamiento o tratados con IL-4 ó IL-10. Posteriormente, algunos animales fueron sacrificados a las 24 h para obtener cortes histológicos (n=5). Otro grupo de animales se sacrificaron a las 1, 6, 12 y 24 h para obtener el homogenado del estriado (n=4). Las pruebas de comportamiento motor se realizaron a las 1, 6, 12 y 24 h en animales de ambos grupos (n=8).

9.6 Análisis del volumen de lesión

Las lesiones inducidas por la administración de glutamato fueron evaluadas 24 h después de la cirugía (Figura 7). Los ratones fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico y sometidos a perfusión transcardiaca con 30 mL de solución salina al 0.9%, seguido de una solución de fijación que contenía amortiguador de fosfatos (0.1 mM) y paraformaldehído 4% (pH 7.4). Los cerebros fueron removidos y colocados a 4°C en la misma solución de fijación. Posteriormente, se realizaron cortes por congelación, en un criostato (1510; Leica, Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberger Nussloch, Alemania) y se obtuvieron series consecutivas de secciones coronales del estriado (40 µm de espesor), las cuales se tiñeron con violeta de cresilo ó FjB (Chemicon, Temecula, CA, USA). Después

de realizar las tinciones, se seleccionaron todos los cortes en los que era visible la lesión (tinción de violeta de cresilo pálido) para la cuantificación del volumen de la lesión. Las áreas dañadas se delimitaron manualmente y se midieron con un analizador de imágenes (programa analizador ImageJ 1.48v; Wayne Rasband, NIH, USA.) por un experimentador que desconocía la asignación de los grupos. El volumen total de la lesión se obtuvo a partir de la suma de todas las áreas dañadas multiplicada por el ancho de las secciones (Türeyen *et al.*, 2004).

9.7 Cuantificación de las células en degeneración

Se añadió una gota de solución de NaOH 1% diluida en etanol 80% a los cortes coroneales montados en portaobjetos, y después de 2 min, se reemplazó por una solución de etanol 70%. Los cortes se cubrieron con una solución de permanganato de potasio 0.06% durante 10 min y luego se lavaron. Posteriormente se incubaron durante 10 min con una solución de FJB 0.0004% preparada en ácido acético 0.1%. Finalmente, las muestras se lavaron y secaron a 50 °C, para después deshidratarlos con xilol y cubrirlos con Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Subsecuentemente, las muestras, fueron colocadas y observadas en un microscopio de epifluorescencia (Eclipse Ti-S, Nikon Instruments Inc.) utilizando un filtro U-MNB2 (395–590 nm). Las células positivas para FJB se contaron utilizando el programa analizador ImageJ.1.48v (Wayne Rasband, NIH, USA.). Para la determinación de células positivas totales, se realizó el conteo en tres cortes por ratón, seleccionadas a partir de la visualización del tracto de la aguja (sección central), así como una anterior y otra posterior, ubicadas a 160 µm de la sección central (Padgett *et al.*, 2015).

9.8 Actividad enzimática de la NOX

La actividad de las NOX se determinó en homogenados de estriado en diferentes momentos (0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h) posteriores a la administración de glutamato (Figura 7). La actividad de las NOX se estimó como la oxidación de dihidroetidio (DHE) a etidio (Et). Los homogenados de tejido se incubaron con DHE (0.02 mM), ADN de salmón (0.5 mg/mL) y NADPH (0.2 mM) como sustrato. La fluorescencia de Et se midió durante 30 min a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una emisión de 610 nm, utilizando un lector de

microplacas de fluorescencia de detección múltiple Synergy HT (Biotek Instruments, Colchester, VT, USA). Se prepararon las muestras por duplicado y la actividad de NOX se expresó como el cambio en la fluorescencia de Et por mg de proteína por min contra el control (solución salina). Algunas muestras se incubaron en presencia de 1 μ M de difenilenoiodo (DPI) o 15 UI de superóxido dismutasa (SOD) para corroborar la especificidad del ensayo (Padgett *et al.*, 2015).

9.9 Cuantificación de proteínas por inmuno blot (western blot)

Los homogenados de tejido (50 μ g de proteína por carril) se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS. Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF a 120 V durante 1 h. Las membranas se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con leche sin grasa al 5% en solución salina amortiguada con Tris (TBS) y se trataron con anti-NOX2 / gp^{91phox} (1:500; ab80508, Abcam, USA) y anti-GAPDH (1:3000; Cell Signaling no. 14C10, USA) durante 12 h a 4 °C. Después de lavarse con TBS para remover el exceso de anticuerpo, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (1:10000; Ab80508, Abcam, USA). Las bandas se visualizaron utilizando el sistema de quimioluminiscencia según las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y se expusieron a la película Kodak XAR-5 en oscuridad.

9.10 Actividad enzimática de la caspasa 3

La actividad de la caspasa-3 se determinó en homogenados de estriado en diferentes tiempo (1, 3, 6, 12 y 24 h) después de la administración de glutamato (Figura 7). La actividad de la caspasa-3 se analizó mediante una técnica fluorogénica (Liu *et al.*, 2007) en un espectrofluorómetro (Shimadzu, RF-5301PC), utilizando el péptido Ac-VDVAD-AMC (BD Pharmingen, no. 556449) como sustrato específico para detectar la actividad proteolítica de la caspasa activa. La actividad se siguió durante 30 min después de la adición del sustrato (80 μ M) a una solución estándar que contenía al homogenado del tejido (50 μ g/mL). Los resultados que muestran la actividad de la caspasa se calcularon como el cambio en la

intensidad de la fluorescencia por miligramo de proteína por minuto y se expresaron como cambio en comparación con el control (solución salina).

9.11 Inmunoanálisis de la concentración de citocinas

Los niveles de citocinas se midieron utilizando el kit ultrasensible de ELISA para IL-1 β (ab100704, Abcam, USA), IL-4 (ab100710, Abcam, USA), IL-6 (ab100712, Abcam, USA), IL-10 (ab46103, Abcam, USA), IL-12 p40 / 70 (ab100699, Abcam, USA), TNF- α (100747, Abcam, USA) y TGF- β (119557, Abcam, USA) de ratón. Las muestras de estriado correspondientes a 100 μ g de proteína se obtuvieron después de diferentes tiempos (1, 3, 6, 12 y 24 h) tras la administración de glutamato (Figura 7). Para la realización del ensayo, se diluyó la muestra (1:10), se procedió de acuerdo con el protocolo del fabricante (Abcam, MA, USA) y la reacción se midió en un espectrofluorómetro (Shimadzu, RF-5301PC). Los resultados se calcularon con base en una curva de concentración proporcionada por el fabricante y se expresaron en picogramos de citocinas por miligramo de proteína.

9.12 Pruebas de conducta motriz

9.12.1 Prueba del cilindro

Los animales se examinaron para determinar el uso preferencial de la extremidad anterior unilateral durante el soporte postural vertical (conducta de exploración) después de la administración de glutamato o solución salina (1, 3, 6, 12 y 24 h; Figura 7). Brevemente, los ratones se colocaron en un cilindro de cristal de 10 cm de diámetro, colocado sobre una mesa y se procedió a grabar en video la conducta de exploración durante 3 min. Se registró el número de contactos unilaterales y bilaterales con las paredes del contenedor. El porcentaje de contactos bilaterales se evaluó en cada prueba utilizando la fórmula de $100 \times \text{contactos bilaterales} / \text{total de contactos de la pared del miembro anterior}$, mientras que el porcentaje de contactos unilaterales se evaluó utilizando la fórmula $100 \times \text{contactos unilaterales} / \text{total de contactos de la pared del miembro anterior}$. Los resultados se expresan como el porcentaje de exploración unilateral (Thornberry *et al.*, 1997).

9.12.2 Prueba de la remoción del adhesivo

La jaula de los animales se colocó en el sitio de las pruebas al menos 30 min antes de comenzar el experimento para permitir la habituación al nuevo entorno. Los animales se retiraron suavemente de la caja de prueba y se colocó una tira de cinta adhesiva de 0.5 cm² en el dorso del hocico. Los animales se devolvieron a la jaula de prueba y se inició un temporizador. La conducta se observó y se registró durante 60 s o hasta que el animal se retiró el trozo de cinta del hocico con el miembro anterior. La capacitación consistió en cinco ensayos previos (uno por día) y se realizaron las pruebas después de la administración de glutamato o solución salina en diferentes tiempos (1, 3, 6, 12 y 24 h) (Figura 7). El resultado se reportó como la latencia de la remoción de la cinta adhesiva en segundos (Fleming *et al.*, 2004).

9.12.3 Prueba de la rejilla invertida

La prueba de la rejilla invertida se utilizó para evaluar la coordinación y la fuerza muscular de las extremidades, especialmente en relación con la musculatura distal y las manipulaciones de los dedos. Los ratones se colocaron en el centro de una rejilla cuadrada horizontal de 15 cm², que consiste en una malla de alambre de 0.5 cm² de grosor que se encuentra rodeada por paredes de madera. La rejilla se colocó a 20 cm por encima de una protección acojinada (para evitar las lesiones por caída) sobre la mesa y se hizo girar boca abajo para permitir que los ratones se movieran libremente. Cada ratón fue grabado durante 60 s y se registró el tiempo que permanecieron sujetos a la rejilla. Si los ratones caían dentro de primeros 10 s, se permitieron ensayos adicionales (máximo tres ensayos) realizados dentro de un intervalo de 1 min. Se realizaron tres ensayos y el resultado se expresó como la latencia hasta la caída y se expresó en s. Esta prueba no requirió un entrenamiento previo, sin embargo, se realizó una prueba previa de 30 s el día anterior al experimento para la habituación (Fleming *et al.*, 2004).

9.12.4 Determinación del score de disfunción neurológica

Todas las pruebas de comportamiento fueron realizadas por el mismo experimentador en una habitación silenciosa, con luz tenue y con ruido blanco de fondo. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados, se realizaron pruebas preliminares para excluir animales

con comportamiento anormal. Con el fin de integrar las diferentes pruebas de función motora, se utilizó una puntuación combinada con base en las tres pruebas de comportamiento (prueba de adhesivo, prueba de la rejilla invertida y prueba de cilindro) para caracterizar los déficits neurológicos funcionales (ND). Determinamos la puntuación del score de ND (NDS) al combinar todas las pruebas, asumiendo un peso específico equivalente para cada una de las pruebas y asignando un valor arbitrario de 15 puntos al rendimiento máximo (Fleming *et al.*, 2004; Bouet *et al.*, 2009).

9.13 Análisis estadísticos

Los datos fueron expresados como la media \pm el error estándar de por lo menos tres experimentos independientes. Los datos obtenidos en las pruebas bioquímicas e histológicas se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y ANOVA de medidas repetidas para las pruebas de comportamiento; en ambos casos se realizó subsecuentemente la prueba de Tukey para comparaciones por pares utilizando el software GraphPad Prism v6.0 y SigmaPlot 12.3. En el caso de encontrar significancia, se aplicó una prueba de t de Student de dos colas adicional. Se consideró la significancia con el valor de $p < 0.05$.

10. Resultados

10.1 La lesión excitotóxica del estriado y la degeneración neuronal son menores en los ratones NOX-2 KO

Para determinar el impacto del daño excitotóxico, se evaluaron tanto el volumen de la lesión como la degeneración neuronal en ratones WT y NOX-2 KO. La Figura 9A muestra cortes representativos de la lesión en el estriado de animales WT y NOX-2 KO teñidos con violeta de cresilo. El tratamiento con solución salina de los ratones WT y NOX2 KO (control), desarrolló una lesión pequeña similar en ambos grupos ($0.05 \pm 0.02 \text{ mm}^3$ y $0.03 \pm 0.01 \text{ mm}^3$, respectivamente). Como era de esperarse, en los grupos tratados con glutamato, los ratones NOX-2 KO desarrollaron solo el 38% de la lesión observada en ratones WT (WT: $1.2 \pm 0.14 \text{ mm}^3$, NOX-2KO: $0.45 \pm 0.10 \text{ mm}^3$ $p < 0.05$; Figura 9B). Las células positivas para FJB

se cuantificaron 24 h después de la inyección de glutamato en cortes de tejido lesionado (Figura 9C).

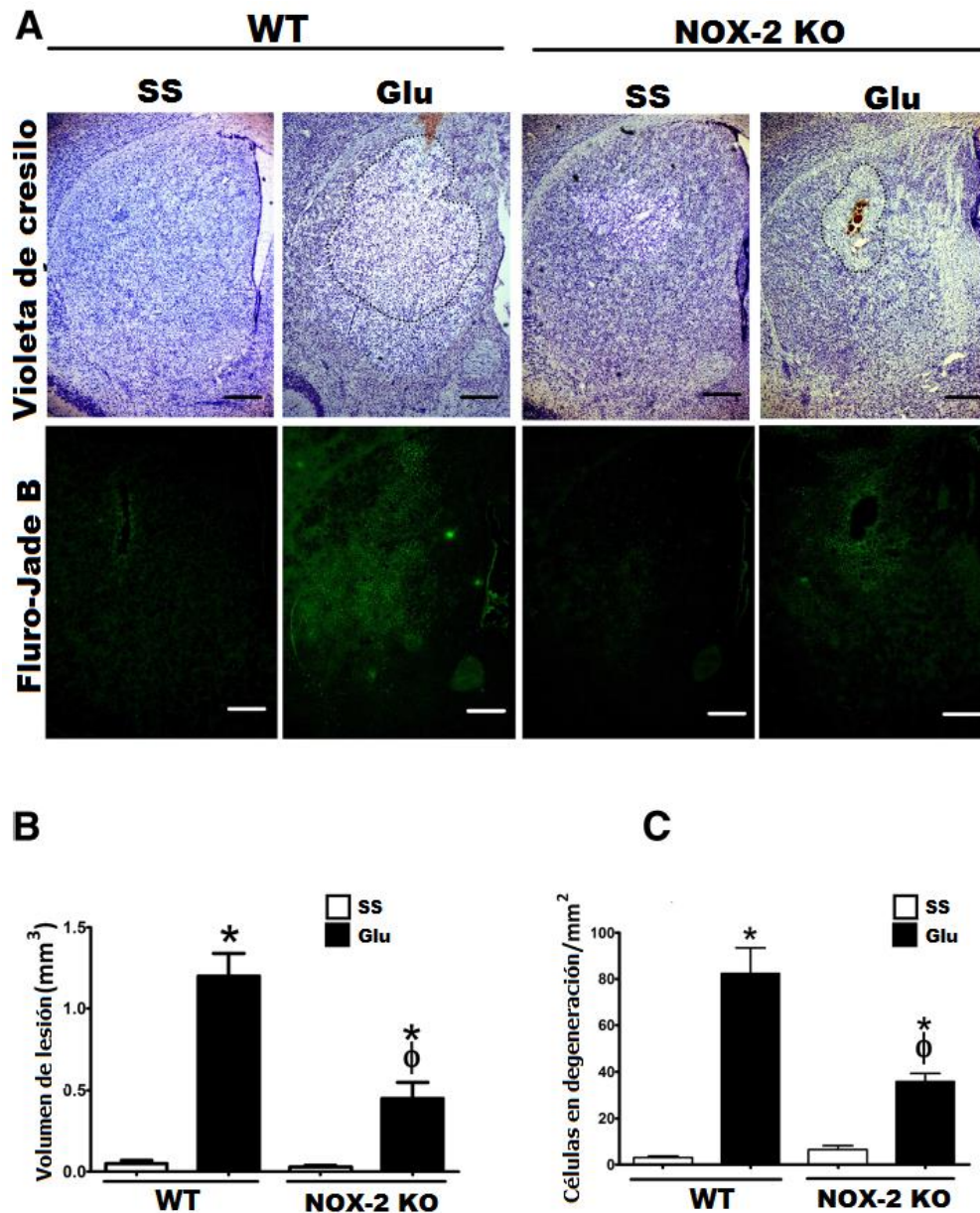


Figura 9. Volumen de lesión y degeneración neuronal en ratones WT y NOX-2 KO inyectados en el estriado con glutamato. Los cortes histológicos fueron obtenidos después de 24 h de administración intracerebral de solución salina (NaCl al 0.9%) o glutamato (1 M) como se detalla en la sección de métodos. Se muestran micrografías representativas de cortes coronales que muestran lesiones del cuerpo estriado teñidas con violeta de cresilo y células dañadas positivas a FjB (A). La línea de puntos delimita el área de lesión de ratones tratados con glutamato. Las barras de escala representan 200 μm (10x) (B) Cuantificación del volumen de la lesión 24 h después de la administración de solución salina o glutamato, el resultado se expresa en milímetros cúbicos. (C) Número total de células FJB positivas contadas en tres cortes por ratón. Los datos se expresan como la media \pm SEM de cinco experimentos independientes. * $p < 0.05$ frente al control con solución salina correspondiente; $\phi p < 0,05$ frente al ratón silvestre (WT) tratado con glutamato.

Al igual que con el volumen de lesión, se encontró un mayor número de células en degeneración en ratones WT inyectados con glutamato (82.3 ± 11.1 células/mm²) que en animales inyectados con solución salina (3.06 ± 0.6 células/mm²; $p < 0.05$; Figura 9B). En concordancia con la cuantificación del volumen de lesión, el número de células positivas para FJB en ratones NOX-2 KO (35.9 ± 7.5 células/mm²; $p < 0.05$) fue aproximadamente la mitad del observado en ratones WT tratados con glutamato. En la Figura 9A se muestran cortes representativos del tejido lesionado de animales WT y NOX-2 KO que muestran células marcadas con FJB. En conjunto, estos resultados confirman que la NOX-2 participa en el desarrollo de la lesión tisular y la degeneración neuronal inducida por el glutamato.

10.2 La actividad de la NOX-2 aumenta durante el daño excitotóxico

En el presente trabajo, medimos la actividad de la NOX en homogenados de estriado de ratones WT y NOX-2 KO en diferentes tiempos (0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h) después de la inyección de glutamato. Detectamos el mayor aumento de la actividad enzimática 1h después de la administración de glutamato en ratones WT ($225 \pm 27\%$ frente al control, $p < 0,05$; Figura 10). Posteriormente se observó un segundo pico, a las 12 h ($195 \pm 10\%$ vs control, $p < 0,05$; Figura 10).

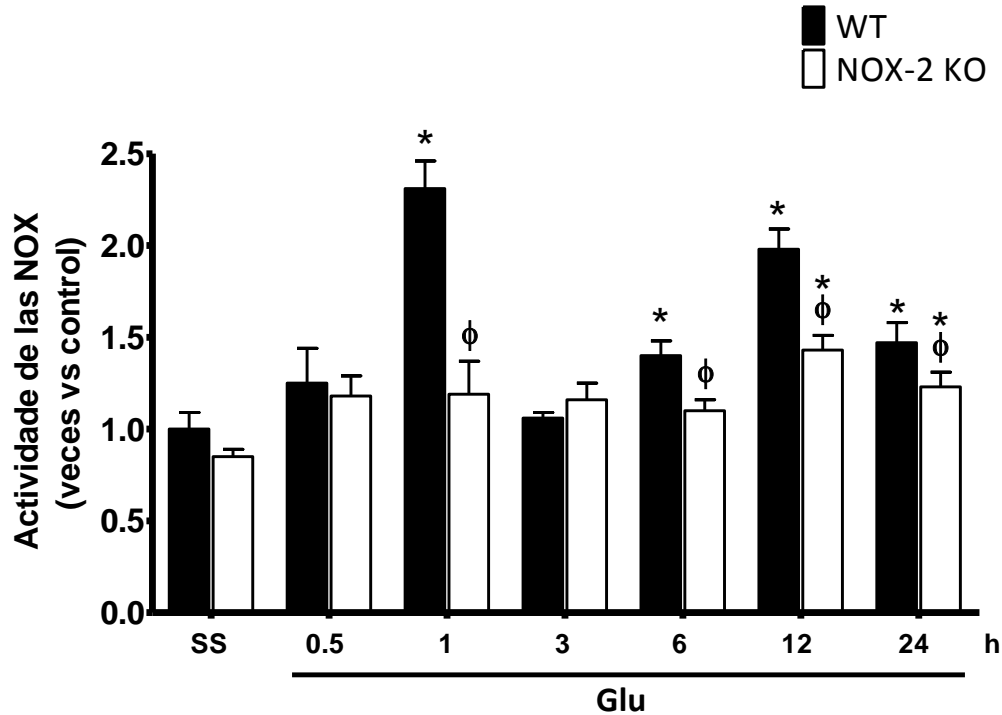


Figura 10. Actividad de las NOX durante el daño excitotóxico en ratones WT y NOX-2 KO. La actividad de las NOX fue evaluada como el cambio de Intensidad de fluorescencia resultante de la oxidación de dihidroetidio (DHE) a etidio (Et) en homogenados de estriado de ratones WT y NOX 2 KO tratados con glutamato (1 M) durante 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h después de la administración de glutamato. Los datos se expresan como cambio de veces de la fluorescencia relativa de Et con respecto al grupo de solución salina (ss). Los valores se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$ vs la solución salina (ss) correspondiente; $\phi p < 0.05$ vs el correspondiente ratón silvestre (WT) tratado con glutamato. Control=1.

En ratones NOX-2 KO, observamos un aumento significativo de la actividad de NOX después de la administración de glutamato a las 12 y 24 h ($p < 0,05$), de aproximadamente la mitad de los cuantificados en ratones WT. Estos resultados indican que en ratones WT, la administración de glutamato promueve un aumento sostenido en la actividad de las NOX por 24h, junto con dos picos máximos de actividad a las 1 y 12h durante el daño excitotóxico, y éste aumento en la activación de las NOX se retrasa y atenúa en los animales NOX-2 KO.

Por otro lado, en animales WT y NOX-2 KO los niveles de NOX-2 aumentaron a partir de las 6 y 12 h respectivamente (Figura 11), lo que sugiere que los cambios observados en los niveles de actividad no dependen directamente del aumento en la cantidad de proteína y

que probablemente están regulados por condiciones independientes de la cantidad de proteína.

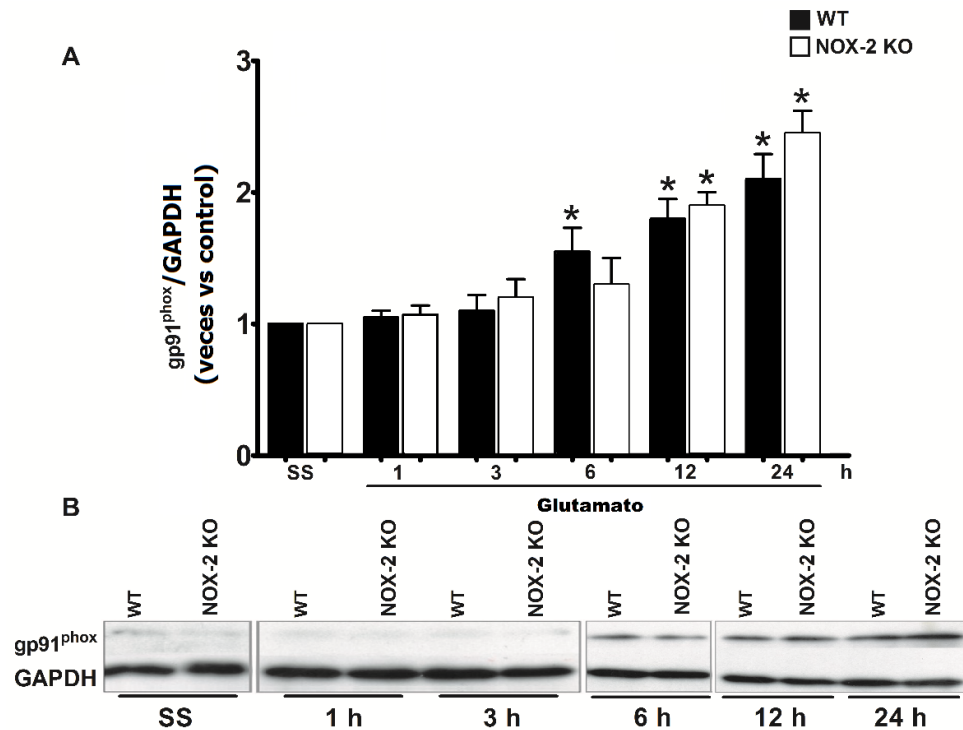


Figura 11. Expresión de gp91^{phox} (NOX-2) en el estriado de ratones silvestres y NOX-2 KO después del tratamiento con glutamato. (A) Niveles de gp91^{phox} (NOX-2) a 1, 6, 12 y 24 h después de la administración intracerebral de glutamato (1 M). Los resultados se expresan como el aumento sobre la intensidad relativa en relación con el control de carga (GAPDH), frente al tiempo en horas (h). Los valores representan el promedio \pm SEM de cuatro pruebas independientes. * $p < 0,05$ frente al control de solución salina correspondiente. (B) Imagen representativa del western blot de gp91^{phox} (peso molecular de 65 kDa) y GAPDH (peso molecular de 37 kDa). Control=1

10.3 La resistencia de los ratones NOX-2 KO al daño excitotóxico implica una disminución en la activación de la caspasa-3

La inyección intraestriatal de glutamato aumenta la activación de la caspasa-3, desde las 3 h en ratones WT ($208 \pm 9\%$ vs ss) y desde las 6 h en NOX-2 KO ($197 \pm 16\%$ vs ss). En ratones WT se observó un pico máximo a las 6 h, el cual disminuye a las 12 y 24 h. Adicionalmente a las 6 h la activación de la caspasa-3 fue menor en NOX-2 KO ($p < 0.05$) en comparación con los ratones WT (NOX-2 KO: $180 \pm 10\%$ vs WT: $280 \pm 25\%$, $p < 0.05$), y el mismo efecto

se observa durante las siguientes 24 h (NOX-2 KO: $57 \pm 15\%$ vs WT: $128 \pm 9\%$, $p < 0.05$; Figura 12). Estos datos sugieren que los ratones NOX-2 KO exhiben una activación más baja de la caspasa-3 durante la lesión excitotóxica inducida por la administración de glutamato, lo que podría reflejarse en la disminución de la muerte apoptótica.

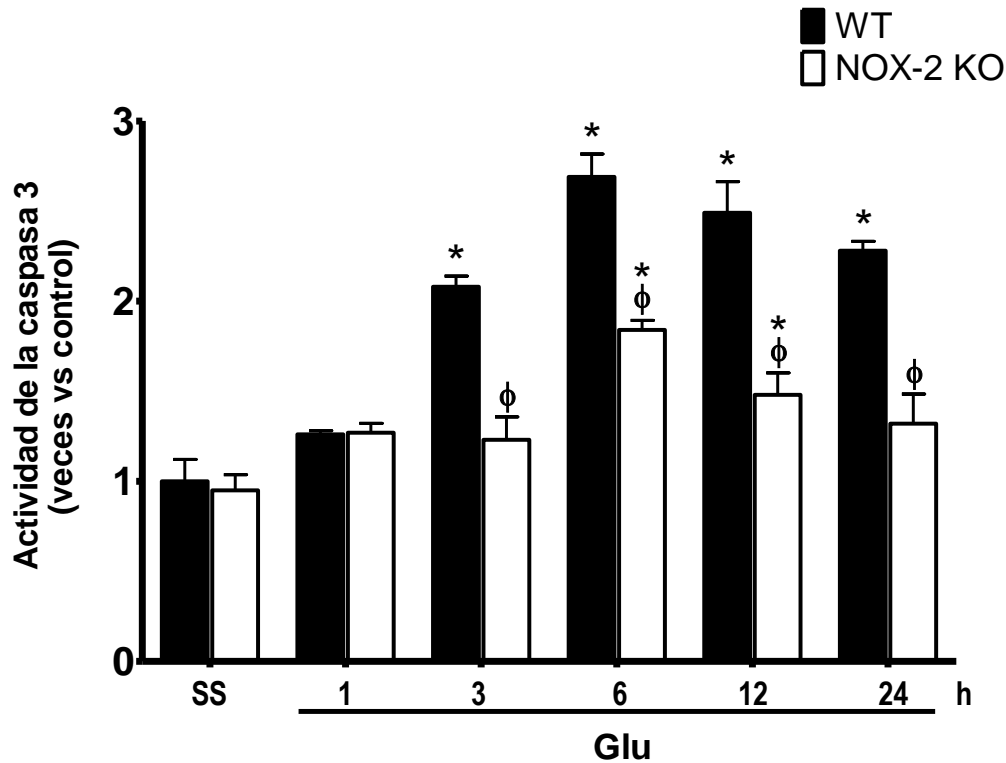


Figura 12. Actividad de la caspasa-3 en ratones WT y NOX-2 KO después de la administración de glutamato. La caspasa-3 activa se midió en homogenados de estriado después de 1, 3, 6, 12 y 24 h de administración de glu (1M) en ratones WT y NOX-2 KO. La fluorescencia producida por la escisión del sustrato específico para la caspasa-3 se cuantificó en unidades relativas de fluorescencia (FRU) y los resultados se expresan como el cambio de la fluorescencia en relación con la solución salina. Los valores se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs ss correspondiente; $\phi p < 0.05$ frente al correspondiente ratón de tipo silvestre (WT) tratado con glutamato. Control=1

10.4 Los ratones NOX-2 KO muestran una mejor recuperación motora que los ratones WT después del daño excitotóxico.

Las lesiones del estriado producen alteraciones en el control de los movimientos voluntarios y el tono muscular, predominantemente en las extremidades anteriores (Fleming *et al.*, 2004). Por lo tanto, se exploró el grado de compromiso funcional que resulta del daño excitotóxico como indicativo de la gravedad de la lesión del estriado. Con el fin de

caracterizar la gravedad del déficit neurológico (NDS), evaluamos tres pruebas tanto en ratones WT, como en NOX-2 KO (Figura 13).

La prueba del cilindro nos indica la latencia de la asimetría del miembro anterior (Figura 13A). Antes de la administración del glutamato, los ratones WT y NOX-2 KO tienden a explorar las paredes del cilindro preferentemente mediante contactos bilaterales, observándose menos del 5% de contactos unilaterales (WT $10 \pm 3\%$ y NOX-2 KO $8 \pm 2\%$ de contactos unilaterales). El daño excitotóxico en ratones WT dio lugar a una disminución temprana y sostenida de los contactos bilaterales desde 1 h ($90 \pm 5\%$ de contactos unilaterales) hasta las 24 h ($50 \pm 4\%$ de contactos unilaterales). Los ratones NOX-2 KO muestran una función motora comprometida similar a la de los ratones WT, 1 h después de la cirugía ($78 \pm 6\%$ de contactos unilaterales; $p < 0.05$); sin embargo, lograron recuperarse a los 24 h ($18 \pm 8\%$ de contactos unilaterales), a diferencia de los ratones WT, los cuales no alcanzaron los niveles basales ($p > 0.05$; Figura 13A).

La prueba de remoción del adhesivo evalúa el control y la coordinación de los movimientos voluntarios de las extremidades delanteras (Figura 13B). Antes de la administración de glutamato, los ratones WT y NOX-2 KO necesitaron un máximo de 14 s para remover el adhesivo del hocico (WT 12 ± 2 s y NOX-2 KO 10 ± 2 s). Después de 1 h de la administración de glutamato, los ratones WT no pudieron retirar la etiqueta antes de los 60 s. Subsecuentemente los ratones WT mostraron una mejoría en la capacidad para remover la etiqueta a las 24 h de la cirugía; sin embargo, el tiempo de remoción fue notablemente superior al mostrado por los controles tratados con solución salina (WT + GLU: 37 ± 5 s vs WT + SS: 11 ± 3 s, $p < 0,05$). Los ratones NOX-2 KO mostraron un rendimiento similar al mostrado por los ratones WT después de 1 h de la administración de glutamato (WT: 55 ± 5 s frente a NOX-2 KO: 50 ± 7 s, $p > 0,05$); sin embargo, a las 6 h del procedimiento, los ratones NOX-2 KO mostraron una marcada recuperación en comparación con los ratones WT (WT 44 ± 5 s frente a NOX-2 KO 22 ± 4 s; $p < 0,05$). Los ratones NOX-2 KO alcanzaron los niveles del control a las 24 h, una situación que no ocurrió en ratones WT (WT: 37 ± 5 s vs NOX-2 KO: 12 ± 3 s, $p < 0.05$; Figura 13B).

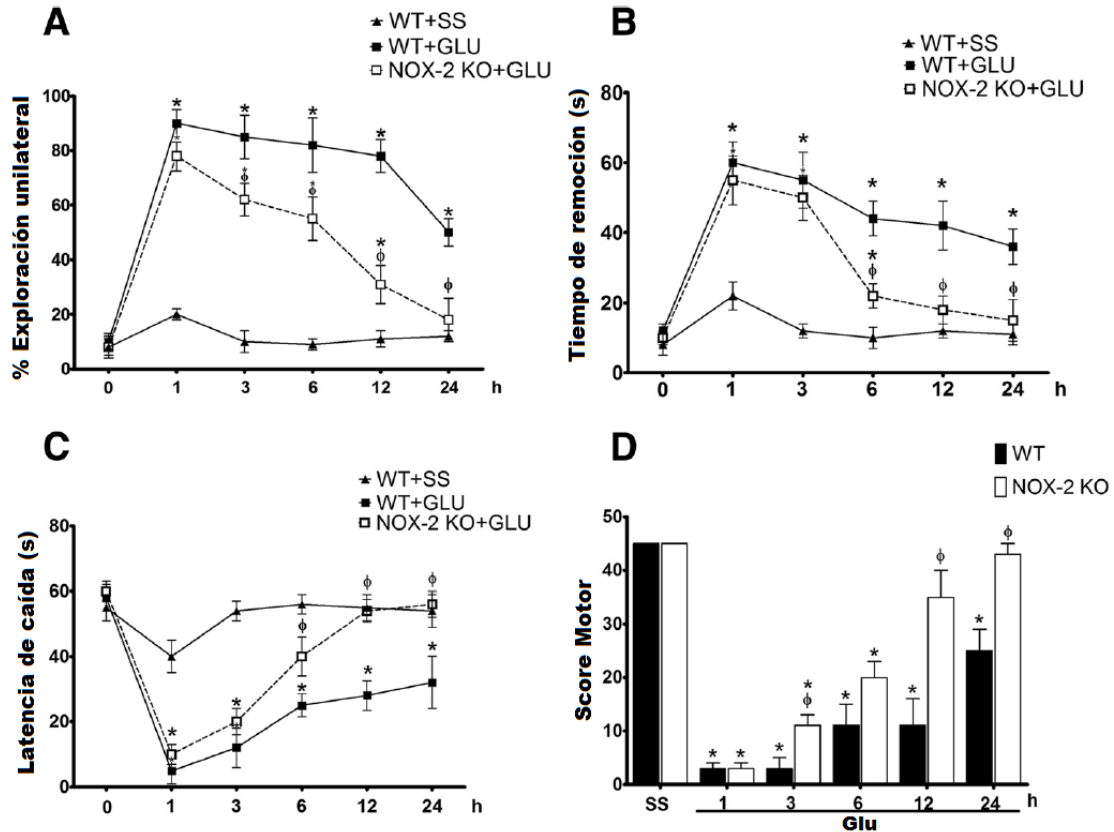


Figura 13. Actividad motora después de la administración de glutamato en ratones WT y NOX-2 KO. El rendimiento de los animales control (ss) e inyectados con glutamato (WT+GLU y NOX-2 KO+GLU) se evaluó en tres pruebas de comportamiento motor a las 1, 3, 6, 12, y 24 h después del procedimiento, las cuales se integraron para obtener una puntuación motora que refleja el deterioro funcional. (A) En la prueba de cilindro, cada ratón obtuvo un porcentaje basado en la proporción de exploraciones unilaterales y bilaterales realizadas en tres ensayos, de 3 min cada uno; el porcentaje se expresó como la media \pm SEM de ocho pruebas independientes. (B) La prueba de remoción del adhesivo que cuantifica el tiempo en que los animales retiran una etiqueta colocada previamente por el examinador. El tiempo de remoción se cuantificó en segundos y se expresa como la media \pm SEM de seis animales independientes. (C) El tono y la fuerza muscular de las cuatro extremidades se evaluaron exponiendo a los ratones a la prueba de la rejilla invertida en la que se cuantificó el tiempo de caída en tres oportunidades no consecutivas de un máximo de 60 s de duración. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la latencia de la caída, de seis pruebas independientes. (D) Para integrar las tres pruebas anteriores, se asignó un puntaje arbitrario al rendimiento de cada animal, otorgando el puntaje más alto al desempeño adecuado de los ratones inyectados con solución salina (45 puntos). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de puntaje, como la media \pm SEM de seis pruebas independientes. * $p < 0,05$ frente al control de solución salina correspondiente; ϕ $p < 0,05$ frente al ratón de tipo silvestre (WT) correspondiente tratado con glutamato

Finalmente, la prueba de la rejilla invertida permite evaluar indirectamente el tono muscular de las cuatro extremidades de los ratones (Figura 13C). Los ratones control permanecieron unidos a la cuadrícula invertida durante aproximadamente 1 min (56 ± 4 s), lo que se considera un rendimiento adecuado y se estableció como el basal. Después de 1 h de la administración de glutamato, los ratones WT y NOX-2 KO no pudieron permanecer sujetos a la rejilla más de 15 s (WT: 5 ± 4 s y NOX-2 KO: 10 ± 3 s). Después de 6 h del

procedimiento, los ratones NOX-2 KO mostraron una mejor recuperación funcional que los ratones silvestres (WT 25 ± 4 vs NOX-2 KO 40 ± 6 s $p < 0,05$) alcanzando un rendimiento similar al de los animales control a partir de las 12 h, desempeño que no se observa en los ratones WT (WT 32 ± 8 vs NOX-2 KO 54 ± 4 s $p > 0,05$; Figura 13C).

Los parámetros de la función motora se integraron en un score de deficiencia neurológica NDS (Figura 13D). Para eso, a cada prueba se le asignó un valor equivalente en la puntuación, planteando un valor máximo arbitrario de 15 puntos (para cada prueba) a los animales control tratados con solución salina. Con base en esta escala, un bajo rendimiento durante la prueba correspondió a una disminución en los puntos otorgados (Wells *et al.*, 2005). Los ratones WT tratados con glutamato mostraron una pobre puntuación en las primeras 3 h (3 ± 1 puntos), que mejoró a partir de las 12 h (11 ± 5 puntos) y continuó a las 24 h (25 ± 4 puntos), sin alcanzar los niveles del control. De manera similar, los ratones NOX-2 KO tratados con glutamato obtuvieron una mala puntuación en la primera hora (3 ± 1 puntos); sin embargo, se observa una mejoría a partir de las 3 h y logran una recuperación a nivel de los controles después de 12 h de la administración del glutamato (WT 11 ± 5 vs NOX-2 KO 35 ± 4 s $p < 0,05$; Figura 13D). Como observamos en las pruebas anteriores, la recuperación funcional de los ratones NOX-2 KO supera la observada en ratones WT lo que sugiere que la actividad de la NOX-2 se asocia con una deficiente recuperación funcional de la conducta motora tras la administración de glutamato.

10.5 El patrón de producción de citocinas en respuesta al daño excitotóxico depende de la NOX-2

La resolución del daño excitotóxico está estrechamente relacionada con la respuesta inflamatoria, la cual tiene como objetivo eliminar el tejido dañado y recuperar las funciones. Para caracterizar esta relación, evaluamos la participación de la NOX-2 en la producción de citocinas asociadas con la respuesta inflamatoria en el SNC (Figura 14). Con respecto a las citocinas proinflamatorias, observamos un aumento de IL-1 β después de 6 h de la administración de glutamato en los ratones WT (701 ± 30 pg / mg⁻¹ de proteína), en comparación con el control de solución salina (298 ± 41 pg / mg⁻¹ de proteína). De manera

similar, los ratones NOX-2 KO presentaron un aumento en la concentración de esta interleucina (682 ± 24 pg / mg^{-1} de proteína). A las 12 h, los niveles de IL-1 β se redujeron notablemente en ambas condiciones, pero aún se encontraron por encima del control (WT + GLU 400.7 ± 22 vs NOX-2 KO + GLU 420 ± 15 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0.05$), volviendo a los niveles de control a las 24 h (WT + GLU, 380 ± 58 y NOX-2 KO + GLU, 401 ± 63 pg / mg^{-1} de proteína; Figura 14A). Contrario a lo esperado, no se encontraron diferencias entre los ratones WT y NOX-2 KO en la producción de IL-1 β .

El daño excitotóxico también causó un aumento similar de la citocina proinflamatoria IL-6, esto en ambos grupos a las 6 y 12 h (WT + GLU, 650 ± 85 y NOX-2 KO + GLU, 553 ± 91 pg / mg^{-1} de proteína). Inesperadamente, después de 24 h de administración de glutamato, los ratones NOX-2 KO mantuvieron niveles altos de IL-6 en comparación con los ratones WT (WT 381 ± 41 vs NOX-2 KO 581 ± 43 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0.05$; Figura 14B). Los niveles de IL-12 aumentaron en la primera hora después del tratamiento con glutamato en ratones WT (423 ± 52 pg / mg^{-1} de proteína) y NOX-2 KO (475 ± 74 pg / mg^{-1} de proteína) en comparación con el control de solución salina (WT: 282 ± 28 y NOX-2 KO: 321 ± 31 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0,05$; Figura 14C).

Después de 6 h, los ratones WT tratados con glutamato mostraron un máximo aumento de IL-12, que fue mucho mayor que el observado en los ratones NOX-2 KO (WT 673 ± 39 vs NOX-2 KO 385 ± 35 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0,05$). A las 12 h, este patrón se invirtió, ya que los niveles de IL-12 eran mayores en los ratones NOX-2 KO que en los ratones WT (WT 363 ± 67 frente a NOX-2 KO 743 ± 29 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0,05$; Figura 14C).

También observamos un aumento de TNF- α inducido por el glutamato tanto en ratones WT (528 ± 39 pg / mg^{-1} de proteína) como en ratones NOX-2 KO a las 6 h (483 ± 35 pg / mg^{-1} de proteína) y 12 h (WT 704 ± 54 y NOX-2 KO 542 ± 29 pg / mg^{-1} de proteína). La producción de TNF- α en ratones NOX-2 KO fue menor a la observada en ratones WT a las 6 y 12 h. Después de 24 h, los niveles de TNF- α se redujeron tanto en ratones WT (482 ± 22 pg / mg^{-1} de proteína) como en ratones NOX-2 KO (410 ± 20 pg / mg^{-1} de proteína, $p > 0.05$; Figura 14D).

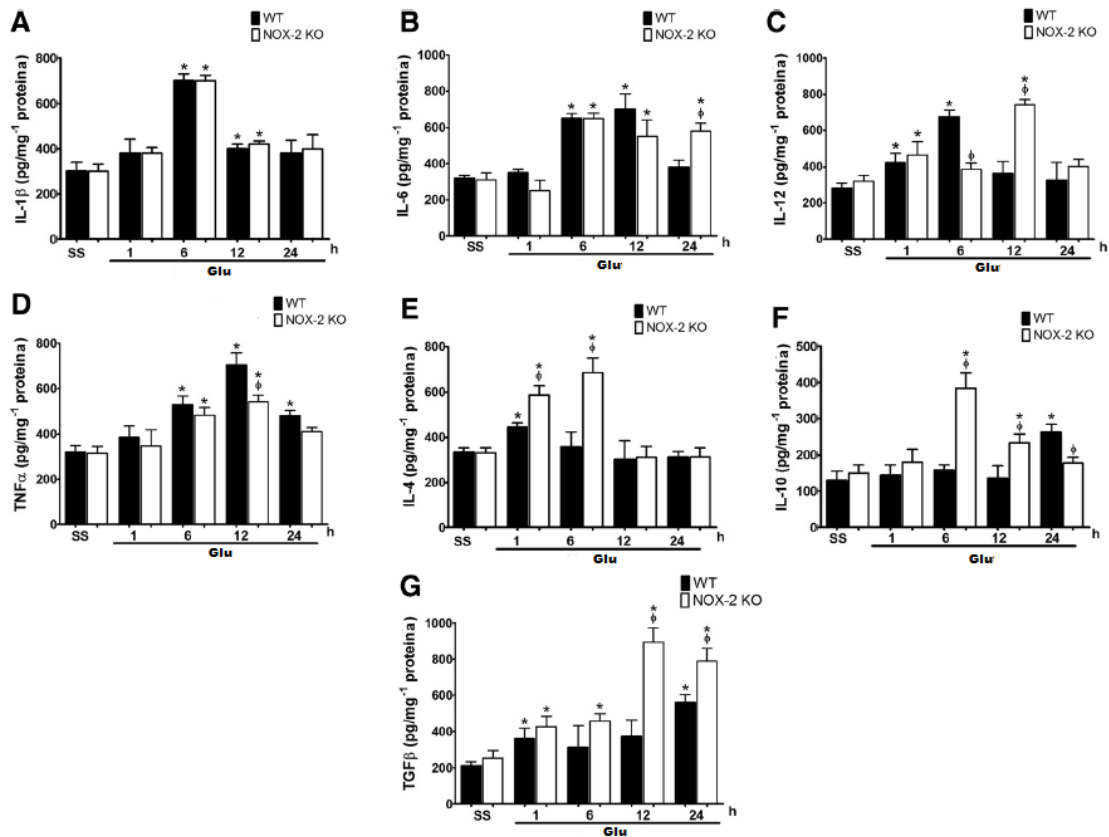


Figura 14. Patrón de la producción de citocinas en ratones silvestres y NOX-2 KO después de la inyección de glutamato en el estriado. La caracterización de la respuesta inflamatoria se llevó a cabo mediante la determinación de la concentración de citocinas en homogenados del estriado de ratones silvestres (WT) y NOX-2 KO determinada mediante ensayos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) a las 1, 6, 12 y 24 h después de la administración de solución salina (SS) o glutamato (Glu) como se detalla en la sección de métodos. (A) Interleucina-18 (IL-18), (B) interleucina-4 (IL-4), (C) interleucina-6 (IL-6), (D) interleucina-10 (IL-10), (E) interleucina-12 (IL 12), (F) factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y (G) factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Los datos se expresan como picogramos por miligramo de proteína y corresponden a la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente al control de solución salina correspondiente; $\phi p < 0,05$ frente al correspondiente ratón WT tratado con glutamato.

Con respecto a la producción de citocinas antiinflamatorias, medimos la concentración de IL-4, IL-10 y TGF- β , citocinas relacionadas con la resolución del proceso inflamatorio en el SNC (Dinarello, 2007; Lobo-Silva *et al.*, 2016). Una hora después de la administración de glutamato, los ratones NOX-2 KO mostraron un aumento de casi el doble, en la producción de IL-4, en comparación con el control de solución salina (NOX-2 KO 586 ± 42 vs NOX-2 KO + SS 330 ± 32 pg / mg⁻¹ de proteína; $p < 0,05$), mientras que en los ratones WT, el glutamato indujo un aumento del 125% con respecto a su control (WT + GLU 443 ± 20 vs WT + SS 335 ± 18 pg / mg⁻¹ proteína; $p < 0,05$). La diferencia observada entre los ratones WT y NOX-2 KO se incrementó notablemente a las 6 h (WT 357 ± 54 vs NOX-2 KO 685 ± 65 pg / mg⁻¹ de

proteína, $p < 0,05$; Figura 14E). A las 12 y 24 h, no se observó diferencia entre los grupos y los valores volvieron a niveles del control.

Por otra parte, la administración de glutamato causó un aumento de IL-10 a las 6 h, en ratones NOX-2 KO en comparación con los ratones WT (WT 158 ± 14 vs NOX-2 KO 384 ± 42 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0,05$), el cual disminuyó a las 12 h (WT 136 ± 34 vs NOX-2 KO 234 ± 24 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0,05$). En cambio los ratones WT mostraron un aumento de IL-10 solo a las 24 h, mientras que los niveles en el grupo NOX-2 KO disminuyen a este tiempo (WT 263 ± 21 vs a NOX-2 KO 178 ± 18 pg / mg^{-1} proteína, $p < 0,05$; Figura 14F).

Con respecto a la producción de TGF- β (Figura 14G), una citocina reguladora negativa, observamos un aumento desde 1 h tanto en ratones WT como en NOX-2 KO tratados con glutamato a la hora (WT 360 ± 59 frente a NOX-2 KO 427 ± 56 pg/ mg^{-1} proteína, $p < 0,05$). Este aumento se mantuvo hasta las 24 h en ambos grupos, alcanzando una concentración máxima a las 12 h (WT: 372 ± 91 vs NOX-2 KO: 893 ± 79 pg / mg^{-1} proteína, $p < 0,05$) en ratones NOX-2 KO y a las 24 h en ratones WT (WT 557 ± 45 frente a NOX-2 KO 789 ± 69 pg / mg^{-1} de proteína, $p < 0,05$). Estos resultados sugieren que el cambio en el perfil de las citocinas en los ratones NOX-2 KO se caracteriza por un aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias en los primeros tiempos durante el evento excitotóxico.

10.6 La administración de la IL-4 previene parcialmente la lesión excitotóxica en ratones WT.

Una de las diferencias más evidentes en la respuesta de los ratones NOX-2 KO al daño excitotóxico fue el aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias; por lo tanto, procedimos a evaluar los parámetros de lesión y degeneración neuronal en animales WT tratados simultáneamente con glutamato e IL-4 ó IL-10 exógenas. En la Figura 15A se muestran cortes representativos del estriado de animales WT teñidos con violeta de cresilo y FjB. El tratamiento con IL-4 disminuye significativamente el volumen de la lesión (WT 1.2 ± 0.14 vs WT + IL-4 0.72 ± 0.05 $p < 0,05$; Figura 15B), así como una menor cantidad de células en degeneración (WT 82.3 ± 11.1 vs WT + IL-4 35.4 ± 4.7 células / mm^2 , $p < 0,05$, Figura 15C) en comparación los ratones tratados solo con glutamato.

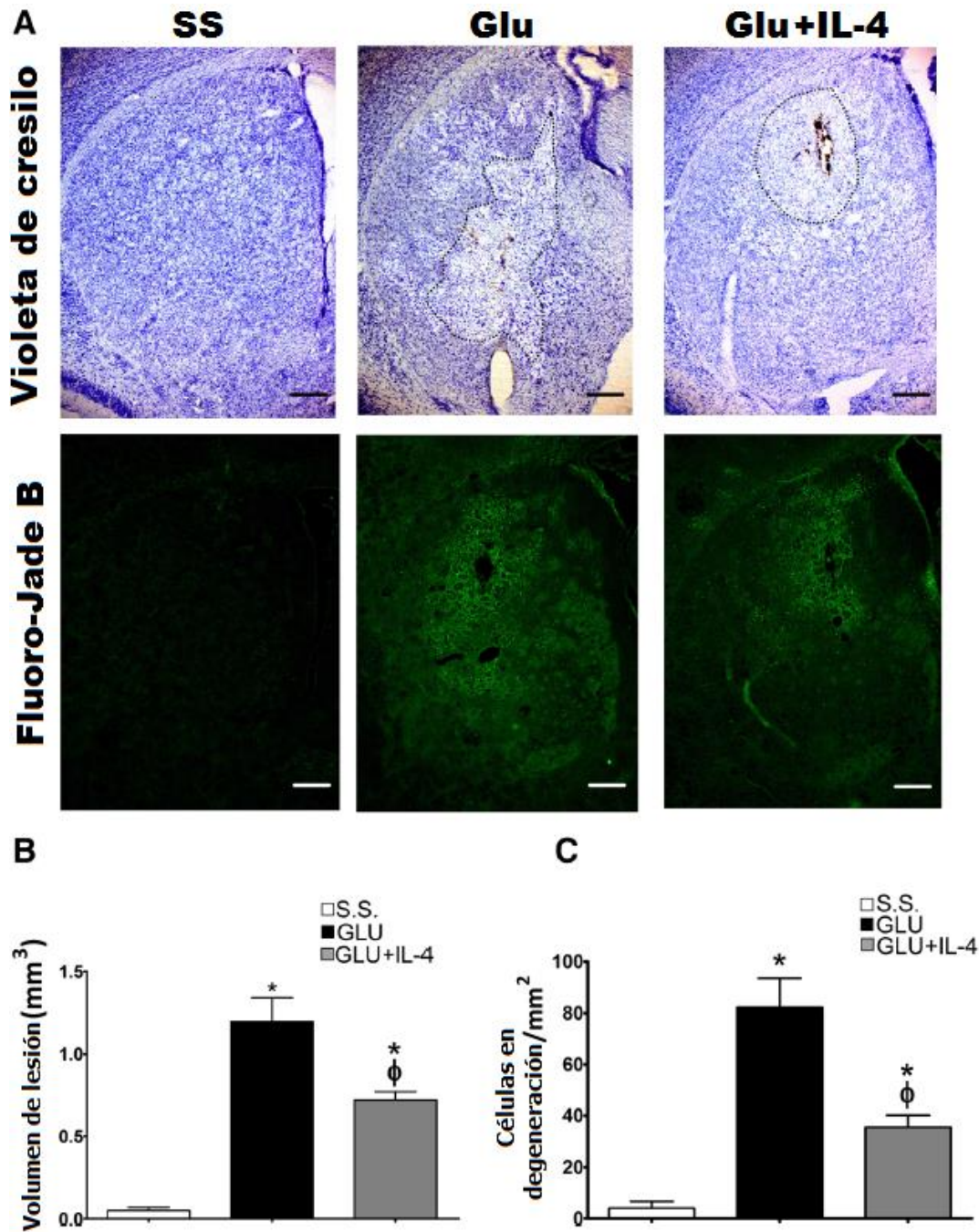


Figura 15. Efecto de la IL-4 sobre la lesión del estriado y la degeneración neuronal en ratones WT tratados con glutamato. Los cortes histológicos se obtuvieron después de 24 h de la administración intracerebral de NaCl al 0.9% (ss), solo glutamato (GLU) o glutamato + IL-4 0.7 ng/mL (GLU+IL4) como se detalla en métodos. (A) Micrografías representativas de cortes coronales del cuerpo estriado teñidos con violeta de cresilo y FJB. La línea de puntos delimita el área de la lesión de los ratones tratados con glutamato. Las barras de escala representan 200 μ m (10x). (B) La cuantificación del volumen de la lesión 24 h después de la administración de ss o glutamato, se expresa en milímetros cúbicos. (C) El número total de células positivas para FJB se contó en tres secciones por ratón. Los datos se expresan como la media \pm SEM de seis experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente al control de solución salina (S.S.); $\phi p < 0.05$ frente al ratón tratado solo con glutamato (GLU).

10.7 La IL-4 regula la actividad de la NOX y la activación de la caspasa-3 en el proceso excitotóxico en ratones WT

Dado que los ratones NOX-2 KO mostraron un aumento en la producción de IL-4, exploramos la posibilidad de la regulación recíproca a través de la determinación de la actividad de las NOX en ratones WT tratados con IL-4. En estas condiciones, los ratones WT tratados con IL-4 mostraron una reducción del 50% en la actividad de NOX inducida por el glutamato solo a las 12 h (GLU 85 ± 12% y GLU + IL-4 vs 44 ± 12% por encima del control $p < 0,05$; Figura 16).

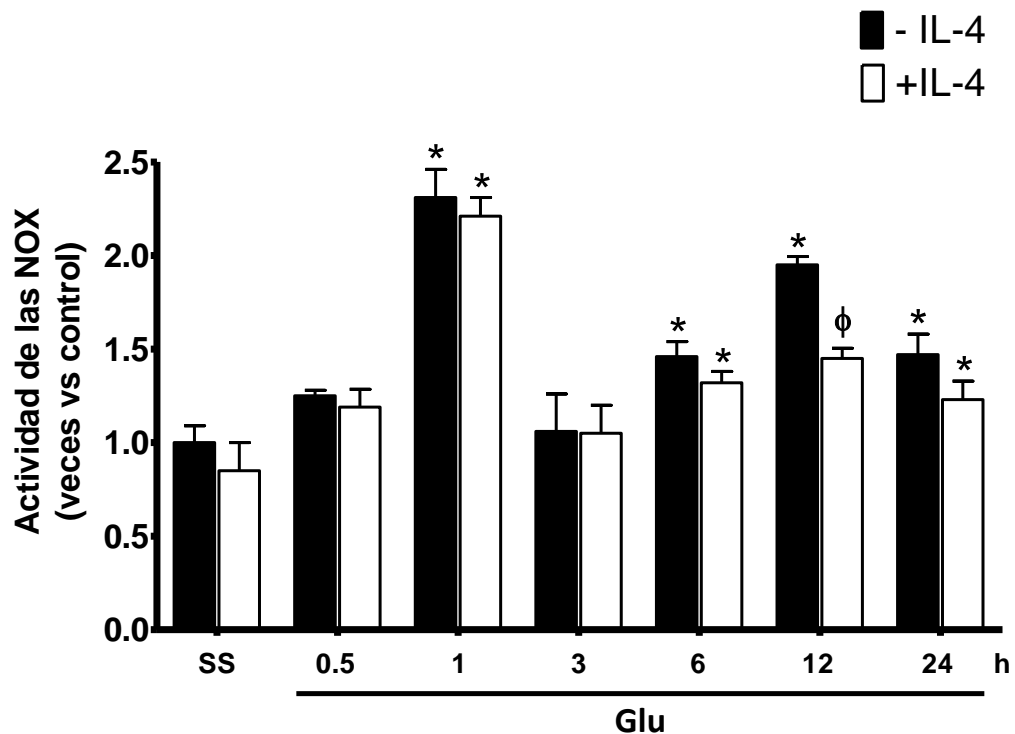


Figura 16. Actividad de la NOX en ratones WT tratados con IL-4 y glutamato. La actividad de las NOX se evaluó en ratones WT tratados con NaCl al 0.9% (S.S.), glutamato (GLU) o glutamato + IL-4 0.7 ng / mL (GLU+IL-4). La actividad de las NOX se midió por la fluorescencia resultante de la oxidación con dihidroetidio (DHE) a etidio (Eth) en homogenados de estriados de ratones después de la administración de glutamato de 0.5 a 24 h (0,5, 1, 3, 6, 12 y 24 h). Los datos se expresan como el cambio en la fluorescencia en relación con el grupo tratado con ss. Los valores se expresan como la media ± SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$ frente al control de salina correspondiente; $\phi p < 0.05$ frente al correspondiente ratón tratado solo con glutamato. Control=1.

De acuerdo con lo anterior, los ratones tratados con IL-4 también mostraron una reducción significativa en la activación de la caspasa-3 a las 12 (GLU 249 ± 10% vs GLU + IL-4 187 ± 9%

en comparación con los controles, $p < 0.05$) y 24 h (GLU $229 \pm 9\%$ vs GLU + IL-4 $172 \pm 10\%$ en comparación con el control $p < 0,05$; Figura 17).

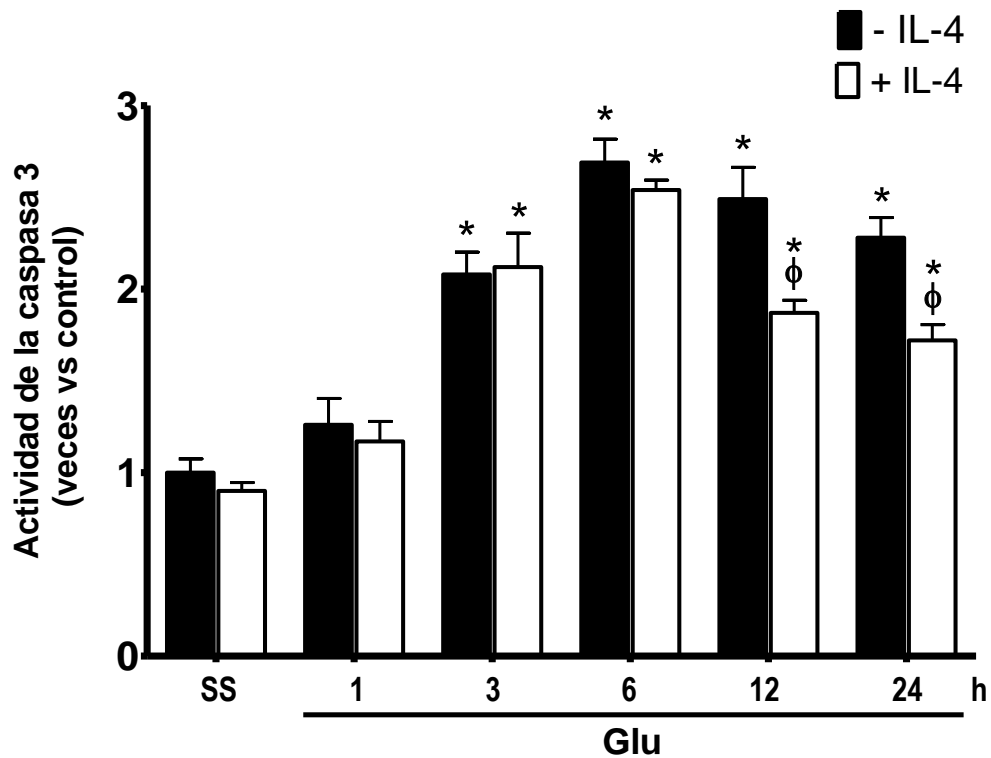


Figura 17. Actividad de la caspasa-3 en ratones WT tratados con IL-4 después de la administración de glutamato. La caspasa-3 activa se midió en homogenados de estriado de ratones tratados con NaCl al 0.9% (SS), glutamato (- IL-4) o glutamato + IL-4 0.7 ng/mL (+ IL-4) después de 1, 3, 6, 12, y 24 h. La fluorescencia producida por la escisión del sustrato específico para caspasa-3 se cuantificó como unidades relativas de fluorescencia (FRU). Los datos se expresan como el cambio en la cantidad de fluorescencia en relación con el control de solución salina sin IL-4. Los valores se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente al control de solución salina correspondiente; $\phi p < 0.05$ frente al tiempo correspondiente de ratones tratados solo con glutamato. Control=1.

10.8 La administración de la IL-10 reduce la lesión inducida por daño excitotóxico en ratones WT.

Después de la administración de glutamato, encontramos que el volumen de la lesión también se redujo notablemente en ratones tratados con IL-10. Se muestran cortes representativos de estriado de animales WT teñidos con violeta de cresilo y FJB (Figura 18A). Los animales tratados con IL-10 mostraron una disminución de más del 60% en el volumen de la lesión en comparación con los ratones no tratados (GLU 1.2 ± 1.14 vs GLU + L-10 $0.45 \pm 0.05\text{mm}^3$ $p < 0.05$; Figura 18B). En cuanto a las células en degeneración, la administración

de IL-10 también disminuyó el número de células positivas a FJB en un 60% (GLU 83.4 ± 11.3 vs GLU + IL-10 $32.3 \pm 4.6\text{mm}^3$ $p < 0.05$; Figura 18C).

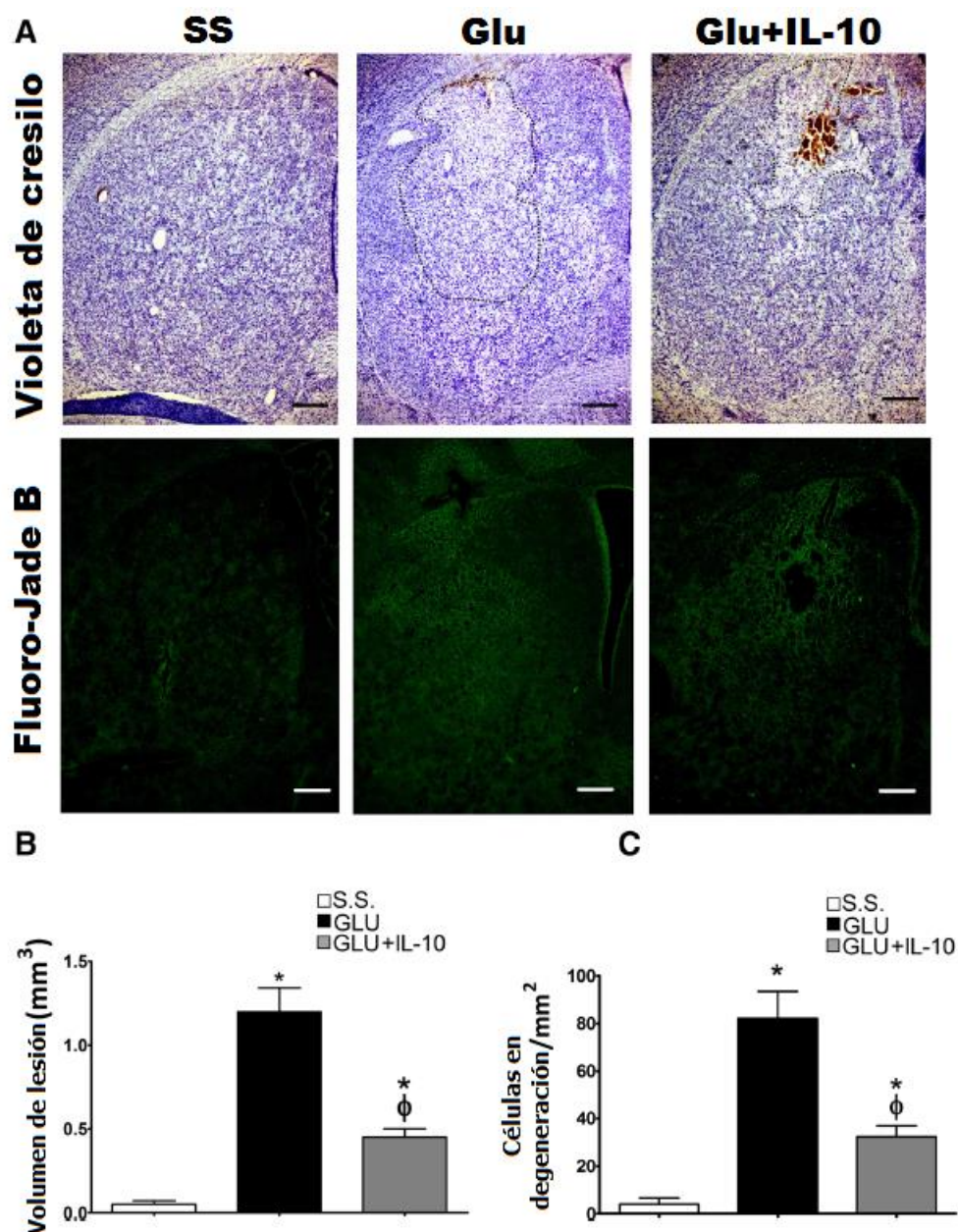


Figura 18. Efecto de la IL-10 sobre el volumen de la lesión y la degeneración neuronal en ratones WT tratados con glutamato. Se obtuvieron cortes histológicos de ratones WT después de 24 h de la administración intracerebral de NaCl al 0.9% (SS), glutamato (GLU) o glutamato +IL-10 0.4 ng/ml (GLU + IL-10) como se detalla en la sección de métodos. (A) Micrografías representativas de cortes coronales de estriado teñidas con violeta de cresilo y FJB. La línea de puntos delimita el área de la lesión de ratones tratados con glutamato. Las barras de escala representan 200 μm (10x). (B) Cuantificación del volumen de la lesión 24 h después de la administración de ss o de glutamato, el resultado se expresa en mm^3 . (C) Número total de células FJB positivas contadas en tres cortes por ratón. Los datos se expresan como la media \pm SEM de

seis experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente al control de solución salina (S.S.); $\phi p < 0,05$ frente al ratón correspondiente tratado solo con glutamato (GLU)

10.9 La IL-10 regula negativamente a la actividad de las NOX y la activación de la caspasa-3 en ratones WT

Cuando los animales WT se trataron simultáneamente con glutamato e IL-10, la actividad de las NOX se redujo notablemente en comparación con los ratones inyectados solo con glutamato a 1 h (GLU $231 \pm 25\%$ vs GLU + IL-10 $108 \pm 7\%$ sobre el control, $p < 0,05$), así como a las 6 h (GLU $141 \pm 5\%$ vs GLU + IL-10 $115 \pm 4\%$ sobre el control, $p < 0,05$); y 12 h (GLU $195 \pm 12\%$ frente a GLU + IL-10 $132 \pm 7\%$ del control, $p < 0,05$). Sin embargo, 24 h después del ataque excitotóxico, ambos grupos mostraron niveles similares de la actividad enzimática (GLU $147 \pm 4\%$ frente a GLU + IL-10 $134 \pm 5\%$ $p > 0,05$; Figura 19).

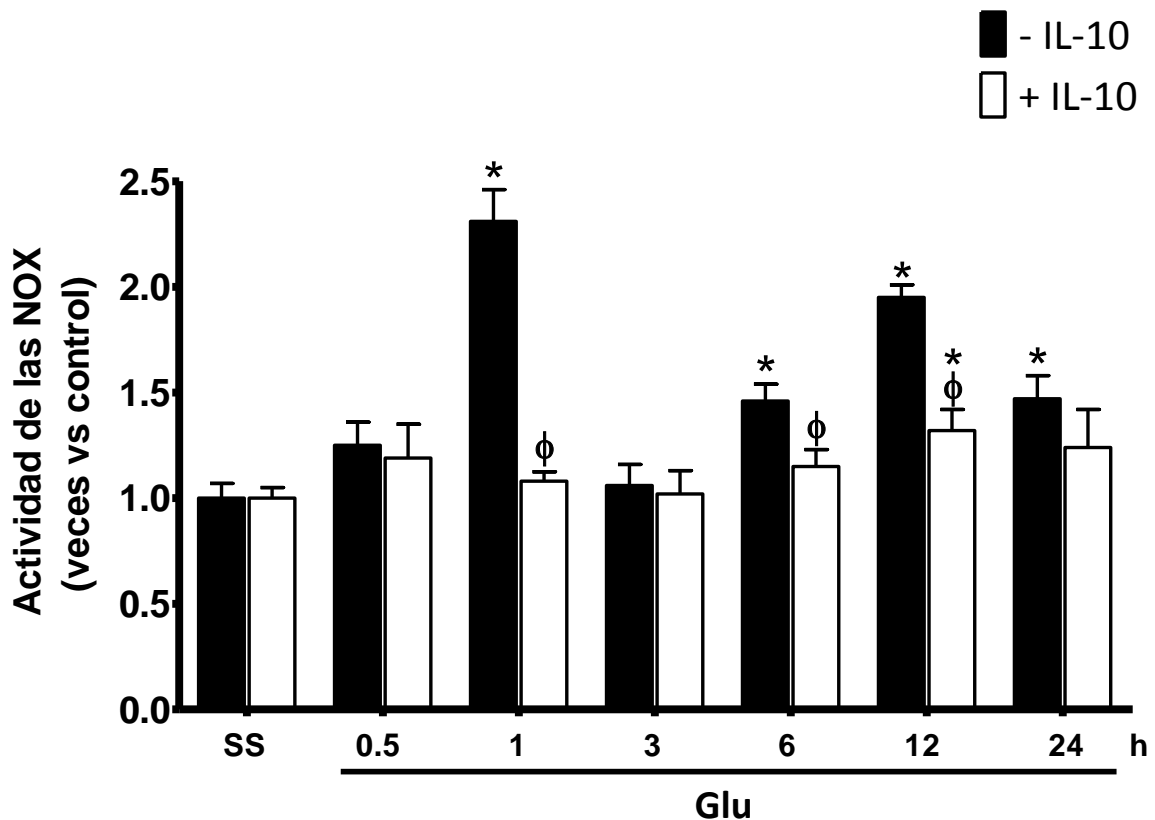


Figura 19. Actividad de las NOX en ratones silvestres tratados con IL-10 y glutamato. La actividad de las NOX se evaluó en ratones silvestres WT tratados con NaCl al 0.9% (SS), glutamato (GLU) o glutamato + IL-10 0.4 ng/mL (+IL-10) como se detalla en la sección de métodos. La determinación de la actividad de las NOX se midió como el cambio en la intensidad de fluorescencia resultante de la oxidación del dihidroetidio (DHE) a etidio (Et) en homogenados del estriado de

ratón después de 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 h de la administración de glutamato. Los datos se expresan como el cambio de la fluorescencia de Et en relación con la solución salina sin IL-10. Los valores se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs el control de ss correspondiente; $\phi p < 0.05$ vs al tiempo correspondiente de ratones tratados con glutamato. Control=1.

En estas condiciones, la IL-10 también disminuyó la actividad de la caspasa-3. Como mostramos anteriormente, la administración de glutamato promueve el aumento de la caspasa-3 activa desde las 6 y hasta las 24 h de la inyección. En estos tiempos, la administración conjunta de IL-10 redujo la activación de la caspasa-3 en un 90% a las 3 (GLU 201 \pm 18% vs GLU + IL-10 112 \pm 4% sobre el control, $p < 0.05$) y 24 h (GLU 228 \pm 27 % vs GLU + IL-10 118 \pm 6% sobre el control, $p < 0.05$); en cuanto a las 6 y 12 h, la administración de IL-10, disminuyó la actividad de la caspasa-3 aproximadamente en un 50% (GLU 270 \pm 30% vs GLU + IL-10 194 \pm 15% de los controles, $p < 0,05$; GLU 249 \pm 10% vs GLU + IL-10 177 \pm 6 % comparado con los controles, $p < 0.05$; Figura 20).

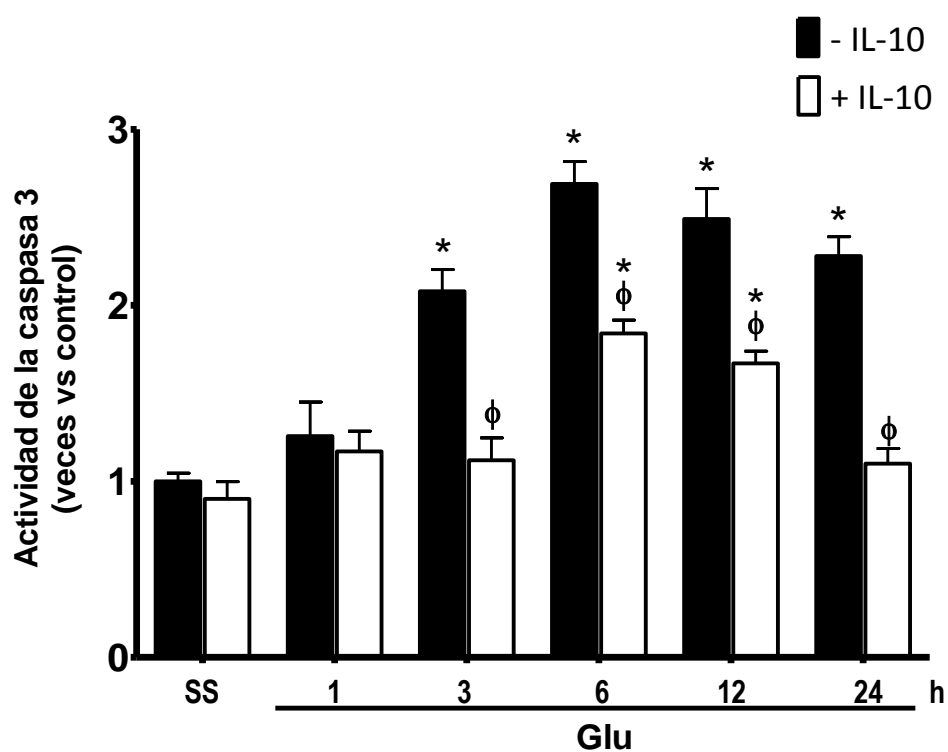


Figura 20. Caspasa-3 activa en ratones tratados con IL-10 y glutamato. La caspasa-3 activa se midió en homogenados del estriado de ratones WT tratados con NaCl al 0.9% (SS), glutamato (IL-10) o glutamato + IL-10 0.4 ng/mL (GLU+ IL-10) a 1, 3, 6, 12, y 24 h después de la administración de glutamato. La fluorescencia producida por la ruptura del sustrato específico se cuantificó en unidades relativas de fluorescencia (FRU). Los valores se cuantificaron como el cambio en la cantidad de fluorescencia en relación con el control de ss. Los valores se expresaron como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ frente al control de ss correspondiente; $\phi p < 0.05$ vs al tiempo correspondiente de ratones WT tratados con glutamato. Control=1.

10.10 La administración de la IL-10 mejora la recuperación motora en ratones WT después del daño excitotóxico

Los ratones tratados con IL-10 tuvieron un mejor desempeño en las pruebas de conducta motora después de la administración de glutamato (Figura 21). En la prueba de cilindro, los ratones tratados con IL-10 mostraron un rendimiento similar a los que no recibieron IL-10 (GLU $10 \pm 3\%$ vs GLU + IL-10 8 ± 2 contactos unilaterales $p < 0,05$) después de 1 h de la cirugía; sin embargo, los ratones tratados con IL-10 fueron capaces de recuperar los niveles basales a las 6 h (GLU $82 \pm 5\%$ vs GLU + IL-10 $20 \pm 4\%$ de contactos unilaterales, $p < 0,05$), mientras que esto no ocurrió en los ratones no tratados (Figura 21A). En la prueba del adhesivo, los ratones tratados con IL-10 también pudieron recuperar el rendimiento inicial desde las 3 h (GLU 55 ± 8 s y GLU + IL-10 $20 \pm 6,5$ s, $p < 0,05$), mientras que los no tratados no recuperaron los niveles basales en las 24 h observadas (GLU 36 ± 5 s frente a GLU + IL-10 15 ± 5 s, $p < 0,05$; Figura 21B). En la prueba de la rejilla invertida, los ratones tratados con IL-10 tuvieron un mejor desempeño que los ratones no tratados, esto desde la primera hora tras el tratamiento con glutamato (GLU 5 ± 4 s frente a GLU + IL-10 26 ± 3 s $p < 0,05$). Los animales tratados con IL-10 tuvieron un desempeño similar al del grupo de control después de las 12 h (SS 58 ± 2 s frente a GLU + IL-10 50 ± 4 s, $p > 0,05$), mientras que los ratones WT no tratados son incapaces de recuperar los niveles basales (Figura 21C).

La mejoría observada en las pruebas individuales se reflejó en el NDS (Figura 21D). Al implementar esta escala, observamos una puntuación significativamente más alta en ratones tratados con IL-10 desde las 3 h (GLU 3 ± 2 puntos y GLU + IL-10 22 ± 4 puntos $p < 0,05$); esta puntuación fue incrementándose progresivamente, hasta alcanzar valores similares a los observados en el grupo control a las 24 h (GLU 11 ± 5 puntos y GLU + IL-10 40 ± 3 vs S.S. 40 puntos $p < 0,05$; Figura 21D). Los ratones que se inyectaron solo con glutamato también mostraron un aumento progresivo en la puntuación motora, sin embargo, no alcanzaron valores del grupo control.

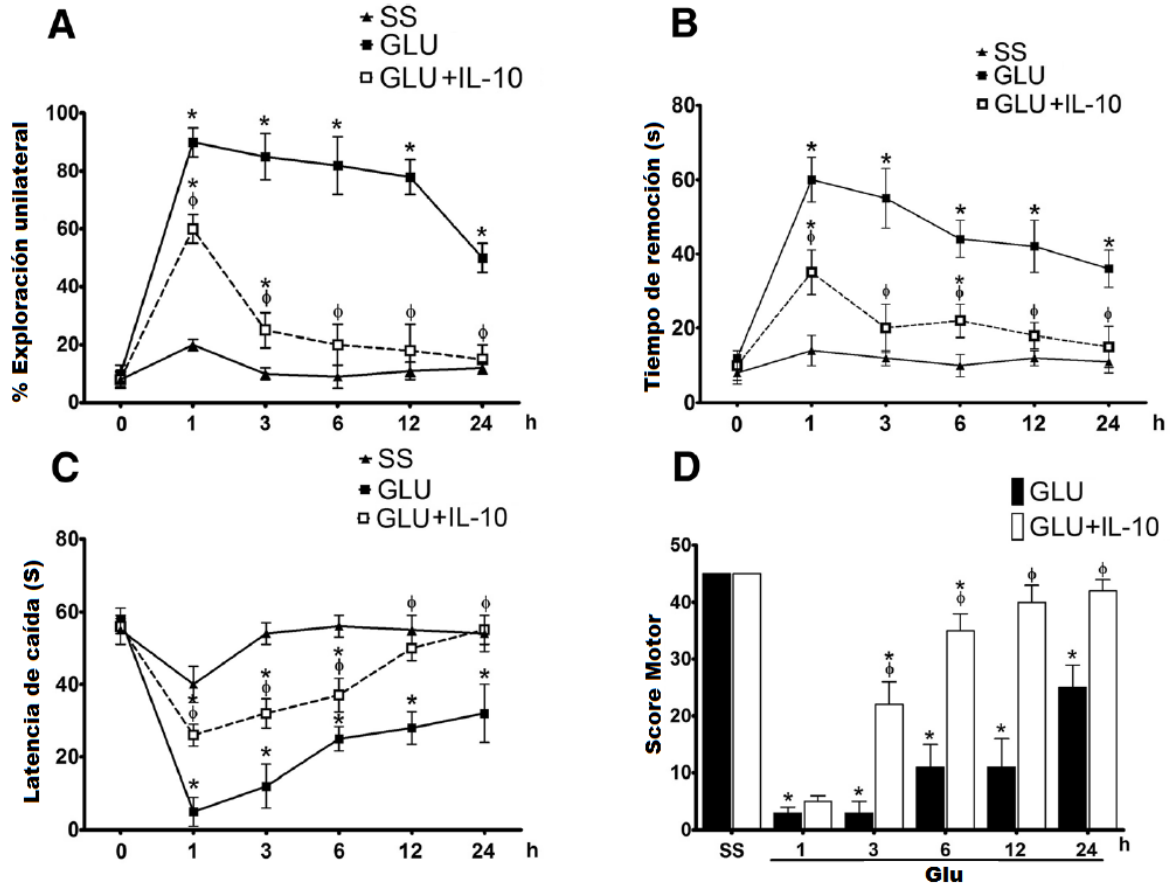


Figura 21. IL-10 mejora la recuperación motora en ratones WT después de la administración de glutamato. Se analizó el desempeño motor de ratones silvestres inyectados con NaCl al 0.9%(SS), glutamato 1M (GLU) y glutamato +IL-10 0,4 ng/mL (GLU+IL-10) en tres pruebas de comportamiento motor después de 1, 3, 6, 12, y 24 h de la inyección de glutamato. Estas pruebas se integraron posteriormente para obtener una puntuación motora que refleja el deterioro funcional. (A) En la prueba de cilindro, cada ratón obtuvo un porcentaje basado en la proporción de exploraciones unilaterales realizadas en tres ensayos, de 3 min cada uno; el porcentaje se expresa como la media \pm SEM de ocho pruebas independientes. (B) La prueba de remoción del adhesivo que cuantifica el tiempo en que los animales retiran una etiqueta colocada previamente por el examinador. El tiempo de remoción se cuantificó en segundos y se expresó como la media \pm SEM de seis animales independientes. (C) El tono y la fuerza muscular de las cuatro extremidades se evaluaron exponiendo a los ratones a la prueba de la rejilla invertida en la que se cuantificó el tiempo de caída en tres oportunidades no consecutivas de un máximo de 60 s de duración. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de la latencia de la caída, de seis pruebas independientes. (D) Para integrar las tres pruebas anteriores, se asignó un puntaje arbitrario al rendimiento de cada animal, otorgando el puntaje más alto al desempeño adecuado de los ratones inyectados con solución salina (45 puntos). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de puntaje, como la media \pm SEM de seis pruebas independientes. * $p < 0,05$ vs el control de ss correspondiente; ϕ $p < 0.05$ frente al ratón tratado con glutamato.

11. Discusión

En lesiones del SNC causadas por diversas patologías, tales como la isquemia o el traumatismo encefálico, las neuronas pierden la capacidad de controlar la homeostasis iónica minutos después de la lesión primaria, lo que resulta en el aumento del Ca^{2+} intracelular, despolarización, liberación de glutamato, alteración de la función mitocondrial, falla energética y producción de ERO (Sato *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Guerriero *et al.*, 2015). Aunque estos eventos ocurren durante los primeros minutos u horas posteriores al evento nocivo, se sabe que determinan en gran medida la extensión del daño cerebral y la respuesta inflamatoria, fenómenos que prevalecen por meses e incluso años. Esta relación se ha demostrado en diversos modelos de daño excitotóxico; por ejemplo, el uso de bloqueadores de los NMDAR durante los primeros minutos del evento excitotóxico en modelos experimentales de isquemia, reducen notablemente el daño neuronal y la neuroinflamación (Hill *et al.*, 2017).

Diversos estudios postulan que la magnitud del daño primario se asocia también con la adquisición de las características de la respuesta inflamatoria, las cuales son responsables de la reparación y recuperación funcional del tejido (Diaz-Arrastia *et al.*, 2014; Rich *et al.*, 2016). Por lo tanto, este estudio obedeció a la necesidad de evaluar los procesos que tienen lugar durante las primeras etapas de la lesión cerebral, particularmente los concernientes a la NOX-2, con el fin de comprender su relevancia sobre el proceso inflamatorio posterior.

En modelos animales, la administración de glutamato produce una sobreestimulación de sus receptores, lo que está asociado al desarrollo del estrés oxidante y muerte neuronal; eventos relacionados a su vez con la instauración de una respuesta inflamatoria (Batlle *et al.*, 2015). Durante este proceso, las ERO son pieza clave, ya que participan directamente en la muerte neuronal y otros procesos fisiológicos paralelos que también se ven afectados por la excitotoxicidad (Maycotte *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2015). Varias fuentes celulares de ERO están involucradas en el daño excitotóxico, sin embargo, cada vez hay más evidencia que señala a la familia de las NOX como parte clave del proceso. Esto debido a que su única

función conocida es la producción de ERO y a que su activación está estrechamente relacionada con la muerte neuronal (Coyoy *et al.*, 2008; Maycotte *et al.*, 2010).

Los siete homólogos de la familia NOX, tienen localizaciones subcelulares diferentes, y su activación está asociada con varias vías de señalización celular (Padgett *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2018). En particular, sabemos que la NOX-2 está involucrada en la muerte neuronal, ya que su inhibición reduce notablemente el daño neuronal en modelos de isquemia, hipoglucemia y trauma encefálico (Páramo *et al.*, 2013, Hirano *et al.*, 2015, Chandran *et al.*, 2017), patologías en las que la excitotoxicidad es un componente fundamental del daño.

En estudios anteriores, demostramos que en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo, la inhibición farmacológica de NOX, disminuye la muerte apoptótica causada por diferentes estímulos (Coyoy *et al.*, 2008; Guemez-Gamboa y Moran, 2009). También hemos confirmado la participación de NOX-2 en la muerte neuronal por excitotoxicidad en modelos animales, mediante su inhibición genética y farmacológica (Guemez-Gamboa *et al.*, 2011), lo que concuerda con lo reportado por otros grupos (Altenhöfer *et al.*, 2012).

En el presente estudio, corroboramos que los ratones NOX-2 KO son menos susceptibles al daño excitotóxico comparados con los ratones WT, evidenciado por una lesión más pequeña y un menor número de células positivas a FjB en ratones NOX-2 KO tratados con glutamato (Figura 9). Así mismo, también, corroboramos que las NOX aumentan su actividad en respuesta a la administración de glutamato y que dicho aumento depende mayormente de la NOX-2, la cual se asocia al aumento del daño excitotóxico. Encontramos que en este modelo, el aumento presentó dos picos máximos (1 y 12 h después de la administración de glutamato); dado que ambos picos de actividad de las NOX ocurren con 12 h de diferencia (Fig. 10), dado lo anterior, sugerimos que cada uno obedece a un mecanismo distinto de activación. Nuestra hipótesis es que, el primer aumento en ERO es parte de la respuesta directa al aumento extracelular de glutamato, mientras que el segundo aumento corresponde a la respuesta celular promovida para la recuperación de la homeostasis; sin embargo, se requieren más estudios para probar esta posibilidad.

Nuestros resultados corroboran que la deficiencia de NOX-2 se asocia con una menor activación de caspasa-3 (Figura 12), probablemente como resultado de una disminución en las vías de señalización apoptótica. Es probable, sin embargo, que el efecto neuroprotector observado en los ratones NOX-2 KO también sea resultado de la disminución del daño inicial y de una menor producción de mediadores que activen vías de señalización de muerte. Estos hallazgos correlacionan con trabajos previos, en los cuales se reportó que el aumento de la actividad de NOX-2 se asocia con la activación de caspasa-3 y, por lo tanto, con la muerte apoptótica (Gomez-Gamboa y Moran, 2009; Altmhöfer *et al.*, 2012). Es importante enfatizar que el daño excitotóxico incluye otros mecanismos de muerte celular (necrosis y autofagia) y que la falta de actividad de NOX-2 no previene completamente la muerte celular.

Las lesiones del cuerpo estriado generalmente se traducen en pérdida en la función sensoriomotora y la ejecución del movimiento de extremidades delanteras. Nuestros resultados muestran una clara correlación entre el tamaño de la lesión y la función motora. Tanto en ratones WT como en NOX-2 KO tratados con glutamato, la función motora inicial se vio afectada de manera similar, probablemente debido a la acción del glutamato en los circuitos neuronales del estriado. Sin embargo, esta condición mejora más rápido en los animales NOX-2 KO, de acuerdo con el daño observado en ambos grupos de animales (Figura 13). El aumento de la actividad de NOX-2 es relevante para el daño excitotóxico y el proceso inflamatorio, ya que se sugiere que contribuye, junto con las citocinas proinflamatorias, al deterioro de la función y al daño secundario orquestado por microglia y amplificado por la astrogliá (Lawrence *et al.*, 1998; Pepe *et al.*, 2017).

La inflamación persistente puede promover una lesión tisular secundaria a través del exceso de producción de factores proinflamatorios, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Estos factores proinflamatorios promueven la polarización de la microglia y astrogliá al fenotipo M1 y A1 respectivamente, lo que a su vez causa la muerte neuronal. La suma de estos eventos resulta en el aumento de la lesión inicial y una mala resolución del daño. En un estudio anterior, observamos que durante el daño excitotóxico la microglia activada en los ratones NOX-2 KO mostraba diferentes características morfológicas en comparación con los

animales WT (Guemez-Gamboa *et al.*, 2011). En el presente trabajo, observamos que los ratones NOX-2 KO, no solo exhiben cambios en la morfología microglial, sino un perfil diferente de producción de citocinas. En este modelo encontramos que el patrón de producción de citocinas en los ratones NOX-2 correspondió al aumento de citocinas antiinflamatorias como la IL-4, la IL-10 y el TGF- β , solo unas horas después del inicio de la lesión (Figura 14).

Como se esperaba, observamos un aumento en la producción de IL-1 β después de 6 y 12 h de tratamiento con glutamato. Sin embargo, en el caso de la IL-1 β no se observaron diferencias entre los ratones WT y NOX-2 KO después del tratamiento con glutamato (Figura 14). Esto contrasta con los resultados observados en un modelo de traumatismo cerebral, donde la deficiencia de la NOX-2 indujo una expresión más baja de IL-1 β después del trauma (Pawate *et al.*, 2004). Este hallazgo podría explicarse por evidencia en otros modelos, en los cuales, se ha sugerido que las ERO mitocondriales también desempeñan un papel clave en el proceso inflamatorio a través de la activación del inflamasoma NLRP3, el cual regula enzimáticamente la producción de IL-1 β (Dostert *et al.*, 2008; Heid *et al.*, 2013). Adicionalmente, a pesar de que inicialmente se sugirió que las ERO derivadas de NOX eran necesarias para la activación del inflamasoma NLRP3 (Hornung *et al.*, 2008), se ha visto que en macrófagos de ratón deficientes en NOX, la producción de IL-1 β no se ve afectada (Pal *et al.*, 2016). Esta observación sugiere que los mecanismos involucrados en la activación de NLRP3 y la producción de IL-1 β dependen de la fuente que produce ERO y del mecanismo de lesión. Posiblemente en nuestras condiciones experimentales, otras fuentes de ERO diferentes a las NOX, intervienen de manera más relevante en la producción de IL-1 β .

Uno de los hallazgos más notables en este estudio es que en los ratones NOX-2 KO, la producción de IL-4 aumenta rápidamente durante el proceso excitotóxico, lo que correlaciona con informes anteriores, que sugieren que la IL-4 contribuye a la polarización de la microglia y la astrogliá a un fenotipo M2 y A2 respectivamente, la cual promueve una respuesta antiinflamatoria. Evidencia reciente muestra que las neuronas que sobreviven a un estímulo nocivo (por ejemplo, isquemia) responden aumentando la producción y liberación de IL-4 (Kim *et al.*, 2015). Aunque los efectos de la IL-4 en la supervivencia

neuronal no se han descrito ampliamente, se sabe que su aumento puede promover la liberación de factores neurotróficos que favorecen la reparación axonal y la supervivencia neuronal.

En el estudio actual, el aumento de IL-4 en los ratones NOX-2 KO sugiere que NOX-2 podría participar en la regulación negativa de esta interleucina. Esto puede influir directamente en la dinámica de la respuesta inflamatoria, ya que la IL-4 contribuye de manera decisiva a la adquisición de un fenotipo microglial antiinflamatorio productor de IL-10. También cabe destacar que durante el daño excitotóxico, el aumento de la actividad de NOX-2 se correlacionó temporalmente, con la disminución de las citocinas antiinflamatorias y el aumento de los mediadores proinflamatorios, lo que coincide con lo informado por otros grupos que postulan que las NOX regula la producción y liberación de citocinas antiinflamatorias (Ferreira *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2017).

De manera interesante, encontramos que la producción de IL-10 también se incrementa notablemente, probablemente inducida por la IL-4 (Lobo-Silva *et al.*, 2016), como se mencionó arriba. Se sabe que la estimulación de los receptores microgliales IL-4R α promueven la activación de varias vías de señalización, incluida la activación de Janus kinase 3 / transcription 6 (JAK3 / STAT6) y el sustrato receptor de insulina 2 (IRS2). Esta situación promueve la expresión de IL-10 por el factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NF κ B) y regula negativamente la producción de interleucinas proinflamatorias por el supresor de la señalización de citocinas 1 (CS1) (Ferreira *et al.*, 2014).

Se sabe que la unión de IL-10 a sus receptores neuronales (IL-10R) activa la vía JAK2 / STAT3, lo que reduce el estrés oxidante y promueve la supervivencia neuronal (Zhu *et al.*, 2017). Es posible que parte de la disminución en la activación de caspasa-3 y la muerte celular observada en los animales NOX-2 KO sea una consecuencia de la disminución en la producción de ERO inducida por la activación del IL-10R durante el evento excitotóxico. En nuestro modelo, una única dosis intraestriatal de la IL-10 recombinante disminuyó la activación de caspasa-3 en ratones WT sometidos a daño excitotóxico (Figura 20); cabe

destacar que la concentración de IL-10 administrada, fue similar a la encontrada en los ratones NOX-2 KO sometidos al evento excitotóxico. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con IL-10 regula negativamente la actividad de las NOX (Figura 19), lo que también podría estar asociado con la reducción del estrés oxidante y con la disminución de la muerte neuronal.

En contraste con lo que observamos en los ratones NOX-2 KO (Figura 12), la administración de IL-4 no disminuyó la activación de la caspasa-3 inducida por el tratamiento con glutamato en la fase inicial (3 y 6 h), sino hasta las 12 y 24 h (Figura 17). Esto sugiere que la acción neuroprotectora de la IL-4 podría ser relevante solo durante la fase secundaria, siendo el proceso inflamatorio el objetivo más probable. Esto concuerda con que la administración de una dosis única de IL-4 reduce notablemente el volumen de la lesión (Figura 15), pero de nuevo, sus efectos sobre la disminución de la actividad de NOX (Figura 16) y la actividad de la caspasa-3 dependen de la activación de otros intermediarios.

En función de nuestros hallazgos, incluido el curso temporal de los diferentes parámetros evaluados, podemos delimitar dos fases en la progresión del daño neuronal inducido por la administración de glutamato: una respuesta inicial, desde la administración de glutamato y hasta las 6 h posteriores y una respuesta secundaria, desde 6 h y hasta 24 h después del procedimiento. En ratones WT, la fase inicial se caracteriza por un aumento en la actividad de NOX y la producción de IL-12, lo que promueve un estado proinflamatorio y un deterioro severo de la función motora. Durante la respuesta secundaria, predomina un entorno proinflamatorio (aumento de la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como de la actividad de NOX), que promueve la muerte neuronal apoptótica. En contraste, en los ratones NOX-2 KO, la respuesta inicial se caracteriza por un aumento en la producción de IL-4 e IL-10, lo que probablemente contribuye a una disminución de la muerte apoptótica y una mejor recuperación funcional (Figura 22)

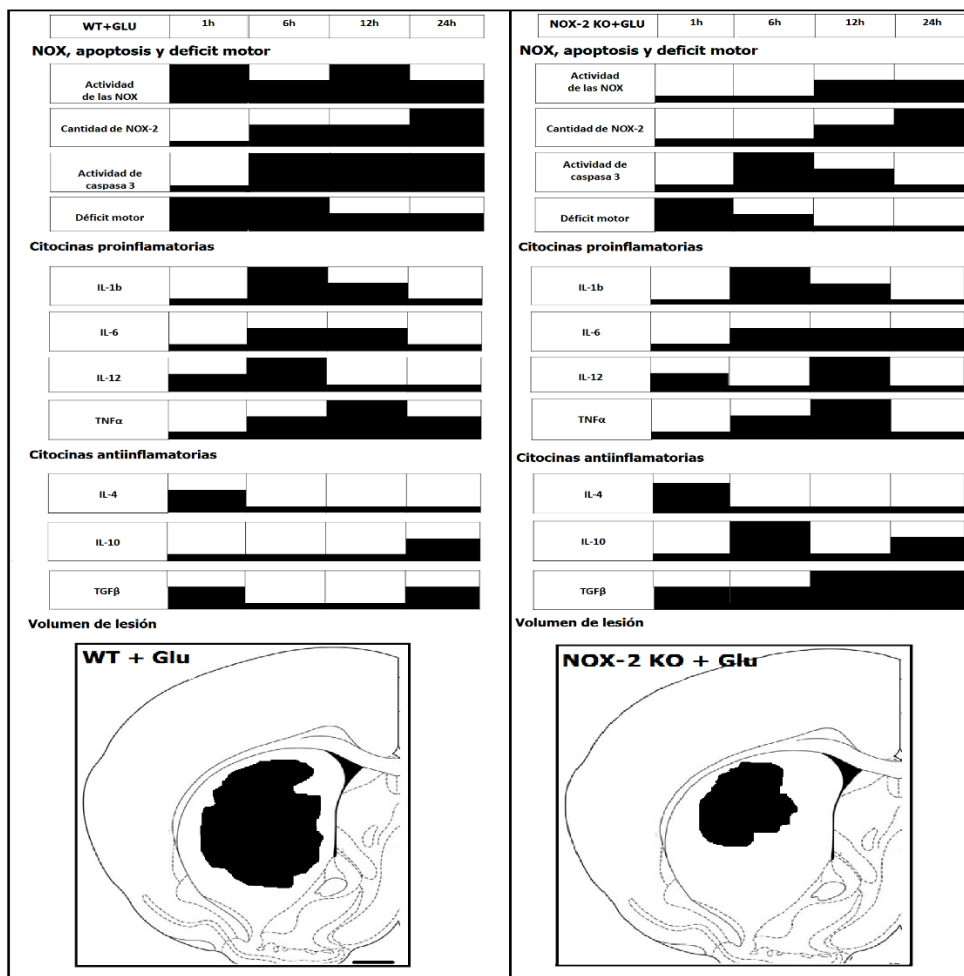


Figura 22. Curso temporal de la muerte celular, déficit motor y respuesta inflamatoria. Curso temporal comparativo entre los parámetros medidos en los ratones WT (columna izquierda) vs los ratones NOX-2 KO (Columna derecha).

En conjunto, estos resultados nos llevan a proponer que la neuroprotección resultante de la inhibición genética de NOX-2 podría deberse, al menos parcialmente, al aumento temprano de la producción de citocinas antiinflamatorias, lo que a su vez disminuye la lesión secundaria al daño excitotóxico y mejora la recuperación funcional (Figura 23).

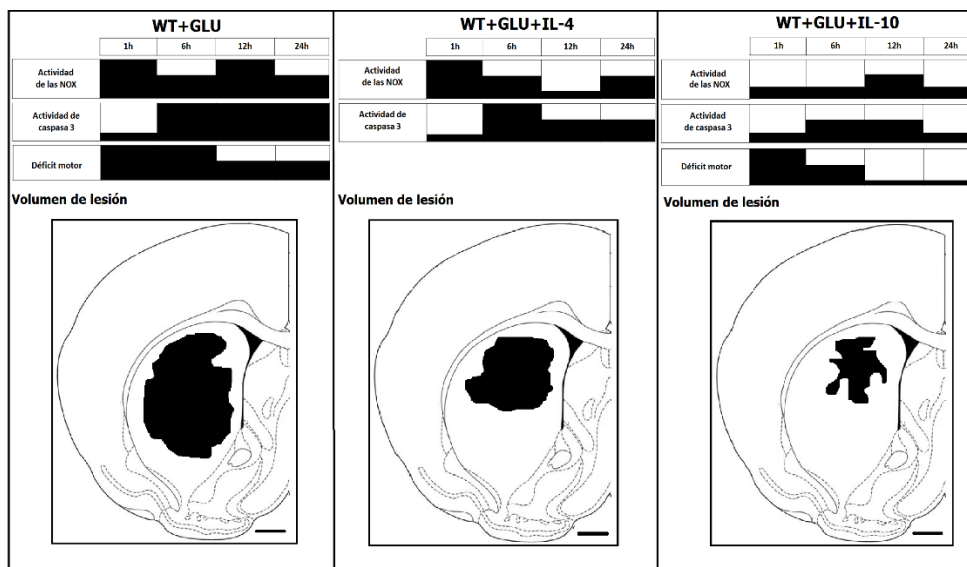


Figura 23. Curso temporal de la activación de las NOX, la caspasa 3 activada y el déficit motor en animales WT tratados con IL-4 e IL-10. Curso temporal comparativo entre los parámetros medidos en los ratones WT tratados con glu (columna izquierda) vs los ratones WT tratados con glu+IL-4 (columna central) vs los ratones tratados con glu+IL-10 (Columna derecha).

12. Conclusiones

La liberación de citocinas proinflamatorias durante el evento excitotóxico promueve la muerte apoptótica de las neuronas que sobrevivieron al daño inicial después de la administración de glutamato. Durante el proceso excitotóxico y la respuesta inflamatoria posterior, las ERO generadas por la NOX-2 desempeñan un papel decisivo en la extensión de la lesión y, por consiguiente, en la gravedad del compromiso funcional. La neuroprotección observada en ratones NOX-2 KO podría deberse, a una respuesta diferencial contra el daño excitotóxico, caracterizada por una mayor producción de citocinas antiinflamatorias, como la IL-4, lo que contribuye a su vez a la producción de IL-10, citocina ampliamente caracterizada como neuroprotectora (Figura 24).

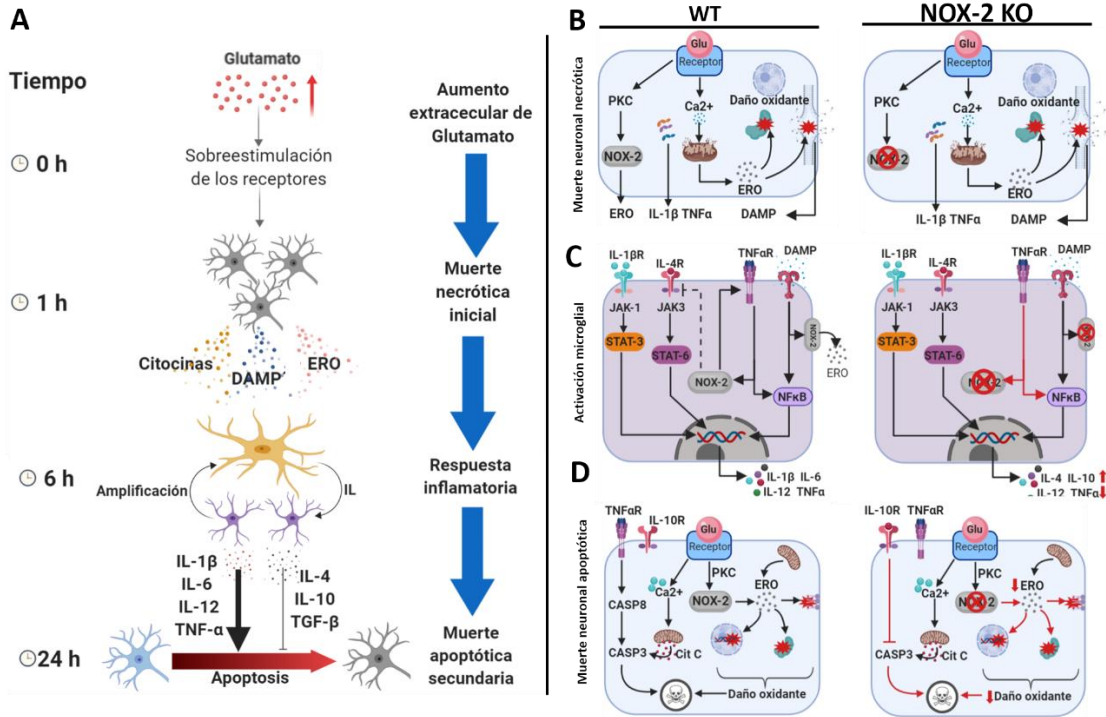


Figura 24. Modelo propuesto del daño excitotóxico y la respuesta inflamatoria secundaria en ratones NOX-2 KO. (A) Representación de la progresión del daño excitotóxico y la respuesta inflamatoria secundaria, en animales WT. Propuesta del mecanismo de neuroprotección observada en ratones NOX-2 KO en (B) la muerte neuronal inicial, (C) la activación de la microglia y (D) la muerte neuronal apoptótica secundaria.

13. Bibliografía referida

- Almeida A, Heales SJ, Bolanos JP, Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res.* 1998;790(1-2): 209-16.
- Altenhöfer S, Kleikers PW, Radermacher KA, Scheurer P, Rob Hermans J, Schiffers P, Ho H, Wingler K, Schmidt HH. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease *Cell Mol Life Sci*; 2012;69(14):2327–43. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1010-9>.
- Amaal AlDakheel, Lorraine V. Kalia, and Anthony E. Lang. Pathogenesis-Targeted, Disease-Modifying Therapies in Parkinson Disease. *Neurotherapeutics*. 2014 Jan; 11(1): 6–23. doi: 10.1007/s13311-013-0218-1
- Amani M, Zolghadrasab M, Salari AA. NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiol Behav*. 2019 Apr 1; 202:52-61. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.01.005.
- Araujo IM, Carreira BP, Carvalho CM, Carvalho AP. Calpains and delayed calcium deregulation in excitotoxicity. *Neurochem Res*. 2010; 35(12):1966-9.
- Athos J, Storm DR. High precision stereotaxic surgery in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2001 May; Appendix 4: Appendix 4A. doi: 10.1002/0471142301.nsa04as14.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. “Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria” *En FEBS Letters*. 2001; 497(1):1-5.
- Battle M, Ferri L, Andrade C, Ortega F, Vidal-Taboada J, Pugliese M, Mahy N, Rodríguez M. Astroglia-microglia cross talk during neurodegeneration in the rat hippocampus. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:102419. doi.org/10.1155/2015/102419.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):245-313.
- Bell RM, Cave AC, Johar S, Hearse DJ, Shah AM, Shattock MJ. Pivotal role of NOX-2-containing NADPH oxidase in early ischemic preconditioning. *FASEB J*. 2005 Dec;19(14):2037-9.
- Benvenisten E, Nguyen V, O’Keefe G. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer’s disease. *Neurochem. Internat*. 2001; 39, 381–391.
- Bergles D E, Diamond J S, Jahr C E. Clearance of glutamate inside the synapse and beyond. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9:29-38.
- Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle JC, Malva JO, Vezzani A. Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1beta release. *J Neurochem*. 2008 Jul;106(1):271-80. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05387.x
- Boddaert J, Bielen K, 's Jongers B, Manocha E, Yperzeele L, Cras P, Pirici D, Kumar-Singh S. CD8 signaling in microglia/macrophage M1 polarization in a rat model of cerebral ischemia. *PLoS One*. 2018 Jan 17;13(1):e0186937. doi: 10.1371/journal.pone.0186937.
- Boldyrev A, Carpenter D, Huentelman M, Peters C, Johnson P. “Sources of reactive oxygen species production in excitotoxin-stimulated cerebellar granule cells”. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 256:320-3240.
- Bouet V, Boulouard M, Toutain J, Divoux D, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Freret T. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc*. 2009;4(10):1560–4. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.125>.
- Brait V, Jackman K, Walduck A, Selemidis S, Diep H, Mast A, Guida E, Broughton B, Drummond G, and Sobey C. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010, 30: 1306–1317.
- Brennan A, Won S, Joon S, Narasimhan P, Kauppinen T, Lee H, Edling Y, Chan P, Swanson R. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience* 2009, 12(7):857-864.
- Brennan-Minnella AM, Shen Y, El-Benna J, and Swanson RA. Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death. *Cell Death Dis* 2013, 4: e624.
- Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans*. 2007 Nov;35(Pt 5):1119-21.
- Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*. 2010 Nov 1;23(3):153-65. doi: 10.1016/j.niox.2010.06.001. Epub 2010 Jun 12.
- Buschman TJ, Miller EK. Goal-direction and top-down control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014 Nov 5;369(1655). pii: 20130471. doi: 10.1098/rstb.2013.0471.
- Buot A, Yelnik J. Functional anatomy of the basal ganglia: limbic aspects. *Rev Neurol (Paris)*. 2012 Aug-Sep;168(8-9):569-75. doi: 10.1016/j.neurol.2012.06.015.
- Canton J, Grinstein S. Priming and activation of NADPH oxidases in plants and animals. *Trends Immunol*. 2014 Sep;35(9):405-7. doi: 10.1016/j.it.2014.07.007.

- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 2016 Jul;15(8):869-881. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00114-9.
- Chandran R, Kim T, Mehta SL, Udho E, Chanana V, Cengiz P, Kim H, Kim C, Vemuganti R. A combination antioxidant therapy to inhibit NOX2 and activate Nrf2 decreases secondary brain damage and improves functional recovery after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017: 271678X17738701. <https://doi.org/10.1177/0271678X17738701>.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49(3):481-493.
- Chen H, Kim GS, Okami N, Narasimhan P, and Chan PH. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation. *Neurobiol Dis* 2011 42: 341-348.
- Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol.* 2012 Oct;167(4):699-719. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02025.x.
- Choi BY, Kim JH, Kho AR, Kim IY, Lee SH, Lee BE, Choi E, Sohn M, Stevenson M, Chung TN, Kauppinen TM, Suh SW. Inhibition of NADPH oxidase activation reduces EAE-induced white matter damage in mice. *J Neuroinflammation.* 2015 May 28;12:104. doi: 10.1186/s12974-015-0325-5.
- Choi HS, Park JH, Ahn JH, Hong S, Cho JH, Won MH, Lee CH. The anti-inflammatory activity of duloxetine, a serotonin/norepinephrine reuptake inhibitor, prevents kainic acid-induced hippocampal neuronal death in mice. *J Neurol Sci.* 2015;358(1-2):390-7. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.10.001>.
- Chuhma N, Tanaka K, Hen R, Rayport S. Functional connectome of the striatal medium spiny neuron. *J Neurosci.* 2011 Jan 26;31(4):1183-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3833-10.2011
- Coyoy A, Valencia A, Guemez-Gamboa A, Morán J. Role of NADPH oxidase in the apoptotic death of cultured cerebellar granule neurons. *Free Radic Biol Med.* 2008 Oct 15;45(8):1056-64. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.027.
- Da Silva F. H, Arnolds HD, Neijt C. A functional link between the limbic cortex and ventral striatum: 205-14.the subiculum accumbens pathway. *Physiology of Brain Res.* 1984;55(2).
- Dager SR, Richards T, Strauss W, Artru A. Singlevoxel HMRS investigaron on brain metabolic changes during lactate induced panic. *Psy Res* 1977; 76: 89-99.
- Dai Y, Zhang H, Zhang J, Yan M. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF-κB pathway. *Chem Biol Interact.* 2018; Mar 25; 284:32-40. doi: 10.1016/j.cbi.2018.02.017.
- Dang PM, Fontayne A, Hakim J, El Benna J, and Perianin A. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptide-mediated neutrophil respiratory burst. *J Immunol* 2001, 166: 1206-1213.
- Dantzer R, Wollman EE. Relationships between the brain and the immune system. *J Soc Biol.* 2003;197(2):81-8.
- Diaz-Arrastia R, Kochanek P, Bergold P, Kenney K, Marx C, Grimes C. Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the department of defense neurotrauma pharmacology workgroup. *J Neurotrauma.* 2014; 31:135-58. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.301>.
- Dinarello C. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol.* 2007; Nov; 37(Suppl 1): S34-S45. doi: 10.1002/eji.200737772
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(4): 379-87.
- Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 2008;320(5876):674-7. <https://doi.org/10.1126/science.1156995>.
- Dykens J, Stern A, Trenkner E. "Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury". *J Neurochem.* 1987; 49(4):1222-1228.
- Dzialo J, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Excitotoxicity and Wallerian degeneration as a process related to cell death in nervous system. *Arch Ital Biol.* 2013 Jun;151(2):67-75. doi: 10.4449/aib.v151i2.1471.
- Estrada-Sánchez AM, Montiel T, Segovia J. Glutamate toxicity in the R6/2 Huntington's disease transgenic mice is age-dependent and correlates with decreased levels of glutamate transporters. *Neurobiol Dis.* 2009; 34:78-86. doi: 10.1016/j.nbd.2008.12.017.
- Evans AE, Kelly CM, Precious SV, Rosser AE. Molecular regulation of striatal development: a review. *Anat Res Int.* 2012;2012:106529. doi: 10.1155/2012/106529.
- Fang XX, Sun GL, Zhou Y, Qiu YH, Peng YP. TGF-β1 protection against Aβ1-42-induced hippocampal neuronal inflammation and apoptosis by TβR-I. *Neuroreport.* 2018 Jan 17;29(2):141-146. doi: 10.1097/WNR.0000000000000940.
- Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA. Glutamate receptors and their association with other neurochemical parameters in excitotoxicity. In: Farooqui AA, Ong WY, Horrocks LA, editors. *Neurochemical aspects of excitotoxicity.* New York: Springer; 2008. p. 105-36.
- Ferreira R, Lively S, Schlichter LC. IL-4 type 1 receptor signaling up-regulates KCNN4 expression and increases the KCa3.1 current and its contribution to the migration of alternative-activated microglia. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:183 <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00183>.
- Fischer AJ, Zelinka C, Milani-Nejad N. Reactive retinal microglia, neuronal survival, and the formation of retinal folds and detachments. *Glia.* 2015 Feb;63(2):313-27. doi: 10.1002/glia.22752.

- Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, Chesselet MF. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol*. 2004; 187:418–29. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.01.023>.
- Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK. Microglia induce motor neuron death via the classical NF- κ B pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron*. 2014 Mar 5;81(5):1009-1023. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.013.
- Franco R, Fernández-Suárez D. Alternatively, activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 2015; 131:65– 86. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.003>.
- Frerking M, Nicoll RA. Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol*. 2000 Jun;10(3):342-51.
- Fox CA, Andrade AN, Schwyn RC, Rafols JA. The aspiny neurons and the glia in the primate striatum: a golgi and electron microscopic study. *J Hirnforsch*. 1971-1972;13(4):341-62.
- Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B. Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*. 2000;98(1):41-53.
- Gallo V, Ghiani C A. Glutamate receptors in glia. New cells, new inputs and new functions. *Trends in Pharmacol Sci* 2000; 21:25-28.
- Gordon R, Anantharam V, Kanthasamy AG, Kanthasamy A. Proteolytic activation of proapoptotic kinase protein kinase C δ by tumor necrosis factor α death receptor signaling in dopaminergic neurons during neuroinflammation. *J Neuroinflammation*. 2012 Apr 27;9:82. doi: 10.1186/1742-2094-9-82.
- Gouaux E. Structure and function of AMPA receptors. *J Physiol*. 2004 Jan 15; 554(Pt 2): 249–253. doi: 10.1113/jphysiol.2003.054320
- Gouveia TL, Scorza FA, Iha HA, Frangiotti MI, Perosa SR, Cavalheiro EA, Silva JA Jr, Feliciano RS, de Almeida AC, Naffah-Mazzacoratti MG. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators during epileptogenesis in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2014 Jul; 36:68-73. doi: 10.1016/j.yebeh.2014.04.009.
- Grabert K, Michoel T, Karavolos M, Clohisey S, Baillie J, Stevens M, Freeman T, Summers K, McColl W. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to ageing. *Nat Neurosci*. 2016 Mar; 19(3): 504–516. doi: 10.1038/nn.4222
- Graveland GA, DiFiglia M. The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Res*. 1985 Feb 18;327(1-2):307-11.
- Gross E, Sevier CS, Heldman N, Vitu E, Bentzur M, Kaiser CA, et al. Generating disulfides enzymatically: reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2006;103(2):299–304
- Guemez A, Estrada A, Montiel T, Páramo B, Massieu L, Morán J. Activation of NOX2 by the stimulation of ionotropic and metabotropic glutamate receptors contributes to glutamate excitotoxicity in vivo through the production of reactive oxygen species and calpain activation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011, 70(11):1020-1035.
- Guemez-Gamboa A, Morán J. NOX2 mediates apoptotic death induced by staurosporine but not by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 2009 Aug 15;87(11):2531-40. doi: 10.1002/jnr.22079.
- Guerriero R, Giza C, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015; 15:27. <https://doi.org/10.1007/s11910-015-0545-1>.
- Harms AS, Lee JK, Nguyen TA, Chang J, Ruhn KM, Treviño I, Tansey MG. Regulation of microglia effector functions by tumor necrosis factor signaling. *Glia*. 2012 Feb;60(2):189-202. doi: 10.1002/glia.21254.
- Heckmann BL, Tummers B, Green DR. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. *Cell Death Differ*. 2019 Jan;26(1):41-52. doi: 10.1038/s41418-018-0195-3.
- Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol*. 2013;191(10):5230–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301490>.
- Heinz Feneis, Wolfgang Dauber. Nomenclatura anatómica ilustrada. Cuarta edición, Alemania. Wolfgang Dauber. Masson, 2000.
- Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L1, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2018 Oct;21(10):1359-1369. doi: 10.1038/s41593-018-0242-x.
- Hill R, Singh I, Wang J, Hall E. Time courses of post-injury mitochondrial oxidative damage and respiratory dysfunction and neuronal cytoskeletal degradation in a rat model of focal traumatic brain injury. *Neurochem. Int*. 2017, 111 45–56. doi: 10.1016/j.neuint.2017.03.015
- Hinson H, Rowell S, Schreiber M. Clinical evidence of inflammation driving secondary brain injury: a systematic review. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015, 78 184–191. doi: 10.1097/TA.0000000000000468
- Hirano K, Chen WS, Chueng AL, Dunne AA, Seredenina T, Filipova A, Ramachandran S, Bridges A, Chaudry L, Pettman G, Allan C, Duncan S, Lee, KC, Lim J, Ma MT, Ong AB, Ye NY, Nasir S, Mulyanidewi S, Aw CC, Oon PP, Liao S, Li D, Johns DG, Miller ND, Davies CH, Browne ER, Matsuoka Y, Chen DW, Jaquet V, Rutter AR. Discovery of GSK2795039, a Novel Small Molecule NADPH Oxidase 2 Inhibitor. *Antioxid Redox Signal*. 2015; Aug 10;23(5):358-74. doi:10.1089/ars.2014.6202.

- Hong H, Kim BS, Im HI. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Int Neurol*. 2016; May;20(Suppl 1): S2-7. doi:10.5213/inj.1632604.302.
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8): 847–56. <https://doi.org/10.1038/ni.1631>.
- Inupakutika MA, Sengupta S, Devireddy AR, Azad RK, Mittler R. The evolution of reactive oxygen species metabolism. *J Exp Bot*. 2016 Nov;67(21):5933-5943. Epub 2016 Oct 14.
- Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 530-7.
- Johnstone JT, Morton PD, Jayakumar AR, Johnstone AL, Gao H, Bracchi-Ricard V, Pearse DD, Norenberg MD, Bethea JR. Inhibition of NADPH oxidase activation in oligodendrocytes reduces cytotoxicity following trauma. *PLoS One*. 2013 Nov 19;8(11):e80975. doi: 10.1371/journal.pone.0080975.
- Kaur C, Ling E. Study of the transformation of amoeboid microglial cells into microglia labelled with the isolectin Griffonia simplicifolia in postnatal rats. *Acta Anat (Basel)*. 1991; 142, 118–125.
- Kim DW, Lee JC, Cho JH, Park JH, Ahn JH, Chen BH, Shin BN, Tae HJ, Seo JY, Cho JH, Kang IJ, Hong S, Kim YM, Won MH, Kim IH. Neuroprotection of Ischemic Preconditioning is Mediated by Anti-inflammatory, Not Proinflammatory, Cytokines in the Gerbil Hippocampus Induced by a Subsequent Lethal Transient Cerebral Ischemia. *Neurochem. Res*. 2015; Sep;40(9):1984- 843 95. doi: 10.1007/s11064-015-1694-y.
- Kim J, Yang M, Son Y, Jang H, Kim D, Kim JC, Kim SH, Kang MJ, Im HI, Shin T, Moon C. Glial activation with concurrent up-regulation of inflammatory mediators in trimethyltin-induced neurotoxicity in mice. *Acta Histochem*. 2014 Oct;116(8):1490-500. doi: 10.1016/j.acthis.2014.09.003.
- Kim SY, Senatorov VV Jr, Morrissey CS, Lippmann K, Vazquez O, Milikovsky DZ, Gu F, Parada I, Prince DA, Becker AJ, Heinemann U, Friedman A, Kaufer D. TGFβ signaling is associated with changes in inflammatory gene expression and perineuronal net degradation around inhibitory neurons following various neurological insults. *Sci Rep*. 2017 Aug 9;7(1):7711. doi: 10.1038/s41598-017-07394-3.
- Klegeris A, McGeer PL. Rat brain microglia and peritoneal macrophages show similar responses to respiratory burst stimulants. *J Neuroimmunol*. 1994 Aug;53(1):83-90.
- Kreitzer AC. Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:127-47. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135422.
- Kumar A, Barrett JP, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav Immun*. 2016 Nov;58:291-309. doi: 10.1016/j.bbi.2016.07.158
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 2014; Apr; 115:157-88. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.006.
- Lambeth D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*. 2004, 4:181-189.
- Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Dec; 2(12): a009621. doi: 10.1101/cshperspect.a009621.
- Laurindo FR, Araujo TL, Abrahão TB. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum Antioxid Redox Signal. 2014 Jun 10;20(17):2755-75. doi: 10.1089/ars.2013.5605.
- Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ. Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *Eur J Neurosci*. 1998; Mar;10(3):1188-95.
- Lelli A, Gervais A, Colin C, Chéret C, Ruiz de Almodovar C, Carmeliet P, Krause KH, Boillée S, Mallat M. The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. *Glia*. 2013 Sep;61(9):1542-55. doi: 10.1002/glia.22540.
- Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol*. 2012; Sep;237(1):147-52. doi: 912 10.1016/j.expneurol.2012.06.011.
- Liou AK, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol*. 2003;69(2):103-42.
- Liu X, Miller B, Rebec G, David E. Protein expression in the striatum and cortex regions of the brain for a mouse model of Huntington’s disease. *J Proteome Res*. 2007;6(8):3134–42. <https://doi.org/10.1021/pr070092s>.
- Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*. 2016; Nov 24;13(1):297. doi: 10.1186/s12974-016-0763-8.
- Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*. 2002 Jul 4;3:7.
- Lu XY, Wang HD, Xu JG, Ding K, Li T. NADPH oxidase inhibition improves neurological outcome in experimental traumatic brain injury. *Neurochem Int*. 2014 Apr;69:14-9. doi: 10.1016/j.neuint.2014.02.006. Epub 2014 Feb 28.

- Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res.* 2014; Feb; 79:1-12. doi:10.1016/j.neures.2013.10.004.
- Ma MW, Wang J, Dhandapani KM, Brann DW. NADPH Oxidase 2 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Traumatic Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017:6057609. doi: 10.1155/2017/6057609.
- Maycotte P, Gumez-Gamboa A, Moran J. Apoptosis and autophagy in rat cerebellar granule neuron death: role of reactive oxygen species. *J Neurosci Res.* 2010;88(1):73–85. <https://doi.org/10.1002/jnr.22168>.
- Mayo L, Cunha AP, Madi A, Beynon V, Yang Z, Alvarez JI, Prat A, Sobel RA, Kobzik L, Lassmann H, Quintana FJ, Weiner HL. IL-10-dependent Tr1 cells attenuate astrocyte activation and ameliorate chronic central nervous system inflammation. *Brain.* 2016 Jul;139(Pt 7):1939-57. doi: 10.1093/brain/aww113.
- McCollum M, Leon R, Rush D, Guthrie K, Wei J. Striatal oligodendroglioneurogenesis and neuroblast recruitment are increased in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res.* 2013 Jun 26; 1518: 91–103. doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.030
- Mikita J, Dubourdieu-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canron MH, Franconi JM, Boiziau C, Petry KG. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler.* 2011; Jan;17(1):2-15. doi: 10.1177/1352458510379243.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166–73.
- Morganti JM, Riparip LK, Rosi. Call off the dog(ma): M1/M2 polarization is concurrent following traumatic brain injury. *PLoS One.* 2016;11(1): e0148001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148001>.
- Murchison D, Griffith WH. Mitochondria amortiguador non-toxic calcium loads and release calcium through the mitochondrial permeability transition pore and sodium/calcium exchanger in rat basal forebrain neurons. *Brain Res.* 2000;854(1-2):139-51.
- Nakajima M, Nito C, Sowa K, Suda S, Nishiyama Y, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Imagawa K, Hirato T, Ueda M, Kimura K, Okada T. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017; Jun 23; 6:102-111. doi: 10.1016/j.omtm.2017.06.005.
- Nauseef W. "Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases" *En Biochimica et Biophysica Acta.* 2013; 1840:757-767.
- Nayernia Z, Jaquet V, Krause H. "New Insights on NOX Enzymes in the Central Nervous System" *En Antioxidants & Redox Signaling.* 2014; 20(17):2815-2837.
- Nicholls DG, Ward MW. Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends Neurosci.* 2000;23(4):166-74.
- Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge G.L, Conn P.J, Ferraguti F, Schoepp D.D, Wroblewski T, Pinc J.P. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology.* 2011 Jun; 60(0): 1017–1041. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.10.022
- Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231.
- Olney JW. Excitatory transmitters and epilepsy-related brain damage. *Int Rev Neurobiol.* 1985; 27:337-62.
- Padgett LE, Burg AR, Lei W, Tse HM. Loss of NADPH oxidase-derived superoxide skews macrophage phenotypes to delay type 1 diabetes. *Diabetes.* 2015;64(3):937–46. <https://doi.org/10.2337/db14-0929>.
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, Singh AK. IL-4-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation inhibits NF-kappaB trans activation in central nervous system (CNS) glial cells and protects oligodendrocyte progenitors under neuroinflammatory disease conditions: implication for CNS-demyelinating diseases. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):4385-98.
- Pal R, Bajaj L, Sharma J, Palmieri M, Di Ronza A, Lotfi P, Chaudhury A, Neilson J, Sardiello M, Rodney GG. NADPH oxidase promotes Parkinsonian phenotypes by impairing autophagic flux in an mTORC1-independent fashion in a cellular model of Parkinson's disease. *Sci Rep.* 2016; 6:22866. <https://doi.org/10.1038/srep22866>.
- Palwinder M and Guy C. Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2005; 2: 20. doi: 10.1186/1742-2094-2-20
- Pamerter ME, Ali SS, Tang Q, Finley JC, Gu XQ, Dugan LL, and Haddad GG. An in vitro ischemic penumbral mimic perfusate increases NADPH oxidase-mediated superoxide production in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 2012, 1452: 165–172.
- Páramo B, Montiel T, Rivera-Martínez M, Morán J, Massieu L. Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013; Nov;45(11):2596-604. doi: 10.1016/j.biocel.2013.08.013.
- Park KW, Lee DY, Joe EH, Kim SU, Jin BK. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J Neurosci Res.* 2005; Aug 1;81(3):397-402. doi:10.1002/jnr.20483

- Paulsen C, Carroll K. Cystidine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical Reviews*. 2013 113:4633-4679.
- Pawate S, Shen Q, Fan F, Bhat NR. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon gamma. *J Neurosci Res*. 2004; 77(4):540–51. <https://doi.org/10.1002/jnr.20180>.
- Pepe G, De Maglie M, Minoli L, Villa A, Maggi 1023 A, Vegeto E. Selective proliferative response of microglia to alternative polarization signals. *J Neuroinflammation*. 2017; Dec 4;14(1):236. doi: 10.1186/s12974-017-1011-6.
- Pham-Huy LA, Hua He, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4(2):89–96.
- Pitts FN, McClure JN. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *N Engl J Med*. 1967 Dec 21;277(25):1329-36. DOI: 10.1056/NEJM196712212772502
- Pollock J, Williams D, Gifford M, Li L, Du X; Fisherman J, Orkin S, Doerschuk C; Dinauer M. Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. 1995. *Nat Genet* 9(2):202-9. Doi: 7719350MGI: J:22868
- Qin Y, Sun X, Shao X, Cheng C, Feng J, Sun W, Gu D, Liu W, Xu F, Duan Y. Macrophage-Microglia Networks Drive M1 Microglia Polarization After Mycobacterium Infection. *Inflammation*. 2015 Aug;38(4):1609-16. doi: 10.1007/s10753-015-0136-y.
- Ramón y Cajal S. *La Textura del Sistema Nervioso del Hombre y Los Vertebrados*, Vol. 3 Ed. Madrid: Imprenta de Nicolás Moya. 1904; 1609-45
- Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unquestimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 119–45
- Ravelli KG, Santos GD, Dos Santos NB, Munhoz CD, Azzi-Nogueira D, Campos AC, Pagano RL, Britto LR, Hernandez MS. Nox2-dependent Neuroinflammation in An EAE Model of Multiple Sclerosis. *Transl Neurosci*. 2019 Mar 26; 10:1-9. doi: 10.1515/tnsci-2019-0001.
- Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia*. 2007 May;55(7):758-71.
- Réus GZ, Fries GR, Stertz L, Badawy M, Passos IC, Barichello T, Kapczinski F, Quevedo J. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015 Aug 6; 300:141-54. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.018.
- Reyes RC, Brennan AM, Shen Y, Baldwin Y, and Swanson RA. Activation of neuronal NMDA receptors induces superoxide-mediated oxidative stress in neighboring neurons and astrocytes. *J Neurosci* 2012, 32: 12973–12978,
- Rich M, Keene C, Neher M, Johnson K, Yu Z, Ganivet A, Holers V, Stahel P. Site-targeted complement inhibition by a complement receptor 2- conjugated inhibitor (mTT30) ameliorates post-injury neuropathology in mouse brains. *Neurosci Lett*. 2016; 617:188–94. <https://doi.org/10.1016/j.jneulet.2016.02.025>.
- Rolls ET. Neurophysiology and cognitive functions of the striatum. *Rev Neurol (Paris)*. 1994 Aug-Sep;150(8-9):648-80.
- Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288: F1144–52. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00221.2004>.
- Savchenko VL. Regulation of NADPH oxidase gene expression with PKA and cytokine IL-4 in neurons and microglia. *Neurotox Res*. 2013 Apr;23(3):201-13. doi: 10.1007/s12640-012-9327-6.
- Schimmel SJ, Acosta S, Lozano D. Neuroinflammation in traumatic brain injury: A chronic response to an acute injury. *Brain Circ*. 2017 Jul-Sep;3(3):135-142. doi: 10.4103/bc.bc_18_17.
- Schmidt E, Morello F, and Pasterkamp R. Dissection and Culture of Mouse Dopaminergic and Striatal Explants in Three-Dimensional Collagen Matrix Assays. *J Vis Exp*. 2012; (61): 3691. doi: 10.3791/3691
- Schrader M, Fahimi HD. Review Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763(12):1755–1766.
- Shen J, Rastogi R, Geng X, Ding Y. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation and neuronal death after ischemic stroke. *Neural Regen Res*. 2019 Jun;14(6):948-953. doi: 10.4103/1673-5374.250568.
- Sheng WS, Hu S, Feng A, Rock RB. Reactive oxygen species from human astrocytes induced functional impairment and oxidative damage. *Neurochem Res*. 2013 Oct;38(10):2148-59. doi: 10.1007/s11064-013-1123-z.
- Segal A. (2016) “NADPH oxidases as electrochemical generators to produce ion fluxes and turgor in fungi, plants and humans” *En Open Biology* 6:1-15.
- Siegel, GJ. Wayne Albers, Scott T. Brady, Donald L. Price. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Edition 7, Elsevier Academic, 2006, 992 pages; 012088397X, 9780120883974
- Sorce S, Krause K, Jaquet V. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2012 69:2387-2407.
- Sorce S, Stocker R, Seredenina T, Holmdahl R, Aguzzi A, Chio A, Depaulis A, Heitz F, Olofsson P, Olsson T, Duveau V, Sanoudou D, Skosgater S, Vlahou A, Wasquel D, Krause K, Jaquet V. NADPH oxidases as drug targets and biomarkers in neurodegenerative diseases: What is the evidence? *Free Radic Biol Med*. 2017 Nov; 112:387-396. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.006.

- Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, and Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *J Clin Invest* 117: 910–918, 2007.
- Suh SW, Shin BS, Ma H, Van Hoecke M, Brennan AM, Yenari MA, and Swanson RA. Glucose and NADPH oxidase drive neuronal superoxide formation in stroke. *Ann Neurol* 2008, 64: 654–663.
- Taetzsch T, Levesque S, McGraw C, Brookins S, Luqa R, Bonini MG, Mason RP, Oh U, Block ML. Redox regulation of NF- κ B p50 and M1 polarization in microglia. *Glia*. 2015 Mar;63(3):423-40. doi: 10.1002/glia.22762.
- Tehse J, Taghibiglou C. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *Eur J Neurosci*. 2018 Dec 16. doi: 10.1111/ejn.14307.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:17907–11.
- Traynelis S, Wollmuth L, McBain C, Menniti F, Vance K, Ogden K, Hansen K, Yuan H, Myers S, Dingledine R. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep; 62(3): 405–496. doi: 10.1124/pr.109.002451
- Türeyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods*. 2004 Oct 30;139(2):203-7.
- Valko K, Ciesla L. Amyotrophic lateral sclerosis. *Prog Med Chem*. 2019; 58:63-117. doi: 10.1016/bs.pmch.2018.12.001.
- Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 2017; 222(5): 2017–2029. doi: 10.1007/s00429-017-1383-5
- Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 1: S191-203.
- Wang J, Ma MW, Dhandapani KM, Brann DW. Regulatory role of NADPH oxidase 2 in the polarization dynamics and neurotoxicity of microglia/macrophages after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med*. 2017 Dec; 113:119-131. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.017.
- Wang Y, Denisova JV, Kang KS, Fontes JD, Zhu BT, Belousov AB. Neuronal gap junctions are required for NMDA receptor-mediated excitotoxicity: implications in ischemic stroke. *J Neurophysiol*. 2010;104(6):3551-6.
- Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. 2011; 15(11):1382-402.
- Wang Z, Wei X, Liu K, Zhang X, Yang F, Zhang H, He Y, Zhu T, Li F, Shi W, Zhang Y, Xu H, Liu J, Yi F. NOX2 deficiency ameliorates cerebral injury through reduction of complexin II-mediated glutamate excitotoxicity in experimental stroke. *Free Radic Biol Med*. 2013; Dec; 65:942-51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.166.
- Wells J, Biernaskie J, Szymanska A, Larsen P, Yong VW, Corbett D. Matrix metalloproteinase (MMP)-12 expression has a negative impact on sensorimotor function following intracerebral hemorrhage in mice. *Eur J Neurosci*. 2005;21(1):187–96. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03829>.
- Willard S, Koochekpour S. Glutamate, Glutamate Receptors, and Downstream Signaling Pathways. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(9): 948–959. doi: 10.7150/ijbs.6426
- Wilson C, Muñoz E, González C. From birth to death: a role for reactive oxygen species in neuronal development. *Semin Cell Dev Biol*. 2018 Aug; 80:43-49. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.012.
- Xia CY, Zhang S, Gao Y, Wang ZZ, Chen NH. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol*. 2015; Apr;25(2):377-82. doi: 10.1016/j.intimp.2015.02.019.
- Yang CM, Hsieh HL, Yu PH, Lin CC, Liu SW. IL-1 β Induces MMP-9-Dependent Brain Astrocytic Migration via Transactivation of PDGF Receptor/NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species Signals. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):303-17. doi: 10.1007/s12035-014-8838-y.
- Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q, Yi F. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Apr;34(4):660-7. doi: 10.1038/jcbfm.2013.242.
- Yao H, Ago T, Kitazono T, Nabika T. NADPH Oxidase-Related Pathophysiology in Experimental Models of Stroke. *Int J Mol Sci*. 2017 Oct 11;18(10). pii: E2123. doi: 10.3390/ijms18102123.
- Yates B. Neurophysiology of Glutamate Receptors. *Int J Biol Sci*. 2013; 9(9): 948–959. doi: 10.7150/ijbs.6426
- Yelnik J1, François C, Percheron G, Tandé D. Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum. Morphological taxonomy of the neurons of the primate striatum.
- Zamanian J, Xu L, Foo L, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*. 2012 May 2;32(18):6391-410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
- Zhang L, Li Z, Feng D, Shen H, Tian X, Li H, Wang Z, Chen G. Involvement of Nox2 and Nox4 NADPH oxidases in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Free Radic Res*. 2017; Mar;51(3):316-328. doi: 10.1080/10715762.2017.1311015.
- Zhang XD, Wang Y, Zhang X, Han R, Wu JC, Liang ZQ, et al. p53 mediates mitochondria dysfunction triggered autophagy activation and cell death in rat striatum. *Autophagy*. 2009;5(3):339-50.
- Zhang L, Xie H, Cui L. Activation of astrocytes and expression of inflammatory cytokines in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Ther Med*. 2018 Dec;16(6):4401-4406. doi: 10.3892/etm.2018.6798.

- Zhao X, Zhang Y, Strong R, James C, Grotta A, Jaroslaw A. 15d-Prostaglandin J (2) activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, promotes expression of catalase, and reduces inflammation, behavioral dysfunction, and neuronal loss after intracerebral hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600233>.
- Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm.* 2014 Aug;121(8):799-817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
- Zhu Y, Liu Z, Peng YP, Qiu YH. Interleukin-10 inhibits neuroinflammation-mediated apoptosis of ventral mesencephalic neurons via JAK-STAT3 pathway. *Int Immunopharmacol.* 2017; 0:353–60. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.017>.
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* 2010; 140: 798-804.