



**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Rol del inmunoreceptor CD300f en la neuroinflamación

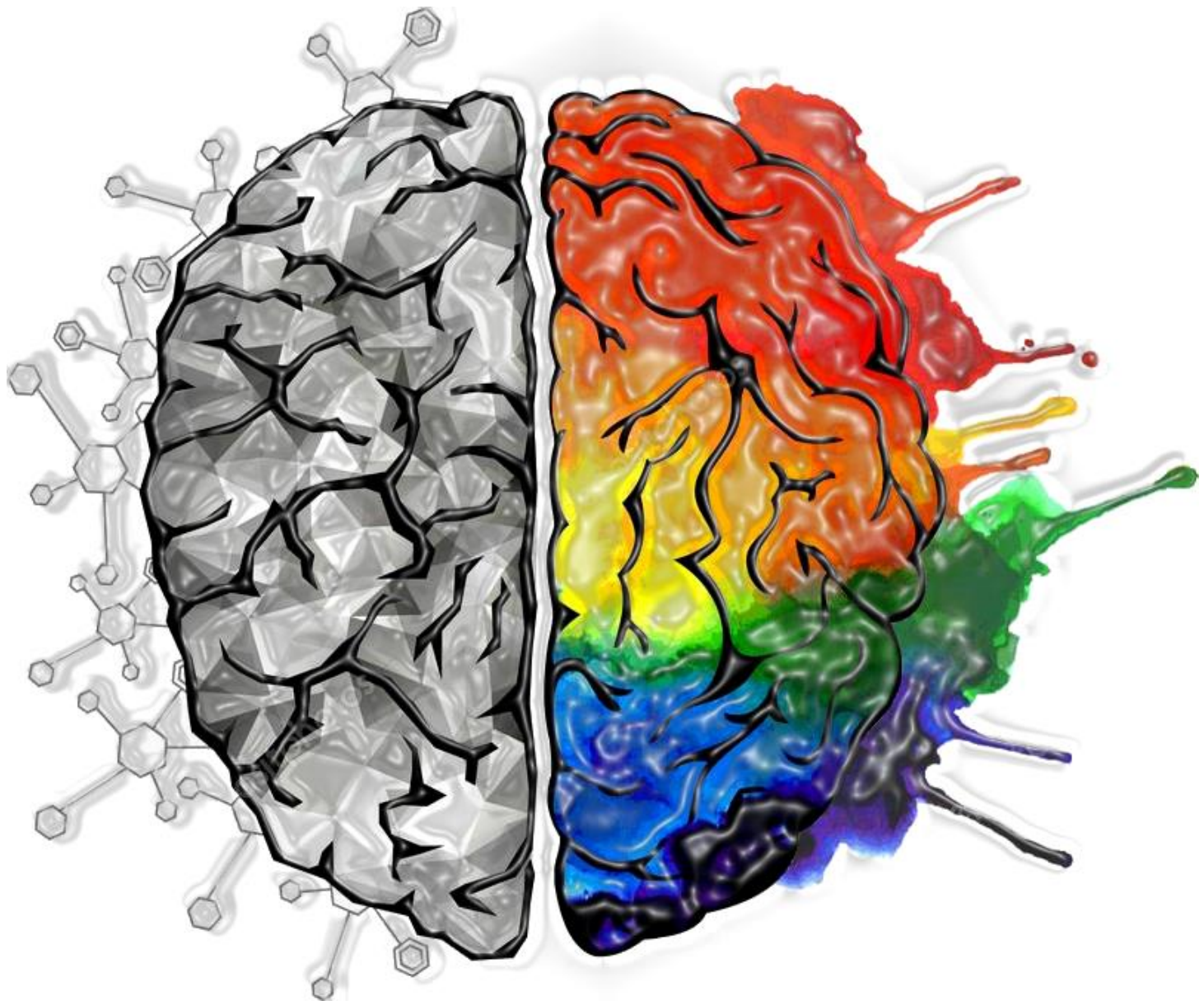
Fabio Andrés Cawen Curbelo

Orientador: PhD Hugo Peluffo

Co-Orientadora: MSc Luciana Negro

*Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica,
Institut Pasteur de Montevideo*

Diciembre 2017



*A mi familia,
por ser incondicionales siempre.*

“Todos somos científicos cuando somos niños, pero al crecer, solo algunos conservan un poco de esa curiosidad que es la madre de la ciencia.”

- Juan Aguilar M.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| Agradecimientos | iii |
| Resumen | 1 |
| Introducción | 3 |
| Trauma cerebral | 3 |
| La microglía..... | 6 |
| Patofisiología Neuroinflamatoria | 10 |
| La familia de inmunoreceptores CD300..... | 13 |
| CD300f | 15 |
| Terapia génica..... | 16 |
| Hipótesis | 21 |
| Objetivo General..... | 21 |
| Objetivos específicos | 22 |
| Mantenimiento de la colonia de ratones con mutación nula para CLM-1 | 22 |
| Objetivo específico 1: Evaluar los efectos de la ausencia del receptor CD300f en la regulación de la inflamación cerebral en condiciones basales así como luego de un estímulo inflamatorio sistémico..... | 22 |
| Objetivo específico 2: Comprender el papel del receptor CD300f en la regulación de la inflamación luego de un trauma cerebral. | 23 |
| Objetivo específico 3: Valorar los niveles de sobreexpresión temporal y espacial de CD300f mediante el uso de terapia génica en una lesión traumática aguda del SNC..... | 24 |
| Materiales y métodos | 25 |
| Genotipados..... | 25 |
| Modelo de LPS..... | 26 |
| Modelo de Trauma Encéfalo-Craneano..... | 29 |
| Terapia génica..... | 31 |
| Fundamentos de las técnicas utilizadas | 34 |
| PCR | 34 |
| PCR cuantitativa en tiempo real | 35 |
| Inmunohistoquímica | 38 |
| Resultados..... | 41 |
| Identificación del genotipo de los ratones | 41 |
| Modelo de LPS..... | 42 |
| Modelo de Trauma Encéfalo-Craneano..... | 47 |
| Terapia génica..... | 48 |
| Discusión | 51 |
| Referencias bibliográficas | 62 |

Agradecimientos

Parece mentira haber llegado a este momento, uno no sabe ni siquiera que escribir. Desde que tengo uso de razón he querido descubrir el porqué de las cosas, explorar y despejar dudas. Ya de más grande encontré en la Biología mi pasión, y un poco después la convertí en lo que quería dedicarme. Al mirar hacia atrás recuerdo mi llegada a Montevideo, dejando muchas cosas atrás, pero traía una valija llena de sueños. Ha sido una etapa dura, en ocasiones llena de desilusiones, pero mucho más de alegrías y satisfacciones. Sin dudas, me ha ayudado a formarme y madurar como persona y como futuro científico, me ha enseñado que con ilusión, constancia y esfuerzo casi todo puede lograrse.

Precisamente a mis padres y hermana les debo el estar hoy aquí y lo que soy. Me han ayudado, apoyado y han estado siempre a mi lado. Hay tanto para agradecerles que sería imposible plasmarlo aquí. Gracias por alentarme a perseguir mis sueños, por confiar siempre en mí y por animarme cada día a no tirar nunca la toalla. Esto es por y para ustedes.

Gracias a Hugo por haberme abierto las puertas y permitirme formar parte de su laboratorio. Por ayudarme y alentarme a llegar hasta acá.

A Luciana, por su comprensión, apoyo y paciencia durante todo este tiempo, aún en la distancia. Gracias por la ayuda, las discusiones y las enseñanzas. Por los momentos de risas dentro y fuera del laboratorio.

A los compañeros del laboratorio e instituto, que estuvieron siempre dispuestos a brindar su ayuda y discutir resultados.

Gracias a todos los compañeros con los que he tropezado en este camino de la ciencia, a los que aún hoy siguen y a los que han tomado nuevos rumbos, por hacer gratos los momentos de clase y aprendizaje compartidos. En especial a esos compañeros que se han convertido en amigos, sin dudas los más importantes.

Gracias a todos aquellos, familia, amigos y compañeros de trabajo que mostraron interés en lo que hacía aunque quizás nunca entendieron de qué se trataba.

Resumen

Se conoce que los receptores inmunes presentes en la superficie celular desempeñan un rol crítico en las respuestas inmunes. Hemos analizado la función del inmunoreceptor CD300f en dos modelos de neuroinflamación *in vivo* en ratones *knockout* (KO) para el receptor.

Se observó en un modelo de neuroinflamación “limpia” una reactividad exacerbada de la microglia en los ratones KO inyectados intraperitonealmente con LPS respecto a sus controles (inyectados con PBS), pero no con respecto al genotipo salvaje (WT) inyectado con LPS.

Adevertimos mayor número de células microgliales en la corteza cerebral de los animales KO controles respecto a los de genotipo salvaje (WT), descartando que esté ocurriendo una proliferación a tasas más elevadas que las observadas para progenitores neuronales hipocampales por epifluorescencia.

Mediante análisis de los cambios en los niveles de expresión de ARNm para genes inflamatorios y de marcadores homeostáticos por ensayos de qPCR tras el estímulo inflamatorio, no se encontró diferencias entre los genotipos. Sin embargo, sí fueron detectadas en los animales KO control tendencias a variaciones en algunos genes inflamatorios tras las condiciones estresantes de manipulación e inyecciones repetitivas.

En tanto, en un modelo de trauma encéfalo-craneano no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión génica estudiados a los 5 días post-lesión.

Finalmente, se valoraron mediante ensayos de inmunohistoquímica los niveles de sobre-expresión de CD300f humano y la proteína reportera GFP, 90 días luego de aplicadas estrategias de terapia génica con lentivectores y nanovecotes modulares

recombinantes directamente en el tejido nervioso. Se detectó únicamente expresión de GFP en células con morfología neuronal y astrocitaria, en zonas adyacentes a los sitios de inyección cuando se utilizó lentivirus como vectores de expresión.

Introducción

Este proyecto de fin de grado se desarrolló en el contexto de investigaciones que tienen como objetivo aportar al esclarecimiento de las implicancias fisiopatológicas en un trauma del Sistema Nervioso Central (SNC) y la búsqueda de posibles estrategias paliativas. Las lesiones traumáticas del SNC producto de accidentes de tránsito, trabajo, deportivos o por violencia, constituyen la mayor causa de muerte e invalidez en jóvenes menores de 40 años en nuestro país¹. Además de los obvios problemas que implica para la persona afectada y su familia, ocasiona elevados costos para el sistema de salud.

Trauma cerebral

El daño que se produce en el tejido nervioso luego del trauma focal se puede clasificar en dos tipos: injuria primaria e injuria secundaria. La injuria primaria es la que sucede inmediatamente al impacto, siendo de tipo mecánico e irreversible. En tanto la secundaria refiere a los complejos mecanismos fisiopatológicos, bioquímicos y estructurales que se activan luego de la primaria y se mantienen por un período de horas o días. Estos procesos conducen a una importante respuesta inflamatoria². Dicha respuesta es muy compleja y puede permanecer por meses e incluso años luego de la lesión, contribuyendo de manera importante en la expansión del daño primario³.

En los daños focales, se establecen dos zonas de lesión en función espacio-temporal: una zona temprana o núcleo de la lesión y otra adyacente más tardía periférica, llamada penumbra⁴.

El núcleo de la lesión consiste en células mayormente necróticas o apoptóticas muriendo rápidamente consecuencia del trauma y/o del entorno hipóxico. Los

cambios neuropatológicos en el núcleo de la lesión ocurren muy rápido, determinando una zona muy difícil de rescatar. Macroscópicamente, el daño incluye la ruptura de los tractos de sustancia blanca, contusiones focales, hematomas extra e intracerebrales y un aumento del volumen encefálico. A nivel celular, los procesos tempranos involucrados incluyen disrupción de la barrera hematoencefálica, microporación de membranas, y cambios conformacionales de proteínas⁴.

En tanto, la zona de penumbra es donde el tejido nervioso se encuentra menos seriamente comprometido (Figura 1); los cambios que ocurren son más graduales y progresivos, y conducen a una muerte celular predominantemente de tipo apoptótica.

La injuria secundaria se desarrolla en dicha zona, siendo más lenta y gradual, ofreciendo una gran oportunidad para opciones terapéuticas. Actualmente no existen fármacos capaces de frenar o disminuir la cascada de mecanismos fisiopatológicos asociados a la lesión secundaria, haciendo necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas para afrontar este problema⁴.

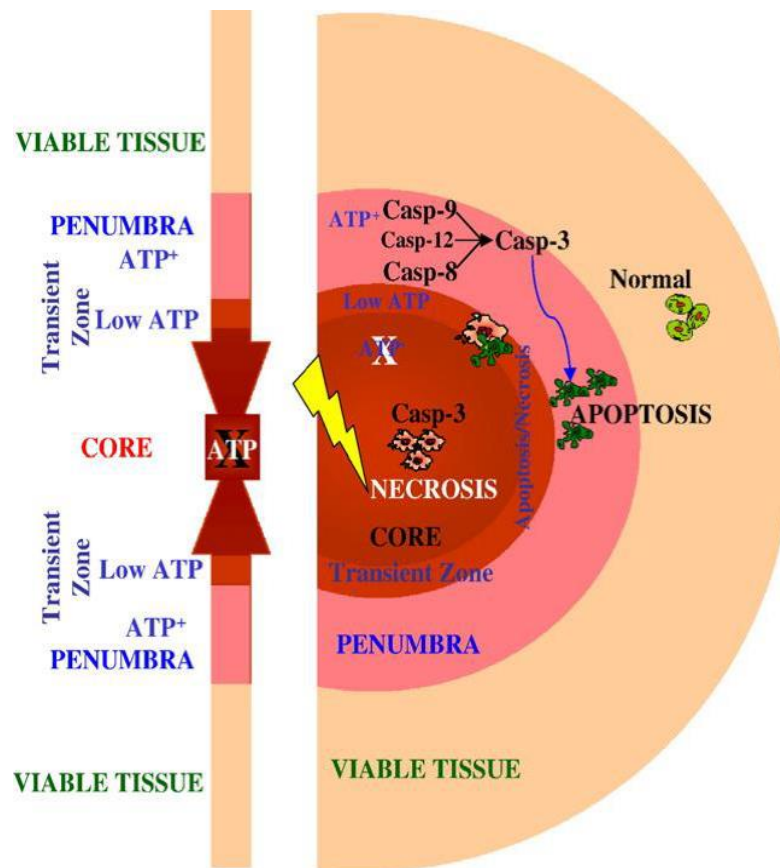


Figura 1| Daño cerebral durante la isquemia. En la figura se representan las distintas regiones que se definen luego de una lesión cerebral de tipo focal: La región central o núcleo, representa zona donde las células sufren necrosis. La región que rodea al núcleo es llamada penumbra, un sitio de muerte celular retardada (de tipo apoptótica) debido entre otras cosas a la disponibilidad de ATP. Una zona de transición entre el centro de la lesión y la penumbra se mezclará con el centro si el flujo sanguíneo cerebral no es restaurado a tiempo. Esta zona puede ser rescatada cuando se trata en una ventana temporal adecuada. La penumbra se encuentra rodeada por una región de tejido viable. Tomado de "Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics"⁵²

El SNC ha sido considerado inmunoprivilegiado por mucho tiempo, pero esto está lejos de ser verdad. Las células del SNC tienen funciones inmunes innatas expresando variedad de receptores capaces de detectar y eliminar células apoptóticas y de regular las respuestas inflamatorias. De todas las células presentes, las células microgliales, derivadas de los mismos precursores mesenquimáticos que dan origen a la médula ósea, son el principal componente del sistema inmune innato del SNC.

La microglía

Se trata de células residentes del sistema inmune en el SNC y se cree que migran hacia este durante el desarrollo⁵.

Fueron descritas por primera vez por del Río-Hortega en los principios del siglo XX y representan el 10-20% de la población total de células del Sistema Nervioso⁶.

Constituyen la primera línea de defensa frente a patógenos, reconociendo, secuestrando y procesando antígenos, así como los mediadores primarios frente a injuria o enfermedad. Además, participan activamente en procesos relacionados con la comunicación y homeostasis neuronal.

Son células dinámicas, que censan constantemente su microambiente para agentes nocivos y procesos perjudiciales⁷. Responden a señales extracelulares y son responsables de la limpieza de los desechos y sustancias tóxicas mediante la fagocitosis, manteniendo de esta manera la homeostasis normal del SNC. Para detectar potenciales injurias perjudiciales expresan un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones que reconocen pequeños motivos moleculares en patógenos o factores asociados con el daño tisular, haciendo posible la identificación y reacción frente a estos eventos⁸. Además, la microglía expresa receptores para un número de factores que están relacionados con el daño neuronal, incluyendo ATP, glutamato, factores de crecimiento, y citoquinas.

Modelos de daño cerebral traumático en animales han mostrado que las células microgliales migran rápidamente hacia el tejido lesionado, y que la microglía activada forma procesos citoplasmáticos extendidos en contacto directo con los axones dañados para formar una potencial barrera entre el tejido sano y lesionado, sugiriendo la activación de la microglía como una respuesta al daño axonal⁹.

Recientemente, el concepto de la neuroinflamación como una “espada de doble filo”¹⁰, con efectos benéficos y perjudiciales, ha cobrado mayor importancia y se ha ampliado para incluir la función de estas células¹¹. Al igual que los macrófagos de la periferia, la microglía responde a los cambios del microambiente polarizándose en un espectro de activación entre el fenotipo clásico tipo M1 y un fenotipo alternativo tipo M2, reflejando plasticidad fenotípica y un mix de fenotipos con diferencias funcionales en la respuesta¹² (Figura 2). De esta manera, patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) liberados por neuronas dañadas, y mediadores proinflamatorios u oxidativos liberados por la infiltración de células inmunes polariza a las células hacia un fenotipo tipo M1. Estas células liberan factores proinflamatorios y radicales libres que promueven la neuroinflamación, estrés oxidativo y neurodegeneración¹². En tanto, en respuesta a señales anti-inflamatorias y neutróficas, la microglía puede ser polarizada hacia un fenotipo tipo M2, que liberan factores anti-inflamatorios y tróficos que resuelven la inflamación. Presentan una actividad fagocítica incrementada y promueven la reparación modulando la neurogénesis, regeneración axonal, plasticidad sináptica, y angiogénesis¹².

La microglía ha demostrado plasticidad en la expresión de marcadores y pueden cambiar entre los fenotipos tipo M1 y M2. Seguido a una lesión cerebral traumática, está presente un mix de fenotipos durante la fase aguda, transformándose a un fenotipo tipo M1 dominante en la fase crónica.

Esta polarización, se ha visto que varía con el tiempo y entre diferentes modelos experimentales de trauma cerebral. En ratones, la microglía activa luego de una contusión focal ha demostrado un incremento bimodal con un pico inicial de tipo M2 a los 7 días, seguido de un pico tipo M1 a los 21-28 días, aunque la mayor parte

presentaba un mix de marcadores de activación tipo M1 y M2¹³. Mientras que en una lesión difusa, donde no hay daño directo sobre la superficie del cerebro, la polarización de la microglía M1 vs. M2 es diferente, probablemente como resultado de respuestas inmunes celulares alteradas, que incluyen menos infiltración de neutrófilos y acumulación restringida de macrófagos en las regiones de sustancia blanca, que sufre los mayores daños. La lesión cerebral difusa resulta en un aumento transitorio de la expresión de IL-1 β , TNF y CD14 en la corteza y el hipocampo del ratón a las 4h después de la injuria, retornando a los niveles basales a las 72 h¹⁴. Adicionalmente, un mix de marcadores tipo M1 y M2 están presentes en la microglía 24 h luego de la injuria¹⁵.

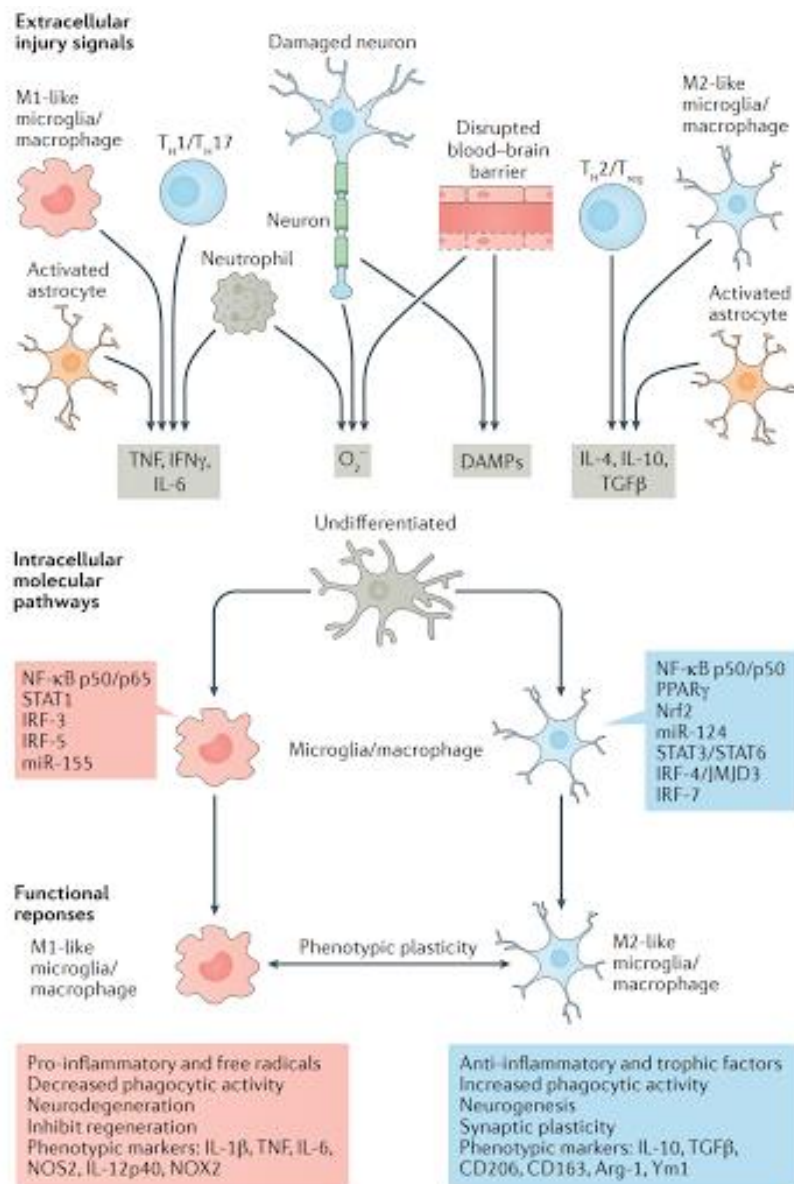


Figura 2| Polarización de la microglía y macrófagos seguida a una lesión por trauma cerebral.

Señales moleculares del tejido dañado conducen las respuestas fenotípicas y funcionales en la microglía luego de una lesión cerebral traumática. Patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) liberados por neuronas dañadas, y mediadores proinflamatorios u oxidativos liberados por infiltración de células inmunes polariza a las células hacia un fenotipo tipo M1. Estas liberan factores proinflamatorios y radicales libres que promueven la neuroinflamación, estrés oxidativo y neurodegeneración. En respuesta a señales anti-inflamatorias y neutróficas, la microglía y macrófagos pueden ser polarizados hacia un fenotipo tipo M2, que liberan factores anti-inflamatorios y tróficos que resuelven la inflamación. Tienen una actividad fagocítica incrementada y promueven la reparación modulando la neurogénesis, regeneración axonal, plasticidad sináptica, y angiogénesis. Microglía y macrófagos han demostrado plasticidad de marcadores y pueden cambiar entre los fenotipos tipo M1 y M2. Seguido a una lesión cerebral traumática, está presente un mix de fenotipos durante la fase aguda, transformándose a un fenotipo tipo M1 dominante en la fase crónica. Tomado de "The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury"¹³

Patofisiología Neuroinflamatoria

La reacción inflamatoria luego del trauma es reconocida como una robusta y compleja interacción entre componentes centrales y periféricos tanto celulares como solubles, dependiente de la edad del paciente, sexo, mecanismo de lesión (focal, difusa), grado de la lesión, injurias secundarias, intervenciones terapéuticas, y la variabilidad genética.

Además del daño tisular, las lesiones agudas del SNC inducen neurodegeneración, desatando, como se mencionó anteriormente, una respuesta inflamatoria caracterizada por la activación temprana de la microglía, astrocitos, y células endoteliales seguido por la infiltración de leucocitos sanguíneos, tempranamente neutrófilos y luego linfocitos y macrófagos derivados de monocitos, en un proceso que depende altamente del tipo y grado del daño tisular¹⁶. Simultáneamente, citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias compiten por promover y terminar la respuesta inflamatoria post-traumática, y la señalización por quimioquinas resulta en la activación y reclutamiento de células inmunes hacia el sitio de lesión¹³.

Diversas investigaciones han aportado evidencias de que la producción de moléculas inflamatorias y el estrés oxidativo por células inflamatorias, determina la extensión final del daño en el tejido y la muerte o supervivencia de neuronas, ya sean cercanas como distales a áreas conectadas con la lesión^{17,18}.

Estudios animales sustentan la evidencia clínica de un estado inflamatorio crónico luego de la lesión cerebral, e indican mecanismos moleculares subyacentes y posibles estrategias terapéuticas. En ratones, una activación microglial crónica con la sobreexpresión de marcadores MHC-II, CD68 y NADPH oxidasa, es observada un año luego de la contusión¹⁹. Estos marcadores indican un fenotipo de microglía tipo M1, con producción de citoquinas proinflamatorias y reducción de actividad

fagocítica. En el transcurso del año, demostraron neurodegeneración progresiva con una extensión de la lesión, estrés oxidativo, demielización y discapacidades cognitivas.

La inflamación post-traumática puede ser entonces beneficiosa ya que promueve la limpieza de los desechos y la regeneración, y/o potencialmente perjudicial, mediando la muerte neuronal y una neurodegeneración progresiva (Figura 3).

Subsecuentemente, una neuroinflamación que no logra ser controlada de forma adecuada, puede llevar a daños permanentes en el SNC. Se han encontrado puntos de control críticos de los procesos inflamatorios, y su estudio ha ido ganando importancia e interés en el campo de la inmunología. Se ha sugerido que el estado antiinflamatorio no es sólo un estado pasivo como resultado de la ausencia de estímulo, sino por el contrario, es una condición activa que requiere de la participación de varias moléculas responsables de la supresión de un potencial estímulo inflamatorio²⁰. En este sentido, se ha caracterizado la regulación de la función de las células inmunitarias por parte de receptores de superficie inhibidores/reguladores en el sistema inmunitario²¹. Varios receptores inmunes han sido descritos como nuevas diana en el control y modulación de la respuesta microglía-macrófagos, como el sistema CD200/CD200R, el receptor TREM-2 y la familia de receptores CD300²²⁻²⁴.

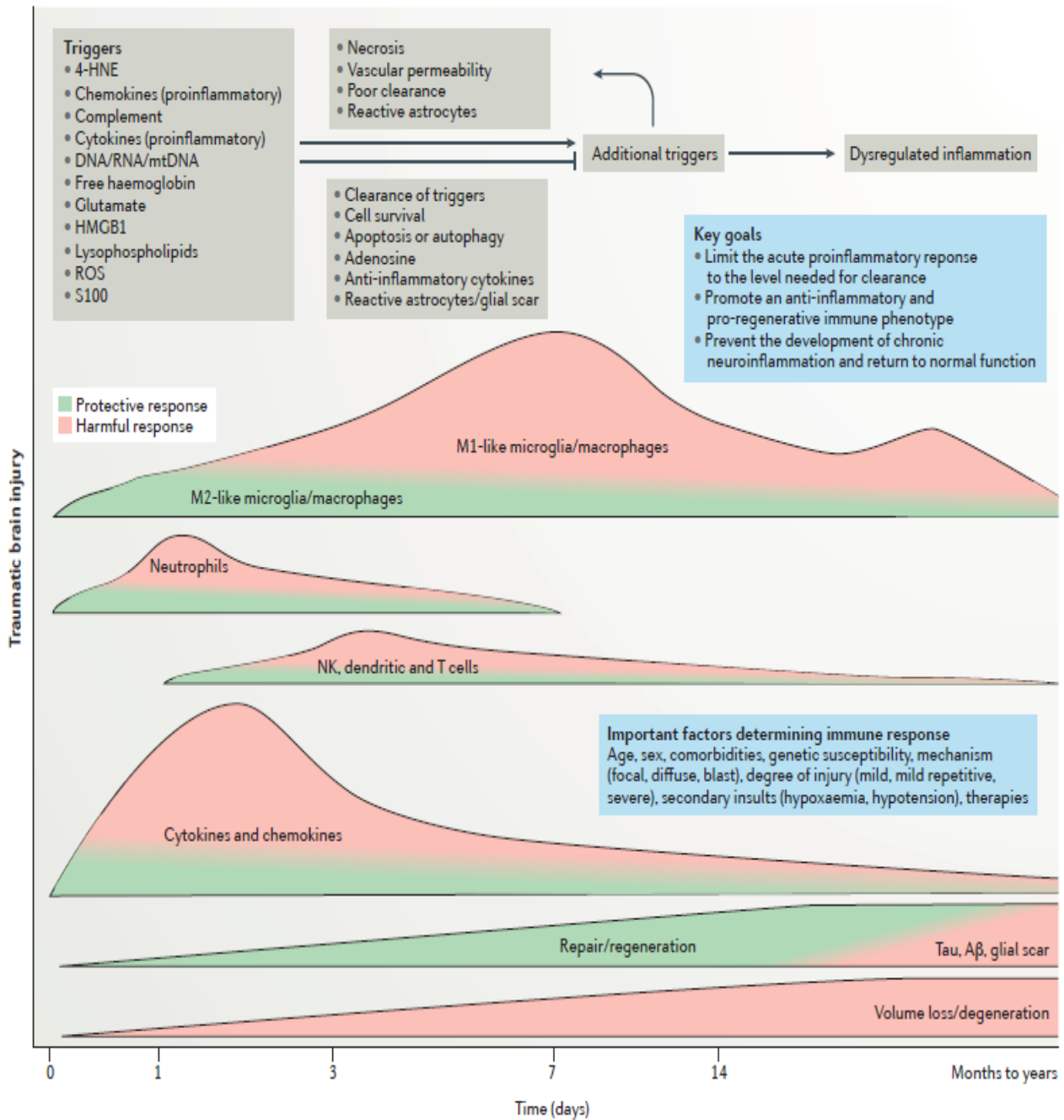


Figura 3| Neuroinflamación luego de una lesión cerebral traumática. Un daño mecánico primario en el SNC puede causar disrupción de la membrana celular, ruptura de vasos y daño de la Barrera hematoencefálica seguido de reacciones secundarias que involucren desbalance iónico, liberación de aminoácidos excitatorios, sobrecarga de calcio, y disfunción mitocondrial, culminando en vías de muerte celular. La injuria primaria y secundaria conducen a la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), citoquinas, quimioquinas, activación de la microglía y atrociitos, y el reclutamiento de células inmunes circulantes. La respuesta inflamatoria es crucial para la limpieza de los desechos, reparación, y la regeneración luego de la lesión cerebral traumática. Sin embargo, una inflamación no regulada puede conducir al daño cerebral agudo y crónico. 4-HNE, 4-hidroxynonenol; HMGB1, high mobility group protein B1; mtDNA, mitochondrial DNA; ROS, reactive oxygen species. Tomado de "The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury" ¹³

La familia de inmunoreceptores CD300

Esta familia se conforma por un grupo de proteínas transmembrana, con un dominio extracelular tipo inmunoglobulina, que incluye siete moléculas (Figura 4) codificadas en un cluster del cromosoma 17 humano. Son expresados en su mayoría por células derivadas de la línea mieloide, a excepción de una de las moléculas (CD300a) que es expresada también por células linfoides. Dentro de esta familia, se ha caracterizado a los CD300b, c, d, e y g como activadores y a CD300a como inhibidor. Por otra parte, se ha visto que el inmunoreceptor CD300f cumple una función dual, pudiendo activar e inhibir la respuesta celular^{25,26}. Muy recientemente, se ha visto que los receptores CD300 son capaces, además, de formar complejos entre sí en la superficie celular a través de interacciones entre los dominios extracelulares de inmunoglobulina, formando homo y hetero-complejos²⁷. Este punto cobra especial interés haciendo que los receptores CD300 representen un mecanismo de las células mieloides para regular las respuestas inmunes en intensidad y duración. Se ha visto que las citoquinas pro-inflamatorias pueden alterar la expresión de los receptores de este familia, así como éstos pueden actuar alterando la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la migración celular.²⁸ Esto evidencia la fuerte correlación entre los receptores CD300 y la regulación de la respuesta inflamatoria, tomando así la familia una importancia creciente.

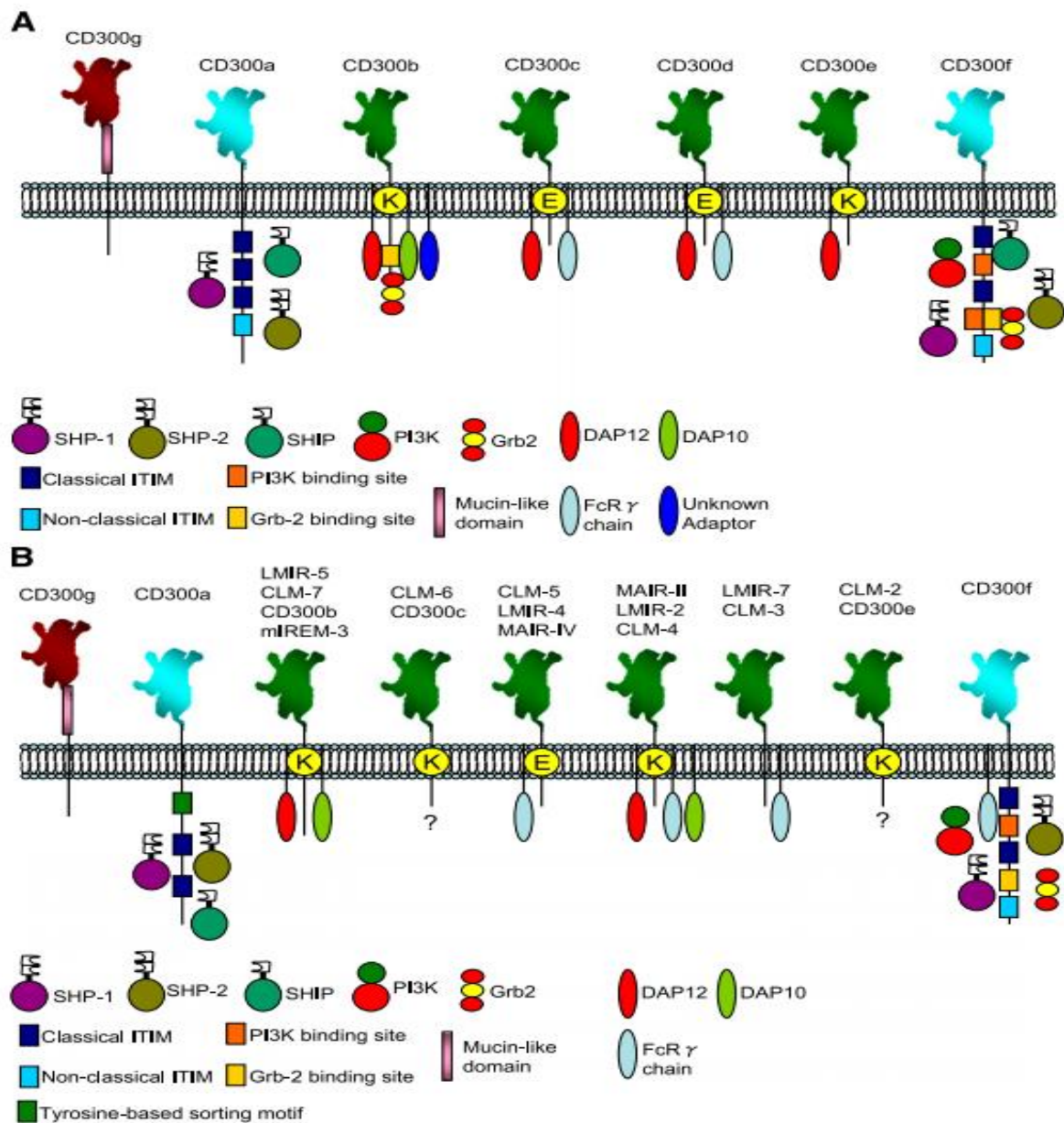


Figura 4| Representación esquemática de los receptores CD300 en humano (A) y ratón (B). El dominio extracelular de los receptores que contienen ITIM está coloreado en turquesa, y el de los no-ITIM en color verde. El dominio extracelular de CD300g está coloreado en marrón. Se indican los motivos de señalización de cada receptor, y se muestra la interacción con fosfatasa, las moléculas adaptadoras y quinasas. Tomado de "The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system"²²

CD300f

El receptor CD300f contiene una cola citoplasmática larga, con una variedad de motivos tirosina que pueden producir señales inhibitorias reclutando fosfatasas (SHP-1, SHP-2, SHIP) y con dos motivos de unión a la PI3 kinasa (PI3K) entre otras, por lo que puede desencadenar señales activadoras^{25,29} (Figura 5).

Presenta su ortólogo murino CLM1 (Figura 4) que se expresa en células mieloides, incluyendo mastocitos. Diversas investigaciones han mostrado su función como modulador en variadas situaciones de inflamación. En ratones con mutación nula (*knockout* – KO) para CLM1, se observó exacerbación de respuestas alérgicas,³⁰ y en un modelo para esclerosis múltiple indujo aumento de óxido nítrico y producción de citoquinas pro-inflamatorias, exacerbando la enfermedad³¹.

Ha sido también relacionado con la fagocitosis de células apoptóticas por interacción directa con fosfatidilserina, siendo clave en la reacción inflamatoria que determina una correcta limpieza del tejido así como en la contribución con la resolución de la de inflamación^{31,32}.

Investigaciones previas de nuestro laboratorio, mostraron un efecto neuroprotector luego de un daño cerebral agudo (excitotóxico) en rata como resultado de la sobreexpresión de CD300f³³. Su sobreexpresión en un modelo de trauma cerebral también mostró ser neuroprotectora cuando se evaluó el volumen de lesión a los 3 días. Por otro lado, hemos observado que los ratones naive KO para CD300f poseen comportamientos compatibles con la depresión como son la anhedonia.

Asimismo, el bloqueo de la interacción entre el receptor CD300f y sus ligandos, utilizando una proteína de fusión soluble (CD300f-IgG2a), reduce el grado de regeneración axonal al ser inyectada en el nervio ciático luego de producida una lesión³⁴.

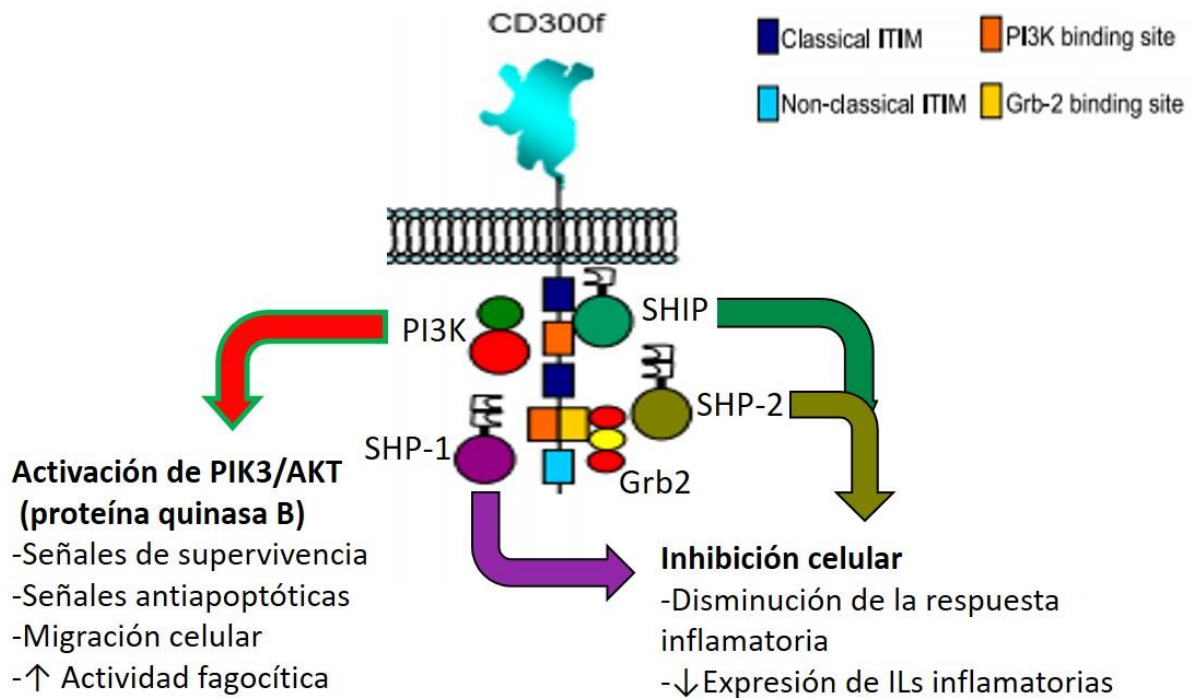


Figura 5| CD300f humano (IREM-1); esquematización de la función dual en los mecanismos de señalización intracelular una vez activo por sus ligandos. Tomado y modificado de "The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system" ²².

Terapia génica

La terapia génica se basa en la introducción de material genético al organismo, consiste en la adición, sobreexpresión, alteración, corrección o bloqueo de la expresión de determinados genes, brindando una amplia gama de posibilidades para tratamientos de diversas patologías^{35,36}. De las posibilidades antes mencionadas que brinda esta herramienta, la adición de genes es la que comúnmente más se aplica en los estudios clínicos y preclínicos, como método para promover un beneficio terapéutico o administrar una proteína carente o no funcional debido a una mutación genética.

Existen barreras importantes en el desarrollo de esta terapia como tratamiento seguro, entre ellas la falta de un método confiable para la introducción del material genético a una población de células blanco, que reduzca el riesgo de desarrollar efectos secundarios indeseados como toxicidad o inflamación, y como punto crítico la introducción del material genético a las células de manera eficiente. Con este fin se han utilizado, modificado y creado vehículos de expresión adecuados a cada situación³⁶. Dependiendo del vector, el ADN foráneo puede integrarse al ADN cromosómico de la célula huésped, o bien existir como vector episomal (*Figura 6*).

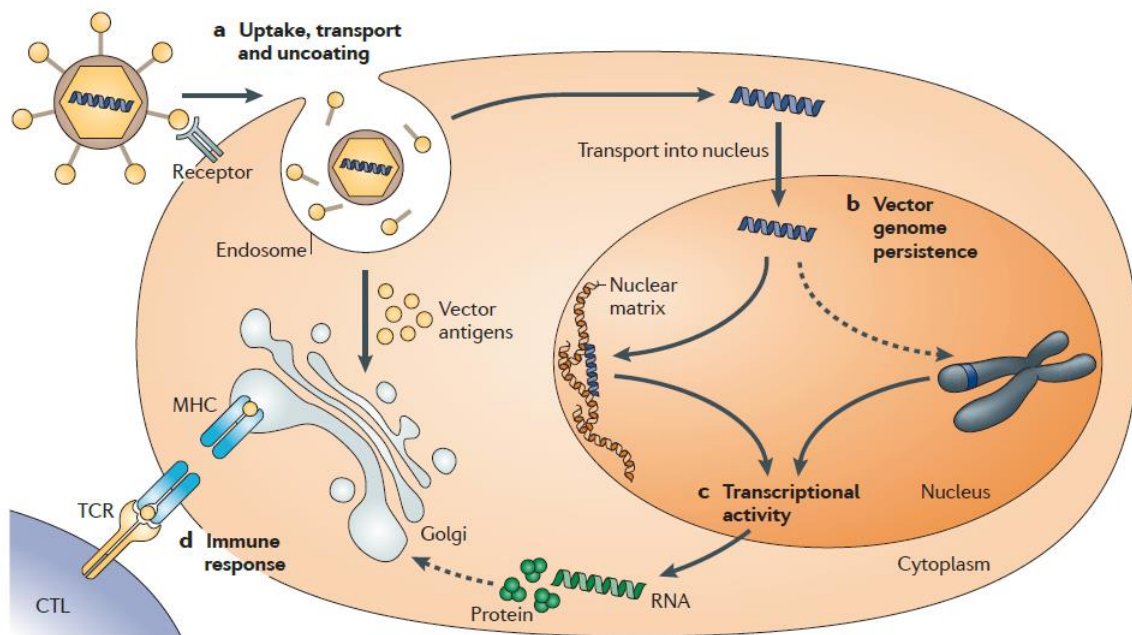


Figura 6| Las cuatro barreras para una terapia génica exitosa. a. Captación, transporte y liberación. Los vectores se unen a la membrana celular y son internalizados por varios procesos. La mayoría de los pasos para la captación involucran una interacción ligando-receptor. Una vez internalizados, gran parte de los vectores desarrollaron mecanismos efectivos para escapar del endosoma. El transporte hacia el núcleo también es necesario para una terapia exitosa. **b.** Persistencia del genoma. Una vez en el núcleo, será procesado. Dependiendo del vector, el ADN podrá existir como una molécula episomal o ser integrado al cromosoma del huésped. **c.** Actividad transcripcional y persistencia del transgen. **d.** La respuesta inmune puede limitar la viabilidad de las células transfectadas y/o la expresión de los productos del transgen. CTL, Linfocito T citotóxico; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; TCR, receptor de la célula T. Tomado de “*State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead*”³⁵

Los vehículos o vectores virales derivan de virus a los cuales se les ha eliminado los genes y secuencias implicadas en su patogenicidad y replicación, manteniendo las secuencias de encapsidación y dejando espacio libre en el genoma para insertar los genes con la función deseada. Las partículas infectivas son producidas en sistemas celulares que complementan las proteínas requeridas para ello, estas partículas no se pueden replicar, llevan genoma recombinante inocuo y mantienen intacto su mecanismo para entrar eficientemente en las células e introducir el material genético de interés.

Paralelamente se ha apostado mucho al desarrollo de vectores no-virales basados en la transferencia de ADN plasmídico utilizando mediadores de origen lipídico, proteínas modulares o complejos policatiónicos^{37,38}.

Los vectores virales, aun siendo muy eficientes como vehículos de transferencia génica, pueden presentar algunas limitaciones, entre las cuales cabe destacar la toxicidad e inmunogenicidad, así como la posible mutagénesis insercional³⁹⁻⁴¹. Teniendo en cuenta esto, los vectores no virales ofrecen una alternativa atractiva por la simplicidad de su uso, su fácil producción a gran escala y la disminución de respuestas inmunológicas específicas intensas. Sin embargo resultan menos eficientes que sus contrapartes virales a la hora de transferir el material genético a las células blanco^{37,38,42,43}.

A la hora de alcanzar el SNC se presenta un gran inconveniente, la barrera hematoencefálica (BHE) restringe la entrada de proteínas y drogas potenciales a los tejidos nerviosos. Como la mayoría de las drogas son incapaces de atravesar la BHE, existen pocos métodos disponibles para el tratamiento de la mayoría de las afecciones del SNC⁴⁴. Esto se convierte en una barrera adicional a las ya

comentadas para la terapia génica, es por ello que la mayoría de las pruebas experimentales en el SNC se realizan mediante la aplicación directa del inóculo en el tejido nervioso.

En el diseño de vectores recombinantes modulares se utilizan frecuentemente péptidos capaces de conferir al vector la habilidad para atravesar la BHE y transferir su carga al SNC^{44,45}, aunque se trata de una tecnología que todavía necesita perfeccionarse. Recientemente un grupo de investigadores logró mediante el diseño de vectores virales adenoasociados con un tipo de cápside particular atravesar la BHE, de hecho observaron que el virus se había infiltrado en la mayoría de las células cerebrales y que la señal fluorescente se mantuvo durante un año⁴⁶. Lograr suministrar genes al cerebro sin métodos invasivos tendrá un potencial extremadamente útil como herramienta de investigación y también en la medicina.

Particularmente, en un trauma encéfalo-craneano (TEC) muy frecuentemente debe de realizarse una craneotomía descompresiva al paciente, implicando la abertura de una ventana en el hueso del cráneo para disminuir la presión intracraneana. El paciente llega al centro hospitalario y puede encontrarse con un diagnóstico entre 4-5 horas post-trauma, con lo cual los modelos preclínicos deben contemplar dicho tiempo para comenzar el tratamiento. De este modo podría quedar así expuesto el cerebro para un procedimiento de terapia génica.

Como antecedente, es relevante comentar los resultados obtenidos en ensayos llevados a cabo por el grupo de investigación del nuestro laboratorio. Un análisis comparativo entre vectores lentivirales y nanovectores de proteínas modulares aplicados en terapia génica para una lesión cerebral producto de una TEC mostró que mientras los vectores lentivirales manifestaron expresión significativa de la

proteína GFP en el cerebro 1 día después de la lesión y tratamiento e incrementaron la expresión a los 14 días, los nanovectores mostraron una expresión baja y estable del transgen GFP desde el día 1 al 14. No se observó toxicidad para ninguno de los vectores luego del tratamiento, así como tampoco incremento aparente de la neuroinflamación o neurodegeneración. De hecho, la inyección de ambos tipos de vectores indujo una recuperación funcional⁴⁷. Además, la sobre-expresión de CD300f luego del trauma cerebral mediante uno de los nanovectores indujo una reducción del volumen de lesión medido a los 3 días (datos no publicados).

Hipótesis

Se propone que el receptor CD300f se expresa en microglía en condiciones fisiológicas, participando activamente en el mantenimiento del fenotipo microglial vigilante. En su ausencia ocurrirían pequeños cambios morfológicos y del fenotipo microglial que modula la actividad sináptica, teniendo también consecuencias funcionales. Por tanto, una vez ocurrido el estímulo inflamatorio, la expresión de CD300f en la microglía aumenta, y conjuntamente con otras señales activadoras e inhibitoras, coopera en la modulación del fenotipo microglial, impactando directamente sobre el desarrollo de la respuesta inflamatoria y su resolución. El receptor CD300f actúa como receptor inhibidor de las cascadas pro-inflamatorias clásicas, pudiendo frenar la amplificación de la neuroinflamación secundaria, contribuyendo a la resolución de la inflamación. Su sobreexpresión supone un efecto neuroprotector reduciendo el daño tisular secundario así como la neurodegeneración producto de la respuesta inflamatoria.

Objetivo General

Valorar el papel que desempeña el inmunoreceptor CD300f a nivel del SNC en el mantenimiento del fenotipo microglial y su influencia en la respuesta inflamatoria. Se espera además aportar a la comprensión de la función de estos receptores en el restablecimiento de la homeostasis luego de lesiones agudas del SNC, así como continuar contribuyendo a la obtención de blancos moleculares que intervengan en la regulación de las respuestas neuro-inflamatorias para su posible utilización posterior en estrategias de terapias avanzadas.

Objetivos específicos

Mantenimiento de la colonia de ratones con mutación nula para CLM-1

Para la valoración del rol que desempeña el inmunoreceptor en el SNC se emplearon dos modelos principales, la sobreexpresión o ausencia del mismo. Para este último se utilizaron ratones con mutación nula (KO) del gen codificante para CLM-1, siendo un punto clave contar con una colonia de ratones con dicha característica.

A los efectos de simplificar la nomenclatura, de aquí en más el receptor murino CLM-1 será nombrado como CD300f.

Tanto para el establecimiento como para el mantenimiento de la misma, el bioterio del instituto realizó los cruces necesarios de ratones silvestres (WT) y KO hasta lograr cruces parentales puros de genotipos homocigotas KO que produzcan una descendencia íntegramente homocigota. La correcta identificación del genotipo de cada generación producto de estos cruces juega un rol fundamental.

Se planteó, adicionalmente a los objetivos programados para el tema central del trabajo, llevar a cabo los genotipados necesarios mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con previa extracción del ADN de las muestras de cola enviadas por el bioterio, notificando luego los resultados obtenidos.

Objetivo específico 1: Evaluar los efectos de la ausencia del receptor CD300f en la regulación de la inflamación cerebral en condiciones basales así como luego de un estímulo inflamatorio sistémico.

Estudio de la reactividad microglial mediante técnicas de inmunohistoquímica y cuantificación de ARNm relacionados al proceso inflamatorio mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR: quantitative PCR) en animales

WT y KO para CD300f sin tratamiento alguno (NAIVE) y en condiciones basales y luego de un estímulo inflamatorio: inyección intraperitoneal repetitiva de Buffer fosfato salino (PBS) o Lipopolisacáridos bacteriano (LPS) respectivamente. Se podrá valorar la actividad microglial luego del estímulo inflamatorio prototípico sin entrada de células mieloides ni rotura de la barrera hematoencefálica.

Resultado esperado: Se espera observar una reactividad microglial exacerbada luego de la inyección de LPS en los animales KO con respecto a los WT, evidenciada mediante el patrón de inmunoreactividad para el marcador Iba-1, así como un aumento en la expresión de marcadores inflamatorios evidenciado por mayor abundancia de sus ARNm. En tanto que, en condiciones basales (animales inyectados con PBS) se espera observar una inmunoreactividad ligeramente aumentada en los animales KO, acorde a un leve aumento de la activación microglial, debida al estrés generado por las inyecciones repetidas.

Por otra parte, de acuerdo a nuestra hipótesis, esperamos que en los animales NAIVE KO para DC300f la expresión de ARNm relacionados a procesos inflamatorios esté también levemente aumentada con respecto a los NAIVE WT producto de la ausencia de nuestro receptor de interés.

Objetivo específico 2: Comprender el papel del receptor CD300f en la regulación de la inflamación luego de un trauma cerebral.

Utilizando técnicas qPCR y el modelo de trauma encéfalo-craneano (TEC) CCI por sus siglas en inglés, Controlled Cortical Impact, en ratones WT y KO se valorará el progreso de la lesión y la expresión de ARNm relacionados a la inflamación.

Resultados esperados: La ausencia de CD300f inducirá un incremento aún mayor en la expresión de los genes pro-inflamatorios, teniendo un efecto directo en el aumento del volumen de lesión.

Objetivo específico 3: Valorar los niveles de sobreexpresión temporal y espacial de CD300f mediante el uso de terapia génica en una lesión traumática aguda del SNC.

Se valorarán los niveles de sobre-expresión del receptor CD300f humano 90 días posteriores al tratamiento, utilizando técnicas de inmunohistoquímica en cerebros de rata WT sometidas a un TEC y posterior aplicación de vectores virales y nanovectores de terapia génica. Los experimentos de terapia génica ya habían sido realizados previamente, por lo cual se disponía de muestras de cerebros de animales tratados con diferentes vectores para la sobre-expresión de CD300f, GFP o vehículo.

Resultados esperados: La sobreexpresión de CD300f será mayor con los vectores virales que con los nanovectores.

Materiales y métodos

Genotipados

El control del genotipo se inicia con una biopsia de cola (3 mm de diámetro) de cada ratón de 4-5 semanas de edad, a partir de la cual se realiza la extracción de ADN.

La obtención del ADN genómico se realiza utilizando 390 µL de un buffer de digestión (TDB: 50mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA, 0.5 %SDS) más 10µL de proteinasa K (20mg/mL), el cual se incuba durante 6 horas. Luego de centrifuga la digestión a 14000g por 5 minutos y se inactiva la proteinasa K por calor a 95°C durante 5 minutos. En algunos casos se llevó a cabo la purificación del ADN con 200 µL del producto de digestión y con 300µL de isopropanol a 4°C, mezclando por inversión 50 veces y centrifugando a 14000g por 1 minuto; se eliminó el sobrenadante y se agregó 300µL de alcohol etílico al 70 % repitiendo el mismo procedimiento de mezcla y centrifugado, Posteriormente, el ADN obtenido es hidratado en 50 µL de agua libre de RNAsas por una hora. La identificación del genotipo se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la amplificación del gen de CD300f utilizando 3 oligonucleótidos, uno común: Common (5'-AGCACCGAGCCTGCACATT-3'), uno para identificación del genotipo KO: (5'-CCACTCCTGCGTCTCCTGGT-3') y otro para la identificación del WT: (5'-GGACAGCAAGGGGGAGGATT-3').

Las condiciones utilizadas para un volumen final de reacción de 10 µL por PCR está constituida por 5 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (contiene: SYBR® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polimerasa, dNTPs con dUTP, Passive Reference, y componentes de buffer optimizados); 0,125 µL del oligómero Common; 0,125 del oligómero WT o KO según corresponda, y 4,75 µL (20-50 ng) del ADN extraído de la

biopsia de la cola de cada ratón. Se realizan dos reacciones independientes para cada muestra, una con el oligómero Common y WT y otra con el Common y el KO; aunado a esto, se realiza un control negativo con 4,75 µL de agua libre de RNAsas en lugar de ADN para cada reacción. Las condiciones para la amplificación en termociclador son: 1 ciclo a 94°C durante 5 minutos; 20 ciclos a 95°C por 8 segundos; 57°C, 8 segundos; 72°C, 120 segundos; 20 ciclos a 95°C por 8 segundos; 58°C, 8 segundos; 72°C, 120 segundos; y finalmente 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos.

Los productos obtenidos por PCR tienen un tamaño de 237 pares de bases para el amplicón con el gen WT y 328 pares de bases para el amplicón con el *knockout*. Se analizan por corrida electroforética a 100V en un gel de agarosa al 2%, el cual es teñido con 1% del intercalante GelGreen™; se observa con luz UV en un transiluminador, donde también se toma la fotografía del mismo.

Dado que la mutación de los ratones *knockout* para CD300f sigue una herencia de tipo Mendeliana, se esperan diferentes genotipos, dependiendo de la cruce parental.

Modelo de LPS

Consiste en la inyección intraperitoneal (i.p) repetitiva de LPS, manteniendo un objetivo experimental clave, la ausencia de infiltración de células mieloides que induzcan variabilidad adicional. La inyección intraperitoneal repetitiva de LPS induce la activación microglial en el SNC constituyendo un modelo de neuroinflamación “limpio” sin infiltración de células mieloides circulantes. Este modelo se llevó a cabo inyectando 1mg/kg de LPS i.p durante 4 días, seguido de la perfusión del animal y procesamiento del cerebro para análisis histológicos o moleculares como fue descrito previamente por otros grupos⁴⁸.

Los ratones silvestres C57BL/6 (WT) o deficientes en CD300f fueron perfundidos con PFA 4% o solución salina - PBS-, si se destinará para análisis histológico o para análisis molecular respectivamente, a 4°C con el propósito de obtener el tejido nervioso en condiciones fisiológicas y minimizando la presencia de sangre. Se aisló el cerebro de cada animal, siendo crioprotegidos con solución de sacarosa al 30% en PBS, y mantenidos a -80°C hasta su procesamiento.

Para el análisis histológico, se realizaron cortes coronales de 30µm de espesor en criostato LEICA CM1850 UV, en portaobjetos y en “free floating” con solución de Olmos (44% H₂O, 30% Etilenglicol, 20% Sacarosa, 5% Buffer Fosfato, 1% PVP) y se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Paralelamente, se procesaron cerebros de ratones Naive, a los que no les fue realizado tratamiento alguno, más que la perfusión para la obtención del tejido, para usarlos como datos basales de los experimentos.

Para valorar la reactividad microglial se realizó inmunohistoquímica sobre la totalidad de los cortes en suspensión, obtenidos de los animales con tratamiento LPS, PBS y los Naive.

Para ello se procedió a eliminar la solución Olmos de los cortes y se lavaron con PBS 0.01M-Tritón 1% (PBST). Se bloqueó el Background tisular con Buffer Blocking (BB; PBS + Tritón 1% + 10% FBS) durante 1h; se inhibió la peroxidasa endógena con 10% metanol en 30% PBS y 2% H₂O₂ durante 10 minutos; se lavó con PBS por 5 minutos 2 veces y se incubó durante toda la noche (ON, over night) a temperatura ambiente (TA) con los anticuerpos (Ac) primarios hechos en conejo anti-Iba1 diluidos en BB. Se procedió a lavar 3 veces por 5 minutos con PBST y se incubó con los Ac. secundarios Goat anti-Ig G de conejo conjugados a HRP (peroxidasa de

rábano) diluidos en BB durante 1 hora a TA. Posteriormente, se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBST y se incubó con Diaminobencidina (DAB) 0,5mg/mL en PBS + H₂O₂ (33 µL en 100 µL de solución final) hasta que se visualizó un color amarronado sobre los cortes. Se lavó 2 veces por 5 minutos con PBS y una vez durante 5 minutos con PB 0.01M. A continuación se los montó sobre portaobjeto con medio de montaje DPX. La reactividad microglial fue observada en los cortes mediante microscopio de luz.

Por otro lado, se llevó a cabo sobre 4 cortes seleccionados con hipocampo, de animales inyectados con LPS, una inmunofluorescencia secuencial en 3 días utilizando el mismo protocolo antes descrito. Se incubó el día 1 ON con Ac. primario anti-KI67, proteína indicadora de división celular, revelándolo con Ac. secundario anti-IgG de conejo -conjugado a Alexa Flúor 546- en el día 2; volviéndose a incubar el mismo día con Ac. primario anti-Iba-1 ON, y revelándolo con secundario anti-IgG de conejo -conjugado a Alexa Flúor 488-, en el día 3. Adicionalmente se realizó una contratinción de los núcelos con DAPI.

Se tomaron fotografías del área de la corteza motora y el hipocampo en microscopio de epifluorescencia y fueron analizadas utilizando el software libre ImageJ, realizando el conteo de células microgliales con el plugin "Cell Counter".

Para el estudio de la expresión de los ARNm relacionados con la inflamación las muestras de tejido se conservaron a -80°C y fueron homogeneizadas, con posterior destrucción celular y extracción del ARN total con TRIZOL y GenElute Total RNA purification kit (SIGMA; RNB100). Fue determinada la concentración total de ARN en NanoDrop™. Se efectuó la retrotranscripción utilizando M-MVL Reverse Transcriptase (invitrogen 28025-013) de manera de obtener el ADN copia (ADNc)

para analizar las variaciones de los ARNm relacionados a la expresión de Tmem119, CD11b, CD86, IL-1 β y NLRP3.

La qPCR para la cuantificación de los ARNm se realizó utilizando 5 μ l de mix: QUANTIMIX EASY kit (BIOTOOLS) o TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™) y 0,5 μ l de cebadores/sonda par cada gen, con curvas de control de amplificación de 18S para la normalización de ciclo⁴⁹, para cada kit, en un detector de secuencias QIAGEN Rotor-Gene Q (Corbett Rotor-Gene 6000). Se utilizó 4,5 μ l de muestra de ADNc en un volumen final de reacción de 10 μ l. Los datos fueron analizados con Rotor-Gene Q Software 2.3. Todas las reacciones de qPCR se establecieron por duplicado.

Modelo de Trauma Encéfalo-Craneano

Se utilizó tejido nervioso obtenido siguiendo un protocolo idéntico al descrito anteriormente para el Modelo LPS. Se estudió los ARNm relacionados a la inflamación en relación con el progreso de la lesión luego de aplicado un TEC.

Para la realización del trauma encéfalo-craneano se induce el estado de anestesia profunda en los animales mediante la inhalación de una mezcla gaseosa de 4% isoflurano y 0.8 % oxígeno, mantenidos durante todo el procedimiento quirúrgico en 2.5-3%. Se coloca al animal en posición prona, fijándolo al sistema quirúrgico estereotáxico y seguidamente, mediante material quirúrgico esterilizado se procede a la apertura de la piel de la cabeza y a la trepanación del cráneo mediante el uso de un taladro Dremel, generando un orificio de 3 mm de diámetro y manteniendo intacta la duramadre. Posteriormente, se realiza una lesión traumática con un pistón de 2.5 mm, fijado a una velocidad, profundidad y tiempo de impacto de 2 m/s, 2 mm y 150 msec respectivamente. Para esto se valió del sistema Pinpoint Precision

Cortical Impactor (Stereotaxic mount, Hatteras Instruments, Cary, NC) que consiste en un pistón controlado por computadora que permite homogenizar las lesiones, generando un modelo fiable y reproducible⁵⁰ (Figura 7).

Tras suturar la herida, el animal es colocado sobre una manta térmica hasta que haya abandonado totalmente el estado de anestesia.

Cabe destacar que el procedimiento antes descrito fue llevado a cabo por la co-orientadora y solo participé como ayudante en las intervenciones.

Se obtuvieron muestras de tejido a diferentes tiempos post lesión (uno, cinco y noventa días) y se conservaron a -80°C, según el protocolo explicado para el modelo LPS.

A los efectos de este trabajo sólo se utilizaron las muestras de 5 días posteriores a la lesión. Las mismas se homogeneizaron en TRIZOL y se extrajo el ARN total para realizar la transcripción inversa y posterior análisis por qPCR de las variaciones en abundancia de los ARNm de interés antes mencionado.

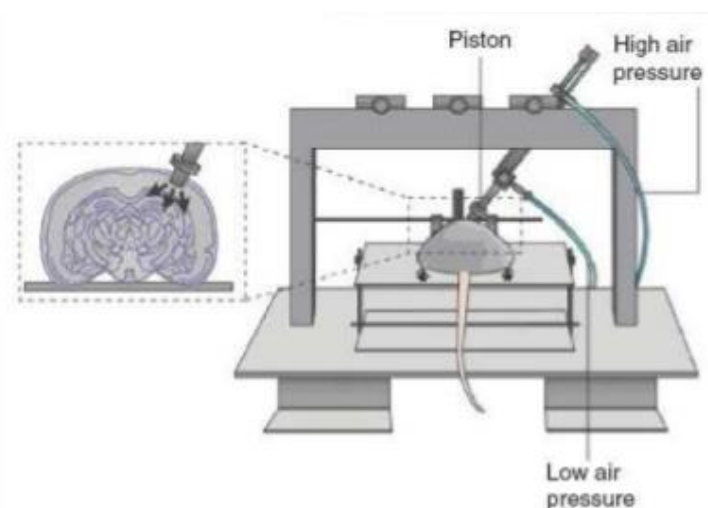


Figura 7| Injuria por Impacto Cortical Controlado. Un pistón dirige un “impactador” rígido, con parámetros de velocidad, profundidad y duración del impacto controlados y repetibles, hacia el tejido expuesto. Tomado de “*Animal models of traumatic brain injury*”⁵¹.

Terapia génica

Se utilizó cerebros de rata WT a las que le fue realizado un TEC y posterior aplicación de terapia génica con vectores virales y nanovectores para expresar GFP o CD300f humano (hCD300f), y poder así diferenciarlo del endógeno.

En el presente trabajo se valoraron mediante técnicas de inmunohistoquímica los niveles de sobreexpresión post-trauma y aplicación del tratamiento en cortes coronales de cerebro de rata utilizando anticuerpos primarios anti-GFP (1:500) y anti-hCD300f biotinilado (1:200), revelando con anti-conejo-HRP (1:200) y estreptavidina-HRP (1:200) respectivamente.

Es preciso mencionar que en trabajos anteriores de nuestro laboratorio se evaluó la titulación de los stocks lentivirales mediante la sobreexpresión de hCD300f en cultivos de células HeLa, pero nunca en tejido. Aunque, como ya se citó, sí fue evidenciado en un modelo *in vivo* de daño cerebral excitotóxico en rata, que la sobreexpresión de hCD300f con vectores no virales redujo significativamente el volumen de lesión, teniendo un efecto comparable a la sobreexpresión de su ortólogo de rata³³.

Los cerebros fueron obtenidos a los noventa días posteriores a la lesión, procesados de la manera descrita para los modelos anteriores. Los cortes histológicos fueron realizados en suspensión ya que el tiempo transcurrido desde la lesión permite una correcta preservación del tejido, siendo conservados en solución de OLMOS tal lo indicado en el objetivo uno.

El procedimiento para la realización del TEC fue idéntico al ya descrito para tal modelo, con variaciones en el pistón y las condiciones utilizadas, siendo en este caso de 3mm, fijado a una velocidad, profundidad y tiempo de impacto de 1.5 m/s, 4 mm y 120 msec respectivamente; y en la craniectomía, siendo esta lateral

derecha de 6mm de diámetro en forma circular, manteniendo intacta la duramadre. La topografía exacta del centro fue 2.5 a 3mm posterior y 2.5 a 3mm lateral al bregma. A nivel cerebral, esta zona corresponde al área motora y somato- -sensorial primaria.

Pasadas 4 horas desde la lesión los animales fueron anestesiados nuevamente y mediante el uso de una jeringa Hamilton conectada a un microinyector, se inyectó intracerebralmente a nivel de la corteza, -2 mm de profundidad, a los vectores conteniendo el gen de hCD300f o de la proteína reportera GFP, en el límite anterior y en el posterior de la lesión con coordenadas respecto al centro de la lesión: -2 mm lateral y +2 posterior, y -2 mm lateral y -2 mm anterior. La inyección se realiza a una velocidad de 0,2µl/min y se mantiene la aguja en el punto de inyección durante 5 minutos para evitar el reflujo del material inyectado debido a que el SNC posee un espacio extracelular muy reducido y por consiguiente una difusión muy limitada. Tras suturar la herida se mantuvo a los animales en condiciones tales que les permita una recuperación favorable.

Se utilizó el vector no-viral modular recombinante HNRK en combinación con el plásmido de expresión para hCD300f o GFP. Los genes transferidos con este vector a células del SNC mediante inyección en el cerebro lesionado, se expresan rápidamente, a niveles moderados y por un período de tiempo corto (días)^{52,53}.

Por otro lado, se utilizaron vectores lentivirales no-integrativos que son infectivos pero no son replicativos, por lo tanto una vez que infectan las células no producen partículas virales nuevas. Estos vectores inducen la expresión del transgen lentamente, pero en general los niveles de proteína transgénica son más elevados y por períodos de tiempo prolongados (meses o años) en el caso de células postmitóticas como las neuronas.

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en diferentes grupos según el tratamiento aplicado: HNRK GFP, HNRK hCD300f, Lentivectores GFP y Lentivectores hCD300f.

Fundamentos de las técnicas utilizadas

PCR

La reacción en cadena de la Polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN.

Inventada por Kay B. Mullis en 1985 y valiéndole un premio Nobel⁵⁴, se convirtió en una de las tecnologías más poderosas y mayormente utilizadas en biología molecular hoy en día⁵⁵. Fue desarrollada basándose en la replicación del ADN que en organismos eucariotas llevan a cabo las ADN polimerasas, realizando la síntesis de ADN en sentido 5'→3' usando un molde de cadena simple, pero partiendo de una región doble hebra⁵⁵.

Entonces, si se tiene un fragmento de ADN que se desea amplificar, es necesario reunir las condiciones antes descritas para emular dicho proceso. Para crear la región doble cadena se usan los denominados cebadores (primers), una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que son complementarios a los extremos 3' del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Partiendo del principio mencionado, la PCR se basa en la repetición en "X" veces de un ciclo formado por tres etapas:

- 1°- Desnaturalización de ADN doble hebra
- 2°- Hibridación de cebadores a la zona 3' de cada hebra
- 3°- Extensión del cebador por actuación de la ADN Polimerasa

En este proceso, las enzimas de *Escherichia coli* utilizadas inicialmente también se desnaturalizaban junto con el ADN, por acción de las elevadas temperaturas, y dejaban de actuar. Fue la introducción de la *Taq* Polimerasa (de *Thermus*

aquaticus)⁵³, aislada por Thomas D. Brock en 1968, que permitió una total automatización de la técnica^{55,57}.

Actualmente se utiliza una polimerasa que proviene de bacterias *E. coli* a las que se les insertó el gen de la Taq polimerasa, y el proceso de la PCR se lleva a cabo en un termociclador donde se programan la cantidad de ciclos, tiempos y temperatura de los mismos de forma exacta.

Si se piensa en como se duplica el ADN en cada ciclo, donde el número de copias presente se duplica, en una cantidad “n” de ciclos al final de los mismos se alcanzará una cantidad 2^n de ADN. Este producto es obtenido entonces a tiempo final de reacción y su cuantificación y/o detección es mediante una corrida electroforética. Dependiendo del tamaño del fragmento amplificado y de la resolución que se deseé lograr se usan geles (agarosa o poliacrilamida) a distintas concentraciones.

La posterior visualización se puede realizar por variadas técnicas, ya sea con agentes intercalantes y fluorescencia, tinción con plata o radiactividad.

PCR cuantitativa en tiempo real

A diferencia de la PCR tradicional, que como ya se mencionó la cuantificación y detección de la secuencia amplificada es a tiempo final de reacción, en la qPCR en tiempo real el producto de PCR es medido en cada ciclo.

Esta técnica fue desarrollada ante la necesidad de una cuantificación robusta y precisa teniendo en cuenta el principio de la PCR tradicional. Simplificando, se basa en el monitoreo de las reacciones durante la fase de amplificación exponencial, obteniendo datos que señalan información cuantitativa de la cantidad inicial del

objetivo a amplificar, pudiendo así determinar con gran precisión la cantidad originaria del mismo.

La cantidad de ADN es medida luego de cada ciclo por tonos de fluorescencia que van incrementando su señal en proporción directa con el número de amplicones generados. Los reporteros fluorescentes utilizados incluye ADN doble hebra unido a fluorocromos o moléculas de fluorocromo conjugadas a los primers o sondas que hibridan con el producto de PCR durante la amplificación. Los cambios en la fluorescencia durante el curso de la reacción son medidos por un instrumento que combina ciclos térmicos con un escaneo de la misma. Al diagramar la fluorescencia vs. el número de ciclos, el aparato genera un diagrama que representa la acumulación de producto durante la duración de la reacción entera.

Existen varias químicas para la PCR fluorescente en tiempo real, la mayormente usada es el ensayo de la 5' nucleasa, que recibe este nombre por la actividad 5' exonucleasa asociada con la Taq polimerasa, siendo los más conocidos de estos TaqMan® basada en sondas específicas, y SYBR® Green a base de fluorocromos^{58,59}.

La técnica de SYBR® Green se basa en fluorocromos que se unen de manera inespecífica al ADN doble hebra, que multiplica su cantidad tras cada ciclo, produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador de PCR en tiempo real. Los fluorocromos de SYBR® Green se unirán a cualquier producto de amplificación, objetivo o no, así como a cebadores que se hayan hibridado.

Esta práctica permite cuantificar solamente una secuencia por reacción, siendo de poca especificidad y requiere de un cuidadoso posterior análisis de datos, presentando como ventaja ser simple, rápida y la utilización de cebadores normales que la hacen una técnica de bajo costo^{58,59}.

En tanto, la técnica basada en sondas específicas consiste en una sonda que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo e inverso unida a dos fluorocromos, en su extremo 5' a un reportero fluorescente y en el extremos 3' un "apagador". Este fenómeno que se da entre ambas moléculas recibe el nombre de FRET por sus siglas en inglés de transferencia energética de fluorescencia por resonancia; que consiste en el "apagado" de la energía emitida por el reportero si están próximos, consecuencia de la transferencia de la misma hacia el "apagador" por las diferencias entre las longitudes de onda de excitación y emisión de cada uno. Ocurre una transferencia de energía desde un nivel alto hacia uno bajo.

Antes de que la reacción de PCR comience, la sonda TaqMan® está intacta y presenta cierto grado de flexibilidad. El reportero y el apagador presentan afinidad el uno por el otro, permitiendo que ocurra el FRET.

Durante la PCR, los primer y la sonda se unen a la secuencia blanco. La ADN polimerasa extiende el cebador previo a la sonda y la actividad 5' exonucleasa de la misma clivará a la sonda, liberando un fragmento conteniendo el fluorocromo reportero dejando de ser "apagado".

De acuerdo a lo descrito, el grado de especificidad que se obtiene con este segundo método es mucho mayor, permitiendo en los resultados incluir la señal del blanco y excluyendo la que no lo es; así como poder analizar varias secuencias por reacción. Como desventaja podría plantearse su mayor costo y optimización^{58,59}.

Un paso importante es el elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación de la secuencia blanco, dependiendo de los intereses planteados. Existen dos tipos: cuantificación absoluta o relativa, la primera se utiliza generalmente cuando se desea saber el número exacto de copias amplificadas o la

concentración precisa, mientras que la segunda se aplica para determinar cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos. Este último tipo se basa en los niveles de expresión de ARNm de un gen de referencia de expresión constitutiva, que no cambian por los estados fisiológicos, usualmente llamados “housekeeping”. Los datos se expresan entonces relativos al gen de referencia y como el número de veces que aumentaron o bajaron los niveles de ARNm, o si se mantuvieron.

En este trabajo, como ya fue mencionado, para el análisis de la expresión de los genes en las muestras de tejido cerebral se utilizó la técnica de qPCR TaqMan® por su especificidad, con cuantificación relativa al gen ribosomal 18S.

Inmunohistoquímica

Los métodos convencionales de tinción para el estudio de muestras biológicas han sido usados por poco más de un siglo, pero el estudio del sistema inmune y el esclarecimiento de ciertos procesos llevados a cabo por éste, como la identificación y destrucción por parte de los linfocitos T de células con potencial maligno dieron pie en los inicios del siglo pasado al desarrollo de la primera aproximación a lo que hoy conocemos como inmunohistoquímica⁶⁰. Consiste en una técnica que combina las propiedades anatómicas de la muestra con técnicas bioquímicas y de reacción inmunológica, permitiendo la localización “in situ” de componentes tisulares específicos. Años más tarde la técnica fue perfeccionada, al punto de hacerla práctica, de fácil realización, útil y aplicable tanto en la investigación científica como en la clínica. El componente esencial de la técnica son los anticuerpos, especialmente inmunoglobulinas G, valiéndose de su gran especificidad y alta afinidad. Desde la expansión de su producción la inmunohistoquímica se ha ido

potenciando cada vez más. Al día de hoy se pueden adquirir sueros comerciales con anticuerpos específicos producidos en laboratorio, respondiendo todos al principio inmunológico de ser generados en respuesta a un estímulo antigénico; entendiéndose como antígeno a cualquier sustancia o partícula que al ser introducido en un organismo superior genera una respuesta humoral y/o celular.

En resumen, para el estudio de una partícula específica en una muestra biológica es necesario contar con el anticuerpo capaz de reconocerla y generar un complejo antígeno-anticuerpo en el sitio que se localice, y la visualización de este se realiza mediante un marcador acoplado al anticuerpo. El marcaje inmunohistoquímico puede ser por una reacción utilizando enzimas, iones metálicos o isótopos radiactivos; o por emisión de luz a longitudes de onda determinadas, producto de la excitación a una longitud de onda diferente de un fluoróforo (inmunofluorescencia)⁶¹.

La fluorescencia es una forma de luminiscencia, entendiéndose esta última como la emisión de la luz que se produce a partir de una fuente de energía no térmica y bajo efecto de una excitación. Es preciso mencionar que ciertos tejidos o células presentan autofluorescencia, propiedad de ciertas sustancias de forma espontánea.

En tanto que la fluorescencia secundaria es que la que se obtiene cuando se la induce, uniendo fluorocromos a anticuerpos dirigidos hacia antígenos tisulares.

Por otra parte, en las técnicas inmunoenzimáticas el antígeno inmovilizado es detectado mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un precipitado insoluble como producto de reacción, coloreado y a veces cuantificable.

Las técnicas mayormente utilizadas combinan enzimas como la peroxidasa de rábano (HRP).

El marcaje inmunohistoquímico puede ser llevado a cabo directa o indirectamente, esta diferencia viene dada por el uso de anticuerpos primarios que se unen

específicamente al antígeno objetivo en el tejido y ya poseen unidos al marcador, o anticuerpos secundarios con el marcador acoplado que se unen al ac. primario sin este, actuando estos últimos a modo de antígenos frente a otros anticuerpos. El empleo del marcaje indirecto tiene como ventaja la amplificación de la señal, por poder unirse varios a una misma inmunoglobulina primaria, permitiendo una mejor visualización en caso de que la partícula objetivo de estudio esté presente de forma escasa. Además se hace económicamente más rentable y presenta mayor practicidad el hecho de poder utilizar los anticuerpos secundarios marcados para el estudio de varias moléculas, y no requerir de un anticuerpo primario marcado por cada una.

Uno de los detalles más sustanciales previo a la realización de la inmunohistoquímica se dirige a preservar el tejido siguiendo una serie de pautas, y con ello a los antígenos. En general, la fijación del tejido se hace con formaldehído con pH tamponado o inclusión en parafina. Como punto importante es mantenerse siempre en rangos de temperatura ambiente, de manera de evitar pérdida de antigenicidad⁶¹.

Resultados

Identificación del genotipo de los ratones

En el transcurso del trabajo desarrollado en el laboratorio se realizaron varios genotipados, a los efectos de establecer y mantener la colonia de ratones KO para nuestro gen de interés. Para cada uno se analizó la amplificación del ADN por PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa, asignando dos carriles por cada animal en el gel, en el de la izquierda se colocó el producto de amplificación de la muestra con los primers Common y KO (amplificación del gen KO) y en el de la derecha con los primers Common y WT (amplificación del gen WT). Se sabe que el amplicón del gen WT tiene un tamaño de 237pb y el del KO 328pb.

Aproximadamente 15 ensayos de PCR y análisis de los productos por electroforesis fueron ejecutados, siendo alrededor de 100 el total de muestras analizadas. En la Figura 8 se observa a modo de ejemplo uno de los geles realizados para la evaluación de los genotipos.

Para el ratón 1 (carriles 1 y 2), se observa una sola banda a la altura esperable en el carril WT; para el ratón 2 (carriles 3 y 4) y al igual que para el ratón 3 (carriles 6 y 7) se observa una banda clara en cada uno de los carriles, coincidiendo con el tamaño predecible; en tanto que, para el ratón 4 (carriles 8 y 9) se visualiza un única banda en el carril KO, a la altura esperada.

Como resultado de este genotipado se tiene que el ratón 1 es del genotipo WT, el ratón 4 es del genotipo KO y los ratones 2 y 3 son heterocigotas para nuestro gen de interés. La ventaja de este método de genotipado con respecto a la simple ausencia de una banda WT en los KO es que se debe amplificar una banda en cada

par de primers, con lo cual no se presta a errores derivados de que la PCR no haya funcionado en algún tubo.

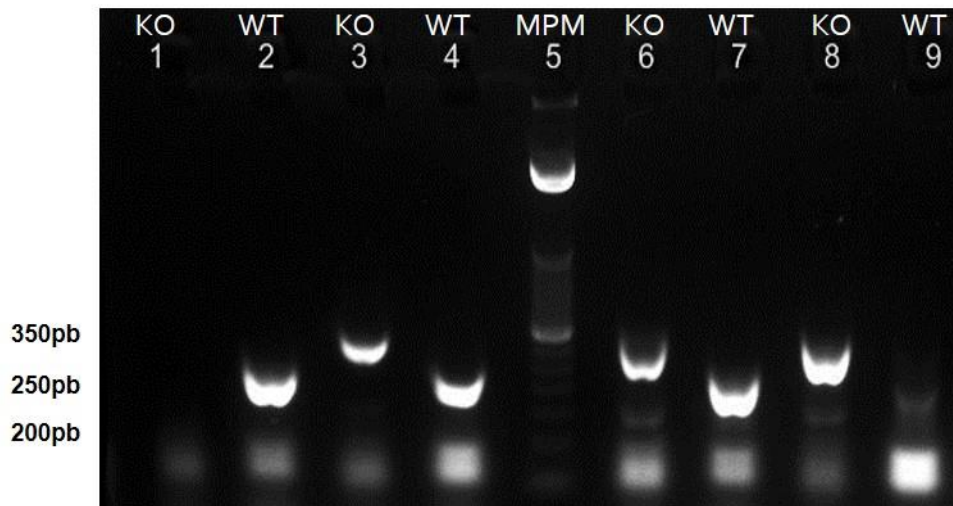


Figura 8| Análisis de genotipos. Gel de agarosa 2%, teñido con 1% de GelGreen™. Muestra los productos de amplificación de la PCR a partir de ADN extraído de muestras de cola de cuatro ratones. Ratón 1: carril 1 y 2; ratón 2: carril 3 y 4; ratón 3: carril 6 y 7; ratón 4: carril 8 y 9. Los carriles 1, 3, 6 y 8 corresponden a la corrida producto de amplificación de la muestra con primers Common y KO; y en los carriles 2, 4, 7 y 9 la amplificación de la muestra con primers Common y WT. Carril 5: marcador de peso molecular. Se puede observar que para el ratón 1, se obtiene una única banda en el carril WT con peso molecular aproximado menor a 250pb, indicando un genotipo WT; para el ratón 4 un única banda en el carril 9, con peso molecular entre 250 y 350pb, evidenciando genotipo KO; mientras que para los ratones 2 y 3 se obtienen bandas en los carriles WT y KO, denotando un genotipo heterocigota.

Modelo de LPS

De acuerdo a los datos preliminares, nuestra hipótesis y los objetivos planteados para este modelo se esperaba observar una mayor reactividad de la microglía en los animales KO para nuestro inmunoreceptor de interés. El modelo LPS nos permite obtener datos sobre la neuroninflamación independiente a la infiltración de células del sistema inmune circulantes en sangre. Se analizó mediante inmunohistoquímica cortes de tejido cerebral de ratones WT y KO para el receptor, sin tratamiento y tras las inyecciones intraperitoneales de LPS o PBS como control.

Fue demostrada una mayor activación de la microglía, evidenciada por Iba-1, en los animales KO para CD300f inyectados con LPS respecto a los controles con PBS (Figura 9). Sin embargo, no se observó diferencias en la activación entre los dos genotipos.

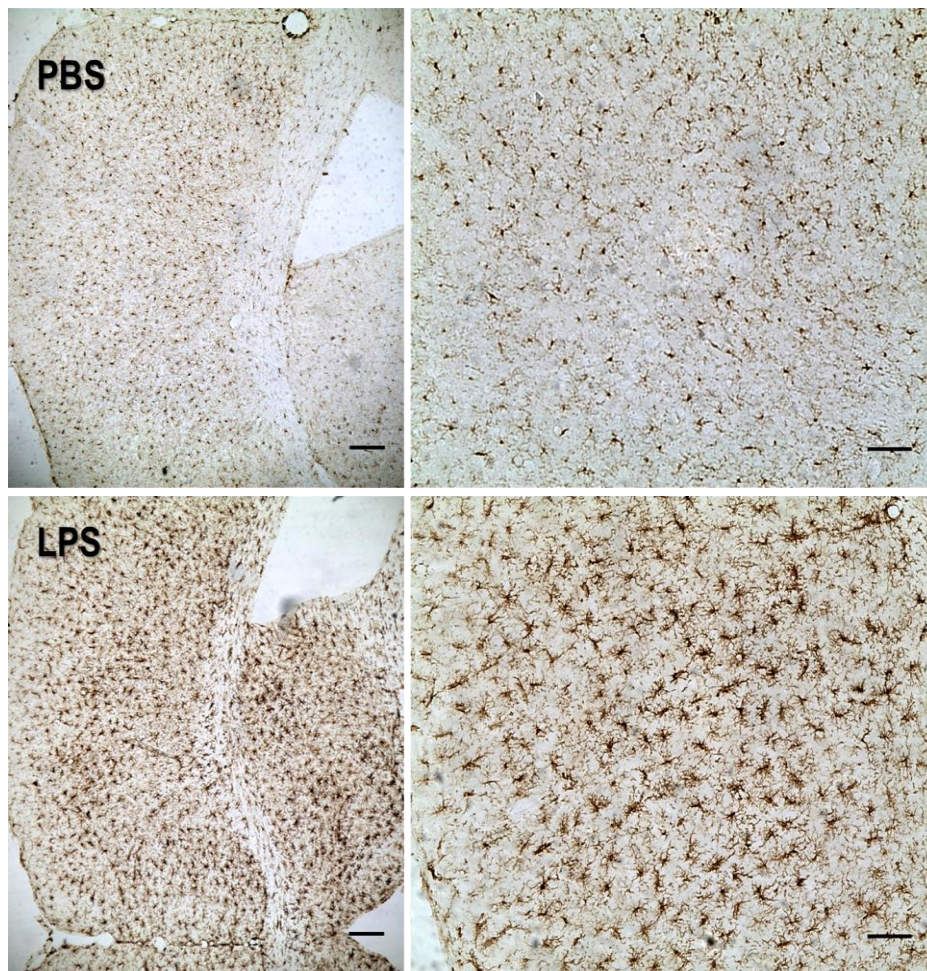


Figura 9| El LPS induce la activación de la microglía en el cerebro. Microscopía óptica del marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo anti-Iba-1. Se evidencia la reactividad de la microglía en la corteza cerebral luego del tratamiento con inyecciones repetitivas de LPS o PBS (control) intraperitoneal en ratones KO. La inyección de LPS induce mayor activación microglial.

Izquierda: aumento 40X, escala de la barra: 200µm; **derecha:** aumento 100X, escala de la barra: 50µm.

Se realizó la cuantificación del número de células microgliales en los animales inyectados con PBS, en tanto que en los inyectados con LPS la elevada activación dificultó la discriminación de unidades celulares debido a su hipertrofia, impidiendo una distinción clara de si se trata del soma de la célula o de una prolongación

hipertrofiada de una célula proveniente de otro corte. Al comparar los animales WT y KO se observó una diferencia que si bien no es estadísticamente significativa, se aproxima a serlo ($p=0.0505$, prueba t Student – dos colas), denotando mayor número de microglía en los ratones KO (Figura 10-A).

Utilizando el software libre ImageJ se llevó a cabo un análisis de densidad en las microscopías ópticas obtenidas, se realizó una umbralización manual y fue evidenciada un mayor porcentaje de área ocupada por la inmunoreactividad para Iba-1 en los animales inyectados con LPS respecto a su control con PBS (Figura 10-B), siendo sólo estadísticamente significativo para el genotipo WT ($p=0.0110$ ANOVA de una vía).

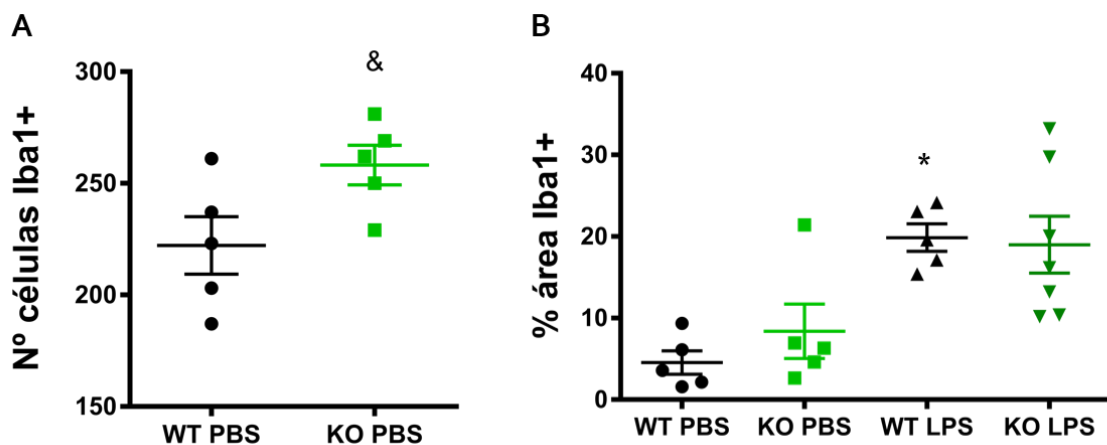


Figura 10| Efecto de la ausencia de CD300f sobre el número de microglía y el área ocupada por ésta. El análisis se realizó a nivel de la corteza cerebral, realizando el conteo de células Iba-1⁺ en ratones inyectados con PBS intraperitoneal y evaluando el porcentaje de área ocupada por estas para cada situación mediante el procesamiento con el software libre ImageJ de imágenes obtenidas por microscopía óptica. Se observa mayor número de células microgliales en los ratones de genotipo KO con respecto a los WT (A). Las inyecciones con LPS inducen igual actividad microglial en ambos genotipos respecto al control de inyecciones con PBS, habiendo diferencias significativas en los ratones WT (B). & $p=0.0505$ t Student- dos colas; * $p< 0.05$ ANOVA de una vía respecto al control.

Al valorar los resultados previamente citados, vimos la necesidad de utilizar un método alternativo para poder evaluar si el mayor número de células Iba-1⁺ observado en los animales KO para CD300f podría explicarse por la existencia de mayor proliferación celular. Se efectuó un estudio por epifluorescencia en cortes de

cerebro seleccionados para que poseyeran la región del hipocampo, valiéndonos de la zona del giro dentado como control positivo de proliferación. Se tomaron fotos de dos zonas de la corteza motora (primaria/M1 y suplementaria/M2) y del giro dentado, para cada hemisferio.

La valoración del estadio celular mediante la detección de expresión del marcador de proliferación Ki-67 se vio afectada por la presencia de mucho ruido en el canal correspondiente a este, impidiendo obtener datos certeros acerca de lo observado. Sin embargo, fue posible detectar con claridad algunas pocas células con expresión activa del marcador en el giro dentado, identificando a una de ellas como microglía y suponiendo a las otras como progenitores neuronales (Figura 11), no detectándose ninguna a nivel de la corteza. Dado que la replicación celular ocurre rápidamente, y los cortes histológicos reflejan un momento corto en la vida del animal, el que no se observe proliferación de la microglía a nivel de la corteza no necesariamente implica que no esté sucediendo de manera más lenta y que pueda explicar el aumento en su número en los animales KO.

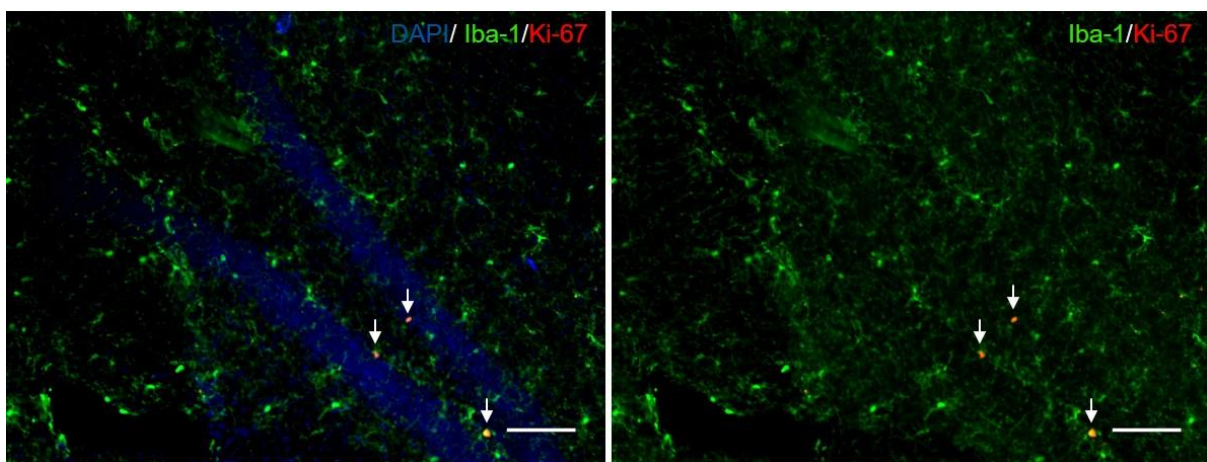


Figura 11| Células microgliales expresando el marcador de proliferación Ki-67. Se muestra la zona del giro dentado, en el hipocampo, utilizada como control positivo de proliferación celular (señalizadas con flecha). Es posible identificar a una de ellas como microglía y se asume a las dos restantes como progenitores neuronales. Escala de la barra: 100µm

Para evaluar el estado inflamatorio producto de las inyecciones de LPS o PBS se realizó una qPCR con análisis relativo al gen 18S de los genes elegidos por su relación a procesos inflamatorios o por codificar para moléculas específicas de microglía o macrófagos (Figura 12). Se observó para ambos genotipos tras las inyecciones de LPS un aumento significativo en el número de ARNm codificantes para CD86, CD11b e IL-1 β pero no para Tmem119 y NLRP3. Para ninguno de los casos se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos WT y KO, luego de ser inyectados con LPS.

Los valores de Tmem119 tanto en el grupo inyectado con LPS y el control (inyecciones con PBS), para ambos genotipos, mantuvieron valores similares respecto a los NAIVE (sin tratamiento), mostrando una leve tendencia al alza. En tanto que, en el caso de NLRP3 los WT también se mantienen en valores similares respecto al control y ratones sin tratamiento; pero sí se observa un aumento significativo en los KO respecto a su control con PBS (Figura 12), más probablemente debido a una disminución del NLRP3 en los animales inyectados con PBS que a un aumento luego del LPS.

Se destaca entonces que si bien las diferencias no son significativas en los animales KO tratados con PBS respecto a los ratones KO sin tratamiento (NAIVE), hay una tendencia al alza en los valores de IL-1 β y a la baja de CD86, CD11b y NLRP3, más acentuada en éste último, en los animales inyectados con PBS, dando indicios de posible estrés producto de la manipulación.

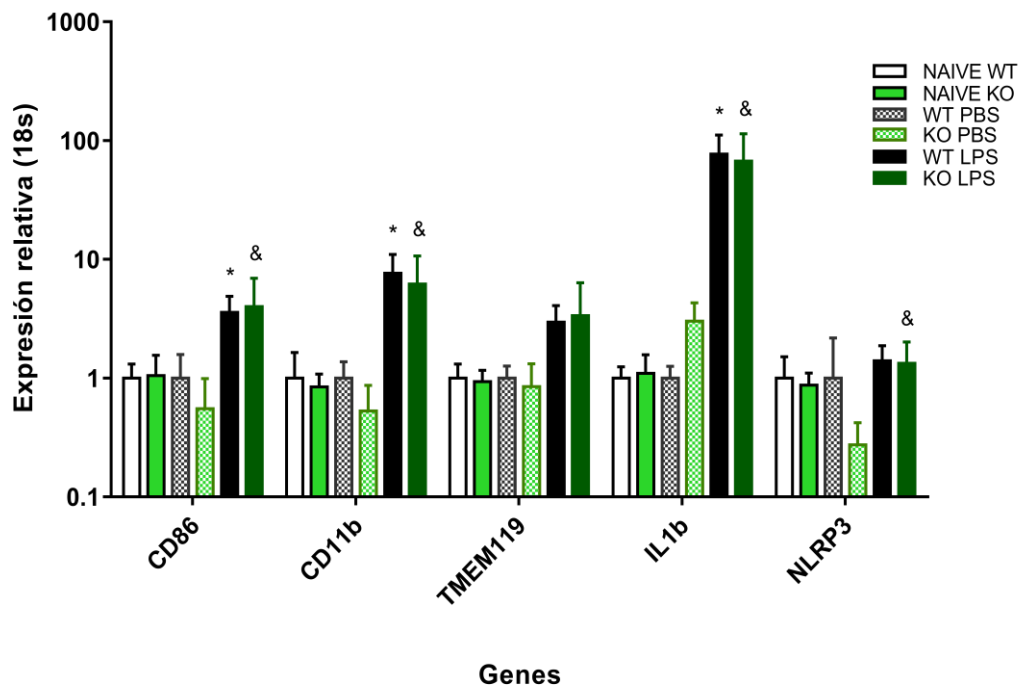


Figura 12| Cuantificación relativa de ARNm para marcadores específicos de microglía y relacionados a procesos inflamatorios en un modelo de neuroinflamación limpia. Se muestra el valor relativo al gen ribosomal 18S que tienen diferentes ARNm en ratones que recibieron un tratamiento de inyecciones intraperitoneales repetitivas de PBS o LPS, a los 4 días del mismo, y en ratones sin tratamiento (NAIVE), discriminados por genotipo WT y KO. No se observan diferencias significativas entre los genotipos para ninguno de los genes, en ninguna de las situaciones planteadas. * $p < 0.05$ respecto a su control, & $p < 0.05$ respecto a su control - ANOVA de una vía.

Modelo de Trauma Encéfalo-Craneano

Se evaluaron las variaciones en los ARNm para los mismos genes analizados en el modelo anterior, 5 días luego de la lesión cerebral traumática. En este modelo, a diferencia del anterior, hay infiltración de células circulantes en sangre producto de la rotura de vasos sanguíneos durante el trauma.

Como se puede observar en la Figura 13, todos los genes en ambos genotipos, a excepción de Tmem119 que se mantiene igual, muestran un aumento significativo en los niveles de ARNm tras la realización del TEC. No obstante, nuevamente no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos WT y KO, aunque sí se observa en los animales KO una tendencia a la baja en la expresión de los genes para CD86 y CD11b, marcadores específicos de microglía y macrófagos.

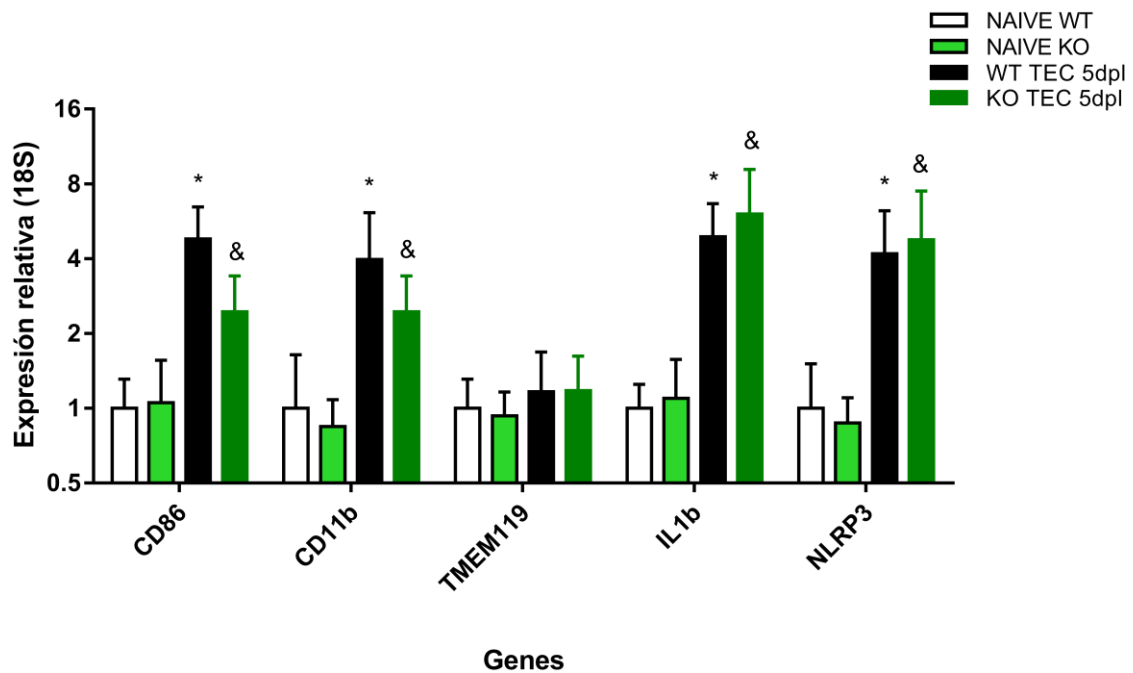


Figura 13| Cuantificación relativa de ARNm para marcadores específicos de microglía y relacionados a procesos inflamatorios 5 días posteriores a un trauma encéfalo-craneano.

Comparación de los valores de expresión relativos al gen ribosomal 18S que tienen ciertos genes a los 5 días posteriores en ratones a los que fue practicado un TEC y ratones control (NAIVE), discriminados por genotipo WT y KO. No se observan diferencias entre éstos, aunque sí una leve tendencia a la baja para CD86 y CD11b. * $p < 0.05$ respecto a su control, & $p < 0.05$ respecto a su control - ANOVA de una vía.

Terapia génica

El laboratorio produjo previamente lentivectores y vectores no virales –HRNK- para la sobreexpresión de CD300f humano⁴⁷. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de transfección y transducción de los mismos en ensayos *in vivo* de terapia génica. Se partió de cortes cerebrales de tres ratas por cada tratamiento aplicado, las muestras se obtuvieron 90 días posteriores a la lesión/tratamiento y fueron conservadas a -80 °C. Se utilizó como reportero control el gen de expresión para la proteína fluorescente GFP.

El análisis se realizó por inmunohistoquímica, pudiéndose constatar la expresión de GFP solamente en uno de los tres animales inyectados con lentivectores (Figura

14 y Figura 15). No se constató expresión de GFP con los vectores HRNK. En tanto que, para ninguno de los dos tipos de vectores se detectó expresión de CD300f humano.

Como se puede ver en la Figura 14 y Figura 15 la expresión de GFP se da principalmente en células con morfología neuronal y astrocitaria, siendo esto acorde a lo esperado ya que el vector lentiviral utilizado fue pseudotipado con la proteína G del virus de estomatitis vesicular (VSG-G)⁶².

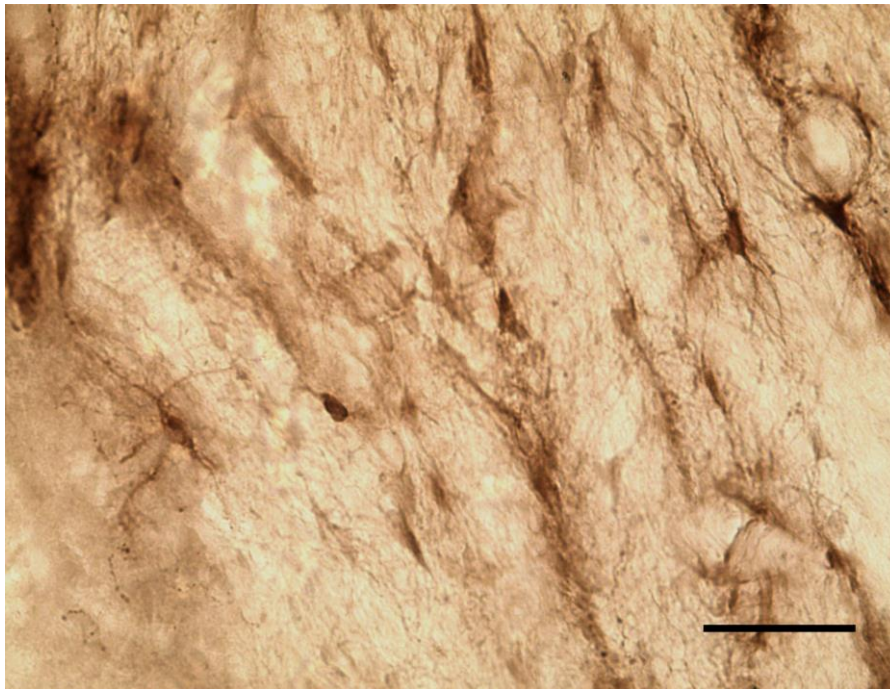


Figura 14 | Transducción *in vivo* de GFP utilizando vectores lentivirales.

Para evaluar la transducción de GFP se realizó una inmunohistoquímica con anti-GFP y un secundario marcado con HRP en cortes de cerebros lesionados y tratados con inyecciones de vectores lentivirales. Se observa una clara expresión de la proteína reportera en neuronas y algunos astrocitos. Aumento 400X. La barra de escala corresponde a 50µm.

A su vez, en el análisis de las muestras se pudo apreciar que la expresión de la proteína se estaba dando principalmente en las zonas adyacentes a los sitios de inyección (Figura 15, A-C), siendo congruente con el hecho de que por tratarse de un tejido con escaso espacio extracelular, la inyección de sustancias en el SNC presenta como inconveniente la poca difusión de las moléculas.

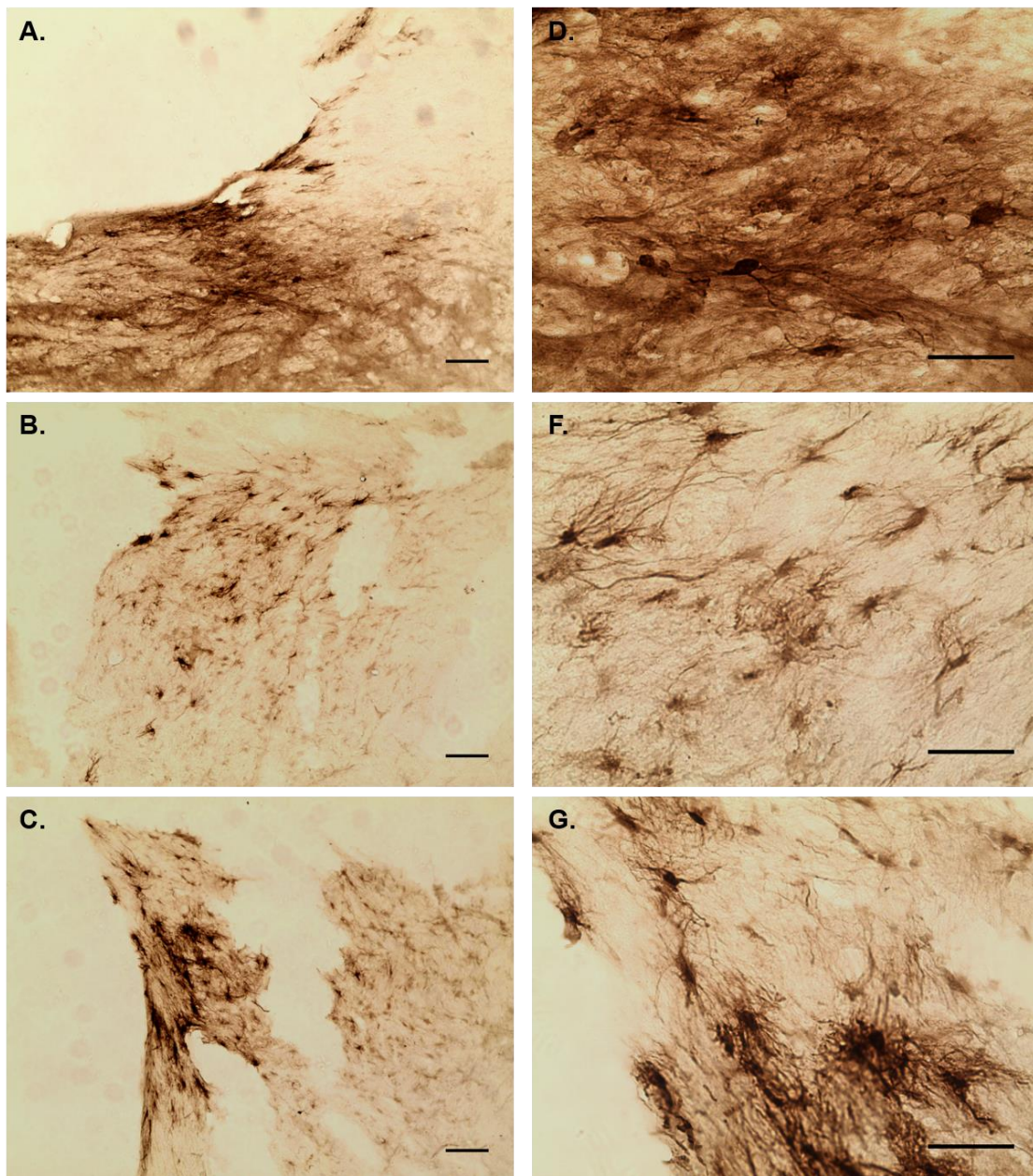


Figura 15| Transducción *in vivo* de GFP mediante vectores lentivirales.

Para evaluar la transducción de GFP se realizó una inmunohistoquímica anti-GFP y un secundario marcado con HRP en cortes de cerebros lesionados y tratados con inyecciones de vectores lentivirales. Se evidencia expresión de la proteína reportera en algunas neuronas (D), pero principalmente en astrocitos (A-G).

A-C: 100X, barra de escala: 100 μ m. **D-G:** 400X, barra de escala: 50 μ m

Discusión

La utilización de ratones modificados genéticamente como modelos biológicos es una parte esencial en la investigación biomédica, por lo que controlar, seleccionar y comprobar su pureza se transforma en un punto fundamental a la hora de trabajar con una colonia de éstos. Requiere de un trabajo minucioso por parte del personal del bioterio, donde se controlan los diferentes factores endógenos o exógenos, ya sean climáticos, fisicoquímicos, nutricionales, microbiológicos y genéticos, no dejando de lado el velar por el cumplimiento de las normas éticas que implica el trabajo con seres vivos. Todos los trabajos realizados aquí han sido por tanto aprobados por el comité de ética de experimentación animal.

A los efectos, se propuso como objetivo llevar a cabo la correcta identificación de los genotipos de las crías resultantes, producto de las cruzas que se encontraba realizando el bioterio del instituto. Dada la complejidad para lograr una PCR exitosa para cada par de cebadores, cumplir con el propósito fue algo complejo al principio, requiriendo de un aprendizaje y puesta a punto de la técnica para lograr la mayor fidelidad posible.

De cada generación de animales se identificaron las poblaciones de heterocigotos nCD300f (+/-), homocigotos nCD300f (-/-) y silvestres nCD300f (+/+). Todos los animales obtenidos, de los diferentes genotipos, fueron y serán empleados tanto en investigación como en el mantenimiento de la colonia que al día de hoy se encuentra en funcionamiento y se está reproduciendo con éxito.

El establecimiento de la colonia de ratones con mutación nula para el inmunoreceptor CD300f (CLM-1) en el bioterio del instituto, contribuye al trabajo de investigación que desarrolla nuestro laboratorio en el área de las neurociencias e

inflamación, pero también contribuye con la elucidación de mecanismos y desórdenes en los que posiblemente esté implicado CD300f, en áreas como el metabolismo y envejecimiento, en las que trabajan otros laboratorios del instituto con los que actualmente colaboramos. A modo de ejemplo, es destacable mencionar en este contexto y el de nuestra hipótesis sobre la activación de la microglía en relación a la ausencia del receptor, una investigación recientemente publicada donde se evidencia el hecho de que la microglía activa dirige una respuesta inmune hipotalámica compleja en respuesta al exceso dietario y además la señalización inflamatoria que lleva a cabo regula tanto la ingesta como el gasto de energía⁶³.

Abocándonos hacia el objetivo principal de la pasantía, donde nos propusimos valorar el papel que desempeña CD300f en la neuroinflamación valiéndonos de ciertos modelos experimentales, logramos dar luz sobre posibles procesos en los que esté implicado. El uso de ratones modificados genéticamente para que carezcan del receptor (*knockout*), así como la sobreexpresión del mismo utilizando como herramienta la terapia génica, constituyen dos modelos complementarios a la hora de brindarnos información acerca del rol que juega en determinados contextos. En este trabajo se utilizó principalmente la ausencia del receptor para intentar caracterizar las funciones del mismo, pero además se consiguió evaluar luego de un trauma encéfalo-craneano los niveles de sobreexpresión espacial y temporal de una proteína reportera producto de la aplicación de terapia génica en un proyecto anterior, como posible medida paliativa ante los efectos que ocasiona una lesión traumática cerebral.

Analizando los resultados obtenidos, hemos descrito la presencia de mayor número de células microgliales en la corteza cerebral de animales con el *knockout* del receptor respecto a los silvestres luego de inyecciones intraperitoneales de PBS. Sin embargo, si bien existía una tendencia hacia el aumento del área ocupada por estas células, los resultados no mostraron una diferencia significativa entre ambos genotipos. Es interesante destacar que otros compañeros de laboratorio observaron posteriormente que los ratones KO naive mostraban un aumento similar en el número microglial al que observamos en ratones KO inyectados con PBS, sugiriendo que este aumento es una característica intrínseca de la falta de CD300f. En tanto, el ensayo inmunohistoquímico con anti-Ki67 realizado para valorar la proliferación celular no nos arrojó resultados concluyentes para verificar si este aumento es debido a una mayor proliferación en los animales KO. La escasa aunque significativa detección de células inmunoreactivas para Ki-67 en el hipocampo nos da la pauta de que el método escogido para tal fin quizás no haya sido el adecuado para la detección de poblaciones celulares con muy baja tasa de replicación. La división celular ocurre muy rápidamente, y valorarla en cortes histológicos que representan un período corto en la vida del animal nos brinda información muy acotada. Sin embargo, podemos descartar que ocurra una importante proliferación microglial a tasas superiores a las observadas en progenitores neuronales hipocampales.

En base a lo descrito recientemente respecto a la homeostasis de la microglía, donde se observó que la autorenovación de éstas se mantiene mediante la proliferación y la apoptosis acopladas, dando como resultado un número estable durante la vida del ratón o humano⁶⁴, podemos suponer que los animales KO para CD300f presentan un desbalance en la regulación de dicho mecanismo. Es

necesario entonces realizar más estudios para poder evaluar estos procesos y tratar de dilucidar el mecanismo implicado, pudiendo estar uno o ambos procesos afectados. Se plantean tres situaciones hipotéticas que podrían explicar lo observado por nuestro grupo: que esté ocurriendo mayor proliferación celular, que la apoptosis no se esté dando a tasas adecuadas, o que ambas vías se encuentren afectadas. Una cuarta posibilidad que podríamos plantear es que se trate de cambios a nivel del neurodesarrollo que determinen un establecimiento temprano del número de microglia.

Como perspectiva, a futuro se debería de determinar la cinética de proliferación y muerte microglial. Teniendo presente una investigación reciente que da cuenta de que la microglía en el cerebro humano se renueva lentamente a una tasa media del 28% por año⁶⁵, un posible ensayo sería evaluar *in vivo* la proliferación celular durante un determinado período de tiempo mediante la incorporación de BrdU por parte de las células. En tanto, por su finalidad, valorar la apoptosis en un período de tiempo extendido se hace más complejo ya que las células que realizaron el proceso no dejan huellas de ello. Igualmente, como aproximación se podría realizar la detección de fosfatidilserina en la membrana de las células y tinción con yoduro de propidio, para valorar la pérdida de la integridad de la membrana, permitiendo conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de muerte celular, o si se encuentra en una etapa tardía en la cual hay presente necrosis secundaria. Adicionalmente, se podría analizar la densidad microglial en animales postnatales entre P1 y P12, momento en el cual se establece la densidad de células microgliales final⁶⁶.

Según los ensayos realizados para la valoración de los cambios en la abundancia de ARNm codificantes para moléculas relacionadas a procesos inflamatorios o marcadores celulares característicos, describimos diferencias en la abundancia de éstos entre los modelos.

Es destacable aludir al hecho de que utilizamos dos modelos muy diferentes de neuroinflamación para el estudio del rol de CD300f en dichos procesos. El modelo LPS consistió en inyecciones intraperitoneales de LPS durante 4 días seguidos y el cerebro se aisló a las 24 horas de finalizado el tratamiento, teniendo éste un efecto sistémico. Por otra parte, en el modelo de TEC el tejido se obtuvo a los 5 días luego de aplicada la contusión, que genera un daño focal sobre el cerebro. Considerando la bibliografía existente donde se describen diferencias en la respuesta de la microglía conforme pasa el tiempo y el tipo de injuria¹³⁻¹⁵, las diferencias en la expresión de los genes evaluados se ve directamente influenciada por este hecho.

En los animales inyectados con LPS no se observó un cambio en la expresión de los genes analizados entre los dos genotipos. Este resultado es contrario a nuestra hipótesis y podría sugerir que en condiciones inflamatorias agudas y no crónicas el CD300f no juega un papel importante en la regulación de la intensidad del fenómeno inflamatorio. Una hipótesis alternativa podría incluir que el efecto anti-inflamatorio del CD300f se ve enmascarado por la elevada inflamación generada por la inyección repetida durante 4 días, de hecho detectamos un aumento de casi cien veces en la abundancia de ARNm para IL-1 β tanto en los animales silvestres como en los KO para CD300f, asociado a un cambio muy intenso en la morfología microglial, difícilmente incrementable. Es decir, talvez el diseño experimental sobre-estimuló al sistema generando una inflamación máxima en ambas condiciones enmascarando así el efecto anti-inflamatorio del CD300f.

Para confirmar esta hipótesis, a futuro se debería repetir el modelo experimental utilizando concentraciones menores de LPS y/o llevándolo a cabo durante menos días.

Teniendo en cuenta esto, las diferencias observadas en los animales sin tratamiento y los inyectados con PBS como control, si bien no fueron significativas, cobran mayor valor. En los animales KO inyectados con PBS se observó una tendencia al alza de IL-1 β a pesar de la tendencia a la baja en abundancia de ARNm para NLRP3. El inflamosoma NLRP3 es crucial para la maduración y secreción de IL-1 β , por lo cual estos datos podrían sugerir un posible mecanismo compensatorio a la inflamación en respuesta a factores estresantes, como lo son la manipulación e inyección intraperitoneal diaria repetida. Esta observación podría indicar que los animales KO poseen una especial vulnerabilidad al estrés, aunque deberían realizarse experimentos en este sentido con modelos de estrés crónico para establecer este hecho.

Además, en estas condiciones de estrés generado, la aparente disminución en la expresión de los genes inflamatorios de microglía observada en lo animales inyectados con PBS, si bien tampoco fue significativa, sugiere una afección en el mantenimiento de la homeostasis y fenotipo de éstas, dando cuenta de un estado menos pro-inflamatorio.

Por otra parte, en lo que refiere al experimento de trauma encéfalo-craneano, no fueron evidenciados grandes cambios de expresión a nivel de los genes seleccionados entre los genotipos. Se observó luego del mismo un aumento en los niveles de expresión de los genes homeostáticos e inflamatorios para ambos genotipos, a excepción de Tmem119. Por otra parte, se observó una tendencia a la

disminución, nuevamente no significativa, en los niveles de expresión de CD86 y CD11b en los ratones lesionados con mutación nula para el receptor, indicando una afección en la homeostasis microglial, la cual muestra un fenotipo menos pro-inflamatorio. Se debe de tener en cuenta además, que el trauma genera rotura de los vasos sanguíneos y por consiguiente de la barrera hematoencefálica, lo cual conlleva a la infiltración de células inmunes circulantes en sangre. Siendo que estos receptores se encuentran también presentes en otras células de la línea mieloide como ser macrófagos o neutrófilos, el hecho de observar niveles más bajos de estos marcadores podría deberse también a un menor reclutamiento de éstos. Para poder evaluar esta hipótesis, sería conveniente efectuar nuevos experimentos de TEC con un análisis de marcadores celulares específicos mediante ensayos de citometría a tiempos cortos post-trauma.

No obstante, en relación al mismo modelo experimental, resultados que no han sido publicados y no se muestran en este trabajo, sí arrojaron cambios significativos en los niveles de expresión de ciertos genes un día después de la lesión. Por consiguiente, posiblemente a los cinco días posteriores de la contusión, los niveles de inflamación que se dan en ambos genotipos son equivalentes a pesar de los cambios iniciales.

Teniendo en cuenta la globalidad en los resultados obtenidos, éstos indican posibles escenarios que se contraponen a nuestra hipótesis inicial, donde esperábamos un aumento en la sobreexpresión de los genes indicadores de activación microglial hacia un fenotipo M1, y por consiguiente de moléculas inflamatorias, como resultado de la ausencia de CD300f. Probablemente la activación de la microglía observada en los animales KO esté desempeñando más funciones neuroprotectoras⁶⁷, o por el

contrario fagocíticas⁶⁸, que pro-inflamatorias. En este contexto es destacable mencionar observaciones en test comportamentales, que han realizado otros integrantes del laboratorio, donde se ve una afección funcional en los animales que carecen de CD300f.

A modo de poder concretar una caracterización en la función que desempeña CD300f en la neuroinflamación es necesario a futuro llevar a cabo un análisis de mayor cantidad de genes relacionados a procesos inflamatorios y fagocíticos, correlacionado con la abundancia de la proteína, a diferentes tiempos del estímulo o lesión. Idealmente deberían realizarse estudios como RNAseq de forma de obtener un panorama amplio de los procesos regulados por CD300f.

Por lo pronto, en un futuro próximo se realizarán ensayos utilizando ratones “floxeados” para el gen de CD300f. Esto permitirá que los animales carezcan del receptor en un momento determinado y no durante toda la vida, lo cual dará cuenta más fiel del efecto de éste, evitando los cambios que puedan ocurrir con la microglía durante el desarrollo como consecuencia de su ausencia.

En otro orden, la valoración en los niveles de expresión de GFP utilizando terapia génica con lentivectores pseudotipados, como medida paliativa para hacer frente a la neuroinflamación, mostraron una transducción exitosa solamente en uno de los tres ratones analizados. Además, esta transducción ocurrió en zonas adyacentes a los sitios de inyección y en tipos celulares con morfología neuronal y astrocitaria, congruentes con lo descrito previamente al pseudotipar con la proteína VSG-G⁶². Estos dos factores denotan las carencias del método al ser aplicado directamente

sobre el tejido nervioso *in vivo* y talvez contribuyan a explicar la falta de efecto neuroprotector post-trauma observado por otros compañeros del grupo.

De todas formas, el uso de lentivectores ha demostrado ser exitoso para lograr la expresión no integrativa⁶² de los genes introducidos aún a los noventa días después de aplicado el tratamiento. La no detección de hCD300f en ninguno de los animales analizados puede deberse a que el anticuerpo utilizado no funcione correctamente en muestras histológicas y no necesariamente a que no se haya logrado transducción del mismo.

Sin dudas, se requiere de ensayos a futuro que introduzcan variaciones en la técnica, valiéndose de moléculas que faciliten la llegada al cerebro por vía sanguínea al permitir atravesar la barrera hematoencefálica, haciendo por consiguiente que sea menos invasiva y resulte en una entrega del material genético en todo el cerebro. Asimismo, es necesario buscar estrategias que permitan afinar el tropismo de los vectores para permitir una entrega hacia células específicas, así como homogeneizar la eficacia de manera de poder obtener resultados similares en diferentes organismos. Esto es de especial relevancia para lograr transducir células microgliales, las más complejas de transducir *in vivo* e *in vitro*⁶².

Aislar moléculas o células para tratar de dilucidar o entender los procesos microscópicos y adjudicar en exclusividad los efectos observados, conducen muchas veces a una simplificación exagerada en la interpretación de los datos, con el fin de generar conocimiento. Por eso, un punto sustancial a la hora de esbozar posibles escenarios es no olvidar la complejidad con la que se despliegan las funciones o patologías en el organismo, llevadas a cabo por interacción o acción de cientos de moléculas y células diferentes, que interactúan con un refinamiento extraordinario.

Conclusiones

Logramos evidenciar ciertas características que se contraponen con la hipótesis inicial propuesta para la ausencia de CD300f, proponiendo un efecto directo de éste en el mantenimiento de la homeostasis microglial, pero no anti-inflamatorio como proponía nuestra hipótesis original.

Determinamos presencia de mayor número de microglia en la corteza cerebral de ratones KO sometidos a condiciones de estrés leve, descartando altas tasas de proliferación que superen a la de los progenitores neurales, pero que podría explicarse por un desbalance en la homeostasis para mantenimiento del número de células, tal vez debida a cambios durante el desarrollo.

En las mismas condiciones, vimos una tendencia a variaciones en los niveles de expresión génica para genes inflamatorios (CD11b y CD86), y se evidenció un posible mecanismo de compensación inflamatoria ante este tipo de estímulo estresante, pudiendo indicar que los animales KO presentan especial vulnerabilidad al estrés.

Tras un trauma cerebral, no fueron evidenciados grandes cambios en los niveles de expresión de genes homeostáticos e inflamatorios al comparar el genotipo KO con el WT, pero obtuvimos indicios de un fenotipo microglial menos pro-inflamatorio en los animales KO.

Estos últimos resultados sugieren que el CD300f en condiciones de estrés leve (inyecciones con PBS) o inflamación aguda (TEC), a corto plazo, tendría una tendencia a ser pro-inflamatorio.

En tanto, demostramos que la aplicación de terapia génica directa, usando lentivectores no-integrativos, es exitosa para lograr la expresión no integrativa de los

genes introducidos aún a los noventa días post-tratamiento, presentando como desventaja una transducción adyacente a los sitios de inyección y una importante variabilidad en la expresión del transgen entre los diferentes animales inyectados.

Referencias bibliográficas

1. Camponovo, B. Enfermedad traumática en Uruguay: aspectos epidemiológicos. *Rev. Médica del Uruguay* **11**, 187–207 (1995).
2. Laurer, H. & McIntosh, T. Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* **12**, 715–21 (1999).
3. Thuret, S., Moon, L. D. F. & Gage, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* **7**, 628–643 (2006).
4. Maas, A. I. R., Stocchetti, N. & Bullock, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* **7**, 728–741 (2008).
5. Graeber, M. B., Streit, W. J. & Pain, Á. N. Á. Microglia : biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 89–105 (2010).
6. Spranger, M. & Fontana, A. Activation of Microglia : A Dangerous Interlude in Immune Function in the Brain. *Neurosci.* **2**, 293–299 (1996).
7. Nimmerjahn, A. et al. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (80-.).* **1314**, (2012).
8. Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J. Microglia-mediated neurotoxicity : uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 57–69 (2007).
9. Davalos, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* **8**, 752–758 (2005).
10. Morganti-Kossmann, M. C., Rancan, M., Stahel, P. F. & Kossmann, T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* **8**, 101–105 (2002).
11. Loane, D. J. & Byrnes, K. R. Role of Microglia in Neurotrauma. *Neurotherapeutics:* **7**, 366–377 (2010).

12. Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* **122**, 787–795 (2012).
13. Simon, D. W. *et al.* The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat. Publ. Gr.* (2017). doi:10.1038/nrneurol.2017.13
14. Fenn, A. M. *et al.* Immune activation promotes depression 1 month after diffuse brain injury: A role for primed microglia. *Biol. Psychiatry* **76**, 575–584 (2014).
15. Fenn, A. M. *et al.* Methylene Blue Attenuates Traumatic Brain Injury-Associated Neuroinflammation and Acute Depressive-Like Behavior in Mice. *J. Neurotrauma* **32**, 127–138 (2015).
16. Raivich, G. *et al.* Neuroglial activation repertoire in the injured brain : graded response , molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Rev.* **30**, 77–105 (1999).
17. Alexander, J. K. & Popovich, P. G. *Neuroinflammation in spinal cord injury : therapeutic targets for neuroprotection and regeneration. Progress in Brain Research* **175**, (Elsevier, 2009).
18. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
19. Loane, D. J., Kumar, A., Stoica, B. A., Cabatbat, R. & Faden, A. I. Progressive Neurodegeneration After Experimental Brain Trauma : Association With Chronic Microglial Activation. *Neuropathol. Exp. Neurol.* **73**, 14–29 (2014).
20. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).
21. Cd, O. X. *et al.* Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science (80-.)*. **290**, 1768–1771 (2012).

22. Borrego, F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* **121**, 1951–1960 (2013).
23. Bajramovic, J. J. Regulation of Innate Immune Responses in the Central Nervous System. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **10**, 4–24 (2011).
24. Griffiths, M. R., Gasque, P. & Neal, J. W. The Regulation of the CNS Innate Immune Response Is Vital for the Restoration of Tissue Homeostasis (Repair) after Acute Brain Injury : A Brief Review. *Int J Inflamm* **2010**, (2010).
25. Alvarez-errico, D., Aguilar, H., Kitzig, F. & Brckalo, T. IREM-1 is a novel inhibitory receptor expressed by myeloid cells. *Eur J Immunol.* **34**, 3690–3701 (2004).
26. Cantoni, C. *et al.* Molecular and functional characterization of IRp60 , a member of the immunoglobulin superfamily that functions as an inhibitory receptor in human NK cells. *Eur J Immunol.* **29**, 3148–3159 (1999).
27. Comas-casellas, E., Schwartz, S. & Sayo, J. CD300 Heterocomplexes , a New and Family-restricted Mechanism for Myeloid Cell Signaling Regulation * □. *J Biol Chem* **285**, 41781–41794 (2010).
28. Clark, G. J. *et al.* The CD300 molecules regulate monocyte and dendritic cell functions. *Immunobiology* **214**, 730–736 (2009).
29. Alvarez-Errico, D., Sayos, J. & Lopez-Botet, M. The IREM-1 (CD300f) Inhibitory Receptor Associates with the p85 Subunit of Phosphoinositide 3-Kinase. *J. Immunol.* **178**, 808–816 (2007).
30. Izawa, K. *et al.* The Receptor LMIR3 Negatively Regulates Mast Cell Activation and Allergic Responses by Binding to Extracellular Ceramide. *Immunity* **37**, 827–839 (2012).
31. Xi, H. *et al.* Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory

- receptor CLM-1. *J Exp Med* **207**, 7–16 (2010).
32. Tian, L. *et al.* p85a recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression Linjie. *Nat. Commun.* **5**, 1–15 (2014).
 33. Peluffo, H. *et al.* Overexpression of the Immunoreceptor CD300f Has a Neuroprotective Role in a Model of Acute Brain Injury. *Brain Pathol.* **22**, 318–328 (2012).
 34. Peluffo, H. *et al.* CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype. *J. Neuroinflammation* **145**, 1–15 (2015).
 35. Kay, M. a. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 316–328 (2011).
 36. Lundstrom, K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends in Biotechnology* **21**, 117–122 (2003).
 37. Mastrobattista, E., van der Aa, M. a E. M., Hennink, W. E. & Crommelin, D. J. a. Artificial viruses: a nanotechnological approach to gene delivery. *Nat. Rev. Discov.* **5**, 115–121 (2006).
 38. Peluffo, H. Modular Multifunctional Protein Vectors for Gene Therapy. in *Non-Viral Gene Therapy* (ed. Yuan, X.) 597–614 (InTech, 2011).
 39. Annoni, A., Goudy, K., Akbarpour, M., Naldini, L. & Roncarolo, M. G. Immune responses in liver-directed lentiviral gene therapy. *Translational Research* **161**, 230–240 (2013).
 40. Howe, S. J. *et al.* Insertional mutagenesis in combination with acquired somatic mutations leads to leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1. *J. Clin* **118**, 3143–50 (2008).

41. Hacein-Bey Abina, S. *et al.* A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **348**, 255–256 (2003).
42. Mastrobattista, E., Bravo, S. A., van der Aa, M. & Crommelin, D. J. A. Nonviral gene delivery systems: From simple transfection agents to artificial viruses. *Drug Discov. Today Technol.* **2**, 103–109 (2005).
43. Salem, A. K., Searson, P. C. & Leong, K. W. Multifunctional nanorods for gene delivery. *Nat. Mater.* **2**, 668–671 (2003).
44. Demeule, M. *et al.* Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**, 1064–1072 (2008).
45. Pardridge, W. M. Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses. *J. Control. Release* **122**, 345–348 (2007).
46. Deverman, B. E. *et al.* Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat. Biotechnol.* 1–8 (2016). doi:10.1038/nbt.3440
47. Negro-Demontel, M. L. *et al.* Comparative analysis of lentiviral vectors and modular protein nanovectors for traumatic brain injury gene therapy. *Mol. Ther. — Methods Clin. Dev.* **1**, 14047 (2014).
48. Chen, Z. *et al.* Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Neuroprotection against Experimental Brain Injury Is Independent of Hematogenous TLR4. *J Neurosci* **32**, 11706–11715 (2012).
49. Haimes, J. & Kelley, M. *Demonstration of a $\Delta\Delta C q$ Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data.* GE Healthcare, Tech Note (2010).

50. Avila, J. C. *et al.* Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation* **9**, 1–11 (2012).
51. Xiong, Y., Mahmood, A. & Chopp, M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 128–42 (2013).
52. Peluffo, H. *et al.* Neuroprotection from NMDA excitotoxic lesion by Cu / Zn superoxide dismutase gene delivery to the postnatal rat brain by a modular protein vector. *BMC Neurosci* **7**, 1–11 (2006).
53. Peluffo, H. *et al.* Nonviral Gene Delivery to the Central Nervous System Based on a Novel Integrin-Targeting Multifunctional Protein. *Hum Gene Ther* **14**, 1215–1223 (2003).
54. Shampo, M. A. & Kyle, R. A. Kary B. Mullis—Nobel Laureate for Procedure to Replicate DNA. *Mayo Clin. Proc.* **77**, 606 (2002).
55. Bartlett, J. M. S. & Stirling, D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* **226**, 3–6 (2003).
56. Chien, A., Edgar, D. B. & Trela, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550–1557 (1976).
57. Saiki, R. K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491 (1988).
58. Life technologies. *Real-time PCR handbook. Applied Biosystems* (2014). doi:CO320850812
59. Tamay de Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **2**, 70–78 (2013).

60. Coons, A. H., Creech, H. J. & Jones, R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp. Biol. Med.* **47**, 200–202 (1941).
61. M^a Carmen Alarcón Leiva, Laura Plaza Guerrero, R. G. F. Fundamentos Biológicos De Inmunohistoquímica. in *Anatomía Patológica y Citológica* **5**, 17–44 (2005).
62. Peluffo, H. *et al.* Efficient gene expression from integration-deficient lentiviral vectors in the spinal cord. *Gene Ther.* **20**, 645–657 (2013).
63. Valdearcos, M. *et al.* Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metab.* **26**, 185–197.e3 (2017).
64. Askew, K. *et al.* Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep.* **18**, 391–405 (2017).
65. Réu, P. *et al.* The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep.* **20**, 779–784 (2017).
66. Bennett, M. L. *et al.* New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E1738–E1746 (2016).
67. Ransohoff, R. M. & Perry, V. H. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 119–145 (2009).
68. Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 209–216 (2014).