

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas  
PEDECIBA Biología, Subárea Neurociencias  
Noviembre 2018

# EFECTO NEUROPROTECTOR DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA CD200-CD200R EN LA LESIÓN MEDULAR POR CONTUSIÓN

Lic. Bruno Pannunzio

Orientador: Dr. Hugo Peluffo  
Co-orientadora: Dra. Natalia Lago

Laboratorio de Neuroinflamación  
y Terapia Génica  
Institut Pasteur de Montevideo

Tribunal:  
Dr. Raúl Russo  
Dr. Marcelo Hill  
Dra. Silvia Olivera

Departamento de Histología  
y Embriología  
Facultad de Medicina, UdelaR

# RESUMEN

La lesión de médula espinal es una de las principales causas de discapacidad física a largo plazo que tiene un fuerte impacto en la calidad de vida de las personas que lo padecen. Al momento de la lesión se produce un daño primario que es inducido por el incidente físico, que luego desencadena en una respuesta secundaria que se caracteriza por un daño debido a la respuesta inflamatoria, entre otros factores. Por lo tanto, la modulación de esta respuesta inflamatoria es un blanco potencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas para reducir el daño secundario y promover una mejor recuperación funcional luego de la lesión. En particular, los receptores inmunes han ganado importancia en los últimos años como nuevas potenciales dianas para el control y modulación de la respuesta microglía/macrófago. Dentro de éstos, la interacción entre el inmunoreceptor CD200R y su ligando CD200 se ha asociado a numerosas patologías neuroinflamatorias y neurodegenerativas. En este proyecto, se analizó el rol del par CD200-CD200R en la progresión de la patología en un modelo en ratón de lesión medular por contusión. En primer lugar, se analizó la expresión espacio-temporal del receptor CD200R y su ligando CD200 por inmunohistoquímica en médula espinal sin lesionar y a diferentes tiempos post-lesión. En tejido medular sin lesionar, CD200 se encontró principalmente en el neuropilo y dentro del canal central, mientras que no se encontró colocalización con marcadores de somas neuronales y prolongaciones de astrocitos. A 1 día post-lesión, se observó una disminución abrupta general del marcaje que permaneció bajo en los días posteriores, aunque el patrón espacial es el mismo que sin lesionar. Por el contrario, no se encontró inmunoreactividad de CD200R en tejido de médulas espinales sin lesionar, similar a lo que sucede con otros inmunoreceptores que se expresan a muy bajos niveles. A 7 días post-lesión se observó un fuerte marcaje de células CD200R+ que también mostraron inmunoreactividad para el marcador de microglía y macrófagos Iba1, aunque también se observaron células positivas para CD200R y negativas para Iba1. Para dilucidar con mayor precisión los tipos celulares que expresan CD200R se analizaron por citometría de flujo médulas sin lesionar y a 1 día post-lesión, cuando el número de neutrófilos en la médula es mayor. En médulas sin lesionar se encontró que el principal tipo celular que expresa CD200R es la microglía, mientras que a 1 día post-lesión es principalmente la población de neutrófilos, aunque la microglía y los macrófagos también expresan CD200R en menor medida.

Se evaluó el efecto de la modulación de la interacción CD200-CD200R en el desarrollo de la fisiopatología de la lesión de médula espinal. En primer lugar, se analizó si el bloqueo de CD200R con un anticuerpo que impide su interacción con el ligando CD200 al momento de la lesión tiene algún efecto en la preservación de tejido. En ausencia de activación de CD200R se observó una mayor

muerte neuronal medida por el número de células NeuN+ y mayor pérdida de mielina medida con Luxol Fast Blue. Esto concuerda con los resultados funcionales en los que se observó una peor recuperación funcional. Luego se analizó si la activación de este receptor tiene un efecto neuroprotector, inyectando la proteína recombinante CD200-His en el parénquima medular al momento de la lesión y se observó que promueve una mayor supervivencia de neuronas y menor pérdida de mielina, que concuerda con datos previos funcionales que indican una mayor recuperación funcional con la administración de esta proteína. También se analizaron diferentes poblaciones celulares por citometría de flujo de médulas lesionadas e inyectadas con CD200-His o vehículo. Se analizaron diferentes marcadores pro- y anti-inflamatorios en microglía, macrófagos y neutrófilos a 3 días post-lesión, y se observó una tendencia hacia un aumento de los marcadores anti-inflamatorios y una disminución de los pro-inflamatorios en médulas inyectadas con CD200-His, así como también una disminución en el número de microglía. A su vez se realizó la administración intravenosa de CD200-His, aunque demostró no tener efecto en la recuperación funcional luego de la contusión medular cuando es administrada por esta vía a las concentraciones utilizadas en el presente trabajo. Finalmente, se planteó el diseño de una proteína recombinante (CD200-RVG) que consiste en un dominio CD200 y un dominio del virus de la rabia que le permitiría a la proteína atravesar la barrera hematoencefálica para llegar al área lesionada de la médula. En primer lugar se analizó por Western Blot y ELISA si la proteína es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque no se pudo evidenciar la presencia de esta proteína en diferentes tejidos luego de haber sido administrada por vía intravenosa. De todas maneras, se evaluó si la inyección de ésta por vía intravenosa tiene algún efecto en la recuperación funcional luego de la lesión, aunque no evidenció un efecto en la recuperación funcional cuando es administrada por vía intravenosa a las dosis utilizadas. En conclusión, se demostró que la interacción entre CD200 y CD200R1 puede ser un potencial blanco terapéutico sobre el cual actuar para desarrollar estrategias que promuevan una mejor recuperación funcional luego de una lesión medular, ya que al modular esta interacción se observaron cambios en la respuesta inflamatoria luego de la lesión que se correlacionaron con cambios en la recuperación funcional. Aunque la administración intravenosa de agonistas de CD200R1 mostró no tener efecto en la recuperación funcional, se debe continuar profundizando en alternativas que sean poco invasivas para utilizar como base del desarrollo de estrategias con aplicación en la clínica.

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores Natalia Lago y Hugo Peluffo que me abrieron las puertas del laboratorio y me enseñaron un millón de cosas. Gracias por tenerme tanta paciencia a veces cuando las cosas no salen tan fácil. Durante todo el camino me acompañaron y me ayudaron a crecer en lo científico y en lo personal. Su enseñanza en cómo moverse en el mundo científico y en como realizar ciencia de calidad es algo que siempre voy a valorar muchísimo.

A todos los del Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica que me ayudaron muchísimo y también me enseñaron mucho. Valoro mucho la mano que nos damos mutuamente para apoyarnos y seguir adelante en conjunto. Gracias Lucha, Dani, Andrés y Fernanda que siempre están ahí para dar una mano y también para apoyar cuando no salen las cosas.

Gracias a Rubèn López-Vales, que sin dudarlo aceptó la propuesta de la pasantía en su laboratorio que me permitió hacer muchos de los experimentos de la tesis. También realizó aportes enriquecedores en el análisis de los resultados que fueron importantes para mejorar la calidad del trabajo.

Muchísimas gracias a toda la gente de la UAB que hicieron que mi estadía en Barcelona fuese inmejorable, siempre acompañándome en cada momento hicieron que mi corto pasaje por Barcelona se pasara volando. En particular quiero agradecer especialmente a Jesús y Alba, que me mostraron todo el funcionamiento del lab, me enseñaron muchas de las técnicas y me ayudaron con las cirugías y lesiones de los ratones. Siempre con toda la buena onda y voluntad por más que les pregunte todo 500 veces me ayudaron sin dudarlo. Espero poder verlos pronto porque ya se extrañan!

A toda la gente del Departamento de Histología y Embriología, a todos los grado 1 que me cubrieron en muchísimas oportunidades para poder hacer los cursos o terminar algún experimento. Gracias a Ernesto y Vale que me ayudaron siempre con todo lo que necesitaba y me ayudaron mucho, sobre todo con los Western Blot, pero siempre están ahí para dar una mano cuando se necesita.

Gracias a todos mis amigos, que son los que están al costado durante todo el camino y que entre todos nos vamos empujando para llegar al final del trayecto sin morir en el intento. Gracias a Los Fósiles por estar desde que empezó esta locura y que hicieron que todo el trayecto de esta carrera sean los mejores años de mi vida.

También quiero agradecer a las agencias financiadoras: a la CAP por becarme para poder realizar la maestría, considero que sin estos instrumentos sería imposible realizar este tipo de formaciones muy específicas, así que muchas gracias. También a CSIC que financió el trabajo por medio de un proyecto de I+D liderado por Natalia Lago y un programa de iniciación a la investigación que me otorgaron y me permitió producir algunos de los reactivos más importantes de este trabajo. Al Banco de Seguros del Estado y a PEDECIBA que también financiaron una gran parte del presente trabajo. Gracias también a las Becas Iberoamérica para Jóvenes Investigadores y Profesores, Santander Universidades, que me financiaron la pasantía en Barcelona.

Por último pero no menos importante, es más, considero que lo más importante es el apoyo incondicional de la familia y mi novia Cami. Sin ellos sería imposible realizar esta carrera que siempre están para celebrar los logros y apagar las frustraciones. Desde el momento en que decidí empezar este camino me apoyaron sin hacer preguntas y fomentaron mi crecimiento profesional. Como siempre digo, los amigos son el apoyo para el camino pero la familia es el combustible que te permite seguir adelante, así que muchas gracias a ustedes y a todos los que mencioné previamente. Este pequeño paso fue un pasito que hicimos entre todos.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

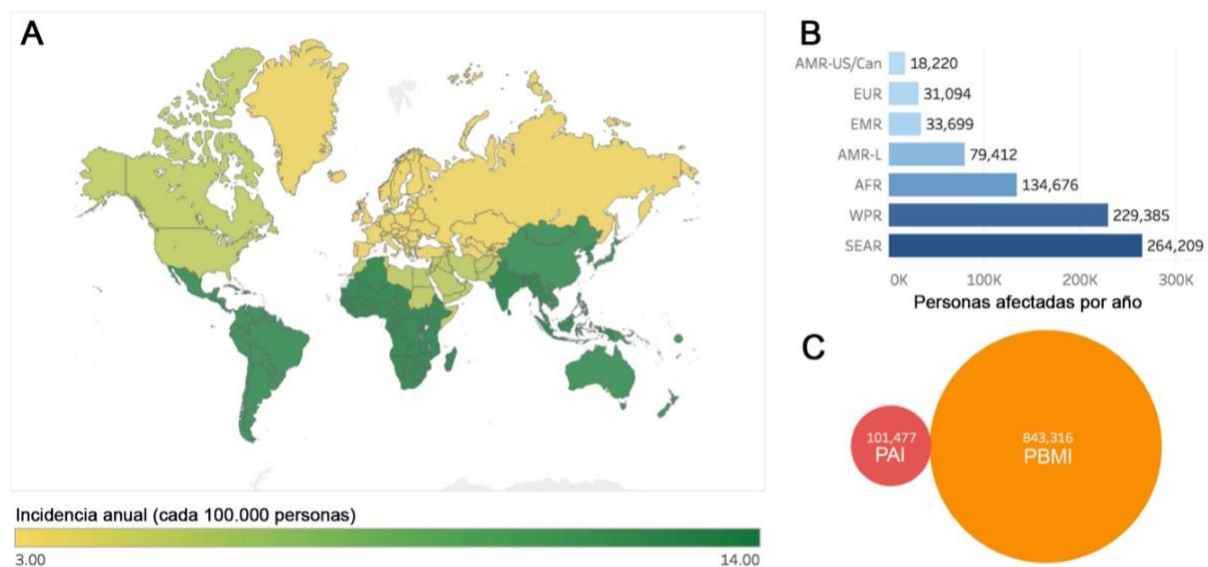
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN HUMANOS</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PROPAGACIÓN DEL DAÑO LUEGO DE LA LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL</b> .....	<b>4</b>
<b>3. ESTRATEGIAS PROMOTORAS DE LA RECUPERACIÓN FUNCIONAL</b> .....	<b>10</b>
<b>4. RESPUESTA INFLAMATORIA EN LESIONES TRAUMÁTICAS AL SNC</b> .....	<b>12</b>
<b>6. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DEL FENOTIPO MICROGLIAL</b> .	<b>18</b>
<b>7. INTERACCIÓN ENTRE EL LIGANDO CD200 Y EL RECEPTOR CD200R1 EN DIFERENTES NEUROPATOLOGÍAS</b> .	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>26</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>1. MANTENIMIENTO DE ANIMALES</b> .....	<b>28</b>
<b>2. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS</b> .....	<b>28</b>
2.1. <i>Lesiones de médula espinal</i> .....	<b>28</b>
2.2. <i>Administración dentro del tejido de la médula espinal</i> .....	<b>29</b>
2.3. <i>Administración intravenosa</i> .....	<b>30</b>
<b>3. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO</b> .....	<b>31</b>
3.1. <i>Obtención de las muestras de tejido para el procesamiento histológico</i> .....	<b>31</b>
3.2. <i>Tinciones para el análisis de preservación de mielina</i> .....	<b>31</b>
3.3. <i>Inmunofluorescencia</i> .....	<b>32</b>
<b>4. ANÁLISIS DE IMÁGENES</b> .....	<b>32</b>
<b>5. CITOMETRÍA DE FLUJO</b> .....	<b>33</b>
<b>6. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>36</b>
<b>7. WESTERN BLOT</b> .....	<b>36</b>
<b>8. ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)</b> .....	<b>38</b>
<b>9. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA RECUPERACIÓN LOCOMOTORA LUEGO DE LA LESIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>40</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE CD200 Y CD200R1 EN LA MÉDULA ESPINAL LUEGO DE UNA LESIÓN POR CONTUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
1.1 <i>Análisis de los tipos celulares que expresan el ligando CD200 en médulas espinales sin lesionar y su variación a diferentes tiempos post-lesión</i> .....	<b>42</b>

1.2 Análisis de los tipos celulares que expresan el receptor CD200R1 en médulas espinales sin lesionar y su variación a diferentes tiempos post-lesión. ....	48
<b>2. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA MODULACIÓN DE LA INTERACCIÓN CD200-CD200R1 DURANTE UNA DAÑO MEDULAR TRAUMÁTICO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DENTRO DEL TEJIDO MEDULAR DE ANTAGONISTAS O AGONISTAS DE CD200R1. ....</b>	<b>56</b>
2.1 Efecto de la administración dentro del parénquima de un anticuerpo bloqueante anti-CD200R1 sobre la pérdida de tejido nervioso. ....	56
2.2 Análisis de la capacidad neuroprotectora de la activación de CD200R1 mediante la administración dentro del tejido medular de la proteína recombinante CD200-His. ....	60
2.3 Impacto de la administración de CD200-His dentro del parénquima en diferentes marcadores pro- y anti-inflamatorios luego de la lesión medular. ....	61
<b>3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE AGONISTAS DE CD200R1 LUEGO DE LA LESIÓN MEDULAR. 64</b>	<b>64</b>
3.2 Efecto de la administración intravenosa de la proteína recombinante CD200-His en la recuperación funcional luego de la lesión medular por contusión. ....	64
3.2 Diseño de la proteína CD200-RVG como forma de entrega de CD200 a través de la barrera hematoencefálica. ....	66
3.4 Impacto de la administración intravenosa de la proteína recombinante CD200-RVG en la recuperación funcional luego de la lesión medular por contusión. ....	72
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>74</b>
<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE CD200 Y CD200R1 EN LA MÉDULA ESPINAL LUEGO DE UNA LESIÓN POR CONTUSIÓN. ....</b>	<b>74</b>
<b>2. EVALUACIÓN DE LA MODULACIÓN DE LA INTERACCIÓN CD200-CD200R1 MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DENTRO DEL TEJIDO MEDULAR DE ANTAGONISTAS O AGONISTAS DE CD200R1. ....</b>	<b>78</b>
<b>3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA DE AGONISTAS DE CD200R1 LUEGO DE LA LESIÓN MEDULAR. 83</b>	<b>83</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>90</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>92</b>

# INTRODUCCIÓN

## 1. Lesión de médula espinal en humanos.

Las lesiones al Sistema Nervioso Central (SNC), en la que se incluye la lesión de médula espinal, permanecen como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. La lesión de médula espinal tiene un fuerte impacto en la calidad de vida, esperanza de vida y carga económica, con costos considerables asociados al cuidado primario del paciente y a la pérdida de ingresos, con un costo directo que varía entre 500.000 y 2 millones de dólares a lo largo de la vida de un paciente (Singh *et al.*, 2014). Aproximadamente entre 250.000 y 500.000 personas a nivel mundial sufren una lesión de médula espinal cada año, siendo la prevalencia mucho mayor en países de bajos y medianos ingresos (Figura 1). La incidencia es mayor en hombres que en mujeres y a su vez afecta principalmente a los jóvenes, ya que el pico de incidencia es alrededor de los 30 años (Singh *et al.*, 2014). A nivel mundial, la principal causa de trauma a la médula espinal son los accidentes de tránsito, y en menor medida los deportes y actividades recreativas, accidentes relacionados al trabajo, violencia y caídas (Singh *et al.*, 2014). En el contexto de los accidentes de tránsito, el 90% de los accidentes



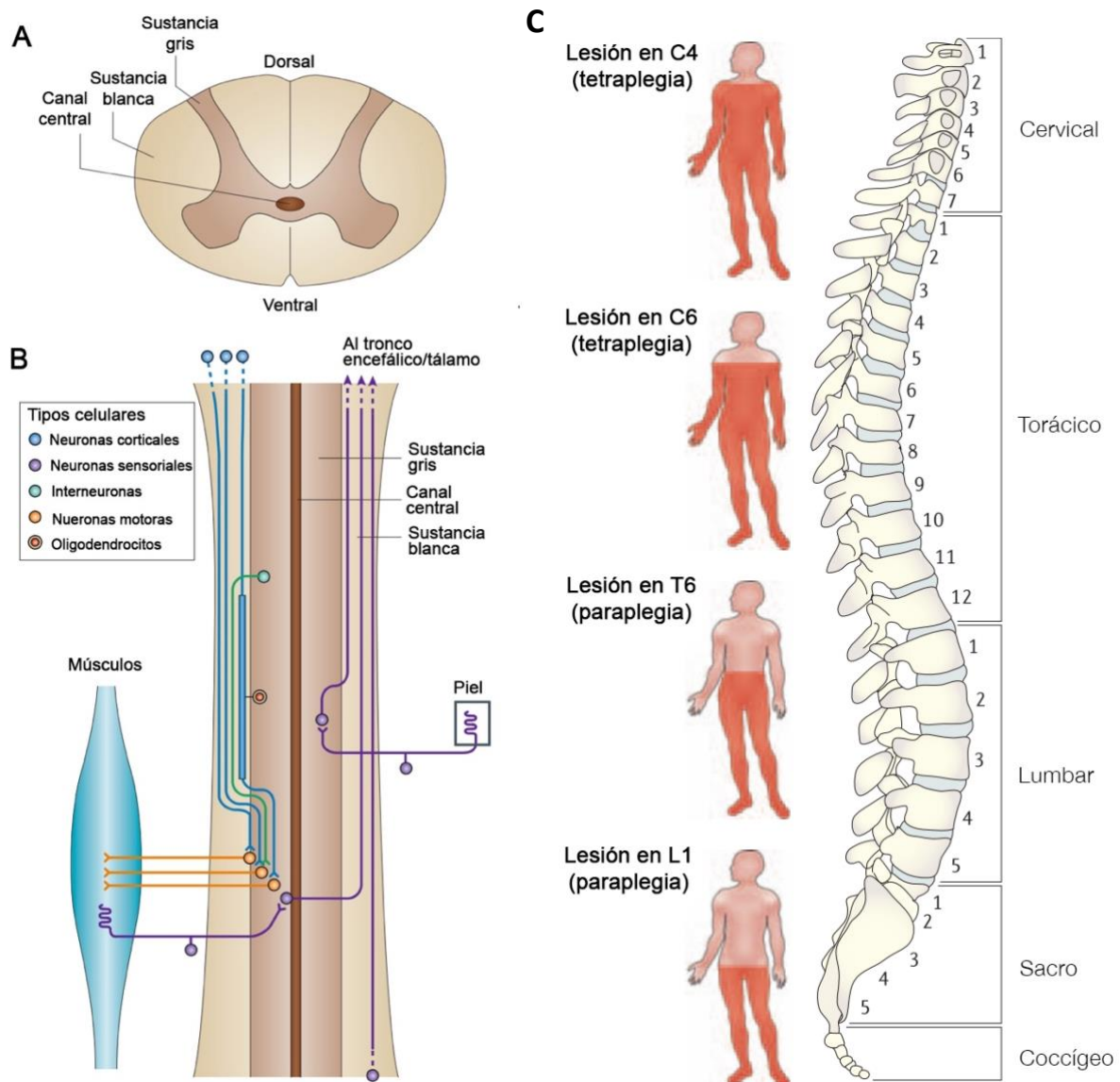
**Figura 1.** Incidencia de lesiones traumáticas a la médula espinal de acuerdo a las regiones establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). América latina se encuentra entre las regiones con mayor incidencia anual. **A:** Incidencia anual de lesiones traumáticas a la médula espinal en cada país. **B:** Personas afectadas por lesiones traumáticas a la médula espinal al año en cada región según la OMS. En América latina hay 79.412 personas que sufren una lesión traumática de médula espinal al año. **C:** Número de personas que tienen lesiones traumáticas de médula espinal cada año de acuerdo a los niveles de ingreso del país. Las lesiones de médula espinal ocurren en mayor proporción en países de bajos y medianos ingresos (PBMI) que en los países de altos ingresos (PAI). Abreviaciones de las regiones establecidas por la OMS, AFR: Región Africana AMR-US/Can: Región de América de Estados Unidos y Canadá; AMR-L: Región de América Latina; EMR: Región Mediterránea del Este; EUR: Región Europea; SEAR: Región del Sudeste Asiático; WPR: Región del Este del Pacífico. Figura adaptada de Kumar *et al.*, 2018.

fatales en transporte terrestre ocurre en países de bajos y medianos ingresos, a pesar de que solamente el 48% de los vehículos del mundo se encuentran en estos países (Lee *et al.*, 2014). La gran parte de las lesiones de médula espinal en civiles proviene de fractura o dislocación de la columna vertebral. Esto surge comúnmente debido a la compresión con flexión en la médula a nivel torácico de la médula espinal e hiperextensión o flexión a nivel cervical de la médula espinal. Además existen algunos indicadores de riesgo, que aumentan la posibilidad de tener una lesión de médula espinal frente a un pequeño trauma, entre los que se encuentra la espondilosis (degeneración de los discos intervertebrales), estenosis congénita (estrechamiento) del canal espinal, hipertrofia del ligamento flavum e inestabilidad de las articulaciones apofisiarias debido a artritis reumatoide (Profyris *et al.*, 2004).

Las lesiones de médula espinal constituyen un grupo muy heterogéneo en cuanto a las complicaciones que causa. De acuerdo a la altura de la lesión y a la severidad puede causar tetraplegia (parálisis total o parcial de los miembros superiores e inferiores y el torso) si la lesión es a nivel cervical, o paraplegia (parálisis total o parcial de los miembros inferiores), si la lesión es a nivel torácico o lumbar (Figura 2C). En humanos, la severidad de la lesión se puede evaluar utilizando la escala ASIA (de la Sociedad Americana de Lesión Espinal), que considera la preservación de funciones motoras y sensoriales (Thuret *et al.*, 2006). La médula espinal está organizada a modo de segmentos y las funciones sensoriales, motoras y autonómicas de cada segmento dependen de conexiones con centros supraespinales para todas las acciones conscientes y voluntarias (Figura 2).

La lesión de médula espinal puede causar complicaciones serias muy variadas, en las que se incluyen la disfunción de la vejiga y/o intestino, problemas sexuales, hiperreflexia autonómica, infecciones en el tracto urinario, problemas respiratorios y gastrointestinales, lesión hepatocelular, disfunción psicológica, entre otros (Saghazadeh & Rezaei, 2017). Aunque algunos pacientes muestran cierta recuperación espontánea luego de la lesión, la mayoría presentan síntomas de forma permanente. La pérdida permanente de funciones motoras, sensoriales y autonómicas por debajo del nivel de la lesión de médula espinal es el resultado de la capacidad muy limitada que tiene el SNC de mamíferos adultos de regenerar axones dañados y de reemplazar neuronas perdidas (David *et al.*, 2012). Hasta el momento, no existen tratamientos que promuevan una regeneración total o parcial del tejido dañado y que permitan recuperar las funciones perdidas, por lo que la prevención (como ser el uso de cinturones de seguridad, restricción del uso de armas y la seguridad en los deportes) es la mejor medicina para esta patología (Thuret *et al.*, 2006). En los últimos años se ha avanzado hacia el desarrollo de tratamientos clínicos efectivos para los pacientes con lesión de médula espinal.





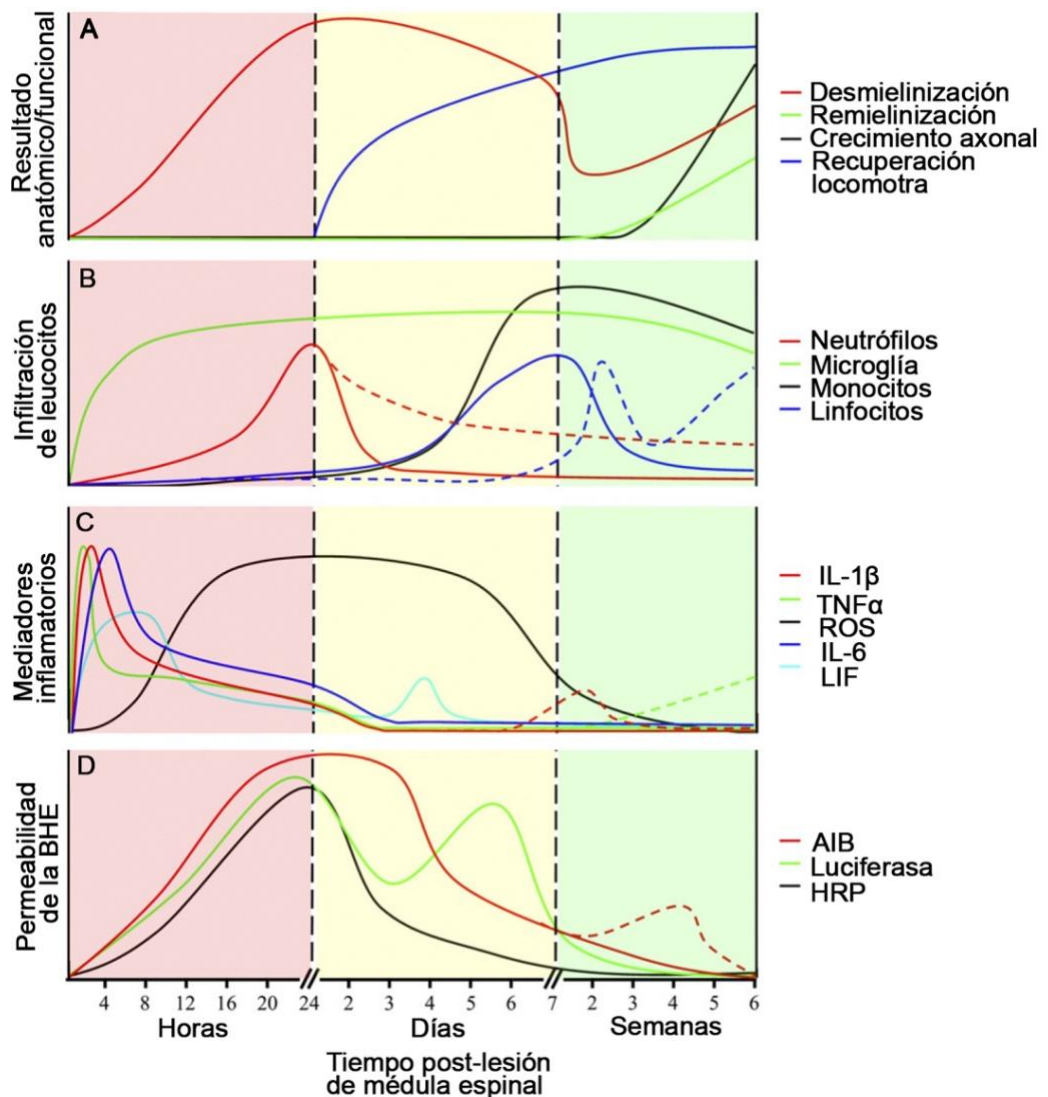
**Figura 3.** Estructura y conexiones de la médula espinal en condiciones normales y los tipos de parálisis según la altura de la lesión. **A:** esquema de una sección transversal de médula espinal en el que se observa la sustancia gris por dentro (de color marrón oscuro) formando una estructura en forma de H en la que se pueden observar dos astas dorsales y dos astas ventrales que contienen los cuerpos neuronales y numerosas prolongaciones celulares de neuronas y células gliales. La sustancia blanca (de color marrón claro) se encuentra por fuera de la sustancia gris y contiene principalmente los tractos de fibras nerviosas. **B:** esquema longitudinal de la médula espinal en la que se observan las proyecciones que provienen desde centros superiores como corteza cerebral y tronco encefálico y establecen contacto con las neuronas de la sustancia gris de los diferentes segmentos de la médula espinal, los cuales envían axones a órganos periféricos como los músculos. Los axones sensoriales ingresan y establecen contacto con neuronas en la sustancia gris de la médula espinal, los cuales envían axones a través de la sustancia blanca hacia centros superiores. **C:** A la izquierda se esquematizan los diferentes tipos de parálisis (tetraplegia o paraplegia) generados por lesiones a diferentes alturas de la médula espinal. En rojo se indican las regiones del cuerpo afectadas por la lesión a la altura de la médula espinal señalada. Imagen adaptada de Thuret *et al.*, 2006.

Estos avances han sido impulsados por el gran incremento en el entendimiento de las consecuencias de la lesión de médula espinal y las razones de la falla de la reparación espontánea, así como también por el desarrollo de tratamientos que promueven una mejora funcional en modelos animales experimentales de lesión de médula espinal (Bradbury & McMahon, 2006).

## 2. Propagación del daño luego de la lesión de médula espinal.

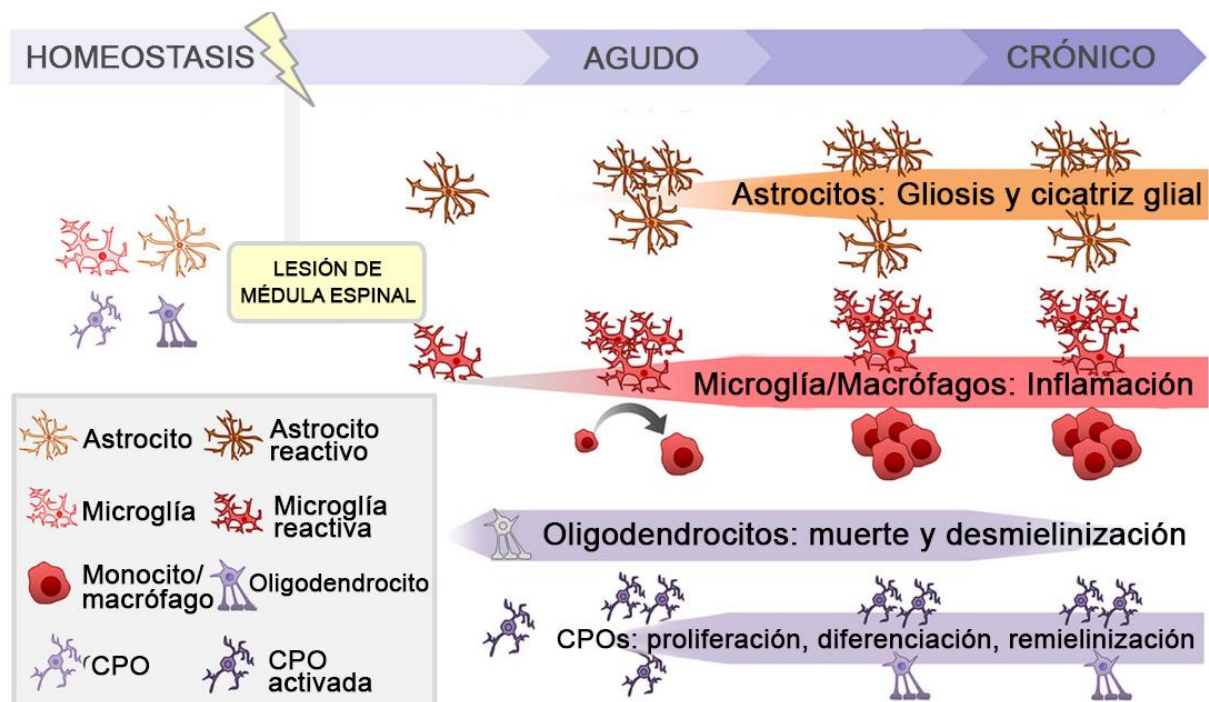
Una lesión traumática a la médula espinal es la consecuencia de un daño físico primario agudo, que precede a una serie de eventos fisiopatológicos que se autopropagan en una segunda fase multifactorial de daño tisular que ocurre en un período de varias semanas y meses. En primer lugar, la lesión mecánica puede dañar directamente a los cuerpos y/o procesos celulares en el tejido neural y esto puede provocar la muerte de estas células, entre las que se incluyen las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, entre otros. Esto resulta especialmente relevante en el caso de las neuronas que no son reemplazadas una vez que mueren. Luego del insulto inicial, se genera una serie de señales que desencadenan en una respuesta secundaria, en la que se pierden estructuras y funciones adicionales mediante procesos activos. El daño al tejido neural se expande rostral y caudalmente desde el epicentro de la lesión en los días y semanas próximas a causa de esta respuesta secundaria (David *et al.*, 2012). La activación de estos mecanismos fisiopatológicos dañinos llevan a la destrucción de tractos axonales que habían permanecido intactos por el trauma inicial, así como también a la muerte y atrofia adicional de cuerpos neuronales y oligodendrocitos con la consecuente desmielinización (Figura 3). Entre los eventos que contribuyen al daño secundario, se destaca la excitotoxicidad, la inflamación intraparenquimal, la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, y cambios en la irrigación sanguínea (hemorragia e isquemia) (Figura 3), cada uno de los cuales tienen un rol importante en determinar el grado del daño secundario, por lo que se ha planteado que pueden ser posibles blancos de acción para disminuir el daño secundario y así limitar el daño tisular provocado por estos procesos (Thuret *et al.*, 2006). Varios estudios sugieren que la respuesta inflamatoria que ocurre luego de la lesión es uno de los principales contribuyentes al daño secundario y a la neuropatología crónica, por lo que muchos esfuerzos de investigación han sido destinados a elucidar los mecanismos que subyacen a esta respuesta inflamatoria y a cómo modularla para limitar el daño secundario (David *et al.*, 2012). Luego de la lesión a la médula espinal, se desencadenan los procesos inflamatorios a nivel de la lesión, donde se producen una serie de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, que promueven el reclutamiento de células del sistema inmune para que ingresen al sitio de la lesión mediante una secuencia temporal conocida para los diferentes tipos celulares que participan (Figura 3). El ingreso de estas células y el desarrollo de la respuesta inflamatoria también está estrechamente relacionada con cambios en la integridad de la barrera hematoencefálica, la cual

a las 3 horas luego de la lesión ya se encuentra alterada y permanece de esta forma hasta 1 semana luego de la lesión (Figura 3). Estas condiciones en su conjunto, resultan en una expansión del daño inicial debido al desarrollo de estos procesos asociados a la respuesta inflamatoria.



**Figura 3.** Correlación temporal entre las cascadas inflamatorias, los eventos secundarios neurodegenerativos y la recuperación funcional luego de una lesión de la médula espinal en roedores. **A:** Resultados anatómicos y funcionales en el transcurso de la lesión de médula espinal, se observa una desmielinización progresiva que inicia muy tempranamente, mientras que la remielinización y crecimiento axonal se comienzan a observar en el transcurso de semanas. Dependiendo de la severidad de la lesión, la recuperación funcional puede comenzar a observarse a partir de las 24 horas y luego de las 3 semanas permanece constante. **B:** Activación de la microglía residente e ingreso de leucocitos en circulación sanguínea al sitio de la lesión. Las líneas punteadas corresponden a lo observado en ratones mientras que las líneas enteras corresponde a lo observado en rata. El mayor número de neutrófilos se observan a las 24 horas post-lesión y disminuye rápidamente, mientras que los macrófagos y linfocitos presentan un pico de ingreso a los 7 días post-lesión. **C:** A las pocas horas luego de la lesión se observa un pico en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se mantiene durante la primer semana. **D:** la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) luego de la lesión ya se observa alterada a las pocas horas luego de la lesión evidenciada por un aumento en la permeabilidad a la entrada de ácido  $\alpha$ -aminobutírico (AIB, 104 Da), peroxidasa de rábano (HRP, 44 kDa) y luciferasa (61 kDa) dentro del tejido medular lesionado. Figura adaptada de Donnelly & Popovich, 2008.

En el SNC, los tipos celulares que participan en el desarrollo de la respuesta inflamatoria frente a una lesión traumática son muy variados. Entre ellos se encuentran los diferentes tipos celulares gliales, que presentan una estrecha relación con las neuronas, lo que hace que el diálogo entre estos tipos celulares se encuentre en la base de muchos procesos endógenos patológicos y regenerativos en el SNC lesionado (Orr & Gensel, 2018). En ausencia de una lesión, la glía apoya a la transmisión de señales y la correcta función neuronal para mantener la homeostasis del sistema en general, mientras que al alterarse las condiciones en el SNC, las células gliales adoptan nuevas funciones (Figura 4). Entre los principales tipos de células gliales se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos y la microglía. Los astrocitos generan la interfase entre la vasculatura formando parte de la barrera hematoencefálica y la unidad funcional neurovascular, secuestran y transportan neurotransmisores, iones y nutrientes, entre otras importantes funciones para la correcta homeostasis del SNC. Los diferentes procesos neuropatológicos, como los que ocurren luego de una lesión en la médula espinal, causan que los astrocitos adopten una serie de cambios moleculares, morfológicos y funcionales que en su conjunto constituyen lo que se denomina “astrogliosis” (Sofroniew, 2014). Estos astrocitos reactivos tienen funciones beneficiosas y perjudiciales en el desarrollo de la fisiopatología luego de la lesión de médula espinal (Gaudet & Fonken, 2018). La astrogliosis más intensa se observa en el área que rodea al sitio de la lesión en lo que se denomina la cicatriz glial. La rotura de la barrera hematoencefálica y los procesos inflamatorios luego de una lesión en la médula espinal causan que los astrocitos reactivos proliferen y migren para rodear a la lesión (Cregg *et al.*, 2014). Esta cicatriz glial se forma entre los 5 y 14 días post-lesión (dpi) en roedores y permanece de manera crónica, tanto en roedores como humanos (Buss *et al.*, 2007; Wanner *et al.*, 2013). Por un lado, la cicatriz glial ayuda a restringir la propagación de los aspectos tóxicos de los procesos inflamatorios, y por lo tanto previene la expansión del daño secundario. Por otro lado, los astrocitos reactivos de la cicatriz glial producen una serie de moléculas y matriz extracelular que previenen el crecimiento axonal y por lo tanto limitan la capacidad de regeneración luego de la lesión de médula espinal (Gaudet & Fonken, 2018). Adicionalmente, los astrocitos reactivos pueden ser tóxicos para las motoneuronas y promover su muerte (Cassina *et al.*, 2002).



**Figura 4.** Dinámica temporal de la activación de los diferentes tipos de células gliales a causa de una lesión en la médula espinal. En el tejido del SNC en condiciones de homeostasis, los astrocitos, microglía y oligodendrocitos tienen una variedad de funciones de gran importancia para mantener el estado de homeostasis y el correcto funcionamiento del tejido nervioso. El daño mecánico generado por una lesión traumática de médula espinal desencadena la activación de las células gliales, las cuales adoptan fenotipos morfológicos, moleculares y funcionales diferentes. Inmediatamente luego de la lesión, los astrocitos, la microglía y las células precursoras de oligodendrocitos (CPO) proliferan y secretan una variedad de citoquinas que contribuyen al daño secundario. En la etapa aguda luego de la lesión, diferentes células del sistema inmune en circulación, entre las que se encuentran los macrófagos, son reclutadas al lugar de la lesión. Adicionalmente, astrocitos, microglía y otros tipos celulares gliales migran hacia el lugar de la lesión para formar la cicatriz glial, la cual limita la expansión del daño, aunque también impide el crecimiento de axones. Los oligodendrocitos en las zonas cercanas a la lesión son susceptibles a la citotoxicidad y mueren, aunque su muerte progresiva es parcialmente compensada por la proliferación de células progenitoras de oligodendrocitos que participan en la remielinización de axones. Estos procesos se mantienen de manera crónica luego de la lesión. Imagen adaptada de Gaudet & Fonken, 2018.

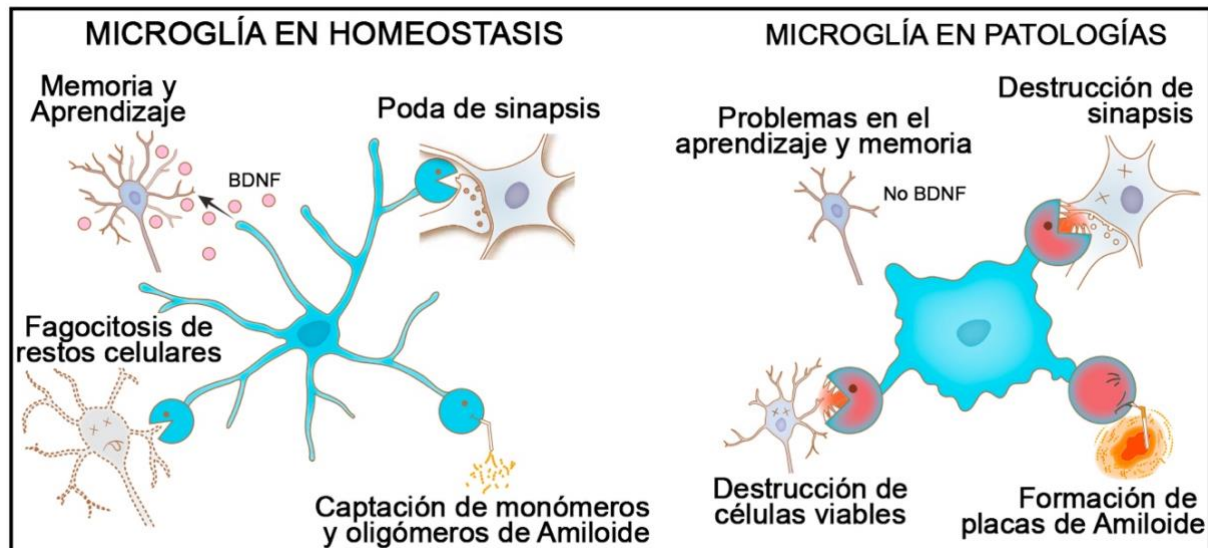
Los oligodendrocitos constituyen otro tipo celular de la glía y tienen importantes funciones en condiciones homeostáticas y patológicas. Estas células envuelven a los axones formando la vaina de mielina que aísla al axón para aumentar la velocidad de conducción del potencial de acción. También participan en numerosos procesos de mantenimiento del axón ya que liberan factores tróficos, así como también regulan el metabolismo y el transporte a través de los axones (Gaudet & Fonken, 2018). Los oligodendrocitos son especialmente susceptibles a sufrir apoptosis luego de una lesión a la médula espinal. En roedores, a los 15 minutos luego de la lesión ya se observan los primeros indicios de muerte de oligodendrocitos (Almad *et al.*, 2011). Esta muerte de oligodendrocitos produce la desmielinización de los axones, generando que la capacidad de conducción de las fibras nerviosas sea muy limitada. Sin

embargo, se puede observar cierta remielinización luego de la lesión, principalmente debido a la proliferación de células precursoras de oligodendrocitos. Paradójicamente, estas células también pueden producir factores que impiden el crecimiento axonal y por lo tanto limitar la regeneración de los tractos dañados (Hackett & Lee, 2016).

El tipo de célula glial que más ha sido estudiado en relación con la progresión del daño secundario luego de la lesión de médula espinal ha sido la microglía, ya que se considera uno de los principales desencadenantes de la respuesta inflamatoria en el SNC (Ransohoff & Perry, 2009; Prinz *et al.*, 2011; Deczkowska, Amit, *et al.*, 2018). Sin embargo, la microglía cumple una variedad de funciones en condiciones normales también. Décadas atrás, se pensaba que la microglía en el SNC adulto en condiciones normales estaba presente en el tejido en forma estática o en un estado de reposo a la espera de la activación frente a algún patógeno o insulto. Contrariamente a este planteo, se ha demostrado que la microglía en condiciones normales se encuentra muy activa, constantemente censando el microambiente y cumpliendo numerosas funciones para mantener la homeostasis del tejido nervioso (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Mediante este mecanismo, la microglía se encuentra constantemente recibiendo una variedad enorme de señales, lo que le permite detectar cambios en el pH, ATP, citoquinas, quimioquinas, aminoácidos y compuestos inorgánicos presentes en el microambiente que las rodea (Prinz *et al.*, 2011). Dentro de las múltiples funciones que cumple la microglía en condiciones normales (Figura 5), una de las principales es remover detritos celulares y cuerpos apoptóticos sin provocar procesos pro-inflamatorios (Ransohoff & Perry, 2009). Se ha demostrado que la microglía participa en el refinamiento de los circuitos por medio de la poda, eliminación y maduración de sinapsis, tanto en el sistema adulto (Schafer *et al.*, 2012) como en el desarrollo (Schafer & Stevens, 2013). Por lo tanto además de tener una función vital en el correcto desarrollo del SNC, también está implicada en los procesos de aprendizaje y memoria (Parkhurst *et al.*, 2013).

En contraste, ante la presencia de un estímulo nocivo, la microglía adopta un fenotipo diferente al homeostático e inicia una serie de cambios morfológicos y funcionales denominados en su conjunto como reactividad microglial (Figura 5). Este estado activado de la microglía se caracteriza por un aumento en la fagocitosis y de la expresión de receptores, citoquinas y quimioquinas, así como también de otras moléculas relacionadas al proceso inflamatorio que son necesarias para comunicar el estado de alerta a otros tipos celulares (Crotti & Ransohoff, 2016). Debido a este cambio en el fenotipo microglial en las diferentes patologías, las funciones realizadas en condiciones homeostáticas por estas células se pueden ver comprometidas dependiendo de la patología y la severidad que ésta

presenta ya que la mayoría de sus genes específicos disminuyen en su expresión (Figura 5). Como se verá más adelante, dado que la población de microglía es el principal tipo celular del sistema inmune en el SNC y el primero en censar los cambios tisulares, presenta un rol fundamental en desencadenar los procesos que llevan a la respuesta inflamatoria luego de una lesión a la médula espinal.



**Figura 5.** La microglía contribuye al correcto funcionamiento del SNC en condiciones de homeostasis (esquemático a la izquierda) pero también participa en la disfunción neuronal durante procesos patológicos (esquemático a la derecha). Una de las principales funciones de la microglía en homeostasis es la de fagocitar restos celulares sin provocar una respuesta inflamatoria, lo cual es esencial para mantener el funcionamiento normal del SNC. Las capacidades fagocíticas de la microglía también son importantes para reducir los efectos tóxicos de los monómeros y oligómeros de  $\beta$ -amiloide. A su vez participa en los procesos de memoria y aprendizaje por medio del apoyo a las neuronas por la liberación de factores tróficos como BDNF (brain-derived neurotrophic factor) y durante el desarrollo normal del SNC participa en la poda de sinapsis para el correcto establecimiento de los circuitos neuronales. En condiciones patológicas variadas, la microglía adopta un fenotipo diferente por lo que cambian sus funciones. En estas condiciones se pierde la capacidad de facilitar la función sináptica normal debido a que pueden participar en la destrucción de sinapsis funcionales y de células viables debido al desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. La capacidad fagocítica de la microglía disminuye con la edad y durante la progresión de diferentes patologías que llevan a la acumulación de placas de  $\beta$ -amiloide con los efectos tóxicos que esto conlleva. Figura adaptada de Herz *et al.*, 2017.

Esta serie de cambios reactivos que se observan en los diferentes tipos celulares tienen un impacto en las neuronas y axones presentes en la región de la lesión. A pesar de que el trauma mecánico genera un daño directo que afecta algunos cuerpos y procesos neuronales, la mayoría de las neuronas mueren a causa de los eventos que ocurren durante la progresión del daño secundario, entre los que se encuentra la respuesta inflamatoria. El daño a los axones que transcurren a lo largo de la médula espinal genera la pérdida de conexiones entre centros superiores y los segmentos inferiores a la lesión en la médula espinal. La pérdida de estas conexiones deja a los segmentos de la médula espinal caudal al lugar de la lesión parcial o totalmente aislados del cerebro y otros centros superiores, generando

parte de los problemas mencionados previamente que son causados por las lesiones en la médula espinal (Bradbury & McMahon, 2006). Cuando estos axones son dañados, el segmento distal con respecto a la región dañada sigue un proceso llamado degeneración Walleriana (Waller, 1850), en el que sucede una secuencia de eventos que es igual en el SNC y el Sistema Nervioso Periférico (SNP), aunque presentan diferencias claves en cuanto al curso temporal de estos eventos y el resultado final. Este proceso inicia con la desintegración del axón y su vaina de mielina y continúa por un período de semanas (en el SNP) a meses (en el SNC), en el que se remueven los productos de degradación de los axones y la mielina desintegrados (Becerra *et al.*, 1995). En el SNP, el proceso de degeneración se resuelve debido a que ocurre una correcta remoción de la mielina desintegrada y de otros restos celulares. En el SNC este proceso de limpieza y remoción de la mielina y restos axonales dañados es incompleto y se mantiene de manera crónica (David & Lacroix, 2003). Se ha planteado que la permanencia de restos de mielina en el área de la lesión es uno de los principales factores que generan que en el SNC se impida la regeneración de los axones dañados debido a que la mielina contiene inhibidores del crecimiento axonal (Schäfer *et al.*, 1996). Por lo tanto, aunque el segmento proximal por lo general sobrevive, este no se regenera de manera espontánea debido a que este axón dañado encuentra una serie de señales inhibitorias dentro del SNC que previenen una respuesta regenerativa exitosa y el cuerpo neuronal se atrofia (David & Lacroix, 2003).

### **3. Estrategias promotoras de la recuperación funcional.**

En vista de lo establecido previamente, uno de los principales enfoques de la investigación en lesiones a la médula espinal ha sido en superar esta incapacidad que presentan los axones en regenerar correctamente luego de la lesión. Los tres objetivos principales de estas investigaciones han sido: iniciar y mantener el crecimiento y elongación axonal, dirigir a los axones en crecimiento hacia las neuronas blanco, y reconstituir el circuito original o equivalente, que finalmente conducirá a la restauración de funciones (Bradbury & McMahon, 2006). Aunque varias intervenciones han reportado una recuperación funcional luego de una lesión de médula espinal experimental, ninguna ha cumplido los tres objetivos planteados completamente.

Una de las estrategias implementadas para lograr la regeneración axonal consiste en eliminar las señales ambientales inhibitorias para el crecimiento en la zona de la lesión. Algunas de estas estrategias han demostrado un cierto grado de regeneración de axones lesionados a través del lugar de lesión en modelos animales experimentales de lesión traumática de médula espinal. Una de ellas consiste en el uso de antagonistas de inhibidores del crecimiento axonal presentes en la mielina como Nogo-66 (Bregman *et al.*, 1995; GrandPré *et al.*, 2002). Otro limitante del crecimiento es la cicatriz



glial mencionada previamente, la cual esta conformada por diferentes moléculas de matriz extracelular que hacen que sea impenetrable por los axones. Dentro de estas moléculas se encuentran los proteoglicanos condroitín sulfato (CSPGs), por lo que una de las estrategias que ha demostrado permitir el crecimiento axonal luego de la lesión de médula espinal es la administración de enzimas que degradan a los CSPGs como la condroitinasa ABC (Bradbury *et al.*, 2002; Yick *et al.*, 2003; Zhao & Fawcett, 2013). Se ha observado también regeneración axonal luego de la administración de moléculas promotoras del crecimiento, como ser la administración exógena de factores neurotróficos como neurotrofina-3 (Bradbury *et al.*, 1999) o NGF (Nerve Growth Factor, Oudega & Hagg, 1996), o la manipulación de vías de señalización pro-regenerativas en las neuronas (Qiu *et al.*, 2002). Numerosas estrategias de trasplante celular han demostrado ser exitosas en promover una mejor recuperación funcional en modelos murinos de lesión medular (Badner *et al.*, 2017). Entre ellas se encuentra el trasplante de fibroblastos modificados genéticamente (Liu *et al.*, 1999), células de Schwann (Bunge, 1994), glía envolvente olfativa (Li *et al.*, 1997) y células madre (Lu *et al.*, 2003). La combinación de terapias dirigidas a diferentes factores han demostrado que pueden actuar sinérgicamente para mejorar la capacidad de regeneración axonal (Bradbury & McMahon, 2006). A pesar de que estas estrategias presentan resultados prometedores, hasta el momento se han logrado regenerar una pequeña proporción de las fibras y la distancia que regeneran la mayoría de los axones es limitada, además de que no está bien determinado en estos estudios que la regeneración de fibras contribuya a la recuperación funcional.

A pesar de que la regeneración de fibras y la reconexión de tractos motores descendentes y sensoriales ascendentes son necesarios para restaurar las funciones, el grado de esta regeneración puede aumentar considerablemente mediante la reducción de la magnitud del daño secundario. El reconocimiento de esto ha llevado a que muchos estudios se enfoquen en entender los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al daño secundario para desarrollar estrategias terapéuticas. Dentro de estas intervenciones terapéuticas, las estrategias neuroprotectoras, es decir que previenen la muerte de neuronas, han sido muy relevantes. Dado que uno de los principales eventos del daño secundario es la respuesta inflamatoria, los mecanismos de punto de control de la inflamación han ganado gran importancia e interés en el campo de la neuroinmunología para el desarrollo de estrategias neuroprotectoras frente a daños al SNC.

#### 4. Respuesta inflamatoria en lesiones traumáticas al SNC.

Ha sido ampliamente demostrado en diferentes modelos animales que varios aspectos de la respuesta inflamatoria pueden exacerbar el daño secundario luego de la lesión de médula espinal. Sin embargo, estos aspectos perjudiciales se deben a efectos secundarios de la inflamación, que normalmente corresponde a una respuesta en tejidos lesionados para controlar infecciones, limpiar restos de tejido y restaurar la homeostasis del tejido (Donnelly & Popovich, 2008). En la mayoría de los tejidos, los efectos destructivos de la respuesta inflamatoria no son tan importantes debido a que poseen una capacidad regenerativa que permite recuperar la organización tisular presente previa a la respuesta inflamatoria. Lo que sucede en el SNC es que la capacidad regenerativa es limitada, por lo que resulta imposible recuperar la organización del tejido que fue interrumpida por la respuesta inflamatoria (David *et al.*, 2012). Por lo tanto, la respuesta inflamatoria cumple una función muy útil y beneficiosa para los tejidos dañados, por lo que idealmente el objetivo debería ser modular esta respuesta inflamatoria en la lesión de médula espinal hacia una dirección reparadora del tejido mientras que se limitan los efectos secundarios perjudiciales, en lugar de bloquear totalmente la respuesta inflamatoria.

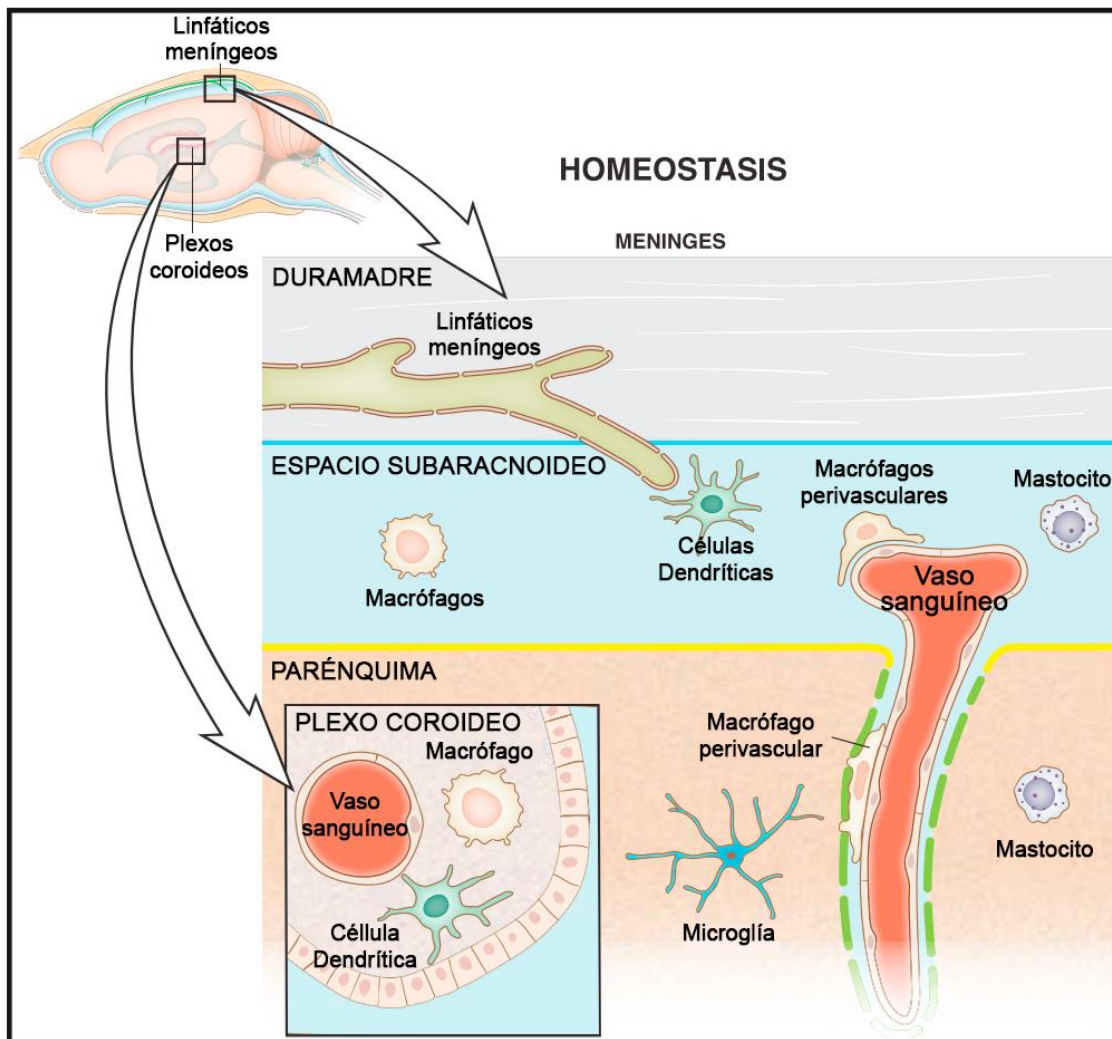
Uno de los ejemplos más importantes que resaltan la importancia de este principio es el de la metilprednisolona, un glucocorticoide con una potente acción inmunosupresora que constituyó la primer droga ampliamente utilizada para tratar la lesión de médula espinal en humanos. Fue demostrado en modelos animales experimentales de lesión de médula espinal que reduce los niveles de neuroinflamación y promueve una mejor recuperación funcional (Bartholdi & Schwab, 1995; Fu & Saporta, 2005). Luego de varios años de uso en humanos, la administración de metilprednisolona falló en demostrar una mejora significativa en las medidas de recuperación luego de la lesión de médula espinal (Hurlbert, 2000). Al deprimir al sistema inmune a nivel de todo el organismo, se ha planteado que aumenta el riesgo de infecciones en personas traumatizadas por lo que este tratamiento puede generar complicaciones. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la administración de metilprednisolona antes de las 8 horas post-lesión, puede tener un efecto beneficioso en la recuperación funcional en humanos y las complicaciones asociadas a la depresión del sistema inmune son muy bajas. Por lo tanto, a pesar de que actualmente no es ampliamente aceptado el uso de la metilprednisolona, algunos especialistas plantean que se puede utilizar bajo ciertas circunstancias (Fehlings *et al.*, 2017).

Se ha propuesto que el desarrollo de estrategias que busquen la modulación de la respuesta inflamatoria en lugar de suprimirla globalmente, presentan una mejor alternativa de tratamiento para mejorar la recuperación funcional luego de la lesión de médula espinal (David *et al.*, 2012). Por lo tanto, para poder desarrollar estas estrategias, se deben conocer los mecanismos que subyacen a los diferentes procesos que desencadenan la respuesta inflamatoria y los que son desencadenados por ésta y que promueven la progresión del daño secundario luego de la lesión. A nivel de todo el organismo, las diferentes respuestas inflamatorias son organizadas y llevadas a cabo por el sistema inmune, que es utilizado para la defensa frente a diferentes patógenos, así como también cuando ocurren insultos a la homeostasis corporal y en los procesos de cicatrización de heridas luego de lesiones. En todos los vertebrados, el sistema inmune presenta dos ramas con características diferentes que les permiten llevar a cabo diferentes funciones especializadas. Una de estas ramas se clasifica como sistema inmune innato, que se define por la habilidad de responder rápidamente de manera no específica, con una capacidad limitada de reconocer antígenos que encuentra. El sistema inmune innato incluye barreras anatómicas como la piel y fisiológicas como la temperatura y el pH. También incluye una variedad de tipos celulares: macrófagos, microglía, células dendríticas, granulocitos (eosinófilos, basófilos, mastocitos y neutrófilos) y células NK (Chaplin, 2010; Sonnenberg & Artis, 2015). Generalmente, estas células utilizan una amplia gama de receptores para censar el ambiente y reconocer patógenos y señales de peligro en los diferentes tejidos, que tras su activación inician diferentes tipos de respuestas inmune innatas. Algunos de estos receptores son los TLRs (Toll-Like Receptors), NLRs (NOD-Like Receptors) y otros inmunoreceptores, como se verá más adelante. Estas células del sistema inmune innato pueden liberar quimioquinas y citoquinas que amplifican la respuesta inmune al reclutar otras células inmunes y promueven diferentes señalizaciones intercelulares en el lugar de la lesión o infección, así como también distalmente a través del sistema circulatorio (Chaplin, 2010). Otro componente importante de la inmunidad innata es el sistema del complemento, que es una familia de proteínas que tiene roles muy diversos en los procesos inflamatorios, como ser la señalización pro-inflamatoria, el marcaje de células para que posteriormente sean ingeridas por otras células (opsonización), la formación de complejos de ataque a la membrana que causa daño celular directo, e incluso el podado sináptico (Stevens *et al.*, 2007). En su conjunto, el sistema inmune innato posee una amplia gama de estrategias defensivas celulares y moleculares que enlentecen el avance de los patógenos invasores y el daño tisular. Cabe destacar que ciertos elementos de este mismo sistema también participan en el remodelado tisular y cicatrización de heridas luego de lesiones (Jassam *et al.*, 2017).

La respuesta inmune innata desencadena a su vez la activación de la segunda rama del sistema inmune, denominada sistema inmune adaptativo, que se caracteriza por tener una respuesta más especializada y personalizada para cada patógeno o insulto. Esta respuesta involucra la activación y expansión de dos tipos celulares: los linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos T CD8+ y CD4+ reconocen antígenos peptídicos mostrados en el complejo mayor de histocompatibilidad y pueden tener funciones citotóxicas, colaboradoras o reguladoras. Por otro lado, los linfocitos B producen inmunoglobulinas, glicoproteínas que reconocen antígenos específicos, así como también este tipo celular puede participar en la activación de linfocitos T (Warrington *et al.*, 2011). Dos de las características más relevantes del sistema inmune adaptativo incluyen la especificidad de antígenos reconocidos y la capacidad de memoria de los antígenos encontrados previamente, lo que permite respuestas más rápidas y específicas luego de una segunda exposición al antígeno (Schenkel & Masopust, 2014).

El SNC se considera como un compartimiento diferente al resto del cuerpo en cuanto a ciertas características del sistema inmune, por lo que se ha planteado como un sitio inmuno-privilegiado (Crotti & Ransohoff, 2016; Jassam *et al.*, 2017). Se considera así debido a que en condiciones normales, el único tipo celular del sistema inmune residente dentro del parénquima nervioso es la microglía, que representa una población inusual dentro de los fagocitos mononucleares. La microglía no deriva de monocitos de la médula ósea como otros fagocitos de adulto, sino que se originan de progenitores eritromieloides en el saco vitelino durante el desarrollo embrionario (Ginhoux *et al.*, 2010). Comparado con otros fagocitos mononucleares, los precursores de microglia emergen considerablemente temprano en el desarrollo, durante la primera ola de hematopoyesis primitiva. Esta población celular migra desde el saco vitelino y coloniza el SNC en formación (Ginhoux *et al.*, 2013). Una vez dentro del SNC, la microglía encuentra un ambiente altamente especializado que se caracteriza por la presencia de neuronas en desarrollo y glías radiales, pero desprovisto de otros tipos de células gliales. El principal responsable de la compartimentalización del SNC y que le da la calidad de inmunoprivilegiado al tejido nervioso es la barrera hematoencefálica, que separa al compartimiento vascular del nervioso y permite el pasaje selectivo de sustancias y células desde la circulación sanguínea al SNC y viceversa. Por esta razón, a diferencia de otros macrófagos residentes en otros tejidos, la microglía se desarrolla y sobrevive durante toda la vida sin contacto con la circulación sanguínea, a menos que suceda un evento traumático que altere la integridad de la barrera hematoencefálica (Crotti & Ransohoff, 2016).

Por fuera del parénquima del tejido nervioso, la vigilancia inmunológica es realizada por células dendríticas y por macrófagos derivados de la médula ósea que se encuentran en las meninges, plexos coroideos y espacios perivascuales (Figura 6). Durante los procesos neuroinflamatorios, el panorama inmunológico en el SNC cambia drásticamente debido a que las células inmunes residentes se activan y a que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica se ve alterada, lo que permite que el parénquima sea infiltrado por células inmunes desde la periferia, entre las que se incluyen principalmente macrófagos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos (Donnelly & Popovich, 2008).



**Figura 6.** Células de la línea mieloide asociadas al SNC en condiciones de homeostasis. Diferentes células de la línea mieloide se posicionan estratégicamente cerca del parénquima del SNC en las meninges y espacios perivascuales rodeando los vasos sanguíneos, donde realizan tareas de vigilancia y mantenimiento de la homeostasis. Mientras que la microglía realiza un censo constante en el parénquima del SNC, los macrófagos, células dendríticas y mastocitos en las meninges, plexos coroideos y espacios perivascuales realizan un muestreo constante de los detritos celulares y potenciales patógenos en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo. La comunicación con el sistema inmune periférico probablemente ocurra mediante los vasos linfáticos de las meninges, mediante los cuales las células inmunes de las meninges y moléculas solubles drenan hacia los nodos linfáticos. Imagen adaptada de Herz *et al.*, 2017.

Los macrófagos derivados de monocitos (MDM) son reclutados desde la circulación sanguínea al SNC luego de una lesión o enfermedad. Para el caso de las lesiones de médula espinal, se han descrito dos sitios de entrada de los macrófagos al lugar de la lesión, una de ellas es a través de la circulación sanguínea y la otra es a través de los plexos coroideos y el canal central (Figura 6). Se ha reportado que a través de la primer vía, ingresan macrófagos con propiedades pro-inflamatorias (Shechter *et al.*, 2009), mientras que los que ingresan por la segunda vía, es decir por los plexos coroideos y canal central, tienen propiedades que promueven la reparación (Shechter *et al.*, 2013).

Cuando la microglía se activa en regiones del SNC dañado, estas células retraen sus procesos y adquieren una forma redondeada, volviéndose hipertróficas o ameboides y más fagocíticas (David *et al.*, 2015; Crotti & Ransohoff, 2016). En secciones de tejido, no se puede distinguir entre microglía activada y los MDM que infiltraron en el tejido utilizando los marcadores más comúnmente usados como Iba-1 y CD11b (David *et al.*, 2018). En condiciones normales y en ausencia de daño, Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1) es utilizado rutinariamente para identificar células microgliales en el SNC ya que sólo este tipo celular expresa esta proteína de superficie en condiciones de homeostasis y puede diferenciarse de los macrófagos perivasculares debido a su morfología ramificada (Ito *et al.*, 1998). Los MDM también expresan Iba-1 en su superficie, pero en ausencia de estímulos inmunes no se encuentran en el parénquima del tejido nervioso, por lo que se puede asumir que todas las células positivas para Iba-1 en el tejido corresponden a la microglía. Cuando se da la lesión, los MDM ingresan al parénquima y la microglía adopta una morfología muy similar a los MDM, por lo que debido a que ambos expresan Iba-1 y no se les puede distinguir, se les denomina en conjunto macrófagos/microglía (David *et al.*, 2018). Hasta el momento no existen anticuerpos específicos para marcar selectivamente a los MDM y a la microglía, aunque se han propuesto una serie de proteínas que se expresan únicamente en la microglía. Entre estas proteínas se encuentran TREM2, Tmem119, Siglec-H y P2ry12 (Bennett *et al.*, 2016). Aunque se ha demostrado que estas proteínas se expresan en relativamente altos niveles en condiciones homeostáticas, es probable que la expresión de estas proteínas disminuya durante la activación microglial, por lo que este campo debe ser estudiado con mayor detalle para determinar un marcador confiable de microglía en ambas condiciones (David *et al.*, 2018).

Otro tipo celular mieloide que entra en la médula espinal lesionada y cumple un rol importante es el neutrófilo. Éstos son los más abundantes entre los granulocitos en sangre y son los primeros leucocitos circulantes en ingresar al lugar de la lesión (Donnelly & Popovich, 2008). Se observa un máximo en el número de neutrófilos en la lesión a las 24 horas, que luego decae rápidamente en los primeros 7 días luego de la lesión, aunque algunos permanecen (Figura 3). Luego de una infección o lesión traumática,

los neutrófilos migran a través de las barreras endoteliales para llegar al lugar inflamatorio, ya que son altamente sensibles a señales quimioatrayentes como CXCL12, CXCL1/2 e INF- $\gamma$ . Dentro del tejido, liberan una variedad de mediadores tóxicos como proteasas y radicales libres destinados a eliminar patógenos y a despejar al tejido dañado, pero estos mediadores pueden también actuar sobre células vecinas sanas causando un daño secundario (Brinkmann *et al.*, 2004). Los neutrófilos también liberan mediadores pro-inflamatorios como citoquinas y eicosanoides que promueven el reclutamiento de MDM circulantes al lugar de la lesión, llevando a un mayor estado inflamatorio. Esto ha llevado a que los neutrófilos sean considerados como perjudiciales en la lesión de medula espinal y otros trastornos del SNC, por lo que se han estudiado estrategias cuyo foco es la migración de los neutrófilos hacia la médula espinal lesionada para limitar su ingreso. Algunos estudios sugieren que aunque los neutrófilos pueden liberar factores tóxicos, su presencia en la médula espinal lesionada puede también ayudar al control de las respuestas inflamatorias y promover la reparación del tejido (Ghasemlou *et al.*, 2010). Esto puede suceder debido a que no todos los productos liberados por los neutrófilos tienen efectos perjudiciales, por ejemplo la liberación de oncomodulina puede actuar como factor de crecimiento y promover la regeneración axonal en el SNC (Kurimoto *et al.*, 2013). Una vez dentro del tejido, los neutrófilos tienen una vida media muy corta, de aproximadamente 7 horas, donde luego sufren la muerte celular por apoptosis. Las células apoptóticas son reconocidas por los macrófagos (y microglía en el SNC) a través de señales mostradas por los neutrófilos que llevan a su fagocitosis, también conocido como esferocitosis (Elliott *et al.*, 2017).

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo expuesto previamente con respecto al desarrollo de los procesos inflamatorios, es necesaria una respuesta inmune eficiente para limpiar los restos celulares producidos por el daño endógeno o factores exógenos, pero puede tener el precio de dañar el tejido localmente. En consecuencia, el tipo y la robustez de la respuesta inmune local refleja un compromiso entre la severidad de la amenaza y la capacidad del tejido de tolerar una actividad inmune robusta con el potencial daño colateral y de regenerar luego de que la respuesta ha sido resuelta (Deczkowska, Amit, *et al.*, 2018). Por consiguiente, mucho esfuerzo de investigación se ha destinado a entender los mecanismos de la respuesta inmune luego de un trauma mecánico.

## 6. Modulación de la respuesta inflamatoria a través de la modulación del fenotipo microglial.

Como fue mencionado previamente, la microglía es el principal actor en el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria luego de la lesión ya que es el principal tipo celular del sistema inmune que reside en el SNC en condiciones de homeostasis (Prinz *et al.*, 2011; Herz *et al.*, 2017; David *et al.*, 2018). Cuando esta condición homeostática se ve alterada o perturbada como consecuencia de una lesión, ya sea aguda o crónica, las células microgliales se vuelven reactivas por medio de dos posibles mecanismos: la expresión *de novo* de una variedad de factores denominados “señales activadoras” o por la pérdida de factores constitutivos denominados “señales de apagado” que mantienen a la microglía constantemente en un estado homeostático. Por lo tanto, cuando estas señales de freno desaparecen, se desencadenan los procesos que llevan a la reactividad microglial (Manich *et al.*, 2018).

En el contexto de las “señales activadoras”, se pueden considerar dos tipos de moléculas como los principales actores. Por un lado, se encuentran numerosos factores solubles como las citoquinas y factores tróficos, cuyos receptores pueden ser expresados en la microglía (Kettenmann *et al.*, 2011). Dentro de esta categoría de moléculas, el ATP es una de las principales señales solubles (Burnstock, 2016). El ATP puede desencadenar su efecto mediante la unión a una variedad de receptores denominados purinérgicos (P2Y o P2X), por ejemplo los receptores P2Y6, P2Y12 o P2X7 presentes en la microglía, que tras su unión al ATP desencadenan diferentes efectos como la fagocitosis o la quimiotaxis hacia las neuronas dañadas (Beamer *et al.*, 2016). Por otro lado, se han implicado moléculas asociadas a la membrana que al unirse a receptores en la microglía inducen su activación. El ejemplo más estudiado en este caso es el receptor TREM2, probablemente debido a su asociación con la enfermedad de Alzheimer. La expresión de este receptor se ve aumentada en diferentes condiciones neurodegenerativas promoviendo la activación de la microglía y un aumento en su capacidad fagocítica (Yeh *et al.*, 2017). Aunque actualmente se desconoce el ligando exacto para este receptor, se ha reportado su unión a neuronas apoptóticas probablemente mediante la unión a residuos de fosfatidilserina u otros fosfolípidos (Cannon *et al.*, 2012). Otras interacciones entre neuronas y microglía se han planteado como activadoras, por ejemplo la interacción entre Sirp- $\alpha$  (Signal regulatory protein alpha) y el ligando CD47 (Matozaki *et al.*, 2009). La presencia de diferentes señales activadoras tienen un rol importante en determinar el tipo de respuesta microglial luego de un daño al SNC. Por ejemplo, cuando la microglía interacciona con señales en las neuronas como Sirp- $\alpha$ , esto va a ser interpretado como una señal de regeneración y recuperación del tejido, mientras que si se da la señalización por activación de TREM2, la microglía va a dirigir su fenotipo hacia uno fagocítico (Yeh *et al.*, 2017).



Por otro lado, como fue mencionado previamente, en condiciones de homeostasis la microglía lejos de estar en estado quiescente, está constantemente sensando de forma activa el microambiente que la rodea recibiendo una amplia variedad de señales (Deczkowska, Amit, *et al.*, 2018). Dentro de estas señales se encuentran las denominadas “señales de apagado” que funcionan como un freno que impide la reactividad de la microglía cuando el sistema se encuentra en condiciones de homeostasis. Estas señales de naturaleza variada en las que se incluye la activación de receptores expresados en la superficie de microglía como CD200R y CX3CR1, que tienen como ligando a CD200 y CX3CL1 que corresponden a moléculas de superficie presente en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Bennett *et al.*, 2016). Estas señales de apagado también están mediadas por factores solubles como TGF- $\beta$  y CSF-1, cuyos receptores son expresados por la microglía (Wohleb, 2016). Se ha sugerido que la microglía también presenta en su superficie receptores para diferentes neurotransmisores como glutamato, GABA, acetilcolina y noradrenalina, por lo que la función microglial podría estar afectada por la actividad neuronal (Pocock & Kettenmann, 2007).

En los últimos años, se ha destacado la pérdida de estas señales constitutivas de apagado como un factor determinante en la activación microglial en diferentes neuropatologías. Teniendo en cuenta que la reactividad de la microglía se encuentra en la base de las respuestas inflamatorias del SNC, muchas de las investigaciones se han enfocado en determinar los mecanismos por los cuales aumentan las señales activadoras y se pierden las señales de apagado de la microglía que promueven un cambio en el fenotipo homeostático de la microglía hacia uno más reactivo. En este contexto, varios inmunorreceptores han sido destacados como posibles dianas para el control y la modulación de la respuesta inflamatoria, en los que se incluyen TREM-2, Siglecs, la familia de receptores CD300 y el sistema CD200/CD200R (Deczkowska, Amit, *et al.*, 2018). En particular, se ha propuesto a la interacción entre CD200 y el receptor CD200R como un regulador fundamental de las respuestas inflamatorias y por lo tanto un posible blanco terapéutico sobre el cual actuar para modular esta respuesta en diferentes patologías neuroinflamatorias como la lesión de médula espinal.

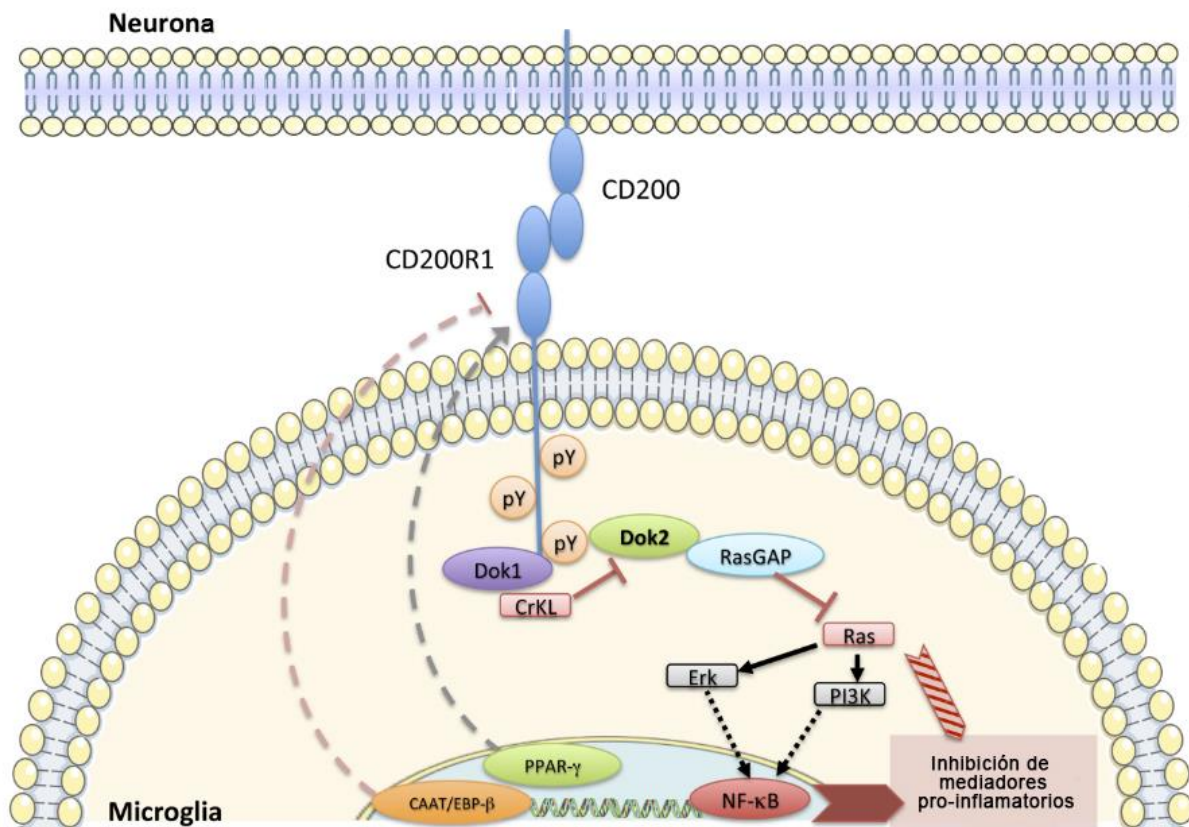
## **7. Interacción entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1 en diferentes neuropatologías.**

CD200, originalmente denominada OX-2 o MRC OX-2, es una proteína que pertenece a la superfamilia de proteínas de superficie celular de las inmunoglobulinas (Barclay & Ward, 1982; Clark *et al.*, 1985; Barclay *et al.*, 1986). En ratón, CD200 es una proteína de 32 kDa sin isoformas, mientras que en humanos también es de 32 kDa con tres posibles isoformas como proteína de membrana y una

isoforma soluble (Wong *et al.*, 2012; Kos *et al.*, 2013). La homología entre CD200 de humano y ratón es de 77.6% a nivel de la proteína y de 80.7% a nivel de ADN (Walker & Lue, 2013). Debido al importante rol que cumple en la inmunoregulación, es una proteína abundante en el tejido nervioso y linfóide, tejidos en donde se identificó por primera vez esta proteína (Barclay, 1981; Barclay & Ward, 1982). En el SNC, se ha descrito que CD200 es altamente expresado en neuronas en roedores y humanos (Webb & Barclay, 1984; Chitnis *et al.*, 2007a; Koning *et al.*, 2009), aunque también en determinadas condiciones se observó expresión en astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales (Deckert *et al.*, 2006; Koning *et al.*, 2009; Cohen *et al.*, 2017). Los tipos celulares que expresan CD200 en el SNC se resumen en la Tabla 1. Como proteína integral de la membrana, CD200 se localiza en la membrana del soma neuronal, axones, dendritas y en las sinapsis. Se ha reportado un enriquecimiento de CD200 en los elementos pre- y post-sinápticos de las sinapsis excitatorias (Cox *et al.*, 2012; Ojo *et al.*, 2012; Loh *et al.*, 2016). Además de la forma unida a la membrana de CD200, se ha descrito una forma truncada de CD200 (CD200tr) resultado del splicing alternativo, la cual se ha encontrado que tiene una acción antagonista del receptor de CD200 (Chen *et al.*, 2008). Se encontró que la expresión de CD200tr en el cerebro de ratón es despreciable en condiciones fisiológicas aunque se sugiere que CD200tr contrarresta la unión de CD200 a su receptor en condiciones neuroinflamatorias.

CD200 interacciona directamente con el receptor CD200R1, previamente llamado OX-2R, que pertenece a la familia de receptores CD200R. Este receptor tiene dos dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas y tiene un gran dominio citoplasmático que le da la capacidad a CD200R1 de activar vías de señalización intracelular (Mihirshahi & Brown, 2010). A diferencia de la mayoría de los receptores inhibitorios, CD200R1 no presenta un motivo de inmunoreceptor inhibitor basado en tirosina (ITIM: immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs) que recluta fosfatasa, sino que este receptor es inusual al contener motivos de fosfotirosinas que reclutan los adaptadores DOK2 y RasGap, que lleva a la inhibición de la vía Ras-ERK y Ras-PI3K (Figura 7) (Mihirshahi *et al.*, 2009; Mihirshahi & Brown, 2010). La inhibición de estas vías lleva a la disminución de la secreción de señales pro-inflamatorias, probablemente mediante la regulación negativa de la vía de NF- $\kappa$ B, aunque otras vías desconocidas pueden estar participando (Zhang *et al.*, 2004). La familia de CD200R, además del CD200R1 tiene 4 miembros similares a éste que son activadores: CD200RLa, CD200RLb, CD200RLc y CD200RLe (también llamados alternativamente CD200R4, CD200R3, CD200R2 y CD200R5, respectivamente), que presentan dominios extracelulares muy similares (comparten hasta el 87% de la secuencia de aminoácidos), aunque difieren en mayor medida en las regiones citoplasmáticas, lo que les otorga la capacidad de ser activadores o inhibidores de la reactividad celular (Wright *et al.*, 2003). Los miembros activadores en su dominio citoplasmático se asocian con adaptadores como

DAP12 (Voehringer *et al.*, 2004), que contienen motivos de inmunoreceptores activadores basados en tirosinas (ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Sin embargo, dado que CD200 presenta una afinidad marcadamente mayor por CD200R1 que por los otros miembros de la familia de CD200R (Wright *et al.*, 2003; Gorczynski *et al.*, 2004), la mayoría de los estudios abordan la interacción con CD200R1, habiendo muy poca evidencia de la interacción con los otros miembros de la familia. Cabe destacar que en humanos, además del CD200R1, la familia de CD200R está conformada por otro miembro activador denominado CD200RLa (Wright *et al.*, 2003).



**Figura 7.** Cascada de señalización intracelular inducida por la activación de CD200R1 mediante la unión al ligando CD200. Cuando CD200, que se encuentra presente principalmente en neuronas en el SNC, se une al CD200R1 presente en la microglía, desencadena una cascada de señalización intracelular que lleva a la fosforilación de Dok1 y Dok2, lo que promueve la inhibición de Ras a través de RasGAP. Esta inhibición de Ras promueve una inhibición de las vías de Ras-ERK y Ras-PI3K. Esto lleva a la inhibición de la secreción de señales pro-inflamatorias probablemente mediante la regulación negativa del factor NF-κB aunque pueden existir otras vías desconocidas que participen en este proceso. Por otro lado, otros factores de transcripción involucrados con la actividad pro- o anti-inflamatoria, como CAAT/enhancer-binding protein-β o PPAR-γ, controlan la expresión de CD200R1. Figura adaptada de Manich *et al.*, 2018.

El receptor CD200R1 se ha encontrado expresado en células de la línea mieloide, que incluye a los macrófagos, microglía, células dendríticas y granulocitos, así como también en algunos subtipos de linfocitos B y T (Preston *et al.*, 1997; Hoek, 2000; Wright *et al.*, 2000; Rijkers *et al.*, 2008).

Interesantemente, algunos trabajos han reportado expresión de CD200R1 en algunos subtipos de astrocitos y oligodendrocitos (Chitnis *et al.*, 2007b; Hernangómez *et al.*, 2012; Shrivastava *et al.*, 2012). Los tipos celulares que expresan CD200R1 se resumen en la Tabla 1. Visto que CD200 es altamente expresado en el tejido nervioso y que CD200R1 es expresado en la microglía presente en el SNC, se planteó que la interacción entre estas proteínas puede tener un rol en la regulación de los procesos inflamatorios en el SNC. Se sugirió que CD200 puede estar protegiendo a las neuronas, al generar señales inhibitorias sobre la microglía que expresa CD200R1 promoviendo que permanezca en un estado homeostático, cuando estos tipos celulares entran en contacto directo. Se observaron agregados de microglía activada en ratones deficientes para la expresión de CD200, incluso en ausencia de estímulos nocivos (Hoek, 2000). Esto sugirió que la activación microglial puede estar siendo constantemente suprimida por la acción de CD200 sobre CD200R1 presente en la microglía. A su vez, se evidenciaron numerosas proteínas endógenas que parecen funcionar de manera similar al par CD200-CD200R1, como el receptor de fractalquina (CX3CR1), TREM2, CD22 y Sirp- $\alpha$ , que tras su activación inducen la activación de señales anti-inflamatorias en la microglía (Griffiths *et al.*, 2009). Estos sistemas podrían tener funciones complementarias en mantener a los macrófagos y microglía en un estado homeostático, o a su vez en promover que la microglía activada vuelva a un estado homeostático luego de un estímulo nocivo (Walker & Lue, 2013).

Los primeros indicios de la importancia que tiene la interacción entre CD200 y su receptor CD200R1 en el SNC surgieron de estudios en los que se bloqueó esta interacción en un modelo murino de esclerosis múltiple, se observó una mayor severidad de la patología y una exacerbación de los procesos inflamatorios (Wright *et al.*, 2000). Coincidiendo con este estudio, se reportó una mayor severidad de esta patología en ratones *Knock-Out* (KO) de CD200, que presentan deficiencia en la expresión de CD200. En estos ratones también se demostró que luego del daño provocado por la sección del nervio facial, presentan una respuesta inflamatoria exacerbada y mayor reactividad microglial (Hoek, 2000). Estas dos publicaciones fueron estudios importantes en establecer la importancia de la interacción entre CD200 y CD200R1 como regulador clave de los procesos inflamatorios del SNC. Desde entonces, el campo de estudio de CD200 y CD200R1 ha crecido en gran medida en varias condiciones inflamatorias como artritis (Chakera *et al.*, 2012; Halmannová *et al.*, 2012), trasplantes (Gorczyński, 2005), infecciones virales (Snelgrove *et al.*, 2008; Rygiel *et al.*, 2009), cáncer (Kretz-Rommel & Bowdish, 2008; Rygiel & Meyaard, 2012) y también en diferentes procesos neuroinflamatorios como los mencionados previamente (Hoek, 2000; Liu *et al.*, 2010; Hernangómez *et al.*, 2016; Cohen *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Expresión de CD200 y CD200R1 en diferentes poblaciones celulares en condiciones fisiológicas. Los niveles de expresión de CD200 y CD200R1 en células residentes del SNC y del sistema inmune periférico se indican con los siguientes signos: - no presentan expresión, + expresión baja o media, ++ expresión alta, +/- resultados contradictorios en cuanto a la expresión. Tabla adaptada de Manich *et al.*, 2018.

	CD200	CD200R1	Referencia
<b>Células del SNC</b>			
Microglía	-	+	Webb & Barclay, 1984; Wright <i>et al.</i> , 2000; Chitnis <i>et al.</i> , 2007b; Koning <i>et al.</i> , 2009; Valente <i>et al.</i> , 2017
Macrófagos perivasculares	-	+++	Chitnis <i>et al.</i> , 2007b; Meuth <i>et al.</i> , 2008; Koning <i>et al.</i> , 2009
Neuronas	+++	-	Webb & Barclay, 1984; Deckert <i>et al.</i> , 2006; Koning <i>et al.</i> , 2009; Valente <i>et al.</i> , 2017
Astrocitos	-/+	-	Webb & Barclay, 1984
Oligodendrocitos	-/+	-/+	Deckert <i>et al.</i> , 2006; Koning <i>et al.</i> , 2009
Células endoteliales	+	-	Wright <i>et al.</i> , 2000; Cohen <i>et al.</i> , 2017
<b>Células inmunes periféricas</b>			
Neutrófilos	-	+	Wright <i>et al.</i> , 2000
Basófilos	-	+	Wright <i>et al.</i> , 2000
Células dendríticas	+	+	Barclay <i>et al.</i> , 1986
Monocitos/marófagos	-	+	Singh <i>et al.</i> , 2013
Mastocitos	-	+	Wright <i>et al.</i> , 2003
Linfocitos T	-	+	Wright <i>et al.</i> , 2003
Linfocitos B	+	+	Barclay <i>et al.</i> , 1986
Células Natural Killer (NK)	-	+	Wright <i>et al.</i> , 2003; Rijkers <i>et al.</i> , 2008

Seguido de estas observaciones claves, rápidamente el par CD200-CD200R1 surgió como un posible blanco sobre el cual actuar para desarrollar estrategias terapéuticas en patologías asociadas a procesos neuroinflamatorios. Como ya ha sido comentado previamente, muchos estudios han reportado una protección del tejido nervioso relacionado al par CD200-CD200R1 durante procesos inflamatorios variados. Se observó en ratones transgénicos que una expresión aumentada de CD200 en el SNC está asociada a una mayor preservación frente al daño axonal y a una reducción en la magnitud de la desmielinización en la médula espinal en un modelo murino de esclerosis múltiple, la

cual tiene un componente inflamatorio en la base de la patología (Chitnis *et al.*, 2007a). Se ha asociado el rol neuroprotector del par CD200-CD200R1 en varias regiones del SNC, inclusive en la retina. En el modelo de uveoretinitis experimental autoinmune, se observó que cuando se bloquea el CD200R1 y se impide su activación, genera una mayor destrucción de la retina (Banerjee & Dick, 2004). Concomitantemente, experimentos en la retina demostraron una menor apoptosis de las células ganglionares luego de la lesión del nervio óptico cuando se administra un agonista del receptor CD200R1, por lo que se puede atribuir la protección a la activación del receptor CD200R1 (Huang *et al.*, 2018). Se ha propuesto que la modulación de la protección tisular a través de CD200-CD200R1 es el resultado de la disminución de la producción de varios mediadores pro-inflamatorios y oxidativos (Manich *et al.*, 2018). Mediante experimentos *in vitro*, se sugirió que la señalización a través de CD200R1 en la microglía confieren cierto grado de neuroprotección en cultivos neuronales de hipocampo seguido de una lesión excitotóxica (Yi *et al.*, 2012). Contrariamente, el bloqueo de CD200R1 en co-cultivos de macrófagos y neuronas, resultó en un incremento en la producción de IL-6 inducida por interferón- $\gamma$ , un aumento en macrófagos que expresan iNOS y una mayor muerte neuronal mediada por los macrófagos (Meuth *et al.*, 2008). Interesantemente, en un estudio se reportó una correlación entre la expresión de CD200 por células residentes del SNC con una mejor recuperación funcional luego de una contusión espinal, ya que la deficiencia de expresión de CD200 en el SNC produjo una mayor activación de la microglía y macrófagos así como mayor factores pro-inflamatorios, llevando a una peor recuperación (Cohen *et al.*, 2017).

Además de la capacidad de protección en el SNC frente a procesos inflamatorios que presenta el par CD200-CD200R1, también se ha sugerido un posible rol en la reparación de tejido y la recuperación de la homeostasis de los tejidos nerviosos luego de lesiones. Este rol de CD200-CD200R1 en la reparación de tejido fue sugerido al observar que cuando se añadió un agonista de CD200R1 en cultivos de microglía y células madre neurales, hubo un aumento y potenciación de la maduración de éstas células (Varnum *et al.*, 2015). A su vez, se observó que cuando se adicionó CD200 a un cultivo primario de neuronas, se promovió la supervivencia neuronal y la neuritogenesis. Interesantemente, se observó que en este caso el efecto protector se realizó a través de la unión de CD200 con el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) en lugar de la activación de CD200R1 (Pankratova *et al.*, 2016). En concordancia con esta observación, se ha propuesto que el efecto anti-inflamatorio presentado por la activación del receptor FGFR puede estar medido por un aumento en la expresión de CD200 (Cox *et al.*, 2013). Por lo tanto, aún permanece por determinar si los efectos positivos en la protección tisular provienen de la interacción de CD200 con el CD200R1 presente en la microglia o por la unión a otros posibles receptores.

Se ha propuesto que la activación de CD200R1 puede promover un cambio del fenotipo de microglía y macrófagos hacia uno anti-inflamatorio que favorezca la reparación. La estimulación de microglía reactiva con un agonista de CD200R1 mostró un aumento de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4 en co-cultivos de neuronas y microglía (Hernangómez *et al.*, 2012), mientras que este cambio hacia un fenotipo anti-inflamatorio se evita con el bloqueo de CD200R1 (Yi *et al.*, 2016). A su vez, la activación de CD200R1 demostró aumentar la expresión de Arginasa-1 en microglía, el cual es un marcador conocido pro-reparativo (Yi *et al.*, 2016). Interesantemente, se observó que la deficiencia de expresión de CD200 en un modelo de lesión de medular por contusión se asoció a una disminución en la expresión de marcadores pro-reparativos como el receptor de IL-4 y el receptor de manosa CD206 (Cohen *et al.*, 2017).

El par CD200-CD200R1 también ha sido asociado a la modulación de la proliferación y apoptosis de la población de microglía. Estos planteos se basan en la observación de que ratones KO de CD200 demostraron tener un mayor número de células microgliales en la retina y el hipocampo en condiciones basales (Broderick *et al.*, 2002; Denieffe *et al.*, 2013). Sin embargo, estos estudios reportaron no encontrar diferencias en el número de células microgliales o de células proliferativas en otras regiones del cerebro en los ratones KO de CD200. Estos resultados contradictorios no permiten establecer si la interacción CD200-CD200R1 tiene un efecto en la proliferación de la microglía en condiciones de homeostasis. A pesar de esto, luego de un estímulo inflamatorio, se planteó que la pérdida de la señalización de CD200-CD200R1 estimula la proliferación microglial, por lo tanto la activación de CD200R1 podría actuar como limitante de la proliferación de las células que lo expresan. En cuanto a la apoptosis, se ha reportado que el tratamiento con un agonista de CD200R1 en un modelo murino de esclerosis múltiple induce la apoptosis en microglía y macrófagos (Liu *et al.*, 2010), aunque la participación de la activación de CD200R1 en la regulación de la apoptosis debe ser analizada en mayor profundidad.

A pesar de que el rol del par CD200-CD200R1 en la fagocitosis a sido poco explorada hasta la fecha, algunos estudios han asociado la modulación de esta interacción a cambios en la capacidad fagocítica de la microglía. Se observó *in vitro* que la activación de CD200R1 disminuye la capacidad que tiene la microglía de fagocitar  $\beta$ -amiloide (Lyons *et al.*, 2012), mientras que la microglía de ratones KO de CD200 mostraron tener mayor fagocitosis de las placas de  $\beta$ -amiloide (Lyons *et al.*, 2017). Concomitantemente con estas observaciones, se han reportado alteraciones en la interacción CD200-CD200R1 en las enfermedades neurodegenerativas de Alzheimer (Walker *et al.*, 2009) y Parkinson (Zhang *et al.*, 2011). Debido a que estas patologías presentan un componente inflamatorio

prominente asociado al envejecimiento, la modulación de la actividad microglial a través de CD200R1 podría tener un rol fundamental en el desarrollo de los procesos neurodegenerativos.

Considerando la naturaleza divergente de todos los modelos experimentales mencionados y la variedad de procesos en los que está involucrada la interacción entre CD200 y su receptor CD200R1, se puede concluir de estos estudios que su modulación podría constituir una estrategia exitosa para modificar las consecuencias de una variedad de neuropatologías, entre los que se encuentra el daño en el tejido nervioso producto de una lesión traumática a la médula espinal.

## HIPÓTESIS

Nuestra principal hipótesis de trabajo es que la interacción entre CD200 y su receptor CD200R1 tiene un rol importante en regular los procesos inflamatorios que subyacen a la progresión del daño secundario luego de una lesión de médula espinal. Por lo tanto, se espera que el bloqueo de la interacción entre CD200 y CD200R1 produzca una exacerbación de la respuesta inflamatoria luego de la contusión medular, generando una mayor pérdida de tejido nervioso y empeorando la recuperación funcional luego de la lesión. Por el contrario, se espera que la activación de CD200R1 reduzca el daño al tejido nervioso al promover una respuesta inflamatoria de menor magnitud, lo que desencadenaría en una mejor recuperación funcional luego de la lesión. Por lo tanto, la activación de CD200R1 podría promover el desarrollo de estrategias terapéuticas que favorezcan una mejor recuperación funcional luego de una lesión traumática a la médula espinal.



# OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el rol biológico del par CD200-CD200R luego de una contusión de médula espinal con el fin de desarrollar una estrategia terapéutica para mejorar la recuperación funcional luego de la lesión basada en la activación de CD200R1.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el patrón de expresión espacio-temporal del par CD200-CD200R en la médula espinal de ratón en condiciones normales y observar los cambios en la expresión que presentan estas proteínas luego de una lesión a la médula espinal por contusión.
2. Evaluar el efecto que tiene la modulación de la interacción entre CD200 y su receptor CD200R1 en la progresión del daño secundario. Se espera determinar el impacto que tiene el bloqueo y la activación de CD200R1 en la modulación de la respuesta inflamatoria y en la preservación del tejido nervioso luego de una contusión medular.
3. Desarrollo de una estrategia terapéutica poco invasiva basada en los resultados del objetivo 2, con potencialidad de aplicación clínica en humanos que hayan sufrido una lesión de médula espinal.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Mantenimiento de animales.

En este trabajo se utilizaron ratones hembras (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6 adultos (de entre 8 y 10 semanas) de peso entre 18 y 22 g. Los animales fueron mantenidos en cajas de a 5 ratones en un ambiente controlado en condiciones estándar de temperatura ( $20 \pm 1$  °C), humedad de aproximadamente 40-60% y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA, del Institut Pasteur de Montevideo), la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, de Facultad de Medicina, Universidad de la República) y el Comité de Experimentación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona, siguiendo los estándares internacionales.

## 2. Procedimientos quirúrgicos.

### 2.1. Lesiones de médula espinal.

Para todos los procedimientos quirúrgicos, los ratones fueron anestesiados con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) de administración intraperitoneal o intramuscular. Para realizar la lesión de la médula espinal por contusión, a los ratones anestesiados se les realizó en primer lugar una laminectomía a la altura de la 11<sup>va</sup> vértebra torácica. En la laminectomía se realiza una pequeña incisión en la piel y músculo por debajo de ésta y luego se quitan pequeños fragmentos de hueso de la vértebra para exponer la médula espinal únicamente en este segmento. Luego de la laminectomía, el animal es inmovilizado y colocado en uno de los dispositivos para realizar la lesión de la médula espinal por contusión (Amo-Aparicio *et al.*, 2018). Las lesiones realizadas en los diferentes análisis fueron variadas en cuanto a la severidad y dispositivos utilizados y se resumen en la Tabla 2. Las lesiones en las cuales se evaluó el efecto de la administración de antagonistas y agonistas de CD200R1 se realizaron con el dispositivo Infinite Horizon Impactor (Precision Scientific) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) que consiste en un dispositivo controlado por computadora que permite regular la fuerza con la que el pistón impacta la médula espinal y la distancia que ésta se desplaza. Para la evaluación del efecto de la administración de anti-CD200R1 dentro del tejido medular y de la administración intravenosa de CD200-His y CD200-RVG se realizaron las lesiones con una fuerza de 50 kDynes y un desplazamiento de la médula espinal de entre 400 y 450  $\mu\text{m}$ . Para el caso del análisis de los efectos terapéuticos de la administración de CD200-His dentro del tejido medular se lesionó con una fuerza de 60 kDynes y un desplazamiento de la médula espinal de entre 500 y 550  $\mu\text{m}$ . Las lesiones para la caracterización de la expresión espacio-temporal de CD200 y

CD200R1 se realizaron con el dispositivo PinPoint PCI3000 Precision Cortical Impactor (Hatteras Instruments), el cual permite controlar la velocidad con la que el pistón impacta y el tiempo que éste permanece en contacto con la médula espinal. Para comparar la severidad de las lesiones de este dispositivo con las lesiones generadas por el Infinite Horizon Impactor se realizó el seguimiento funcional de los ratones en ambas condiciones y se determinó que con los parámetros de velocidad de impacto y tiempo de contacto utilizados, los ratones lesionados con el dispositivo PinPoint PCI300 tienen una recuperación funcional equivalente a una lesión de 60 kDynes con el Infinite Horizon Impactor.

## 2.2. Administración dentro del tejido de la médula espinal.

La administración dentro del tejido de la médula espinal se realizó a los 5 minutos de haber realizado la lesión utilizando una aguja de vidrio de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro (marca Eppendorf) acoplada a una jeringa Hamilton de 10 mL. En el lugar de la lesión se introdujo la aguja hasta 0.4 mm dentro del tejido y se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de las diferentes soluciones a una velocidad constante de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  controlada por un inyector automático (KDS 310 Plus; KD Scientific). La punta de la aguja se mantuvo dentro del tejido de la médula espinal por 3 minutos luego de cada inyección para evitar el reflujo del líquido hacia fuera del tejido.

**Tabla 2.** Condiciones de lesión utilizadas en los diferentes experimentos.

Experimento	Dispositivo utilizado	Fuerza de impacto (kDynes)	Desplazamiento de la médula
Caracterización del patrón de expresión espacio-temporal de CD200 y CD200R1 luego de la lesión de médula espinal	PinPoint PCI3000 (Hatteras Instruments)	No medible; equivalente a 60	No medible
Evaluación del efecto del anticuerpo bloqueante anti-CD200R1 dentro del tejido de la médula espinal		50	400-450 $\mu\text{m}$
Evaluación del efecto de la administración de CD200-His dentro del tejido de la médula espinal	Infinite Horizon Impactor (Precision Scientific)	60	500-550 $\mu\text{m}$
Evaluación del efecto de la administración intravenosa de CD200-His y CD200-RVG		50	400-450 $\mu\text{m}$

Para el caso de la evaluación del efecto del bloqueo de CD200R1 en la preservación tisular luego de la lesión de médula espinal se inyectó 1  $\mu$ L con un contenido de 1  $\mu$ g del anticuerpo anti-CD200R1 (Clon OX-131: FcSilent™ Absolute Antibody; Reino Unido), generado en rata que se une específicamente al CD200R1 de ratón. Como control, se inyectó 1  $\mu$ L con contenido de 1  $\mu$ g del anticuerpo del mismo isotipo IgG1 (FcSilent™ Absolute Antibody; Reino Unido) que no se une a CD200R1. Estos dos anticuerpos recombinantes fueron diseñados para minimizar la unión del receptor Fc $\gamma$ R y también demostraron tener menor unión del sistema del complemento. Se ha demostrado que el anti-CD200R1 utilizado es específico para el CD200R1 en ratones C57BL/6, ya que este anticuerpo también reconoce el receptor CD200RLe pero éste no es expresado en la cepa C57BL/6, y a su vez no reconoce al CD200RLa, CD200RLb y CD200Rc, que sí se encuentran en esta cepa de ratones (Akkaya *et al.*, 2013). Ambos anticuerpos fueron suministrados libres o en muy bajas concentraciones de endotoxinas (nivel de endotoxinas menor a 1 EU/mL). La administración dentro del tejido medular de la proteína recombinante CD200-His fue realizada de la misma manera que fue descrito previamente. En este caso se inyectó 1  $\mu$ L de la proteína CD200-His a una concentración de 1.22  $\mu$ g/ $\mu$ L o 1  $\mu$ L de vehículo control (PBS). La proteína recombinante CD200-His fue producida por la empresa Sinobiological (China) en células HEK293 y fue suministrada sin conservantes para poder ser administrada *in vivo*. Luego de realizada la inyección, se procedió a cerrar la herida mediante suturas 5-0 para suturar los músculos y grapas (FST, 7.5 x 1.75 mm) para la piel. Finalmente se colocaron los ratones en una manta térmica hasta que finalizó el efecto de la anestesia.

### 2.3. Administración intravenosa.

Para el caso de las administraciones intravenosas, se realizaron la inyecciones a las 4, 8 y 22 horas post-lesión. Para ello, los animales fueron inmovilizados en un cepo de forma cilíndrica que permite exponer la cola del ratón y utilizando una jeringa de insulina (BD Micro-Fine™) se administraron las proteínas recombinantes CD200-His, CD200-RVG o vehículo control (PBS) en las venas laterales de la cola de los ratones. Se administraron 150  $\mu$ g en total de cada proteína recombinante separados en tres inyecciones de 100  $\mu$ L, a una concentración de 0.50  $\mu$ g/ $\mu$ L. La proteína recombinante CD200-His administrada por vía intravenosa fue la misma que la inyectada dentro del tejido medular. La proteína recombinante CD200-RVG también fue producida por la empresa Sinobiological (China) en células HEK293 y fue suministrada sin conservantes para poder ser utilizada *in vivo*.

Para disminuir el dolor de los animales se administró de forma intraperitoneal el analgésico Tramadol (5 mg/kg de peso), una vez luego de que se despertaron de la anestesia y a las 24 y 48 horas luego de la lesión. A todos los animales lesionados se les vació la vejiga de forma manual comprimiendo

levemente el abdomen una o dos veces por día hasta que el control de la vejiga fue recuperado.

### 3. Procesamiento histológico.

#### 3.1. Obtención de las muestras de tejido para el procesamiento histológico.

Para obtener los tejidos de médula espinal sin lesionar y a 1, 7, 14 y 28 días post-lesión (dpl) para el procesamiento histológico los animales fueron anestesiados de forma profunda con Pentobarbital intraperitoneal (100 mg/kg de peso) y se realizó la perfusión intracardíaca de los ratones con 100 mL de paraformaldehído (PFA) al 4% en buffer fosfato 0.1 M, introduciendo la aguja de la jeringa en el ventrículo izquierdo y realizando un pequeño corte en la aurícula derecha para formar un circuito abierto. Luego de la perfusión se disecaron aproximadamente 0.5 cm de longitud de la médula espinal centrados en el sitio de la lesión (o segmento equivalente en la médula espinal sin lesionar) y se realizó la post-fijación de los segmentos de médula espinal con PFA al 4% en buffer fosfato 0.1 M durante 3 horas. Se realizó un lavado con buffer fosfato salino (PBS) y se crioprotegieron los tejidos en una solución de sacarosa (Sigma-Aldrich) al 30% en PBS a 4°C por al menos 48 horas. Luego, las muestras fueron embebidas en un compuesto soluble en agua de glicoles y resinas (Tissue-Tek; Sakura) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras de médula espinal congeladas se cortaron en un criostato Leica y las secciones de tejido fueron colectadas en portaobjetos de vidrio gelatinizados. Se realizaron 4 series de portaobjetos, en el cual se colocaron secciones transversales de 14 µm de grosor, por lo que las secciones adyacentes en el mismo portaobjetos representan una separación de 140 µm de la médula espinal.

#### 3.2. Tinciones para el análisis de preservación de mielina.

Para los análisis de preservación de mielina, se realizaron dos tinciones: FluoroMyelin y Luxol Fast Blue (LFB). Para la tinción con FluoroMyelin, las secciones de tejido fueron rehidratadas con PBS a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con una solución de FluoroMyelin (Invitrogen, N° catálogo: F34651) en PBS a una dilución de 1:300 durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de 3 lavados con PBS durante 10 minutos cada uno, se montaron los preparados con medio de montaje Mowiol (Sigma-Aldrich) y se dejaron secar durante 24-48 horas en oscuridad. Finalmente, las preparaciones fueron observadas y digitalizadas en el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 utilizando el filtro del canal para FITC. Para la tinción con LFB, las secciones fueron deshidratadas colocándolas en soluciones de concentración creciente de etanol. Luego se colocaron en una solución de LFB (Sigma-Aldrich) en 95% de etanol y 0.05% de ácido acético durante toda la noche a 37°C. Las secciones fueron lavadas en agua destilada previamente a ser colocadas en

carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$  al 0.05%) en agua destilada durante 30 segundos seguido de un breve lavado con etanol al 70%. Luego de tres lavados con agua destilada, las secciones fueron deshidratadas con soluciones crecientes de etanol finalizando en xilol y montadas con el medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich). Luego de que se dejaron secar durante 24 horas, los preparados fueron observados y digitalizados con el microscopio Olympus IX81 utilizando luz transmitida.

### 3.3. Inmunofluorescencia.

Para inmunofluorescencia, las secciones fueron rehidratadas en PBS y permeabilizadas con PBS-Tritón 100X al 1% (PBS-T) en tres lavados de 5 minutos cada uno. Se realizó el bloqueo con suero fetal bovino (FBS) al 10% en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente las secciones fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en FBS al 10% y PBST-T. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se muestra en la Tabla 3. Luego de la incubación con los anticuerpos secundarios durante 1 hora, se procedió a realizar 3 lavados con PBS-T y a la incubación durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente con DAPI (Sigma-Aldrich, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), el cual se une al surco menor del ADN. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y se realizó el montaje con medio de montaje Mowiol (Sigma-Aldrich) cubriéndolos con un cubreobjetos de vidrio. Luego de dejar secar los portaobjetos montados en oscuridad, las secciones de tejido fueron observadas y las imágenes digitalizadas con los microscopios confocales Leica SP5 o el Zeiss LSM 880. Todas las imágenes obtenidas del microscopio confocal consisten en un único plano focal de 1  $\mu\text{m}$  de grosor.

## 4. Análisis de imágenes.

Las imágenes de microscopía fueron analizadas y procesadas con el software libre FIJI - Image J (NIH). Para determinar el área de mielina preservada, en las imágenes de las secciones transversales de médula espinal teñidas con LFB, se diseñó un Macro de Image J que consiste en programar un archivo de texto que le indica al programa las acciones que debe ejecutar para procesar automáticamente todas las imágenes en simultáneo. En primer lugar se programó el Macro para que realizara un "Umbral de color" en cada imagen y se le asignó los valores umbrales de tono, saturación y brillo para seleccionar los píxeles de la imagen que estén dentro del rango de estos tres parámetros. Previamente se determinaron los valores umbrales para estos tres parámetros con imágenes de diferentes regiones de la médula espinal, ya sea en la lesión o lejos de ésta, para determinar cuáles son los parámetros que permiten seleccionar únicamente los píxeles correspondientes a la tinción con LFB, que evidencia a la mielina con un tono azulado (Figura 15 en resultados). Una vez que se seleccionaron los píxeles

correspondientes al tono del colorante del LFB, el Macro crea una máscara con estos píxeles sobre la imagen original y mide el área de esta máscara y por lo tanto da como resultado el valor del área ocupada por la mielina. El Macro se ejecutó en *Process/Batch/Macro...* seleccionando las carpetas conteniendo las imágenes de las secciones de médula espinal teñidas con LFB y abriendo el archivo de texto que contiene las instrucciones que debe ejecutar el programa. Luego de procesar todas las imágenes automáticamente se obtiene el resultado de los valores de área para cada una de las imágenes con lo que posteriormente se analiza el perfil de desmielinización en cada muestra. El número de neuronas que sobreviven luego de la lesión medular se determinó mediante el conteo manual del número de cuerpos celulares NeuN<sup>+</sup> presentes en la sustancia gris desde el canal central hasta la superficie ventral de la médula espinal.

## 5. Citometría de flujo.

Se analizaron diferentes poblaciones de células del sistema inmune en médulas espinales sin lesionar y a 1 y 3 dpi, siguiendo el protocolo descrito previamente por (Francos-Quijorna *et al.*, 2016; Amo-Aparicio *et al.*, 2018). Se utilizaron 4 ratones en cada condición experimental. En primer lugar, los ratones fueron anestesiados profundamente con pentobarbital (100 mg/kg) intraperitoneal y perfundidos con PBS en frío para eliminar la sangre. Luego se extrajo un segmento de médula de 0.6 cm de largo y se colocó en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, ThermoFisher Scientific) en hielo. Una vez que se extrajeron todas las médulas espinales, se realizó la digestión enzimática colocando las muestras de tejido en una solución enzimática conteniendo Colagenasa (Sigma-Aldrich, N° catálogo: C9407, dilución 1:100) y DNAsa (Sigma-Aldrich, N° catálogo: D4527, dilución 1:100) en medio HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ThermoFisher Scientific) durante 30 minutos a 37°C, agitando vigorosamente en un vortex cada 10 minutos. Luego de frenar la reacción enzimática añadiendo 9 ml de DMEM con FBS al 10%, se realizó la digestión mecánica de los tejidos pasándolos a través de una malla de 70 µm (BD Bioscience Discovery Labware) y posteriormente la suspensión de células fue centrifugada a 500 G a 4°C durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de células en 1 mL de medio DMEM con FBS 10% y se repartió el volumen de la suspensión en el número de tubos correspondientes a los marcajes. Cada tubo fue llevado hasta 1 mL con DMEM y FBS 10% y se centrifugaron a 600 G durante 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y los pellets de células fueron resuspendidos en 100 µL de la mezcla de anticuerpos correspondientes a los respectivos marcajes extracelulares en cada tubo. Los anticuerpos y controles de isotipos utilizados con esta metodología se muestran en la Tabla 3. Se incubaron durante 1 hora a 4°C en oscuridad y en agitación y posteriormente se realizó un lavado añadiendo DMEM y FBS 10% en cada tubo hasta llegar a 1 mL y las muestras fueron centrifugadas durante 6 minutos a 600 G. Se eliminó el

sobrenadante y las células marcadas con anticuerpos fueron resuspendidas y fijadas en 400  $\mu$ L de PFA al 4% en PBS. Para el caso de los tubos correspondientes a los marcajes extracelulares, las muestras fueron guardadas a 4°C hasta su posterior análisis. Para el caso de los marcajes intracelulares, posteriormente a la fijación con PFA, las muestras fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 600 G durante 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos en 500  $\mu$ L de buffer de permeabilización (Invitrogen) e incubados durante 30 minutos a 4°C en oscuridad y agitación. Luego de una centrifugación a 600 G durante 6 minutos, se eliminó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 100  $\mu$ L de los anticuerpos primarios para los marcajes intracelulares diluídos en buffer de permeabilización o simplemente buffer de permeabilización para el caso de los controles negativos. Luego de 1 hora de incubación con los anticuerpos primarios a 4°C en oscuridad y agitación, se realizó un lavado con buffer de permeabilización y se centrifugaron las muestras a 600 G durante 6 minutos. Luego de eliminar el sobrenadante, el pellet de células fue resuspendido en 100  $\mu$ L de los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos diluídos en buffer de permeabilización (ver Tabla 3). Luego de una incubación con los anticuerpos secundarios durante 45 minutos a temperatura ambiente en agitación y oscuridad, se realizó un lavado con PBS y se centrifugaron las muestras a 600 G durante 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 400  $\mu$ L de PFA 4% en PBS para una segunda fijación. Posteriormente las muestras fueron guardadas a 4°C en oscuridad para su posterior análisis.

Para todos los análisis de citometría de flujo, las muestras fueron procesadas en un citómetro FACSCanto (BD Biosciences). Para cada muestra, se adquirieron eventos hasta agotar el volumen de la muestra. El análisis posterior de los datos se realizó utilizando el software FlowJo (BD Biosciences).



**Tabla 3.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para inmunofluorescencia y en los análisis por citometría de flujo.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Fluoróforo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>No catálogo</b>	<b>Dilución</b>
<b>Inmunofluorescencia</b>				
anti-CD200 (clon OX90)	-	Serotec	MCA1958	1:100
anti-CD200R1 (clon OX110)	-	Serotec	MCA2281	1:40
anti-NeuN	-	Millipore	ABN78	1:200
anti-Neurofilamento 200	-	Millipore	N0142	1:160
anti-Acuaporina 4	-	Invitrogen	AB3594	1:400
anti-S100 $\beta$	-	Sigma-Aldrich	HPA015768	1:200
anti-Iba 1	-	Wako	WDJ3047	1:600
anti-IgG de conejo	Alexa Fluor 546	Invitrogen	A-11035	1:300
anti-IgG de ratón	Alexa Fluor 546	Invitrogen	A-11030	1:300
anti-IgG de rata	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11006	1:300
<b>Citometría de Flujo</b>				
anti-CD45	PerCP-Cy5.5	eBioscience	45-0454-82	1:100
anti-CD11b	PE-Cy7	eBioscience	25-0112-81	1:100
anti-F4/80	APC	eBioscience	17-4801-80	1:100
anti-F4/80	PE	eBioscience	12-4801-80	1:100
anti-Ly6G	PE	eBioscience	12-9668-80	1:100
anti-CD206	FITC	eBioscience	MA5-16870	1:100
IgG2bk	FITC	eBioscience	11-4031-81	1:100
anti-Arginasa 1	-	Santa Cruz	SC-18354	1:100
anti-iNOS	-	Abcam	AB115819	1:100
anti-CD200R1	-	R&D Systems	AF2554	1:50
anti-IgG de cabra	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11055	1:150
anti-IgG de conejo	Alexa Fluor 647	Invitrogen	A-21245	1:150

## 6. Extracción y cuantificación de proteínas.

Para evaluar si la proteína CD200-RVG atraviesa la barrera hematoencefálica, 5 ratones fueron administrados con 100  $\mu\text{L}$  de la proteína a diferentes concentraciones por vía intravenosa en las venas laterales de la cola. Las concentraciones de CD200-RVG administradas fueron las siguientes: 0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (solo PBS), 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0.50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . A los 30 minutos de la administración intravenosa se realizó la eutanasia de los ratones con pentobarbital (100 mg/kg) intraperitoneal y se perfundieron por vía intracardiaca con 50 mL de PBS en frío. Se extrajeron muestras de médula espinal, cerebro, hígado y bazo, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento. Para realizar la extracción total de proteínas, las muestras de tejido fueron homogeneizadas mecánicamente en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 7.4; NP40 al 1%; sodio-deoxicolato al 0.25%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM) con un cóctel inhibidor de fosfatasa (Roche, N<sup>o</sup> catálogo: 04906845001) en hielo y fueron sonicadas en 3 ciclos de 10 segundos con 10 segundos de descanso y 10% de amplitud. Luego de permanecer por aproximadamente 45 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación, las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 13.000 G a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se recuperó el sobrenadante, se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  para realizar la cuantificación proteica y el resto fue congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La cuantificación proteica se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA) según (Smith *et al.*, 1985) en una placa de 96 pocillos. La curva de calibración se realizó con concentraciones conocidas (0, 31.25, 62.5, 125, 500, 1000, 1500 y 2000  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de seroalbúmina bovina (BSA) diluidas en PBS. En cada pocillo (por duplicado) se colocaron 8  $\mu\text{L}$  de las muestras de tejido diluidas previamente 1:50 en PBS y de las diferentes concentraciones de BSA. Luego de incubar las muestras con 200  $\mu\text{L}$  de la mezcla BCA/ $\text{CuSO}_4$  (50 mL de BCA y 1 mL de  $\text{CuSO}_4$  al 4%) durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , se realizó la medición de absorbancia a 562 nm. Con los valores de absorbancia de la curva estándar de BSA, se realizó una regresión lineal a partir de la cual se interpolaron los valores de absorbancia de las diferentes muestras de tejido para determinar la concentración total de proteínas.

## 7. Western Blot.

Se separó una fracción de los extractos de proteínas previamente cuantificados para ser analizadas por *Western Blot*, por lo que se les añadió buffer de carga 4X (2% SDS; 0,375M Tris; 10% glicerol; 5% beta-mercaptoetanol; 0,2% Azul de Bromofenol). Las proteínas de las muestras fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), formado por un gel de corrida (acrilamida/bis-acrilamida 12%; Tris 0.375 M pH 8.8; SDS 0.10%; TEMED 0.05% y APS 0.10%) y un gel de concentración (acrilamida/bis-acrilamida 4%; Tris 0.125 M pH 6.8; SDS 0.10%;

TEMED 0.05% y APS 0.075%). Una vez que el gel polimerizó, se procedió a ensamblar el equipo de electroforesis llenando la cubeta con buffer de corrida para SDS-PAGE (SDS 0.1%; Glicina 0.192%; Tris 0.025M pH 8.8; H<sub>2</sub>O mQ) y luego se realizó una pre-corrida del gel a 80V durante 15 minutos. Se cargaron en cada pocillo los  $\mu$ L de las muestras de proteínas con buffer de carga para que cada pocillo tuviera 240  $\mu$ g de proteínas, y en uno de ellos se cargaron 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, N° catálogo: 26616, Thermo Scientific). Se realizó la corrida a 120V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el gel de corrida (15 minutos aproximadamente), y luego se subió el voltaje a 160 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el borde interior del gel (55 minutos aproximadamente). Para que las proteínas sean accesibles a la detección por anticuerpos, se realizó la transferencia del gel hacia una membrana de nitrocelulosa. Para ello, una vez finalizada la electroforesis, se desmontó el equipo y se procedió al armado del cassette conformado por: una esponja delgada, papel de filtro, el gel con las proteínas separadas por peso molecular, la membrana de nitrocelulosa, otro papel de filtro y otra esponja delgada, desde el polo negativo al polo positivo. Se cerró el cassette cuidando que todos los elementos estuvieran bien sumergidos en buffer de transferencia (Tris 25mM; Glicina 192mM; Etanol 20%), evitando la formación de burbujas. Luego se colocó el cassette en la cubeta de transferencia llena de buffer de transferencia frío y se aplicó una corriente de 100V durante 2 horas a 4°C. Una vez finalizada la electrotransferencia, se desarmó el “sándwich” y la membrana se tiñó de forma reversible con Rojo de Ponceau (Rojo Ponceau S 0.2%; ácido tricloroacético 3%) por 5 minutos para comprobar la eficacia de la transferencia. Antes de proceder con la incubación con los anticuerpos, las membranas se lavaron con PBS durante aproximadamente 10 minutos para retirar la marca del Rojo de Ponceau.

Se realizó el bloqueo de la membrana con leche al 5% en PBS-Tween (Tween-20 0.1% en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Luego de retirar la solución de bloqueo, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario de ratón anti-HisTag (Santa Cruz, N° catálogo: 57598, dilución 1:500) que reconoce y se une a la cola de 10 histidinas de la proteína recombinante CD200-RVG. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1% de 10 minutos cada uno y posteriormente las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen, N° catálogo: 65-6120, dilución 1:4000) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación suave. Luego se realizaron dos lavados con PBS-Tween 0.1% y uno con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo. Para la detección de la señal del anticuerpo secundario se incubaron las membranas durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente para la HRP (Thermo Scientific, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate) y posteriormente en una cámara oscura se realizó la exposición de

placas (Kodak, BioMax Light Film) durante 10 minutos a las membranas. Las placas fueron reveladas con una solución de revelado (Laboratorio mediQ) y fijados con una solución de fijado (Laboratorio mediQ).

## 8. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Para la detección de la proteína CD200-RVG se realizaron ensayos de ELISA "sándwich", que consiste en medir la cantidad de proteína entre dos capas de anticuerpos que reconocen dos sitios diferentes de la proteína. En primer lugar los pocillos de una placa de PVC de 96 pocillos fueron recubiertos con una capa de anticuerpo de captura. Para ello, se incubaron durante toda la noche a 4°C con 100 µL de una solución del mismo anticuerpo anti-HisTag que el utilizado para el Western Blot a una concentración de 10 µg/mL diluido en buffer carbonato/bicarbonato (pH 9.6). Luego, se realizaron dos lavados colocando 200 µL de PBS en cada pocillo, descartando el sobrenadante y golpeando la placa sobre papel absorbente para remover las gotas que quedaron en los pocillos. Posteriormente los pocillos fueron bloqueados incubándolos durante 1 hora a temperatura ambiente con 200 µL de solución de bloqueo (leche 5% en PBS). Luego de un lavado con PBS-Tween 0.05%, se incubaron los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente con 100 µL de las muestras de tejido diluidas 1:3 en PBS. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0.05% se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 100 µL del anticuerpo de detección rata anti-CD200R1 de ratón (Serotec, clon OX110, N° catálogo: MCA2281) a una dilución de 1:1000 en PBS. Luego de tres lavados con PBS-Tween 0.05%, los pocillos fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Santa Cruz, N° catálogo: SC-2065) a una dilución de 1:5000 en PBS. Se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.05% y los pocillos se incubaron durante 25 minutos con 100 µL del sustrato 3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina (Sigma-Aldrich, N° catálogo: T0440). Finalmente, se colocaron 50 µL de HCl 6 M en cada pocillo y se realizó la medida de absorbancia a 450 nm.

Para obtener una medida cuantitativa de la cantidad de CD200-RVG en las muestras de tejido se utilizó la interpolación a partir de una curva de calibración de concentraciones conocidas de la proteína (25, 12.5, 6.25, 3.125 y 0.78 ng/µL). Para cada tipo de tejido analizado, se realizaron las diluciones de la proteína CD200-RVG a diferentes concentraciones en la muestra de tejido del ratón control al cual se le inyectó únicamente PBS, a modo de realizar las mediciones de la curva de calibración en las mismas condiciones que las muestras de tejido. A su vez, para eliminar la señal generada por la unión inespecífica del anticuerpo secundario a otras proteínas de la muestra se utilizaron controles negativos, en los cuales se realizaron los mismos pasos que en los pocillos con la muestra a analizar pero se omitió la adición del anticuerpo primario anti-CD200R1. Por lo tanto, la medida de absorbancia

de cada muestra correspondiente a la señal específica de la proteína CD200-RVG se obtuvo sustrayendo los valores de absorbancia de los controles negativos con las medidas de absorbancia de su respectiva muestra de tejido. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los valores de absorbancia de cada condición se obtuvo promediando la absorbancia de los pocillos duplicados. Con los valores de absorbancia de la curva de calibración se realizó una regresión lineal a partir de la cual se extrapolaron los valores de absorbancia de las muestras para obtener un valor cuantitativo de la concentración de CD200-RVG en cada caso.

## 9. Análisis funcional de la recuperación locomotora luego de la lesión.

La recuperación de la actividad locomotora fue evaluada a los 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 días post-lesión (dpl) en un campo abierto usando la escala de 9 puntos *Basso Mouse Scale* (BMS; (Basso *et al.*, 2006)), que fue desarrollada específicamente para analizar la recuperación funcional de los ratones luego de una lesión de médula espinal por contusión a nivel torácico. El análisis por BMS de los movimientos y coordinación de los miembros inferiores fue realizado por dos investigadores independientes, uno de ellos ciego al tratamiento, realizando un consenso entre los puntajes otorgados. La Tabla 4 muestra los parámetros locomotores a observar para determinar el puntaje dentro de la escala BMS como fue planteado por (Basso *et al.*, 2006). En la Figura 8 se observa un ejemplo representativo de la evaluación de un ratón por la escala BMS a 28 dpl, donde se determina si el ratón presenta determinados movimientos para cada miembro inferior, otorgándole un puntaje a cada una de ellas y haciendo un promedio entre ambos miembros para determinar el puntaje total del ratón a ese día post-lesión.

MOUSE # 11 DATE: 16/05/18 DPO: 28 SCORE: L 3 R 3

Ankle Mvt		Plantar W/O		Plantar W		Stepping				Coord	Paw Position				Trunk Instability			Tail
L	R	L	R	L	R	Dorsal L	Dorsal R	Plantar L	Plantar R		I.C. L	I.C. R	L.O. L	L.O. R	SEVERE	MILD	NORM**	
Ø	Ø	L	R	L	R	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø*	I	I	I	I				Down
S	S					O	O	O	O	Some	E	E	E	E	EVENTS*:	INSTANCES:		Up&Down
E	E					F	F	F	F	Most	P	P	P	P	- H. Hit	- Mild		
						C	C	C*	C*					- Scoliosis	- Severe			Up
														- Spasm				

Comments: \_\_\_\_\_

Ø - No Mov't  
S - Slight Mov't  
E - Extensive Mov't

Ø - None  
O - Occasional  
F - Frequent  
C - Consistent  
\*: <5 missed steps or dorsal steps

IC - Initial Contact  
LO - Lift Off  
I - Internal Rotation  
E - External Rotation  
P - Parallel  
+: none or <3 assessable pass

**SUBSCORE TALLY**

**Plantar Stepping**  
Freq = 0, Consistent = 1  
L \_\_\_\_\_  
R \_\_\_\_\_

**Coordination**  
None = 0, Some = 1, Most = 2  
\_\_\_\_\_

**Paw Position**  
Rotated thru out = 0  
Parallel and rotated = 1  
Parallel thru out = 2  
L \_\_\_\_\_  
R \_\_\_\_\_

**Trunk**  
Severe = 0; Mild = 1; Normal = 2  
\_\_\_\_\_

**Tail**  
Down, Up&Down = 0; Up = 1  
\_\_\_\_\_

**TOTAL SUBSCORE**

**Figura 8.** Ejemplo representativo de la evaluación de un ratón lesionado a los 28 días post-lesión (dpl). La tabla utilizada para evaluar el puntaje en la escala BMS es la propuesta por Basso *et al.*, 2006. En este caso, el ratón demostró tener movimiento extensivo del tobillo en ambos miembros inferiores y apoyar la planta de ambas patas. Dado que no mostró realizar pasos en ninguno de los miembros inferiores se le otorgó un puntaje de 3 en cada miembro, por lo que se promedió en un puntaje total de 3 para este ratón a los 28 dpl. No se completó el total de la tabla dado que al no mostrar pasos en ninguno de los miembros, todos los otros parámetros a evaluar van a ser de 0.

## 10. Análisis estadístico.

Todos los datos mostrados en el texto se expresan como la media  $\pm$  el desvío estándar. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0. El análisis estadístico de la evaluación locomotora por BMS se realizó utilizando el test ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguido de un análisis post-hoc de Bonferroni. Para las comparaciones entre las diferencias en las medias de dos grupos se utilizó el test t de Student de dos colas no pareado. Valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos. En las gráficas de área de mielina, número de neuronas y del puntaje en el BMS cada punto representa la media  $\pm$  el error estándar de la media. En los gráficos de *Box Plot*, la línea horizontal inferior y superior del recuadro representa el primer y tercer cuartil respectivamente, la línea horizontal intermedia representa la mediana y las barras de error representan el valor máximo y mínimo.

**Tabla 4.** Puntajes del 0 al 9 en la escala *Basso Mouse Scale* y las acciones locomotoras a observar en los ratones lesionados para determinar el puntaje del ratón. Tabla adaptada de (Basso *et al.*, 2006).

<b>Puntaje</b>	<b>Acción locomotora</b>
0	Sin movimiento de tobillo
1	Movimiento de tobillo leve
2	Movimiento extensivo del tobillo
3	- Apoyo plantar de la pata con o sin soporte del peso - Pasos dorsales ocasionales o frecuentes sin apoyo de la planta de la pata
4	Pasos plantares ocasionales
5	- Pasos plantares frecuentes o consistentes sin coordinación - Pasos plantares frecuentes o consistentes con poca coordinación y la pata rotada al contacto inicial y al levantar
6	- Pasos plantares frecuentes o consistentes con poca coordinación y la pata paralela al contacto inicial - Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata rotada al contacto inicial y al levantar
7	- Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y rotada al levantar - Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, pero con inestabilidad severa del tronco
8	- Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, con leve inestabilidad del tronco leve - Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, estabilidad del tronco normal pero con la cola abajo o alternando abajo y arriba
9	-Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, estabilidad del tronco normal y la cola siempre arriba

# RESULTADOS

## 1. Caracterización de la expresión espacio-temporal de CD200 y CD200R1 en la médula espinal luego de una lesión por contusión.

### 1.1 Análisis de los tipos celulares que expresan el ligando CD200 en médulas espinales sin lesionar y su variación a diferentes tiempos post-lesión.

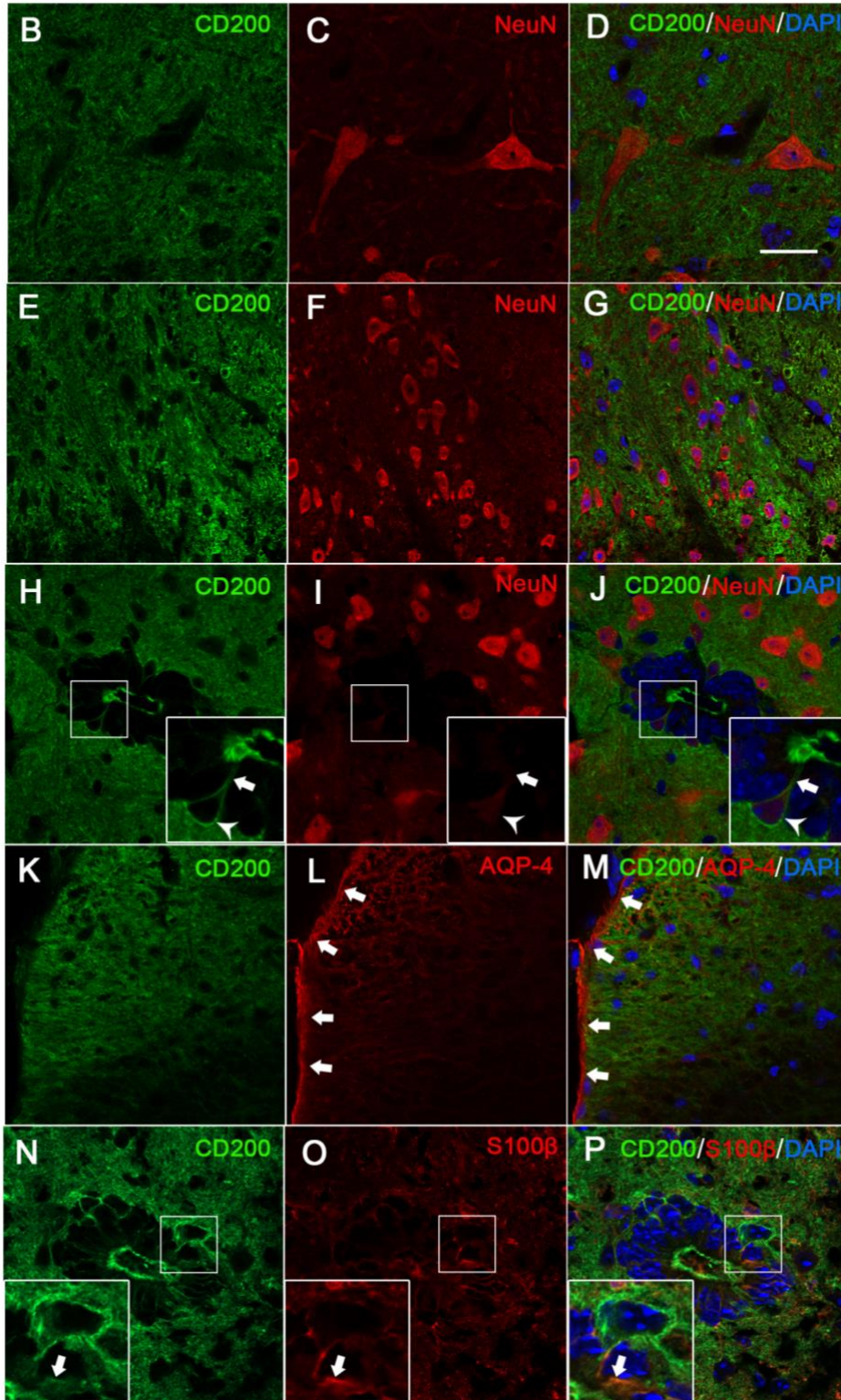
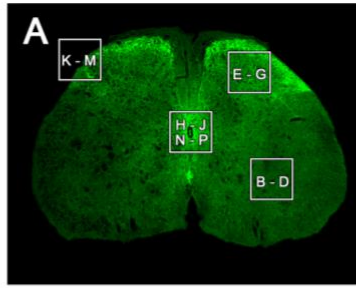
Estudios previos realizados por el laboratorio demostraron por qPCR que el nivel de expresión de CD200 en la médula lesionada disminuye drásticamente a 1 dpl y luego continúa disminuyendo progresivamente hasta los 14 dpl, mientras que a los 28 dpl aumentan los niveles de expresión aunque no llegan a los valores observados en las médulas espinales naïve (sin lesionar). Por lo tanto, se planteó evaluar por inmunofluorescencia si se observa el mismo patrón temporal de expresión de CD200 luego de la lesión y a su vez determinar cuáles son los tipos celulares que lo expresan (Figura 9). Para ello, se evaluó el uso de dos anticuerpos de compañías diferentes (Serotec y R&D) que reconocen a CD200. Ambos anticuerpos presentaron un patrón de marcaje muy similar pero dado que el anticuerpo de Serotec permitió generar una señal más intensa en diluciones más altas, todos los análisis posteriores fueron realizados con el anticuerpo de esa marca. Junto con este anticuerpo anti-CD200 se utilizaron diferentes anticuerpos para la marcación de neuronas y astrocitos, ya que como fue mencionado en la introducción, se ha reportado expresión de CD200 en estos tipos celulares. De esta manera se buscó determinar si colocalizan estos marcajes para evaluar si estos tipos celulares expresa CD200 en la médula espinal. En la Figura 9A se representa un esquema de un corte transversal de médula espinal y se marca con recuadros las diferentes regiones sobre las cuales se realizaron mayor aumento en las siguientes imágenes de inmunofluorescencia. Para evaluar si es expresado por las neuronas se utilizó el marcador NeuN, que es ampliamente utilizado para evidenciar el soma de neuronas de diferentes morfologías y tamaños, aunque no pone en evidencia las diferentes prolongaciones neuronales (Mullen *et al.*, 1992; Wolf *et al.*, 1996). En la Figura 9B-G se puede observar que el marcaje con NeuN evidencia claramente los somas neuronales muy variados. En el asta ventral (Figura 9B-D) se pueden observar los grandes cuerpos de motoneuronas, mientras que en el asta dorsal (Figura 9E-G) los somas neuronales son de menor tamaño. El marcaje con CD200 se observa con mayor intensidad en los espacios entre los cuerpos neuronales, en lo que se denomina el neuropilo, que corresponde a un complejo entramado de distintas prolongaciones neuronales y gliales, mientras que en estas microfotografías se destaca la falta de colocalización entre los somas neuronales y CD200. Esto corresponde con estudios previos que describen este mismo patrón en la sustancia gris de la médula espinal, que puede deberse a que CD200 es una proteína de superficie celular y el neuropilo contiene



abundantes prolongaciones celulares formadas por membrana celular.

En la Figura 9H-J se destaca en el canal central una región fuertemente inmunoreactiva para CD200 en contacto con el líquido cefalorraquídeo hacia la luz del canal en toda la circunferencia de la superficie apical. Como se puede apreciar, estas prolongaciones (marcadas con flechas) provienen de células que se marcan con NeuN por lo que corresponden a neuronas, aunque el marcaje con NeuN parece ser más débil que otros tipos de neuronas presentes en la imagen (Figura 9I). El soma de estas neuronas parece tener una marca más intensa de CD200 (señalado con punta de flecha) comparado con los somas de las otras neuronas que parecen no mostrar una marca de CD200 en el soma. Como se discutirá más adelante, estas neuronas que emiten prolongaciones que atraviesan la capa de endotelios y que contactan al líquido cefalorraquídeo.

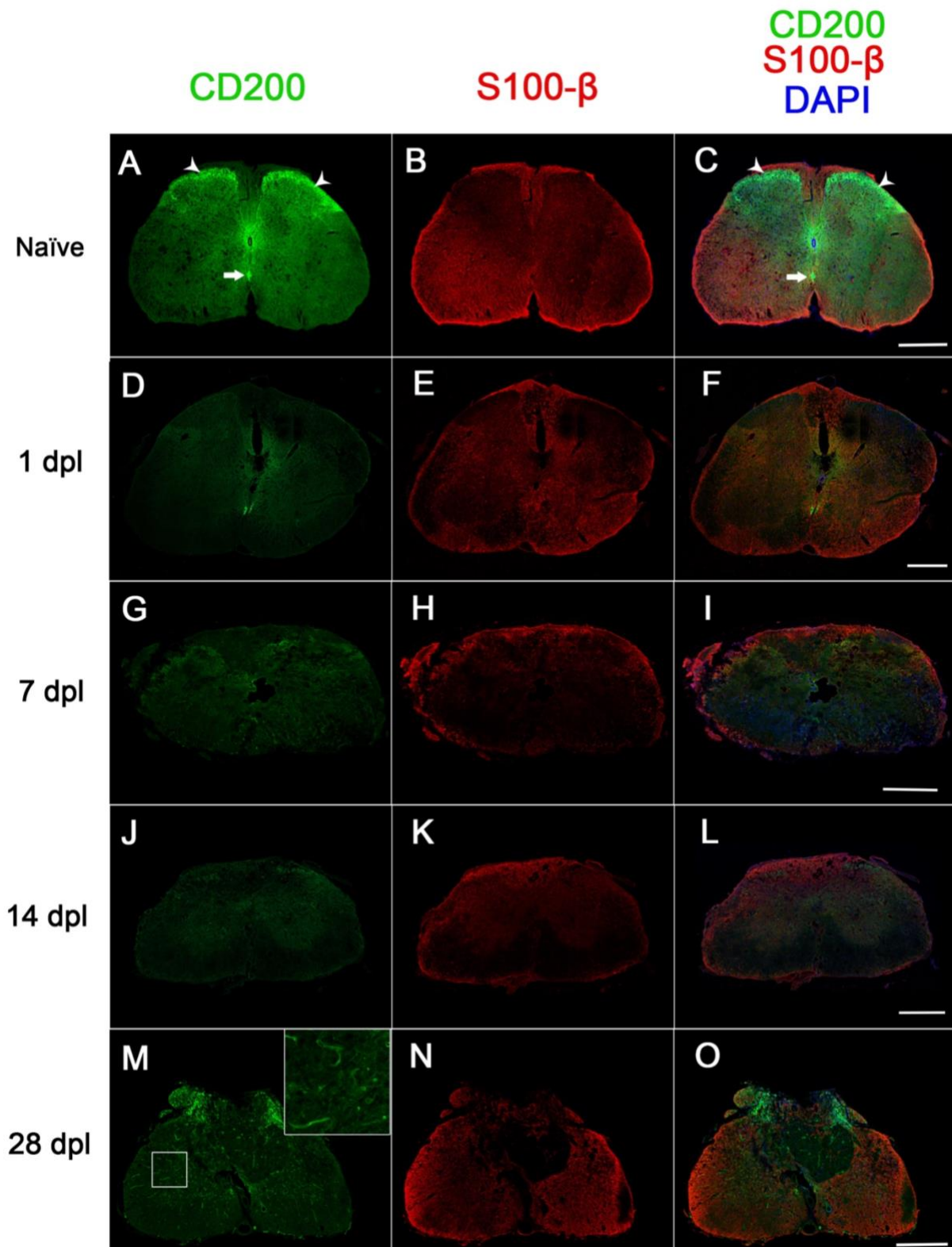
Luego se planteó evaluar si los astrocitos muestran un marcaje positivo para CD200, por lo que utilizamos un anticuerpo que reconoce a la acuaporina-4 (AQP-4), la cual se encuentra en la superficie celular de algunos procesos astrocitarios, principalmente los que contactan con los vasos sanguíneos (Nesic *et al.*, 2010; Hubbard *et al.*, 2015; Gleiser *et al.*, 2016). Se decidió utilizar este marcador para evaluar la expresión de CD200 en astrocitos por dos razones: en primer lugar, debido a que CD200 y AQP-4 son proteínas de superficie celular, por lo que de co-expresarse en el mismo tipo celular podrían mostrar un co-marcaje preciso. En segundo lugar, debido a que se ha demostrado que CD200 es expresado por células endoteliales (Wright *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2017), en vista de la estrecha relación que tiene AQP-4 con los vasos sanguíneos, podría ser probable que los procesos astrocitarios próximos a los vasos sanguíneos que expresan AQP-4 también expresen CD200. El marcaje de AQP-4 que se obtuvo en el tejido de médula espinal es el típico de los procesos astrocitarios y se observa con mayor intensidad en la zona que se encuentra inmediatamente por debajo de la piamadre (Figura 9L), en lo que se conoce como *glia limitans*, que consiste en una compleja red de procesos astrocitarios que limitan con las meninges, en particular con la piamadre. Como se puede observar en la Figura 9K-M, CD200 no presenta una colocalización clara con AQP-4 y el patrón de marcación es diferente, ya que por debajo de la piamadre no presenta mayor intensidad de marcaje.



**Figura 9.** Inmunofluorescencia de médulas espinales de ratones naïve marcadas para CD200 (en verde) y otros marcadores de neuronas y astrocitos para evaluar los tipos celulares que expresan CD200 en la médula espinal en condiciones normales (sin lesión). **A:** esquema representativo de una sección de médula espinal en donde se marcaron con recuadros las regiones correspondientes a donde se tomaron las diferentes imágenes de inmunofluorescencia de esta figura. **B-D:** asta ventral de la sustancia gris con marcaje de NeuN (en rojo). Se observan inmunoreactividad de CD200 en el neuropilo, mientras que los grandes somas de las motoneuronas no presentan marcaje de CD200. **E-G:** asta dorsal de la sustancia gris marcada con NeuN (en rojo). También se observa una clara inmunoreactividad del neuropilo, mientras que los somas más pequeños característicos de esta región de la sustancia gris no presentan marcación de CD200. **H-J:** en la región que rodea al epéndimo se observa una fuerte inmunoreactividad para CD200 en el neuropilo y en algunas prolongaciones que se originan en neuronas que proyectan hacia el interior del canal central y contactan al líquido cefalorraquídeo. En el inserto se destaca la presencia de una de estas neuronas que expresan NeuN en menor medida que las otras neuronas de la imagen. Las flechas señalan la prolongaciones de estas neuronas que atraviesan la capa de endimocitos mientras que las puntas de flecha señalan el soma que se marca más intensamente con CD200. **K-M:** las prolongaciones de astrocitos inmunoreactivas para aquaporina-4 (AQP-4, en rojo) son más prominentes en el límite del parénquima medular con la piamadre, en una estructura que se denomina *glía limitans*, formada principalmente por procesos astrocitarios. Estas prolongaciones celulares parecen no presentar inmunoreactividad para CD200. **N-P:** algunas de las prolongaciones que atraviesan la capa de endimocitos y contactan al líquido cefalorraquídeo son positivas para el marcador de astrocitos S100- $\beta$  (en rojo, señaladas con punta de flecha), aunque se pueden apreciar en el inserto otras prolongaciones que se originan de cuerpos celulares que son negativos para S100- $\beta$  pero positivas para CD200, que corresponden a las neuronas que contactan al líquido cefalorraquídeo mencionadas previamente. Barra de calibración en C: 30  $\mu$ m (misma escala en todas las imágenes).

Dado que AQP-4 es expresado únicamente en algunos procesos astrocitarios específicos, se decidió utilizar otro marcador de astrocitos más amplio que permita reconocer una mayor proporción de los astrocitos. Por lo tanto, se utilizó un anticuerpo que reconoce S100- $\beta$ , una proteína citoplasmática expresada por casi todos los tipos de astrocitos. Como se puede apreciar en la Figura 9N-P, hay cierta colocalización entre CD200 y S100- $\beta$ , aunque no todo el marcaje con CD200 se corresponde con un marcaje de S100- $\beta$ , lo que evidencia que los astrocitos expresan CD200 aunque no son el único tipo celular que lo hace. En la Figura 9N-P se muestra el epéndimo de la médula espinal naïve, donde se puede apreciar que en el neuropilo que rodea al canal central presenta una inmunoreactividad marcada para CD200 al igual que otras zonas de la sustancia gris de la médula espinal. Se pueden reconocer las prolongaciones que contactan al líquido cefalorraquídeo mencionadas previamente. Interesantemente, algunas de estas prolongaciones parecen ser positivas para S100 $\beta$  (marcada con flechas) aunque expresan CD200 en menor medida que las prolongaciones de las neuronas que contactan al líquido cefalorraquídeo. Adicionalmente, se observa que la región que contacta la luz del canal central que se marca intensamente para CD200 no presenta marca de S100 $\beta$ , por lo que estas prolongaciones probablemente se correspondan con las prolongaciones de las neuronas que contactan al líquido cefalorraquídeo. Apoyando esta idea se encuentra el hecho que en nuestro grupo de trabajo se evidenció que estas prolongaciones no se marcan para lectina de tomate, que marca a las células endimarias (Lago *et al.*, 2018).

En una segunda instancia, se planteó evaluar si luego de una lesión medular cambia el patrón de expresión de CD200, considerando si cambian los tipos celulares que lo expresan y a su vez determinando si la expresión de esta proteína aumenta o disminuye a diferentes días luego de la lesión. Para ello se lesionaron ratones y se perfundieron a diferentes tiempos de la lesión (1, 7, 14 y 28 dpl). Para evidenciar los cambios de expresión de CD200 a diferentes tiempos post-lesión, se utilizaron secciones transversales de los tejidos de médula espinal y se realizó una inmunofluorescencia utilizando anticuerpos que reconocen CD200 en conjunto con los que reconocen S100 $\beta$ . En la Figura 10A se puede observar una fuerte inmunoreactividad general del tejido para CD200, con un marcaje más intenso en las láminas I y II de la sustancia gris (puntas de flecha), así como también la región que rodea el canal central. A su vez, una pequeña región de la sustancia blanca a ambos lados del surco anterior (señalada con la flecha en la Figura 10A) presenta un marcaje más intenso de CD200. A 1 dpl se puede observar un claro descenso en la inmunoreactividad de CD200 en el epicentro de la lesión en todo el tejido de la médula espinal lesionada (Figura 10D-F). Las láminas I y II de la sustancia gris son las que presentan la mayor disminución de la intensidad del marcaje, mientras que la región que rodea el canal central y la región de sustancia blanca adyacente al surco anterior mantienen una inmunoreactividad más intensa que el resto del tejido medular. A 7 dpl (Figura 10G-I) se puede observar que la expresión de CD200 permanece en bajos niveles y se destaca la desorganización general del tejido medular, generado por la propagación del daño secundario. Debido a esta pérdida de organización tisular, no se observan regiones con una mayor inmunoreactividad de CD200. A 14 dpl (Figura 10J-L), la intensidad del marcaje de CD200 se mantiene en bajos niveles en el tejido, en el que se pueden comenzar a dilucidar las estructuras de las sustancia gris y blanca, evidenciando una reorganización del tejido hacia un estado similar al que se observa en condiciones normales. Se puede apreciar que las láminas I y II de la sustancia gris presentan una tinción levemente más intensa que el resto del parénquima. La región dorsal de la médula espinal muestra una mayor inmunoreactividad de S100- $\beta$ , evidenciando que a 28 dpl (Figura 10M-O), se destaca la presencia de una cavidad a nivel dorsal que indica la pérdida de tejido a causa de la progresión del daño secundario. A pesar que la intensidad de marcaje para CD200 es baja, se puede apreciar un aumento progresivo de la expresión a partir del descenso a 1 dpl. A su vez, se puede observar una región levemente más inmunoreactiva para CD200 en la región que corresponde a las láminas I y II de la sustancia gris, indicando una tendencia a volver al marcaje observado en la médula espinal naïve. En el inserto a mayor aumento de la Figura 10 se pueden observar estructuras cilíndricas seccionadas transversal y longitudinalmente que tienen el aspecto de vasos sanguíneos y se marcan fuertemente para CD200 y no se observaban a tiempos post-lesión previos, como fue descrito por otros autores recientemente (Cohen *et al.*, 2017).



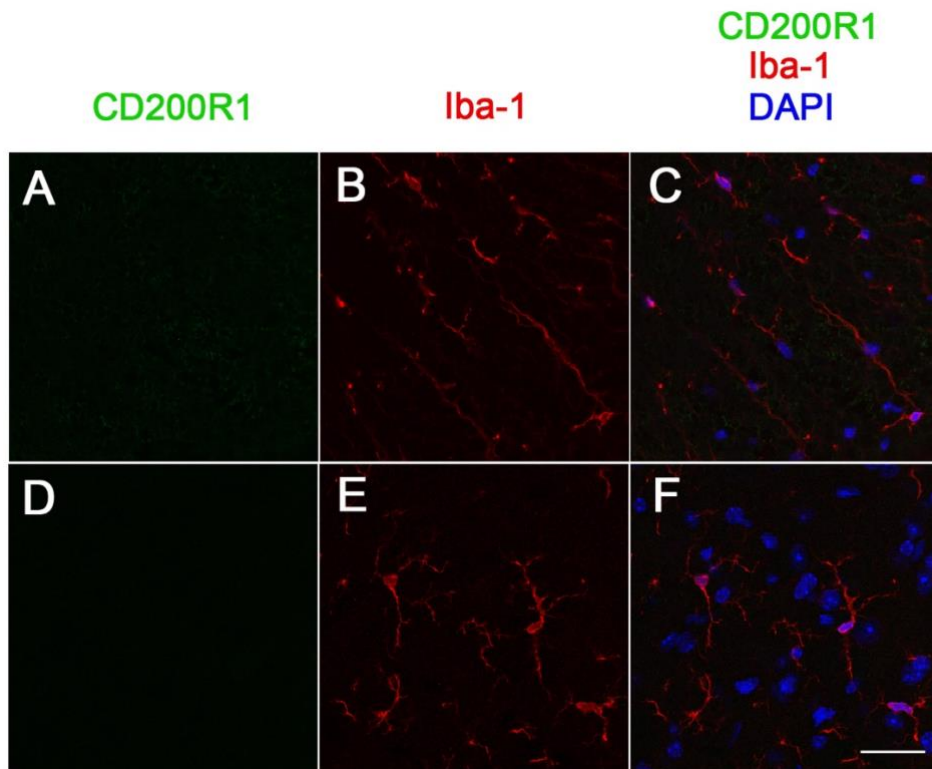
**Figura 10.** Inmunofluorescencia de médula espinal naïve y a 1, 7, 14 y 28 dpl para evidenciar cambios de expresión de CD200 (en verde) y la colocalización con S100- $\beta$  (en rojo). **A-C:** se puede observar un intenso marcaje de CD200 en la médula espinal naïve en el neuropilo que es más prominente en las láminas I y II de la sustancia gris (señaladas con puntas de flecha), así como también alrededor del canal central y en una región de la sustancia blanca a ambos lados del surco anterior (señaladas con flechas). **D-F:** se observa en el epicentro de la lesión una leve desorganización tisular y una abrupta disminución en la inmunoreactividad general de CD200 en el tejido, indicando una rápida disminución de la expresión de esta proteína a 1 dpl. Las láminas I y II y la

(continuación leyenda Figura 10):

región que rodea al canal central ya no se marcan intensamente para CD200, mientras que la región en la sustancia blanca que rodea al surco anterior permanece con una intensa marca para CD200. **G-I:** la organización del tejido de la médula en sustancia se perdió a los 7 dpl en el epicentro de la lesión y la inmunoreactividad de CD200 disminuyó aún más que a 1 dpl. No se observan regiones con un marcaje más intenso de CD200. **J-L:** a 14 dpl se puede comenzar a evidenciar nuevamente la organización del tejido de la médula espinal en el epicentro de la lesión y la marca de CD200 muestra valores similares a los observados a 7 dpl aunque se puede evidenciar un leve incremento en la marca de CD200 en las láminas I y II de la sustancia gris. **M-O:** a 28 dpl se observa una cavidad dorsal en la región donde se realizó la lesión formada por tejido desorganizado. La marca de CD200 es levemente más intensa, siendo más fuerte en las láminas I y II. En el inserto a mayor aumento se evidencian estructuras positivas para CD200 que tienen forma cilíndrica y tienen aspecto de vasos sanguíneos. La barra de calibración en cada fila de imágenes es de 300  $\mu\text{m}$ .

## 1.2 Análisis de los tipos celulares que expresan el receptor CD200R1 en médulas espinales sin lesionar y su variación a diferentes tiempos post-lesión.

En una segunda instancia, se planteó evaluar el patrón de expresión espacio-temporal del receptor CD200R1 en la médula espinal naïve, y si su expresión cambia luego de la lesión medular. Al igual que CD200, el análisis de los tipos celulares que expresan CD200R1 se realizó por inmunofluorescencia. Debido a que un gran número de estudios previos ya han descrito que las células que expresan CD200R1 corresponden a la microglía y células de la línea mieloide, se determinó utilizar un marcador para reconocer y analizar cuál de estos tipos celulares expresan esta proteína. El marcador más utilizado para evidenciar la microglía por inmunofluorescencia es una proteína de unión a calcio denominada Iba-1, la cual ha sido demostrada que se expresa específicamente en microglía y células de la línea monocítica. En condiciones normales, las únicas células del sistema inmune que se encuentran en el SNC y expresan Iba-1 son la microglía y los macrófagos perivasculares que se encuentran en muy escaso número, por lo que en médulas naïve permite marcar la microglía principalmente (Ito *et al.*, 1998). Como se observa en la Figura 11, utilizando un anticuerpo anti-Iba-1 en tejido de médula espinal naïve, se pueden observar células positivas para este marcador que presentan la morfología típica de la microglía en condiciones de homeostasis, que consiste en un soma pequeño elipsoide, con pocas prolongaciones tortuosas y muy ramificadas que se extienden por poca distancia. En cuanto al receptor CD200R1, no se pudo observar marcaje en el parénquima de la médula espinal naïve (Figura 11A y D). A pesar de que se probaron dos anticuerpos anti-CD200R1 de compañías diferentes (Serotec y R&D) previamente caracterizados y a diferentes concentraciones, no se logró obtener un marcaje inclusive utilizando el anticuerpo muy concentrado.



**Figura 11.** Inmunofluorescencia de médula espinal naïve para evidenciar CD200R1 (en verde) e Iba-1 (en rojo). **A-C:** sección transversal de sustancia blanca de la médula espinal en la que se observan células positivas para Iba-1 con la morfología típica de microglía en estado homeostático, es decir un soma pequeño redondeado con pocas prolongaciones finas y muy ramificadas. No se obtuvo señal correspondiente al marcaje de CD200R1. **D-F:** sección transversal de sustancia gris de la médula espinal naïve en la que se observan células Iba-1 positivas con la misma morfología que en A-C. Tampoco se pudo obtener señal del marcaje correspondiente a CD200R1 en esta sección. La barra de calibración para todas las imágenes corresponde a 30  $\mu$ m.

Previamente fue demostrado por el grupo de investigación por qPCR que el nivel de expresión de CD200R1 en médula espinal naïve es muy bajo y aumenta progresivamente a partir de 1 dpl hasta alcanzar un máximo a 7 dpl y luego disminuir hacia el día 28 post-lesión (Lago *et al.*, 2018). Por lo tanto, se planteó analizar si se observa el mismo patrón de expresión temporal de CD200R1 por inmunofluorescencia y determinar cuáles son los tipos celulares que lo expresan a diferentes tiempos post-lesión. Como ya fue mencionado en la introducción, luego de la lesión la integridad de la barrera hematoencefálica se ve alterada y se da el ingreso de varios tipos celulares del sistema inmune desde la circulación sanguínea hacia el parénquima medular. Los principales tipos celulares que infiltran el tejido lesionado son los macrófagos y los neutrófilos, ambos pertenecientes a la línea celular mieloide, y como se ha planteado previamente que las células mieloides expresan CD200R1, se esperaría encontrar células positivas para este receptor luego de la lesión en el parénquima de la médula espinal. Previamente, ya ha sido demostrado que a 1 dpl se observa un pico máximo en el número de neutrófilos en el tejido lesionado, mientras que a 7 dpl es el pico en el número de macrófagos (Donnelly & Popovich, 2008). Como se observa en la Figura 12A-C, que corresponde a una sección

transversal de médula espinal en el epicentro de la lesión a 1 dpl, se evidencia la presencia de células relativamente pequeñas y redondeadas que presentan una fuerte inmunoreactividad con el anticuerpo anti-CD200R1 y que no se marcan con el anticuerpo anti-Iba-1 (señaladas con flechas), por lo que no corresponden a células de la línea monocítica ni a células microgliales. En el inserto de la Figura 12C, se observa que el núcleo de estas células positivas para CD200R1 pero negativas para Iba-1 es irregular y con varios lóbulos, lo que indica que corresponde a un tipo celular de la línea granulocítica, muy probablemente correspondiendo a un neutrófilo, ya que son las principales células infiltrantes a 1 dpl. Como se mencionó previamente, el anticuerpo anti-Iba-1 marca tanto macrófagos como microglía y luego de la lesión se pueden encontrar ambos tipos celulares en el parénquima medular, a diferencia de la médula espinal naïve en la cual no se encuentran macrófagos. Luego de la lesión, la microglía cambia de fenotipo hacia uno más reactivo, cambiando su morfología típica del estado homeostático con prolongaciones altamente ramificadas hacia una forma más redondeada y sin prolongaciones, que se asemeja a la de los macrófagos. Dado que Iba-1 es expresado por macrófagos y microglía, resulta imposible discriminar entre ambos tipos celulares por inmunofluorescencia luego de la lesión ya que la microglía reactiva adopta una morfología muy similar a la de los macrófagos que ingresan desde la periferia. Por lo tanto a partir de ahora, las células positivas para Iba-1 luego de la lesión en el tejido medular van a ser denominadas macrófagos/microglía. En la Figura 12A-C también se puede observar una célula positiva para Iba-1 pero negativa para CD200R1 (señalada con punta de flecha), que corresponde a alguno de estos dos tipos celulares.

A 7 dpl (Figura 12D-F), en el epicentro de la lesión se puede apreciar que hay un abundante número de células grandes redondeadas que se marcan positivamente para Iba-1 (Figura 12E), que está en concordancia con el hecho de que a 7 dpl es cuando se da el pico máximo en el número de macrófagos en el parénquima medular. Se puede observar que la inmunoreactividad del anti-CD200R1 aumenta considerablemente en el tejido comparado con los animales naïve y a 1dpl (Figura 12D). Todas las células que se marcan positivamente para CD200R1 tienen aspecto de macrófago/microglía, es decir el aspecto globoso o redondeado y de gran tamaño sin prolongaciones evidentes. Todas las células que son positivas para CD200R1 a este tiempo también lo son para Iba-1, indicando que los macrófagos/microglía son el tipo celular predominante que expresa el receptor a 7dpl. Se puede observar que una célula en particular (señalada con la flecha), se marca fuertemente con CD200R1 y parece no presentar inmunoreactividad para Iba-1, aunque si se observa con mayor detalle en la Figura 12E, se puede apreciar que aunque la intensidad del marcaje es muy baja, también presenta inmunoreactividad para Iba-1, y que junto con su morfología, indicaría que también es una célula del

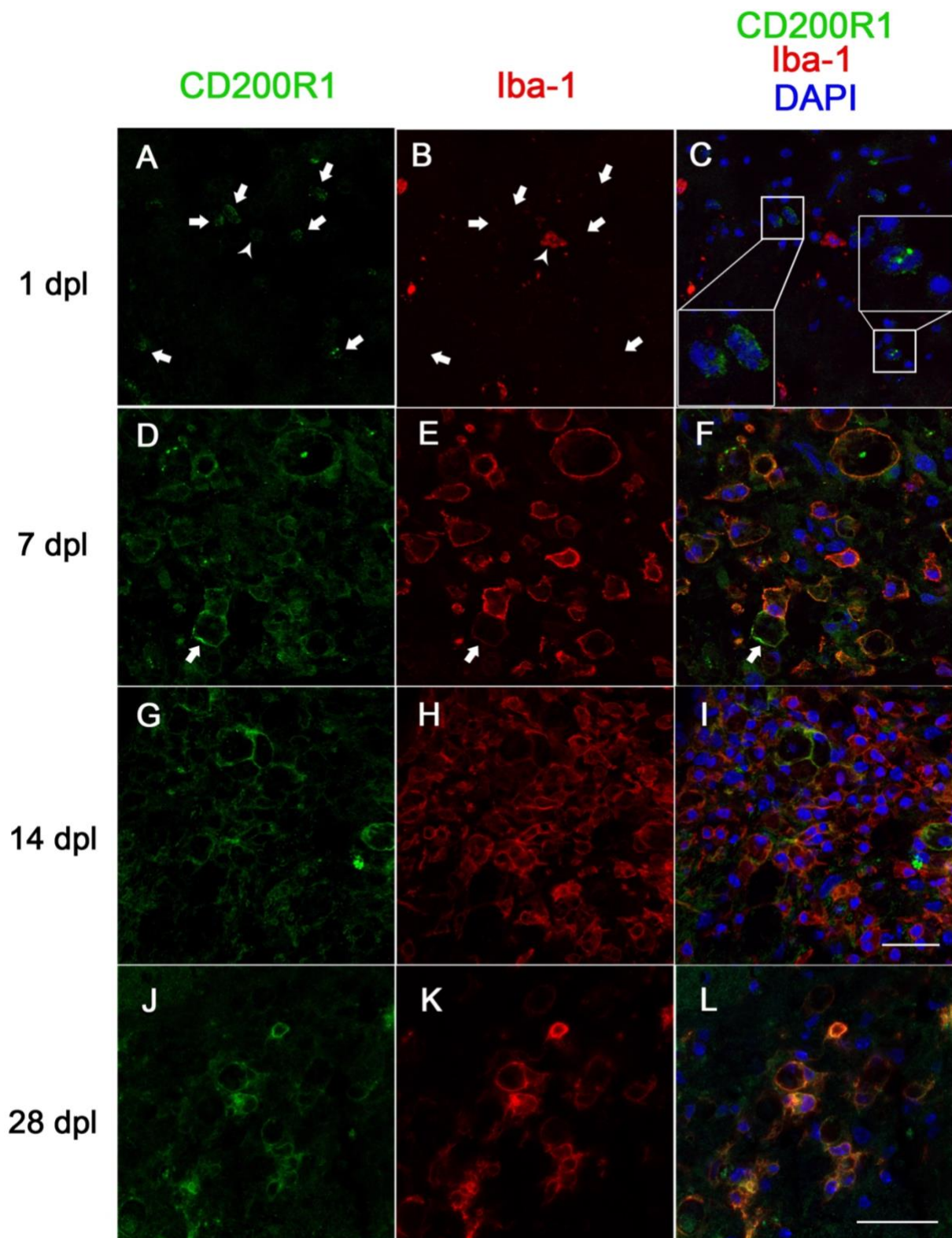


tipo macrófago/microglía. En esta sección del epicentro de la lesión, también se puede apreciar que todas las células que se marcan para Iba-1 (macrófago y microglía) presentan inmunoreactividad para CD200R1 aunque a diferentes intensidades de marcación.

A 14 dpl (Figura 12G-I), se puede apreciar que en el epicentro de la lesión hay un gran número de células que son positivas para Iba-1 y tienen el típico aspecto de macrófago/microglía. También se puede apreciar que a pesar de que hay algunas células que son fuertemente marcadas con anti-CD200R1, hay algunas células Iba-1 positivas cuya inmunoreactividad para CD200R1 no es tan evidente. Esto sugiere que a este tiempo post-lesión cambia el nivel de expresión de este receptor aunque permanece un alto nivel de macrófago/microglía en el parénquima medular.

A 28 dpl (Figura 12M-O) se puede observar que en el epicentro de la lesión todavía se evidencian células Iba-1 positivas con la morfología del tipo macrófago/microglía, es decir de aspecto redondeado y de cuerpo grande y sin prolongaciones evidentes. A su vez se puede apreciar que la inmunoreactividad general del tejido para CD200R1 disminuye considerablemente aunque todas las células Iba-1 positivas parecen también marcarse para CD200R1.

Dado que no se logró detectar por inmunofluorescencia la presencia de CD200R1 en el tejido medular sin lesionar, se decidió determinar cuáles son los tipos celulares que lo expresan por otra metodología. Se ha observado con otros inmunoreceptores como TREM2 que no se puede detectar la presencia por inmunohistoquímica (Jay *et al.*, 2015). Sin embargo, por citometría de flujo se pudo detectar la presencia en diferentes poblaciones en condiciones normales, entre las que se encuentra la microglía. Por lo tanto, se analizó el tejido de médula espinal naïve y a 1 dpl por citometría de flujo, para separar diferentes poblaciones celulares y analizar en cada una de ellas si expresan CD200R1. Dado que en la médula espinal naïve la población de microglía está presente pero no lo están los macrófagos y neutrófilos en un número considerable, se decidió evaluar la expresión de CD200R1 también a 1 dpl por citometría de flujo para evaluar si estos tres tipos celulares expresan el receptor y a su vez detectar si cambia su expresión luego de la lesión.



**Figura 12.** Inmunofluorescencia con marcaje de CD200R1 (en verde) e Iba-1 (en rojo) en médulas espinales a la altura del epicentro de la lesión a diferentes días post-lesión. A-C: a 1 dpl se observan abundantes células positivas para CD200-R1 que son negativas para Iba-1 (señaladas con flechas). En los insertos a mayor aumento se puede apreciar que el núcleo de estas células parece ser complejo y lobulado, por lo que en conjunto con la ausencia de marcaje para Iba-1 estaría indicando que corresponden a granulocitos, más específicamente muy probablemente sean neutrófilos. A su vez hay otras células que son positivas para Iba-1 y negativas para CD200R1 (señalada con la punta de flecha), por lo que pueden ser macrófagos o microglía. D-F: a 7 dpl se puede observar un aumento considerable en el número de células Iba-1 positivas con aspecto redondeado y de mayor

(continuación leyenda Figura 12):

tamaño que corresponden a macrófagos/microglía, debido a que no se puede diferenciar por la morfología y ambos tipos celulares expresan Iba-1. Estas células también son positivas para CD200R1. Señalada con la flecha se encuentra una célula que se marca fuertemente para CD200R1 pero tiene una marca muy baja de Iba-1. **G-I:** a 14 dpl se puede observar un aumento aún mayor en el número de células positivas para Iba-1 que a su vez son positivas para CD200R1. **J-L:** a 28 dpl se evidencia un descenso abrupto en el número de células Iba-1 positivas. Aunque hay escasas células que son inmunoreactivas para Iba-1, todas parecen expresar CD200R1. Barras de calibración de A-I se muestran en la imagen I y corresponde a 30  $\mu\text{m}$ . La barra de calibración de J-L se muestra en la imagen L y corresponde a 30  $\mu\text{m}$ .

Como se muestra en la Figura 13A, la estrategia de selección de poblaciones fue la siguiente: en primer lugar se eligieron las células que son CD45 positivas ( $\text{CD45}^+$ ), que corresponden a leucocitos (macrófagos, granulocitos y linfocitos) y microglía. Una vez que se eligieron únicamente las células únicas que se detectaron aisladas, por medio de la eliminación de eventos dobles o de mayor número, se separó la población de microglía del resto de células mieloides y linfocitos por los marcadores CD11b y CD45. Se ha descrito que la microglía es positiva para CD11b al igual que las células mieloides, pero a diferencia de éstas, presentan una expresión más baja de CD45 que las células mieloides, por lo que la población de microglía se define como  $\text{CD11b}^+$  y  $\text{CD45}^{\text{bajo}}$ , mientras que las células mieloides se definen como  $\text{CD11b}^+$  y  $\text{CD45}^{\text{alto}}$ . La población de linfocitos se separa claramente del resto de la población debido a que son  $\text{CD11b}^-$  y presentan una muy alta señal de CD45. En médulas espinales naïve no se debería encontrar un número tan alto de linfocitos, por lo que esto evidencia que la perfusión no fue del todo correcta y quedó algo de sangre en los tejidos de médula espinal extraídos. Dentro de la población de células mieloides, para separar a los macrófagos de los granulocitos se utiliza el marcador F4/80, ya que se ha demostrado que los macrófagos son  $\text{F4/80}^+$ , mientras que los granulocitos son  $\text{F4/80}^-$ . Dentro de la población de células  $\text{F4/80}^-$ , para diferenciar a los neutrófilos de los otros granulocitos se utiliza el marcador Ly6G, el cual es expresado únicamente por los neutrófilos (Francos-Quijorna *et al.*, 2016; Amo-Aparicio *et al.*, 2018). En el primer recuadro de la Figura 13A y B se puede apreciar que en la médula espinal a 1 dpl hay un número total de células  $\text{CD45}^+$  considerablemente más alto que en la médula espinal naïve que se corresponde con la entrada de células mieloides desde la circulación sanguínea hacia el tejido lesionado. A su vez en el recuadro con el marcaje de CD11b y CD45 se puede observar que la población de células mieloides es casi ausente en la médula espinal naïve, mientras que a 1 dpl el número de células en ese recuadro aumentó considerablemente.

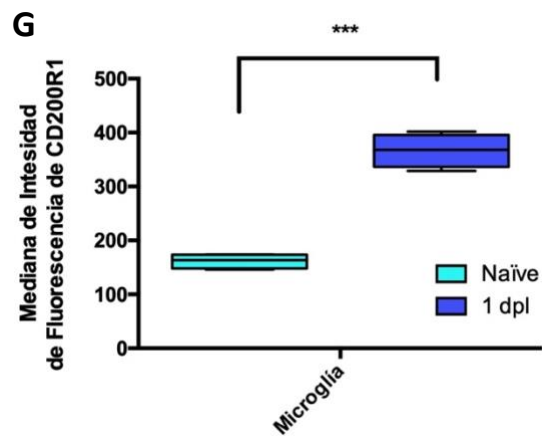
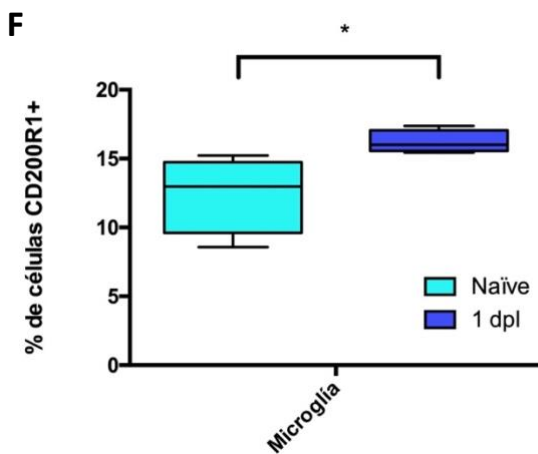
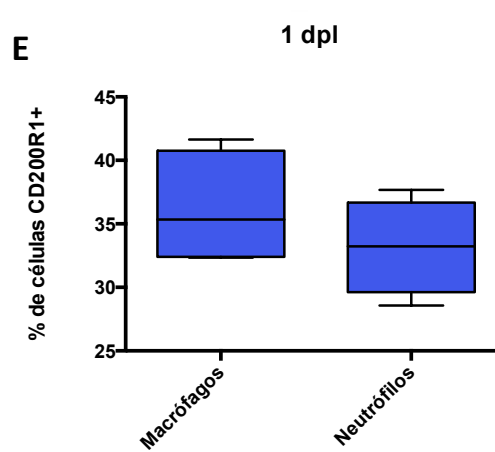
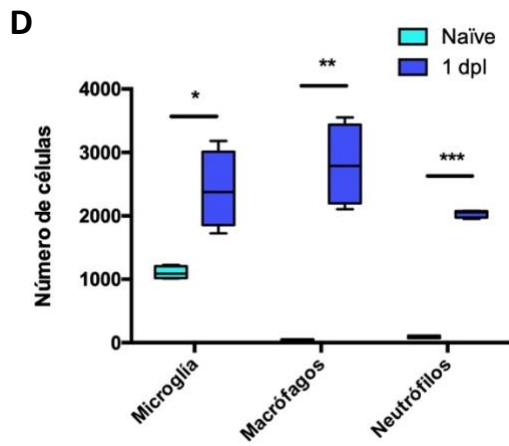
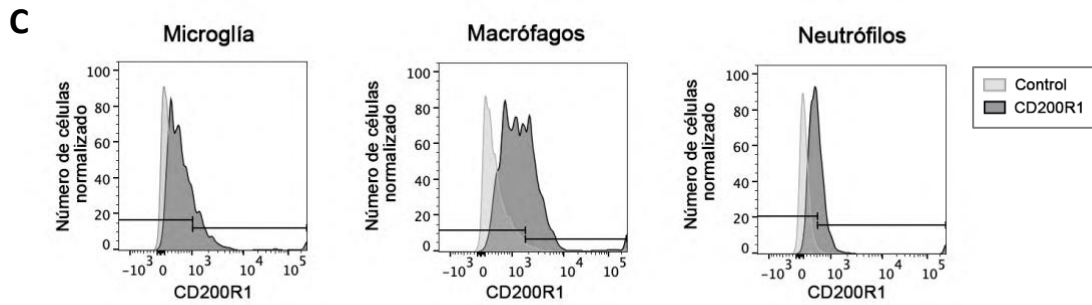
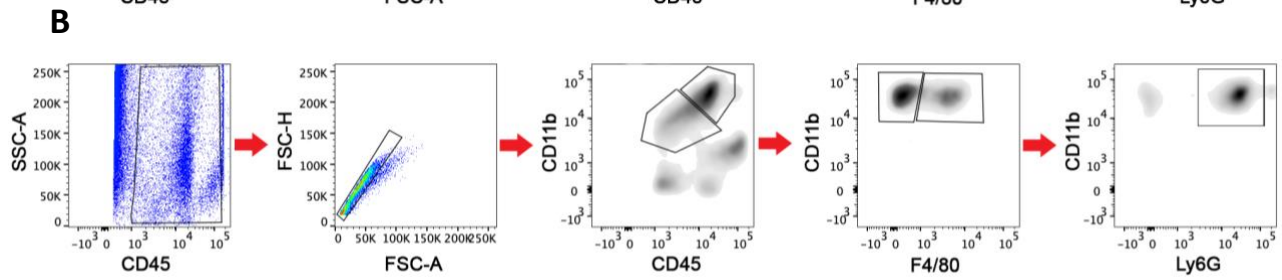
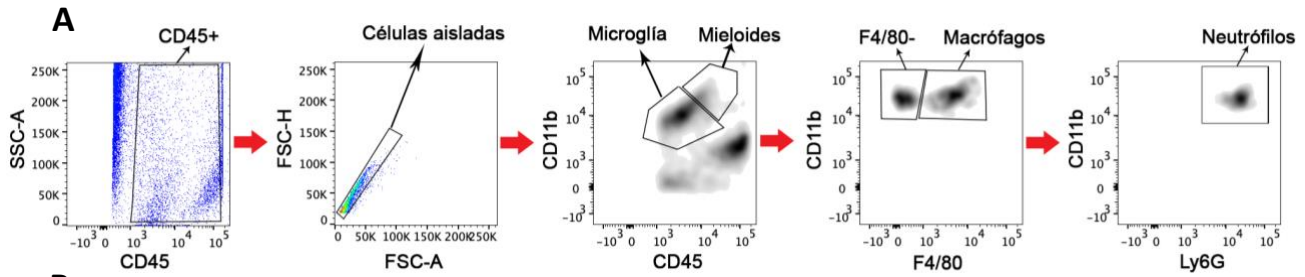
Una vez que tenemos las diferentes poblaciones celulares a analizar correctamente separadas, se procede a analizar el número de células presente en cada población celular en la médula espinal naïve y a 1 dpl. En la Figura 13D se puede observar que en la médula espinal naïve se pudo detectar la

presencia de microglía, mientras que la población de macrófagos y neutrófilos está prácticamente ausente. Por el contrario, luego de 1 dpl se puede apreciar el aumento significativo tanto en la población de microglía (test t de Student,  $p=0.005$ ), macrófagos (test t Student,  $p=0.0001$ ) y de neutrófilos (test t Student,  $p<0.0001$ ).

Para analizar la expresión de CD200R1 en cada una de las poblaciones celulares analizadas, se determinó el límite de fluorescencia a partir del cual se considera a la señal como positiva utilizando un control con la misma muestra sin añadir el anticuerpo primario. De este modo se puede discriminar entre la señal que genera la unión inespecífica del anticuerpo secundario de la señal que genera la marca específica del anticuerpo primario anti-CD200R1 (Figura 13C).

En la Figura 13F se observa la presencia de CD200R1 en un  $12.4\pm 2.8\%$  de la población de microglía en la médula espinal naïve, que aumenta levemente a un  $16.2\pm 0.8\%$  a 1 dpl (test t de Student,  $p=0.04$ ,  $n=4$  en cada grupo experimental). En la Figura 13G también se puede apreciar un aumento significativo (test t de Student,  $p<0.0001$ ,  $n=4$  en cada grupo experimental) en la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD200R1 en la población de microglía a 1 dpl comparado con la médula espinal naïve, lo que indica que las células de esta población aumentan la expresión de este receptor a 1 dpl.

Por otro lado, dado que en la médula espinal naïve las poblaciones de macrófagos y neutrófilos se encuentran prácticamente ausentes, cualquier medida de CD200R1 en un número tan pequeño de eventos no se puede considerar como confiable. Por lo tanto se evaluó la expresión de CD200R1 en estas poblaciones a 1 dpl (Figura 13E) y se pudo detectar la presencia de CD200R1 en ambas poblaciones celulares mieloides, siendo un  $36.2\pm 4.5\%$  de los macrófagos y  $33.2\pm 3.7\%$  de los neutrófilos positivos para CD200R1 a 1 dpl en la médula espinal ( $n=4$ ).



**Figura 13.** Microglía, macrófagos y neutrófilos expresan CD200R1 evidenciado por citometría de flujo de médulas espinales naïve y a 1 dpl. **A y B:** Dot blots representativos de citometría de flujo de médulas espinales naïve (A) y a 1 dpl (B) para demostrar la identificación de las poblaciones de microglía macrófagos y neutrófilos a partir de los marcadores utilizados. **C:** Histogramas representativos de la marca con CD200R1 en la población de microglía macrófagos y neutrófilos, comparando con los controles negativos (en gris claro) para establecer la población positiva para CD200R1 (señalada con la barra horizontal derecha). En los tres ejemplos correspondientes a microglía, macrófagos y neutrófilos a 1 dpl se puede apreciar un corrimiento hacia el lado positivo en la señal correspondiente a la muestra cuando está presente el anticuerpo primario anti-CD200R1 con respecto al control sin éste, lo que indica la presencia de células positivas para CD200R1 en las tres poblaciones celulares analizadas. **D:** los análisis de los tejidos de médula espinal naïve y a 1 dpl por medio de citometría de flujo evidenció que en la médula espinal naïve hay un número muy reducido de macrófagos y neutrófilos, mientras que si está presente la población de microglía. A 1 dpl se observa un aumento significativo en las tres poblaciones celulares. **E:** a 1 dpl se observa que un  $36.2 \pm 4.5\%$  de los macrófagos y  $33.2 \pm 3.7\%$  de los neutrófilos expresan CD200R1. **F:** en la médula espinal sin lesionar un  $12.4 \pm 2.8\%$  de la población de microglía es positiva para CD200R1, mientras que a 1 dpl un  $16.2 \pm 0.8\%$  es positiva para este receptor. **G:** a 1 dpl se observa un aumento significativo en la mediana de la intensidad de fluorescencia de CD200R1 en la población de microglía. En **D-G** se representa en celeste los valores correspondientes a las médulas espinales naïve y en azul a 1 dpl. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , test t de Student,  $n=4$  por grupo experimental.

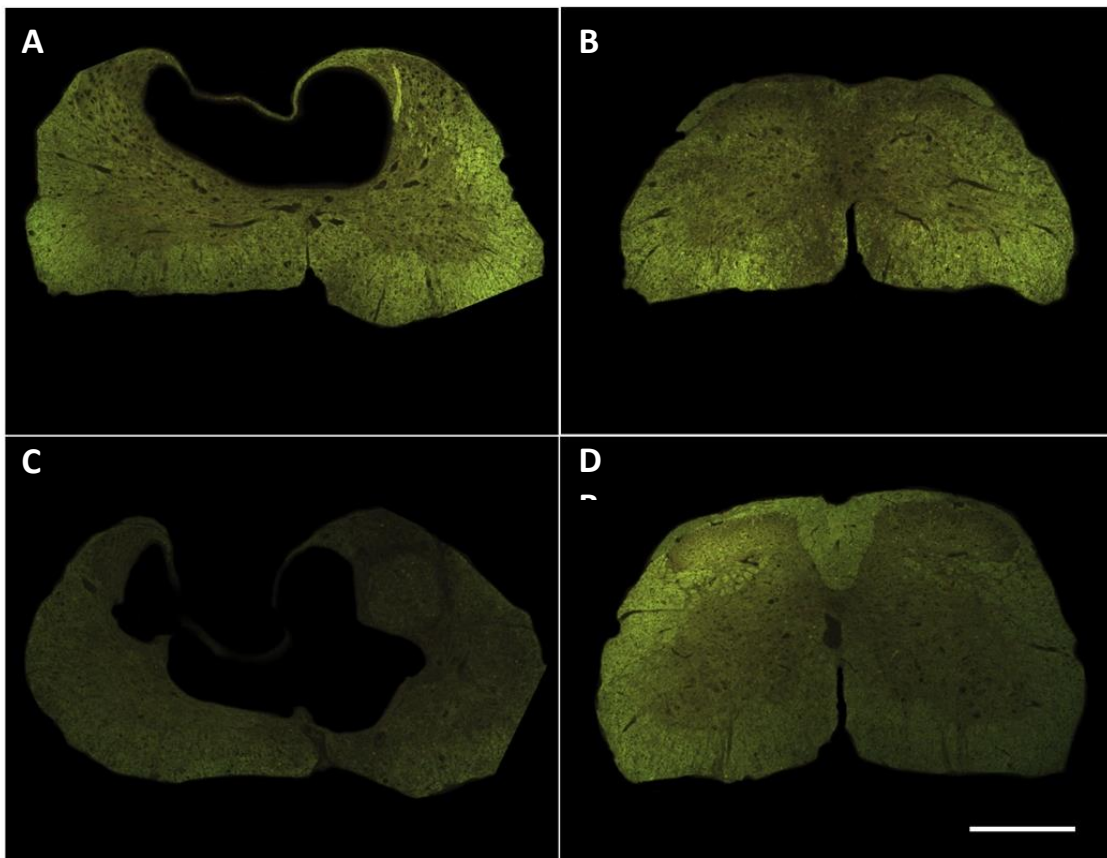
## 2. Evaluación de los efectos de la modulación de la interacción CD200-CD200R1 durante una daño medular traumático mediante la administración dentro del tejido medular de antagonistas o agonistas de CD200R1.

Una vez realizada la caracterización espacio temporal de CD200 y CD200R1 en la médula espinal naïve y a diferentes tiempos post-lesión, se evaluó el efecto de la modulación de la interacción entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1 al momento de la lesión medular. Nuestra hipótesis propone que al modular esta interacción podemos modificar el fenotipo microglial y tal vez el de otras células inflamatorias, y así también modificar el daño secundario generado por la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, se debería ver un efecto en la preservación tisular así como también en diferentes marcadores inflamatorios cuando esta interacción es modulada, lo que impactaría en última instancia en la recuperación funcional luego de la lesión.

### 2.1 Efecto de la administración dentro del parénquima de un anticuerpo bloqueante anti-CD200R1 sobre la pérdida de tejido nervioso.

Con el fin de diseccionar el rol que cumple el receptor CD200R1 en el desarrollo de la patología de la lesión medular, en primer lugar se evaluó el efecto de su bloqueo. Para ello, se realizó el procesamiento histológico de muestras de médulas espinales de ratón, a los cuales al momento de realizar la lesión por contusión, se les administró directamente en el tejido medular en la lesión  $1\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-CD200R1 bien caracterizado que se une al receptor e impide su activación (Akkaya *et al.*, 2013), o un anticuerpo del mismo isotipo IgG1 control que no se une a CD200R1. Una de las formas de evaluar

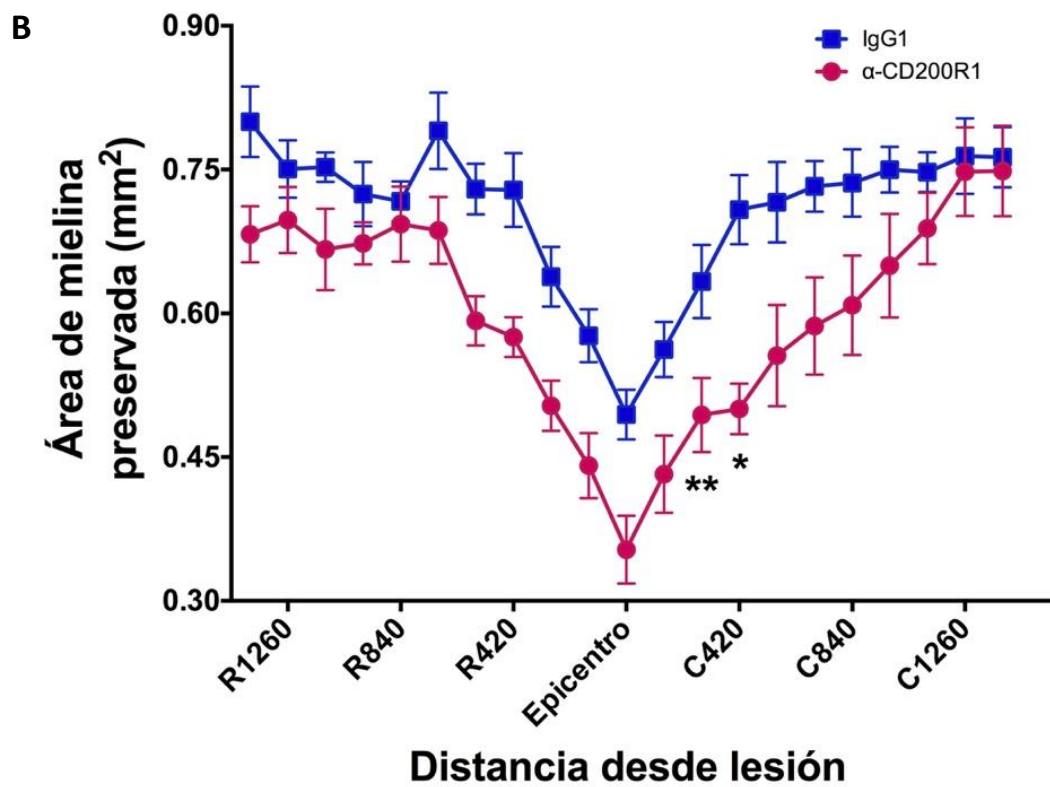
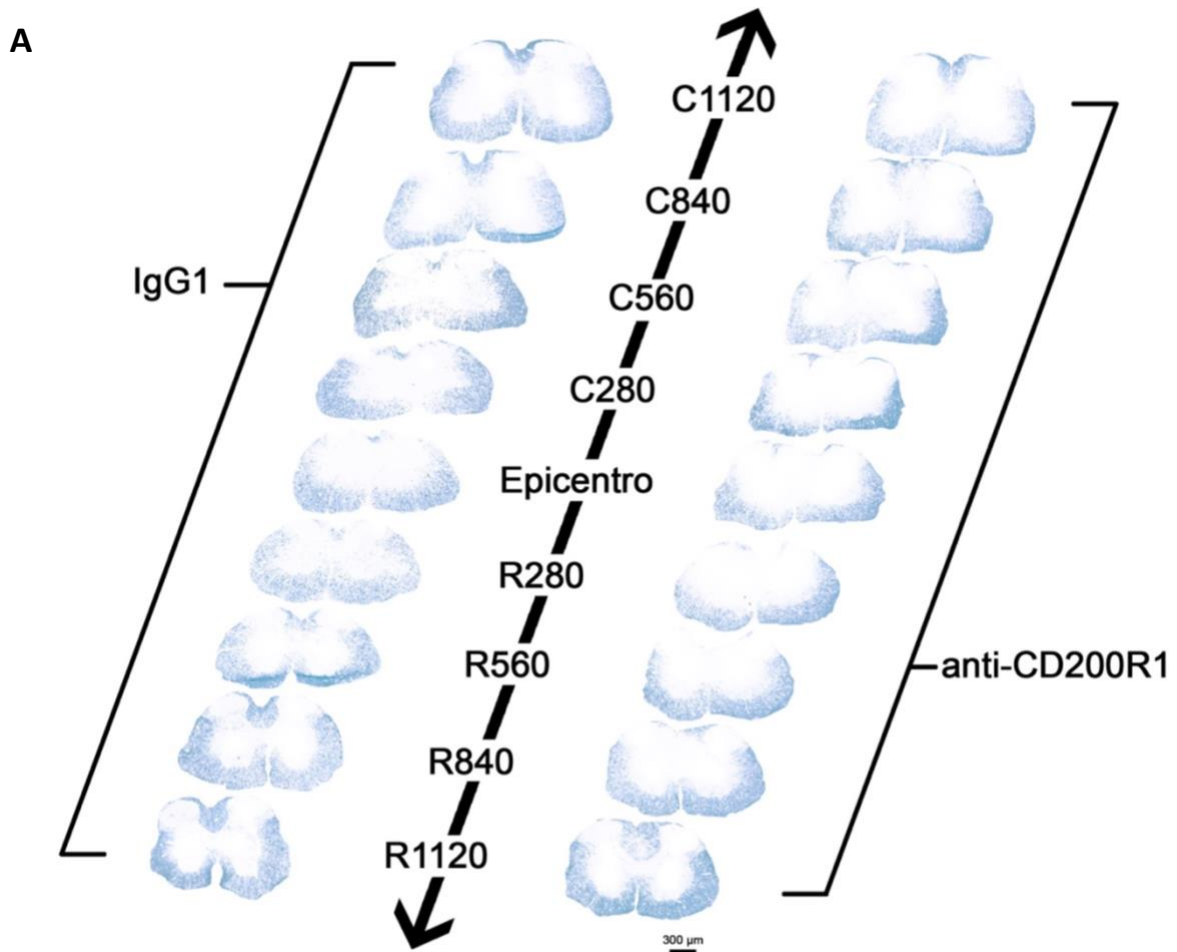
el daño generado por la respuesta inflamatoria en el tejido medular es evaluar la pérdida de mielina luego de la lesión. Por lo tanto, en primer lugar se planteó determinar cuál técnica permite encontrar diferencias confiables en el área de mielina que permanece intacta, lo cual se relaciona inversamente con el área de mielina perdida. En primer lugar se realizaron pruebas con el marcador fluorescente Fluoromyelin que consiste en una tinción para lípidos, por lo que no es específica para mielina, aunque debido a que ésta tiene alto contenido lipídico, el marcador se une preferentemente a ella y se marca con mayor intensidad. Como se observa en la Figura 14A y B, a 28 dpl, la sustancia blanca que contiene una mayor proporción de mielina que la sustancia gris, se tiñe con mayor intensidad que ésta, por lo que la técnica podría permitir cuantificar el área de tejido ocupada por mielina. A pesar de ello, la tinción con esta técnica no mostró ser homogénea en todas las secciones (Figura 14C y D), por lo que no pudimos obtener una cuantificación confiable y comparable entre diferentes secciones.



**Figura 14.** Secciones de médula espinal lesionadas teñidas con Fluoromyelin. A y C: en la lesión se observa el tejido desorganizado con una gran cavidad dorsal. B y D: caudal a la lesión se observa una mayor organización de tejido. En A y B la tinción con Fluoromyelin permite un marcaje homogéneo que permite diferenciar las sustancia blanca de la sustancia gris y realizar una cuantificación confiable del área ocupado por la mielina. C y D: ejemplos de secciones donde la tinción con Fluoromyelin no fue homogénea por lo que no permite realizar una cuantificación del área de mielina comparable entre secciones. Barra de calibración: 600  $\mu$ m.

Luego se evaluó la tinción Luxol Fast Blue, que se basa en un colorante con afinidad por lipoproteínas presentes en la mielina, por lo que presenta una tinción con mayor especificidad que el Fluoromyelin. Utilizando esta tinción se logró diferenciar claramente la sustancia blanca de la sustancia gris y a su vez demostró teñir uniformemente todas las secciones de las diferentes muestras (Figura 15A), por lo que se decidió utilizar esta tinción para cuantificar el área de mielina preservada en las diferentes condiciones experimentales. Las imágenes de microscopía óptica de las secciones de médulas espinales lesionadas fueron procesadas automáticamente con el programa Fiji (Image J) para determinar el área de cada sección que se tiñe positivamente para mielina y determinar así los perfiles de desmielinización rostral y caudalmente al epicentro de la lesión en secciones de médulas espinales a 28 dpl. Ambos tratamientos muestran un perfil similar en cuanto a la pérdida de mielina, ya que presentan un mínimo de área ocupada por mielina en el epicentro de la lesión que aumenta progresivamente tanto rostral como caudalmente (Figura 15). En la Figura 15A se observan dos series representativas de médulas espinales de ratones tratados con anti-CD200R1 y otro con IgG control, en donde se observa la mayor pérdida de mielina en el epicentro de la lesión evidenciada con LFB, que se va haciendo cada vez menor en sentido rostral y caudal. A todos los niveles analizados, se observa una tendencia hacia una mayor pérdida de mielina cuando se administra el anticuerpo bloqueante anti-CD200R1 comparado con el control de isotipo (Figura 15B), aunque se observa una diferencia significativa únicamente a 280 y 420  $\mu\text{m}$  caudalmente al epicentro de la lesión. Estos datos se correlacionaron con una peor recuperación funcional en los animales a los cuales se les administró CD200R1 en experimentos previos realizados por nuestro grupo de investigación (Lago *et al.*, 2018).





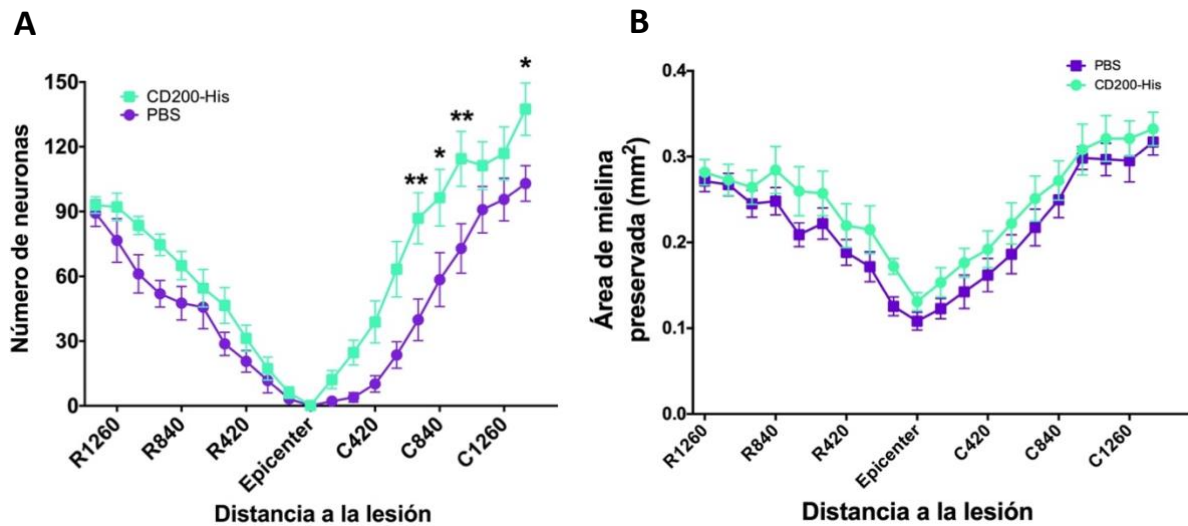
**Figura 15.** La administración del anticuerpo bloqueante anti-CD200R1 en el tejido medular al momento de la lesión promueve una mayor pérdida de mielina. A: series representativas de secciones transversales de médula espinal teñidas con Luxol Fast Blue de ratones a los cuales se les administró dentro del tejido medular al momento de la lesión un anticuerpo bloqueante de CD200R1 o un anticuerpo IgG1 control que no se une al receptor. Se indican las distancias desde el epicentro en sentido rostral (R280-R1120: de 280 a 1120  $\mu\text{m}$  en sentido rostral) y caudal rostral (C280-C1120: de 280 a 1120  $\mu\text{m}$  en sentido caudal). El área de mielina es mínima en el epicentro de la lesión y aumenta progresivamente en ambos sentidos. B: área de mielina preservada medida con LFB en secciones de médula espinal a 28 dpl. El tratamiento con anti-CD200R1 (en rojo) tiende a una mayor pérdida de mielina comparado con el IgG1 control (en azul) en todas las distancias analizadas (ANOVA de dos vías,  $p=0.0007$ ) que es significativa únicamente a los 280 y 420  $\mu\text{m}$  en sentido caudal. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , test post-hoc de Bonferroni,  $n = 7$  por tratamiento.

## 2.2 Análisis de la capacidad neuroprotectora de la activación de CD200R1 mediante la administración dentro del tejido medular de la proteína recombinante CD200-His.

Dado el efecto perjudicial que tiene bloquear al receptor CD200R1 luego de la lesión medular, resulta relevante buscar estrategias para su activación y de ese modo evaluar si activando el receptor se observa un efecto neuroprotector en el tejido nervioso. La capacidad de neuroprotección puede ser evaluada analizando parámetros de preservación tisular, como el área de mielina preservada y el número de neuronas que sobreviven a los 28 días luego de la lesión, cuando el daño secundario ya desencadenó la pérdida de tejido. Al igual que la administración con el anticuerpo bloqueante, al momento de la lesión, los ratones fueron inyectados dentro del tejido medular 1 $\mu\text{L}$  de la proteína recombinante CD200-His o vehículo control (PBS). El conteo del número de neuronas que sobreviven se realizó por inmunofluorescencia de las secciones de médula espinal con anticuerpo anti-NeuN, para luego contar el número de cuerpos neuronales positivos para NeuN y realizar el perfil rostral y caudalmente al epicentro de la lesión. Se observó que tanto los animales administrados con CD200-His como los administrados con vehículo no presentan neuronas vivas en el epicentro de la lesión, mientras que se observa tanto a nivel rostral como caudal una tendencia a un mayor número de neuronas en los animales tratados con CD200-His (ANOVA de dos vías,  $p=0.0078$ ,  $n=7$  por tratamiento). El mayor aumento en la supervivencia neuronal se observa caudalmente donde hay un aumento significativo en el número de neuronas en los animales tratados con CD200-His comparado con los controles (Figura 16A).

Cuando se observa área de mielina preservada teñida con Luxol Fast Blue para evaluar la preservación de ésta, se puede apreciar que presenta el mismo perfil que con la administración de anti-CD200R1, es decir que presenta un mínimo del área de mielina en el epicentro de la lesión que aumenta progresivamente en sentido rostral y caudal (Figura 16B). A pesar de que el tratamiento parece

promover muy levemente una mayor área de mielina preservada a los 28 dpl comparado con el vehículo control, esta diferencia no es significativa (ANOVA de dos vías,  $p=0.146$ ,  $n=7$  por tratamiento). En su conjunto, estas observaciones indican que la administración de CD200-His dentro del tejido medular al momento de la lesión tiene un efecto neuroprotector, al promover una mayor preservación del tejido neural.



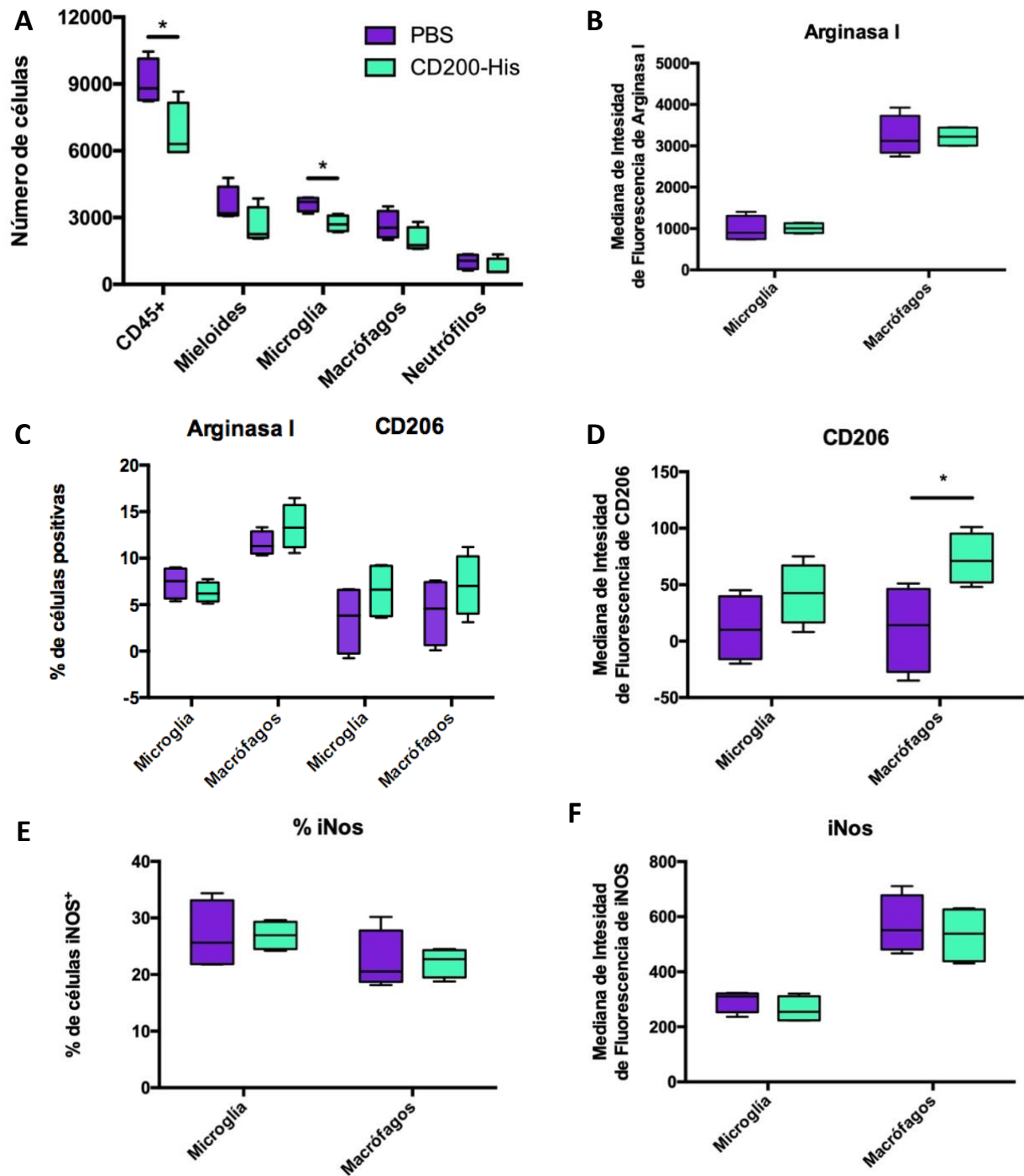
**Figura 16.** La administración de CD200-His dentro del tejido medular al momento de la lesión promueve una mayor preservación tisular. **A:** el tratamiento con CD200-His dentro del tejido medular promueve una mayor preservación de las neuronas a los 28 dpl medido por el número de células positivas en la inmunofluorescencia para NeuN en secciones de médula espinal a diferentes distancias desde el epicentro. Se observa una tendencia al aumento en el número de neuronas tanto a nivel rostral como caudal del epicentro, aunque el aumento es estadísticamente significativo únicamente en cuatro de los puntos analizados caudalmente (ANOVA de dos vías,  $p=0.0078$ , se observaron 4 distancias a las cuales los valores fueron estadísticamente diferentes por el test post-hoc de Bonferroni). **B:** área de mielina preservada a los 28 dpl calculada en secciones de médula espinal teñidas con Luxol Fast Blue a diferentes distancias desde el epicentro de la lesión (140 a 1400  $\mu\text{m}$  desde el epicentro de la lesión), tanto en sentido rostral (R) como caudal (C). A pesar de que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos a ninguno de los tiempos analizados, se puede observar una leve tendencia hacia la mayor preservación de mielina con el tratamiento con CD200-His (ANOVA de dos vías,  $p=0.146$ , no se observaron valores significativo luego del test post-hoc de Bonferroni). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , test post-hoc de Bonferroni,  $n=7$  por tratamiento.

### 2.3 Impacto de la administración de CD200-His dentro del parénquima en diferentes marcadores pro- y anti-inflamatorios luego de la lesión medular.

Con el fin de continuar profundizando en los mecanismos de la modulación de la respuesta inflamatoria por la administración dentro del tejido medular de la proteína recombinante CD200-His se analizaron marcadores inflamatorios por citometría de flujo en médulas espinales a 3 dpl. En primer lugar se analizaron diferentes poblaciones celulares relacionadas a la respuesta inflamatoria, entre las que se encuentran los neutrófilos, macrófagos y microglía. Se llevó a cabo la misma estrategia de

selección de poblaciones que se muestra en la Figura 13A Y B. La administración de CD200-His dentro del tejido medular al momento de la lesión promueve que a los 3 dpl haya un menor número de células de las poblaciones de células del sistema inmune analizadas dentro del tejido de la médula espinal lesionada, comparado con la administración de vehículo control (Figura 17A, n=4 por tratamiento). A pesar de que la única población en la que se observa una reducción significativa en el número de células por el tratamiento con CD200-His es la microglía (test t de Student,  $p=0.010$ ) y las células CD45<sup>+</sup> que corresponden a los leucocitos y la microglía (test t de Student,  $p=0.032$ ), en las otras poblaciones del sistema inmune analizadas se observa una tendencia a la disminución en el número de células por el tratamiento con CD200-His que no es significativa (test t de Student, mieloides:  $p=0.155$ , macrófagos:  $p=0.167$ , neutrófilos:  $p=0.337$ ).

Luego se analizaron diferentes marcadores pro- y anti-inflamatorios en la población de macrófagos y microglía para evaluar si el tratamiento con CD200-His promueve un cambio en el fenotipo de estas poblaciones celulares. A 3 dpl en ambas poblaciones celulares no se observó ninguna diferencia significativa en el número de células positivas para los marcadores anti-inflamatorios (Figura 17C) Arginasa I (test t de Student, microglía:  $p=0.34$ , macrófagos:  $p=0.23$ ) y CD206 (test t de Student, microglía:  $p=0.24$ , macrófagos:  $p=0.29$ ). La mediana de intensidad de fluorescencia para Arginasa I (Figura 17B) tampoco se vio modificada por el tratamiento con CD200-His en ambas poblaciones celulares a 3 dpl (test t de Student, microglía:  $p=0.34$ , macrófagos:  $p=0.23$ ). Sin embargo, se puede observar un aumento significativo en la mediana de la intensidad de fluorescencia del marcador CD206 (Figura 17D) en la población de macrófagos de ratones tratados con CD200-His, lo que indica un aumento de la expresión de este marcador anti-inflamatorio en los macrófagos producido por el tratamiento con CD200-His (test t de Student,  $p=0.032$ ). A pesar de que también se puede observar una tendencia hacia un aumento de la mediana de fluorescencia para el marcador CD206 en la población de microglía de ratones tratados con CD200-His (Figura 17D), este aumento no es estadísticamente significativo (test t de Student,  $p=0.17$ ). Para el caso del marcador pro-inflamatorio iNOS, se puede apreciar que el tratamiento con CD200-His no genera ningún cambio tanto en el número de células positivas para iNOS (Figura 17E, test t de Student, microglía:  $p=0.98$ , macrófagos:  $p=0.96$ ) como para la expresión de este marcador en la población de microglía y macrófagos (Figura 17F, test t de Student, microglía:  $p=0.34$ , macrófagos:  $p=0.64$ ).



**Figura 17.** El tratamiento con CD200-His dentro del tejido medular al momento de la lesión tiende a promover una disminución en los marcadores pro-inflamatorios y a aumentar los anti-inflamatorios evaluados por citometría de flujo en tejidos de médula espinal a 1 dpi. **A:** número de células de diferentes poblaciones celulares del sistema inmune a 1 dpi: células CD45+ (leucocitos y microglía), células mieloides (macrófagos y granulocitos), microglía, macrófagos y neutrófilos. El tratamiento con CD200-His promueve una disminución significativa en el número de células CD45+ y microglía a 1 dpi. A pesar de que en las poblaciones de mieloides, macrófagos y neutrófilos se observa una reducción en el número de células por el tratamiento con CD200-His, esta diferencia no es estadísticamente significativa. **B:** mediana de intensidad de fluorescencia del marcador anti-inflamatorio Arg I en la población de macrófagos a microglía, donde se evidencia que el tratamiento con CD200-His no tiene un efecto en la expresión de este marcador en estas poblaciones células a 1 dpi. **C:** porcentaje de células positivas

(continuación leyenda Figura 17):

para los marcadores anti-inflamatorios Arg I y CD206 en la población de microglía y macrófagos a 1 dpl. Al igual que en (B), se puede observar que el tratamiento con CD200-His no tuvo efecto en el porcentaje de células que son positivas para Arg I, mientras que sí tiende a aumentar el número de células positivas para CD206, aunque este aumento no es estadísticamente significativo. **D**: la mediana de intensidad de fluorescencia para CD206 muestra que a la vez que hay más células que expresan este marcador anti-inflamatorio, éste tiende a ser expresado en mayor medida luego del tratamiento en la población de microglía y macrófagos, aunque este aumento tampoco es significativo. **E y F**: el tratamiento con CD200-His no tuvo efecto tanto en el porcentaje de células positivas (E) como en la mediana de intensidad (F) del marcador pro-inflamatorio iNos. En todas las figuras el tratamiento con CD200-His se representa con color verde mientras que la administración con PBS se representa en violeta. \* $p < 0.05$ , test post-hoc de Bonferroni,  $n=4$  por tratamiento.

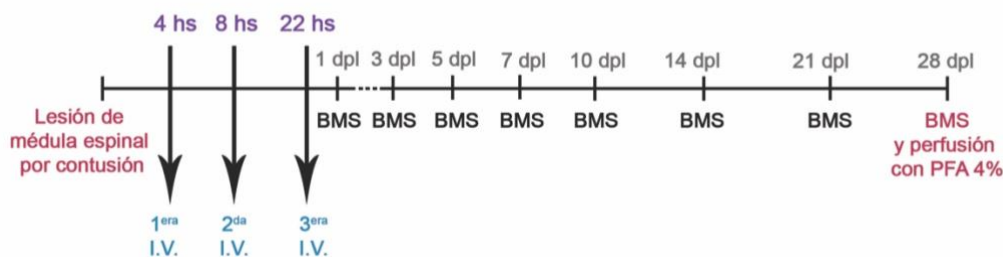
### 3. Efecto de la administración intravenosa de agonistas de CD200R1 luego de la lesión medular.

Con el fin de desarrollar una estrategia terapéutica basada en la activación de CD200R1 con mayor relevancia en la clínica, se decidió evaluar la administración de agonistas de CD200R1 por vía intravenosa, ya que es menos invasiva que la administración dentro del tejido medular. A su vez, se planteó determinar el efecto en la recuperación funcional de la activación de CD200R1 en las células del sistema inmune periférico, comparando con la activación del receptor en las células inmunes presentes en el SNC. Dado que la proteína recombinante CD200-His en principio no podría atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), si se observa un efecto en la recuperación luego de la administración de esta proteína por vía intravenosa, se debería a que la activación de CD200R1 en las células del sistema inmune periféricas cumple un rol en la progresión del daño luego de la lesión. A su vez, se planteó evaluar el uso de otra proteína recombinante que pueda activar al receptor CD200R1 y que pueda atravesar la BHE para llegar al lugar de la lesión dentro del parénquima medular. De esta forma se planteó determinar si es una estrategia viable para activar al receptor CD200R1 en el SNC mediante una administración intravenosa.

#### 3.2 Efecto de la administración intravenosa de la proteína recombinante CD200-His en la recuperación funcional luego de la lesión medular por contusión.

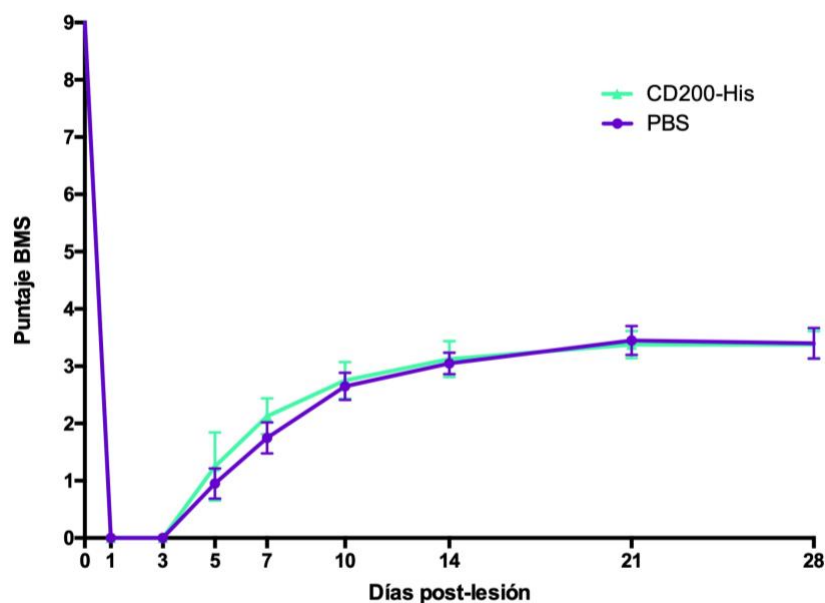
En la Figura 18 se representa el diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de la administración de la proteína recombinante CD200-His por vía intravenosa. Se realizaron dos experimentos independientes en diferentes días con las mismas condiciones, en la cual se analizaron la mitad de los animales cada uno. Luego de que se lesionaron los ratones, se realizó la administración intravenosa de CD200-His ( $n=4$ ) o el vehículo control (PBS,  $n=10$ ) a las 4, 8 y 22 horas post-lesión, y se analizó el efecto de este tratamiento en la recuperación funcional. Se decidió retrasar la primera administración a las 4 horas post-lesión para obtener un modelo con mayor semejanza a lo que se

puede obtener clínicamente, ya que por lo general los pacientes no pueden acceder a tratamiento médico inmediatamente a la lesión. Para evaluar la recuperación funcional de los ratones lesionados, se realizó un seguimiento durante 28 días luego de la lesión utilizando la escala *Basso Mouse Scale* (BMS), analizando diferentes parámetros de la locomoción que se ha demostrado que son un indicativo del nivel de recuperación funcional en ratones con lesión medular. Esta misma escala fue utilizada en los estudios previos del grupo de investigación que determinaron una peor recuperación funcional luego de la administración del anticuerpo bloqueante de CD200R1 mencionados previamente (Lago *et al.*, 2018).



**Figura 18.** Diseño experimental de la administración por vía intravenosa de proteínas recombinantes luego de la lesión medular por contusión. A las 4, 8 y 22 horas post-lesión se realizaron las administraciones intravenosas de las proteínas recombinantes o el vehículo control. Posteriormente se realizó el seguimiento funcional de los ratones utilizando la escala BMS a 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 dpl. Al día 28 post-lesión, se realizó la eutanasia de los ratones y perfusión con PFA 4%.

En la Figura 19 se puede observar la recuperación funcional de los ratones lesionados hasta el día 28 post-lesión evaluada utilizando la escala BMS. Se puede apreciar que a 1 y 3 dpl, los ratones tienen un puntaje de 0 debido a que no muestran movimiento alguno en los miembros inferiores. A partir del día 5 post-lesión, comienza a evidenciarse la recuperación funcional ya que en los animales de ambos grupos experimentales se puede observar movimiento en el tobillo de los miembros inferiores, que corresponde al primer indicio de la recuperación de funciones locomotoras. El tratamiento con CD200-His parece no tener efecto en el puntaje en el BMS a los 5 dpl comparado con el grupo control. A 7 dpl tampoco se observan diferencias significativas en el puntaje en el BMS entre el grupo tratado con CD200-His ( $2.12 \pm 0.6$ ) o con PBS ( $1.75 \pm 0.8$ ), la mayoría de los ratones tratados con CD200-His muestra movimiento extensivo del tobillo en ambos miembros inferiores, mientras que de los tratados con PBS la mayoría muestra movimiento extensivo únicamente en uno de los dos miembros inferiores. A partir de los 10 dpl y hasta los 28 dpl ambos grupos experimentales presentan puntajes en el BMS prácticamente iguales, observándose un aumento marcado hasta el día 14 post-lesión donde la mayoría de los ratones presenta apoyando la planta de ambas patas traseras (puntaje de 3 en el BMS). Desde el día 14 hasta el 28 post-lesión, la recuperación funcional es escasa, observándose pasos ocasionales en los que se levanta totalmente la pata en algunos de los ratones de ambos grupos experimentales.



**Figura 19.** No se observan diferencias en la recuperación funcional medida con la escala BMS hasta el día 28 post-lesión entre los ratones lesionados e inyectados por vía intravenosa CD200-His (en verde, n=4) o vehículo control (PBS, en violeta, n=10) a las 4, 8 y 22 horas post-lesión. En ambos grupos experimentales se observa una mejora en la recuperación funcional de la actividad locomotora a partir del día 5 post-lesión, donde se observa un aumento marcado hasta el día 14 post-lesión que se hace menos evidente hasta los 28 dpl. En ninguno de los tiempos analizados se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos (ANOVA de dos vías,  $p=0.76$ , no se observaron valores significativo luego del test post-hoc de Bonferroni).

### 3.2 Diseño de la proteína CD200-RVG como forma de entrega de CD200 a través de la barrera hematoencefálica.

Considerando el efecto que presentó la proteína CD200-His administrada a nivel del SNC en el tejido medular lesionado y la falta de efecto observada cuando esta proteína es administrada por vía intravenosa, se propuso evaluar el uso de una proteína recombinante diseñada por nuestro laboratorio, que consiste de un dominio CD200 para unirse y activar al CD200R1 al cual se le añadió un dominio de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG: Rabies Virus Glicoprotein). Esta glicoproteína se ha demostrado que es la que le confiere tropismo por el SNC y la permite atravesar la BHE cuando es utilizada como proteína de fusión en diferentes complejos (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017). A pesar de que es aceptado que esta proteína es necesaria para la entrada del virus al SNC, los mecanismos precisos por los cuales se da esta entrada todavía no están totalmente aceptados (Schnell *et al.*, 2010). La estrategia de utilizar un dominio RVG de la proteína para dirigir moléculas hacia el SNC cuando son administradas por vía intravenosa ya fue utilizada con éxito en varios estudios. Mediante esta estrategia se ha logrado entregar ARN pequeño de interferencia (Kumar *et al.*, 2007; Alvarez-Erviti *et al.*, 2011), exosomas y enzimas (Xiang *et al.*, 2011) al SNC. Por lo tanto, en nuestro laboratorio se planteó diseñar la proteína recombinante CD200-RVG que contiene



un dominio de CD200 para activar al receptor CD200R1 y un dominio RVG para atravesar la BHE y concentrarse en el SNC. Al igual que la proteína recombinante CD200-His, la proteína CD200-RVG también posee un *HisTag*, que consiste de una cola de 10 histidinas que fue incluida para facilitar la purificación durante el proceso de producción (Figura 20).



**Figura 20.** Dominios de las proteínas recombinantes CD200-His y CD200-RVG. La proteína CD200-His consta de un dominio CD200 y una cola de 10 histidinas (HisTag) que fue adicionada para facilitar la purificación de la proteína durante la producción. La proteína CD200-RVG además del dominio CD200 y el HisTag, posee un dominio de la glicoproteína del virus de la rabia (RVG).

Para evaluar si la proteína recombinante CD200-RVG es capaz de atravesar la BHE, a 5 ratones naïve se le inyectaron concentraciones crecientes de la proteína (o el vehículo como control) por vía intravenosa. A los 30 minutos luego de la administración, los animales fueron sacrificados y perfundidos con PBS y se disecaron diferentes órganos para luego realizar la extracción proteica. Dado que durante la perfusión se eliminó el contenido de la sangre, si se logra detectar contenido de la proteína CD200-RVG en los tejidos obtenidos de cerebro y médula espinal, sería un fuerte indicativo de que la proteína puede atravesar la barrera hematoencefálica. Para evidenciar la presencia de la proteína en los extractos de tejidos, se realizó la técnica de *Western Blot*. Para evidenciar la presencia de la proteína CD200-RVG se utilizó un anticuerpo anti-HisTag que reconoce la cola de 10 histidinas presente en la proteína recombinante, seguido de un anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano que reconoce al anticuerpo primario, y por lo tanto evidencia la presencia la proteína de interés CD200-RVG.

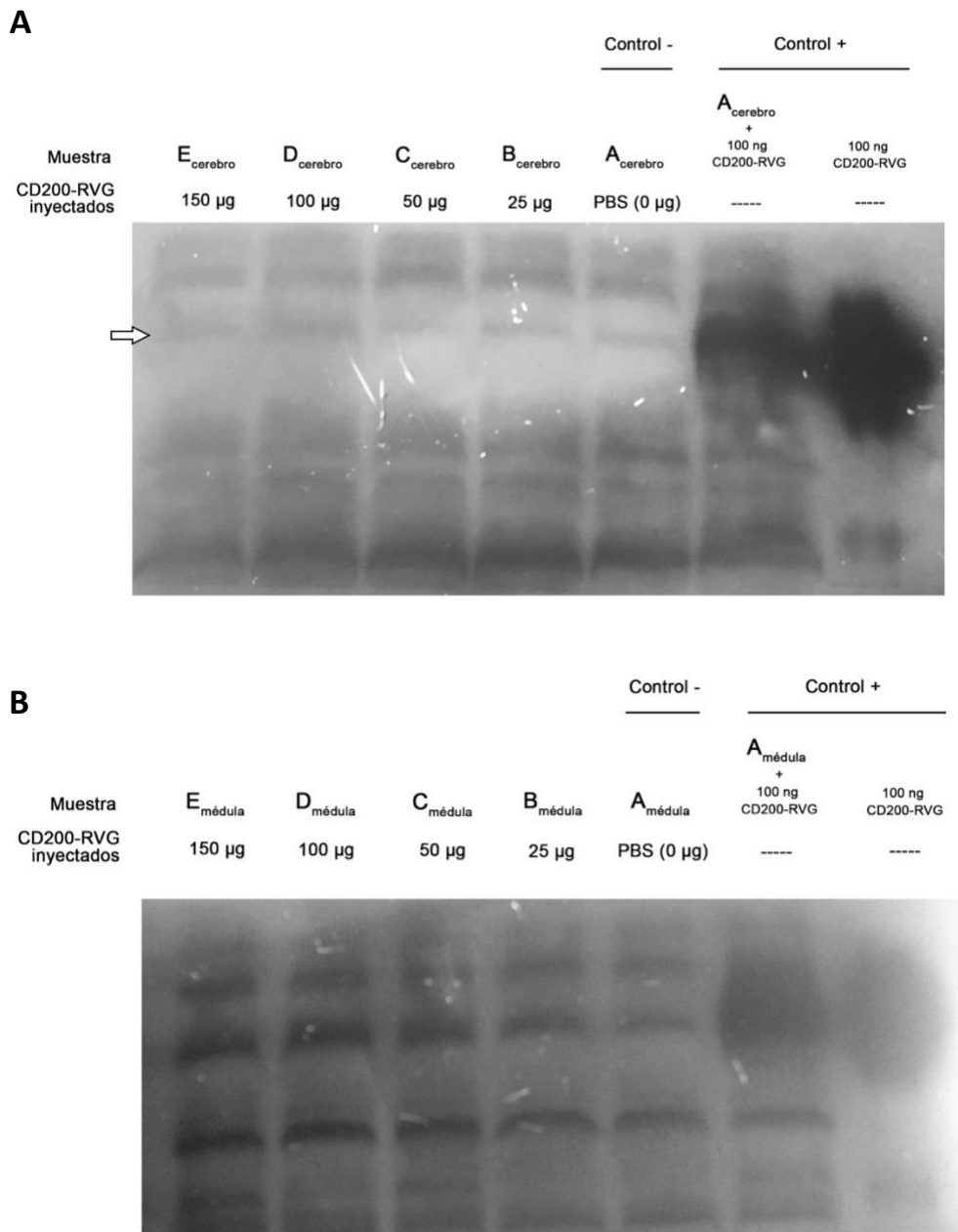
En la Figura 21 se muestra el resultado obtenido para las muestras de cerebro (Figura 21A) y médula espinal (Figura 21B). En ambos casos, en el control positivo en los que se cargaron 100 ng de la proteína CD200-RVG directamente, se puede observar una banda muy fuerte que se encuentra entre los 55 y 70 kDa según el marcador de peso molecular. Según la referencia del proveedor de la proteína Sinobiological, la proteína en gel de electroforesis corre hasta una altura de 44.9 kDa en las mismas condiciones de corrida, por lo que parece haber una pequeña discrepancia en el peso molecular observado de CD200-RVG. Como un control positivo adicional, a la muestra del tejido control (ratón

inyectado con PBS) se le añadieron 100 ng de CD200-RVG previa a la carga en el gel, para demostrar que el buffer de lisis en el cual se encuentran las muestras de proteínas de los tejidos no altera la corrida de la proteína. Ya que la banda aparece a la misma altura que el último pocillo en el cual se cargaron directamente los 100 ng de CD200-RVG únicamente podemos afirmar que el buffer de lisis no altera la corrida de la proteína.

Considerando las muestras de tejido de cerebro de los ratones inyectados con diferentes concentraciones de CD200-RVG o vehículo (PBS), se puede observar en la Figura 21A que en todos los pocillos de las muestras de cerebro se observa una banda (señalada con una flecha) a una altura muy similar a la observada en los controles positivos, por lo que podría corresponder a CD200-RVG. Sin embargo, se puede apreciar que en el carril del control negativo, que corresponde a la muestra de cerebro del ratón inyectado con PBS, también se observa esta banda señalada con la flecha. Dado que el ratón inyectado con PBS no puede tener CD200-RVG en el tejido debido a que no se le administró esta proteína, se llegó a la conclusión de que la banda señalada con la flecha corresponde a otra proteína a la cual el anticuerpo anti-HisTag se une inespecíficamente. Debido a que no se observa otra banda de un peso molecular similar que esté ausente en el control negativo pero presente en las muestras de cerebro de ratones inyectados con CD200-RVG, se concluyó que no se pudo detectar la presencia de CD200-RVG en las muestras de cerebro.

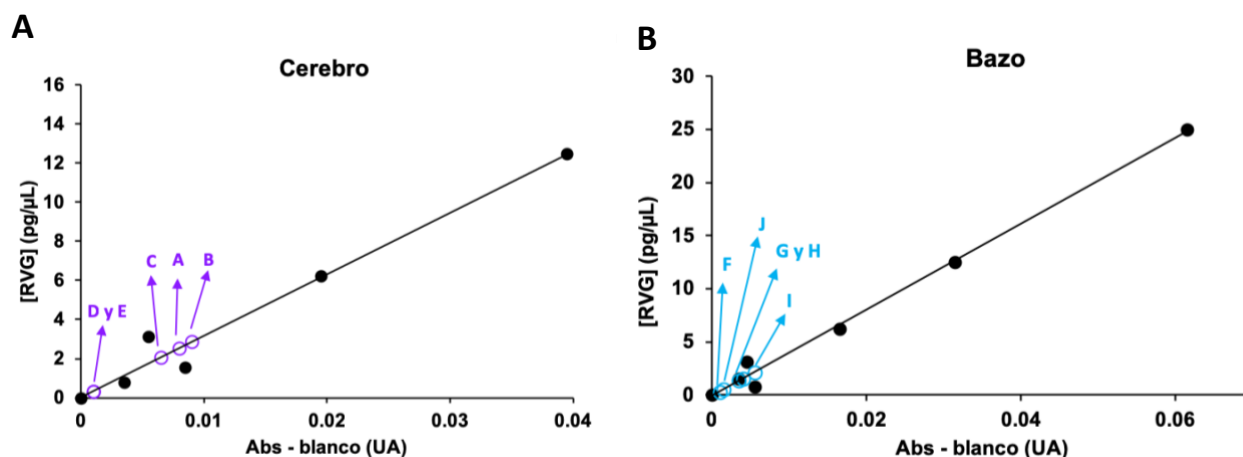
Con las muestras de médula espinal (Figura 21B) se observó algo muy similar a lo sucedido con las muestras de cerebro. Ambos carriles correspondientes a los controles positivos muestran una banda del mismo peso molecular que la observada en los controles positivos de las muestras de cerebro. Al igual que lo sucedido con las muestras de cerebro, se observa en las muestras de médula espinal una banda a una altura similar a la de los controles positivos, pero a su vez la muestra de control negativo (ratón inyectado con PBS) también presenta la misma banda, por lo que se concluyó que esta banda también corresponde a otra proteína a la cual el anticuerpo anti-HisTag se une inespecíficamente.

Debido a que se realizaron varias pruebas para determinar una mejor señal específica de la banda de CD200-RVG utilizando varias combinaciones de concentraciones de anticuerpos y de proteína cargada y siempre se observó el mismo resultado, se determinó que la técnica de Western Blot con estos anticuerpos y en estas condiciones no tiene la sensibilidad necesaria para evidenciar la presencia de CD200-RVG en los tejidos extraídos.



**Figura 21.** Western Blot para evidenciar la proteína CD200-RVG en muestras de cerebro (A) y médula espinal (B) utilizando el anticuerpo anti-HisTag. En ambos casos, se observa una banda intensa en los controles positivos en los que se añadieron 100ng de la proteína CD200-RVG directamente en el carril. A su vez, en las muestras de cerebro y médula de ratones inyectados con diferentes concentraciones de la proteína CD200-RVG por vía intravenosa muestran una banda a una altura similar a la de los controles positivos, pero esta banda también se ve en el control negativo que corresponde a la muestra de tejido del ratón al cual se le inyectó únicamente PBS, por lo que corresponde a una proteína a la cual el anticuerpo anti-HisTag se une inespecíficamente.

Dado que la sensibilidad del *Western Blot* demostró no ser suficiente para diferenciar la banda correspondiente a CD200-RVG en los tejidos extraídos, se decidió analizar la presencia de la proteína por ELISA, que ha demostrado ser una técnica con mayor sensibilidad para detectar proteínas que se encuentran en muy bajas concentraciones. Se utilizaron las mismas muestras de extracto de proteínas totales que las utilizadas para el *Western Blot*, es decir las muestras de tejido de ratones inyectados a concentraciones crecientes de CD200-RVG o vehículo control. Se puso a punto un ELISA “Sandwich” que consiste en tratar la placa con anticuerpo anti-HisTag para capturar la muestra y luego un anti-CD200 para evidenciar y cuantificar la proteína de interés CD200-RVG en cada muestra. También se evaluó la posibilidad de invertir el orden de los anticuerpos, es decir capturar la muestra con una anticuerpo anti-CD200 y evidenciar con un anti-HisTag. Sin embargo con estas condiciones se obtuvo una señal de fondo muy superior que dificultó discriminar entre la señal específica de la inespecífica, por lo que se decidió utilizar la primera condición descrita. Se realizó la curva de calibración colocando concentraciones crecientes de CD200-RVG diluidas en la muestra de tejido control (inyectada con PBS). Luego de realizar la curva de calibración se pueden interpolar los valores de absorbancia de las muestras de tejido a las cuales queremos determinar la concentración de CD200-RVG. En la Figura 22 se puede observar que tanto la curva estándar de CD200-RVG para las muestras de cerebro y bazo mostraron una regresión lineal con un  $R^2$  de 0.97 y 0.99, respectivamente, por lo que la interpolación a realizar es confiable.



**Figura 22.** Ensayo de ELISA de las muestras de cerebro (A) y bazo (B) para determinar la concentración de CD200-RVG en los diferentes extractos de proteínas. Se realizó una curva de calibración para cada tejido con las siguientes concentraciones de CD200-RVG: 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 y 0.78 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y en ambos casos los coeficientes de determinación de la regresión lineal fueron altos (A:  $R^2=0.97$ ; B:  $R^2=0.99$ ). Las muestras de tejido fueron disecadas de los ratones A y F: inyectado con PBS; B y G: inyectado con 25  $\mu\text{g}$  de CD200-RVG; C y H: inyectado con 50  $\mu\text{g}$  de CD200-RVG; D e I: inyectado con 100  $\mu\text{g}$  de CD200-RVG; E y J: inyectado con 150  $\mu\text{g}$  de CD200-RVG.

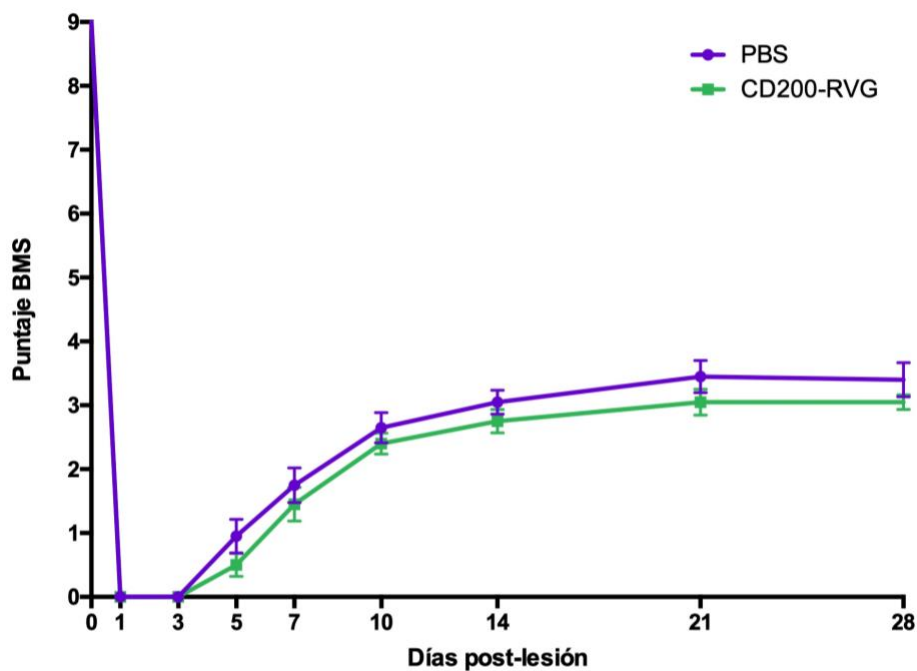
Como se observa en la Tabla 5 y en la Figura 22, no se pudo detectar de manera confiable la presencia de CD200-RVG tanto en cerebro como en bazo. A pesar de que al interpolar los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes muestras se obtiene un valor de concentración de CD200-RVG mayor a 0 para esa muestra, estos valores no pueden ser considerados como válidos ya que se encuentran por debajo del límite de detección del ensayo. Todos los valores de concentración de CD200-RVG en las muestras obtenidos de la interpolación de la curva estándar se acumulan por debajo de los 3.125 pg/ $\mu$ L de CD200-RVG. Como se puede apreciar en ambos gráficos (Figura 22A y B), los puntos correspondientes a valores de concentración menores a 6.25 pg/ $\mu$ L se alejan de la regresión lineal de la curva estándar, indicando que por debajo de este valor las mediciones de absorbancia la relación ruido-síñal es mucho mayor y por lo tanto la cuantificación por debajo de este límite no es confiable ya que el ruido añade una variación considerable en nuestra cuantificación.

**Tabla 5.** Valores de absorbancia y de concentración de CD200-RVG de la curva estándar y las muestras de cerebro y bazo. Curva estándar de CD200-RVG que contiene concentraciones crecientes (de 0 a 25 pg/ $\mu$ L) de CD200-RVG diluidas en la muestra correspondiente de tejido del ratón A (inyectado con PBS). **A-E:** muestras de cerebro; **F-J:** muestras de bazo de ratones inyectados con diferentes concentraciones de CD200-RVG por vía intravenosa. **A y F:** inyectado con PBS; **B y G:** inyectado con 25  $\mu$ g de CD200-RVG; **C y H:** inyectado con 50  $\mu$ g de CD200-RVG; **D e I:** inyectado con 100  $\mu$ g de CD200-RVG; **E y J:** inyectado con 150  $\mu$ g de CD200-RVG.

	Muestras	Abs (UA)	Blanco (UA)	Abs - blanco (UA)	[CD200-RVG] (pg/ $\mu$ L)
Curva estándar	0 ng CD200-RVG	0.0605	0.0605	0.000	0.00
	0.78 ng CD200-RVG	0.066	0.0605	0.006	0.78
	1.56 ng CD200-RVG	0.064	0.0605	0.004	1.56
	3.13 ng CD200-RVG	0.065	0.0605	0.005	3.12
	6.25 ng CD200-RVG	0.077	0.0605	0.017	6.25
	12.5 ng CD200-RVG	0.092	0.0605	0.032	12.5
	25.0 ng CD200-RVG	0.122	0.0605	0.062	25
Muestras cerebro	A (inyectado con PBS)	0.061	0.053	0.008	2.54
	B (25 $\mu$ g CD200-RVG)	0.062	0.053	0.009	2.85
	C (50 $\mu$ g CD200-RVG)	0.058	0.052	0.006	2.06
	D (100 $\mu$ g CD200-RVG)	0.053	0.052	0.001	0.33
	E (150 $\mu$ g CD200-RVG)	0.059	0.058	0.001	0.33
Muestras bazo	F (inyectado con PBS)	0.060	0.059	0.001	0.32
	G (25 $\mu$ g CD200-RVG)	0.065	0.061	0.004	1.53
	H (50 $\mu$ g CD200-RVG)	0.066	0.062	0.003	1.33
	I (100 $\mu$ g CD200-RVG)	0.068	0.063	0.005	2.14
	J (150 $\mu$ g CD200-RVG)	0.066	0.064	0.001	0.52

### 3.4 Impacto de la administración intravenosa de la proteína recombinante CD200-RVG en la recuperación funcional luego de la lesión medular por contusión.

A pesar de que no se pudo comprobar si la proteína CD200-RVG logra atravesar la BHE, apoyándonos en los resultados de otro grupos de investigación previos en otros modelos, se procedió a probar *in vivo* el efecto que tiene la administración intravenosa de esta proteína en la recuperación funcional luego de la lesión medular por contusión. Para evaluar el efecto de la administración intravenosa de la proteína CD200-RVG luego de la lesión de médula espinal se realizó el diseño experimental mostrado en la Figura 18, que corresponde al mismo procedimiento que el utilizado con la proteína CD200-His.



**Figura 23.** No se observan diferencias en la recuperación funcional medida con la escala BMS hasta el día 28 post-lesión de los ratones lesionados e inyectados por vía intravenosa CD200-RVG (en verde oscuro, n=10) o vehículo control (PBS, en violeta, n=10) a las 4, 8 y 22 horas post-lesión. En ambos grupos experimentales se observa una mejora en la recuperación funcional de la actividad locomotora a partir del día 5 post-lesión, donde se observa un aumento marcado hasta el día 14 post-lesión que se hace menos evidente hasta los 28 dpl. A pesar de que en todos los tiempos analizados a partir de 5 dpl el tratamiento con CD200-RVG parece promover una peor recuperación funcional, en ninguno de los tiempos analizados se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tratamientos (ANOVA de dos vías,  $p=0.22$ , no se observaron valores significativo luego del test post-hoc de Bonferroni).

El grupo de los ratones inyectados con el vehículo control (PBS) fue el mismo que en el estudio de administración intravenosa de CD200-His dado que ambos experimentos fueron realizados en paralelo, por lo que la progresión temporal de la recuperación funcional evaluada con la escala BMS observada en el grupo control es la misma que en la Figura 23. La recuperación funcional de los ratones inyectados con CD200-RVG es muy similar a la de los ratones inyectados con PBS. El primer indicio de recuperación funcional que mostraron los ratones lesionados de ambos grupos experimentales fue a los 5 dpl y se observó una mejora en la recuperación funcional hasta el día 14 post-lesión que luego aumenta muy levemente hasta el día 28 post-lesión. El tratamiento con CD200-RVG demostró no tener efecto en la recuperación funcional luego de la contusión medular ya que en ninguno de los tiempos post-lesión analizados se observaron diferencias significativas entre los puntajes en el BMS obtenidos entre el grupo tratado con CD200-RVG y el grupo control (ANOVA de dos vías,  $p=0.22$ , no se observaron valores significativo luego del test post-hoc de Bonferroni). Al día 28 post-lesión, los ratones tratados con CD200-RVG tienen un puntaje en el BMS levemente menor al que presentan los ratones inyectados con PBS (CD200-RVG:  $3.05\pm 0.4$ , PBS:  $3.4\pm 0.8$ ) debido a que la mayoría de los animales inyectados presentan pasos en los que levantan el pie ocasionalmente en ambos miembros inferiores, mientras que de los animales tratados con CD200-RVG la mayoría presenta pasos en uno de los dos miembros inferiores.

# DISCUSIÓN

Debido a que la respuesta inflamatoria es uno de los determinantes de la magnitud del daño secundario luego de una lesión al SNC, resulta relevante identificar mecanismos para modular dicha respuesta. Los inmunoreceptores han sido identificados como posibles diana sobre los cuales actuar para modular esta respuesta. En particular, la activación del par CD200-CD200R se ha mostrado como anti-inflamatoria en diversos modelos de inflamación del sistema nervioso, y en el presente trabajo se examinó el rol que cumple el receptor CD200R1 y su ligando CD200 en la progresión de este daño secundario a la lesión medular traumática por contusión. Por ello en primer lugar se analizó el patrón de expresión espacio-temporal de CD200 y CD200R1 por inmunofluorescencia y citometría de flujo para determinar los tipos celulares que expresan estas proteínas en tejido de médula espinal en condiciones naïve (sin lesionar) y evaluar si a diferentes tiempos post-lesión hay cambios en el patrón de expresión. Con el fin de diseccionar la participación de este par en la lesión de médula espinal, se administraron antagonistas y agonistas de CD200R1 para modular esta interacción y de este modo evaluar si cumple un papel en el desarrollo de la fisiopatología de la lesión medular. Dado que se evidenció que esta interacción cumple un rol regulador en la progresión del daño, se planteó profundizar en los mecanismos que subyacen a esta modulación evaluando los cambios que se observan en la respuesta inflamatoria cuando se actúa localmente en la lesión o sistémicamente. Teniendo en cuenta que la activación de CD200R1 localmente en el sitio de la lesión presentó un efecto neuroprotector, se evaluó el uso de agonistas de CD200R1 administrados por vía intravenosa para desarrollar una estrategia terapéutica menos invasiva.

## 1. Caracterización de la expresión espacio-temporal de CD200 y CD200R1 en la médula espinal luego de una lesión por contusión.

En el presente trabajo se planteó realizar la caracterización del patrón de expresión espacio-temporal de CD200 y CD200R1 en el tejido de la médula espinal sin lesionar y evidenciar si se observan cambios luego de la contusión medular. En primer lugar analizamos la distribución de la expresión de CD200 en la médula espinal de ratón sin lesionar (condición naïve). CD200 presenta un patrón de expresión difuso en la médula espinal naïve, siendo más prominente en el neuropilo de la sustancia gris, lo cual concuerda con estudios previos que mostraron un marcaje de CD200 difuso en el entramado de prolongaciones celulares del neuropilo en diferentes regiones del SNC (Koning *et al.*, 2009; Shrivastava *et al.*, 2012; Cohen *et al.*, 2017). Se denomina neuropilo a la región de la sustancia gris del SNC que



consiste en un complejo entramado de prolongaciones celulares de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía. El marcaje positivo del neuropilo para CD200 podría estar dado por la gran extensión de membrana celular de las prolongaciones neuronales que expresan CD200, ya que ha sido demostrado que CD200 es una proteína de superficie celular que es expresada en el SNC en condiciones normales principalmente por las neuronas (Webb & Barclay, 1984; Deckert *et al.*, 2006; Koning *et al.*, 2009). En la médula espinal, observamos que dentro de la sustancia gris, algunas regiones mostraron marcarse más intensamente que otras, por ejemplo las láminas I y II de la sustancia gris en el asta dorsal, que ya fue observado previamente (Hernangómez *et al.*, 2016). Esta mayor intensidad de marcaje podría estar dada por una mayor abundancia de prolongaciones neuronales en esta región y/o porque las prolongaciones en esta región tienen una elevada expresión de CD200. Otra región que presentó un marcaje más intenso fue la sustancia gris que rodea al epéndimo, de la cual se originan prolongaciones celulares positivas para CD200, que proyectan hacia la luz del canal central y contactan con el líquido cefalorraquídeo (LCR). Se ha descrito un tipo particular de neuronas que contactan con el LCR tanto a nivel del cerebro como de tronco encefálico y médula espinal (Petracca *et al.*, 2016; Orts-Del'Imagine *et al.*, 2017; Jalalvand *et al.*, 2018). Estas neuronas ciliadas emiten prolongaciones que atraviesan la capa de endimocitos y se disponen hacia la luz de los ventrículos y el canal central. Se ha planteado que estas neuronas censan diferentes parámetros del LCR como el pH y que actúan como mecanorreceptores siendo estimuladas por cambios en el movimiento del fluido (Jalalvand *et al.*, 2018). Por lo tanto, las prolongaciones CD200 positivas observadas en el canal central de la médula espinal parecen originarse en estas neuronas que contactan el LCR, aunque para afirmarlo habría que realizar un marcaje para evidenciar la proteína canal PKD2L1, que es un marcador específico expresado únicamente por estas neuronas (Orts-Del'Imagine *et al.*, 2017). A su vez, en nuestro grupo evidenciamos que estas prolongaciones no son positivas para la lectina de tomate (Lago *et al.*, 2018), marcador utilizado para evidenciar a los endimocitos que delimitan al canal central, por lo que apoya el planteo de que estas prolongaciones provienen de neuronas. Dado que en condiciones normales se pueden encontrar células del sistema inmune en el LCR, entre las que se encuentran los macrófagos (Ling *et al.*, 1998; Engelhardt & Sorokin, 2009), CD200 en estas prolongaciones podría estar señalizando a estas células para evitar que fagociten a estas prolongaciones. Apoyando esta idea está la observación de que CD200 favorece una disminución de la fagocitosis en macrófagos y microglía (Hayakawa *et al.*, 2015; Lyons *et al.*, 2017). Una explicación alternativa podría ser que el CD200 expresado en estas prolongaciones actúe como una señal que mantenga fuera del parénquima nervioso a estas células inflamatorias manteniendo el estatus de compartimiento inmunoprivilegiado al SNC en condiciones normales. Otra de las regiones que presentó una marca más intensa y prominente de CD200 fue en la sustancia blanca adyacente al

surco anterior. A través de esta región de la sustancia blanca transcurre el fascículo surco-marginal, por el cual transcurre el tracto vestibulo-espinal (Nathan *et al.*, 1996; Watson & Harrison, 2012). Se desconoce la razón por la cual esta región de la sustancia blanca se tiñe más intensamente para CD200.

En una segunda instancia, se planteó analizar los cambios en el patrón de expresión de CD200 luego de la lesión de médula espinal por contusión, analizando los cambios a diferentes tiempos post-lesión. Estudios previos de nuestro grupo de investigación, habían demostrado por PCR en tiempo real (qPCR) que los niveles de expresión del ARNm de CD200 disminuyen de forma significativa a las 24 hs de la contusión medular y luego continúa disminuyendo levemente hasta el día 14 post-lesión, mientras que a los 28 dpl se da un aumento en la expresión de CD200 aunque no llega a los valores presentados en las condiciones naïve (Lago *et al.*, 2018). En el presente trabajo nos propusimos analizar la expresión de CD200 por inmunofluorescencia para confirmar lo observado mediante qPCR y para determinar si el patrón de expresión se mantiene luego de la lesión. El descenso cualitativo observado a 1, 3 y 14 dpl y el leve aumento a 28 dpl de la inmunoreactividad de CD200 en el tejido de la médula espinal en el epicentro de la lesión concuerda con lo observado por qPCR. A 1 dpl se observó que a pesar de que se da una disminución generalizada de CD200 en el epicentro de la lesión, la región de sustancia gris que rodea al canal central y fascículo surco-marginal de la sustancia blanca adyacente al surco medio anterior permanecen con una alta inmunoreactividad para CD200, mientras que en el asta dorsal de la sustancia gris, que corresponde a la región donde se realizó el impacto de la lesión mecánica, la expresión de CD200 disminuye drásticamente. El hecho de que a 7 dpl la región que rodea al canal central y el fascículo surco-marginal ya no presentaron esa marca más intensa para CD200, podría estar indicando que CD200 disminuye a medida que progresa el daño, ya que de las regiones que muestran la marca más intensa, la región dorsal que es la primera en ser dañada a su vez es la primera en disminuir la expresión de CD200, mientras que las otras regiones disminuyen la expresión más tardíamente. Como ha sido descrito, a 28 dpl se observó la presencia de una cavidad a nivel dorsal, producto del daño generado por la progresión del daño secundario luego de la lesión. A su vez, se observa un aumento en la expresión de CD200 dada por la presencia de numerosas estructuras cilíndricas inmunoreactivas para CD200 que probablemente correspondan a vasos sanguíneos, aunque para confirmarlo se tendrían que co-marcar con marcadores de células endoteliales como CD31. Esto concuerda con estudios en los que se ha planteado que la formación de nuevas células endoteliales que expresan CD200 en el lugar de la lesión cumplen un papel importante en la recuperación funcional luego de la lesión (Cohen *et al.*, 2017).

Los estudios previos en los que se analizó la expresión y función de CD200R en la médula espinal en

condiciones normales y luego de la lesión, no diferenciaron la participación de los diferentes miembros de la familia de receptores de CD200. Dado que CD200R1 es el único miembro que se une a CD200 y es inhibidor, se propuso analizar en mayor detalle el patrón de expresión de este miembro de la familia CD200R en la lesión de médula espinal. En el presente trabajo, no pudimos evidenciar la presencia de CD200R1 en microglía por medio de inmunofluorescencia en la médula espinal en condiciones naïve, inclusive utilizando el método de amplificación con Tiramida que permite aumentar la señal de fluorescencia. Esto concuerda con lo observado previamente en estudios en los cuales por inmunofluorescencia CD200R1 en el SNC en condiciones normales solo se evidenció en macrófagos perivasculares, mientras que no se pudo detectar en la microglía (Wright *et al.*, 2000; Deckert *et al.*, 2006; Shrivastava *et al.*, 2012). Esta incapacidad de detectar el receptor en microglía por inmunohistoquímica se ha observado con otros inmunoreceptores como TREM2, la familia de CD300 y Siglec (Deczkowska, Amit, *et al.*, 2018), probablemente debido a que estos receptores son expresados en bajos niveles en condiciones normales. Sin embargo, por citometría de flujo pudimos evidenciar la presencia de CD200R1 en microglía en la médula espinal naïve.

Luego se planteó determinar los cambios de expresión de CD200R1 que se observan en la médula espinal luego de la contusión y analizar cuáles son los tipos celulares que expresan este inmunoreceptor. En nuestro grupo de trabajo fue previamente establecido el patrón de expresión temporal de CD200R1 luego de una lesión medular por medio de qPCR. Se pudo detectar la presencia de ARNm de CD200R1 en condiciones normales, por lo que se demostró cierta expresión constitutiva del receptor en la médula espinal naïve. El tejido se obtuvo luego de perfusión con solución salina, lo cual sugiere que el mRNA para CD200R1 era de origen microglia y/o de macrófagos perivasculares. A 1 dpl se observó un pequeño aumento no significativo en la expresión de este receptor, mientras que a 7 días se dio el pico máximo aumentando la expresión unas 20 veces comparado con los valores en condiciones naïve, que luego disminuye hasta los 28 dpl aunque permanece más alto que en condiciones naïve (Lago *et al.*, 2018). Se propuso corroborar los datos de la expresión temporal de este receptor luego de la lesión por inmunofluorescencia y citometría de flujo para determinar cuáles son los tipos celulares que lo expresan. Por citometría de flujo, se observó que a 1 dpl el número de células de las poblaciones de macrófagos y neutrófilos que ingresan desde la circulación sanguínea aumentó considerablemente en la zona de la lesión. A su vez se detectó la presencia de CD200R1 en un alto porcentaje de estas poblaciones. Mediante inmunofluorescencia, a 1 dpl pudimos evidenciar la presencia de numerosas células CD200R1+, que en gran parte no eran positivas para Iba-1, por lo que no se correspondían con microglía o macrófagos. Por su aspecto redondeado y el núcleo complejo y lobulado, junto con el hecho de que a 1 dpl se da el pico máximo de presencia de neutrófilos en la

médula espinal lesionada, se consideró la posibilidad de que sean neutrófilos. Para confirmarlo, en nuestro grupo de investigación se realizaron inmunofluorescencias para co-marcas CD200R1 con la mieloperoxidasa, expresada por los neutrófilos de manera específica. Se observó que muchas de estas células positivas para CD200R1 también lo eran para mieloperoxidasa, indicando que gran parte de las células CD200R1 positivas a 1 dpl corresponden con neutrófilos (Lago *et al.*, 2018). A 7 y 14 dpl se observó por inmunofluorescencia un drástico aumento en el número de células positivas para CD200R1 e Iba-1, que se correspondían con macrófagos/microglía. Como se mencionó previamente, cuando la microglía adopta un fenotipo reactivo, su morfología se asemeja a la de macrófagos que ingresaron al lugar de la lesión desde la circulación sanguínea, y ambos tipos celulares expresan Iba-1, por lo que resulta imposible diferenciar entre ambos tipos celulares con los marcadores establecidos para estos tipos celulares hasta el día de hoy. Se ha planteado la posibilidad de utilizar la proteína Tmem119 como marcador específico de microglía ya que es únicamente expresado por este tipo celular en el SNC, inclusive luego de lesiones y otras patologías (Bennett *et al.*, 2016), aunque se ha observado que a tiempos mayores a 7 dpl en el caso de la médula espinal, la expresión de este marcador disminuye, lo que dificulta el uso de este marcador para la identificación de este tipo celular en la progresión de la lesión de médula espinal (David *et al.*, 2018). A 28 dpl se observó un menor número de macrófagos/microglía en el epicentro de la lesión aunque estos mostraron ser CD200R1 positivas en su mayoría. En su conjunto, lo observado por inmunofluorescencia permitió determinar que el patrón de expresión temporal se condice con lo observado por qPCR y a su vez determinar cuáles son los principales tipos celulares que lo expresan en los diferentes tiempos post-lesión analizados. Para determinar con mayor detalle cuáles son los tipos celulares que expresan CD200R1 y los cambios en la expresión del receptor en cada población celular luego de la lesión, se tendría que hacer un análisis más exhaustivo por citometría de flujo de los tejidos de médula espinal hasta los 28 días post-lesión o incluso analizar a mayores tiempos luego de la lesión.

## **2. Evaluación de la modulación de la interacción CD200-CD200R1 mediante la administración dentro del tejido medular de antagonistas o agonistas de CD200R1.**

Para evaluar el rol de la interacción entre CD200 y CD200R1 en el desarrollo de la fisiopatología de la lesión de médula espinal por contusión, se planteó modular esta interacción activando o impidiendo la activación de CD200R1. En nuestro grupo de investigación, había sido analizado previamente el efecto que tiene el bloqueo de la activación de CD200R1 por medio de la administración de un anticuerpo bloqueante dentro del tejido de la médula espinal al momento de la lesión, donde se observó que los animales presentaron una peor recuperación funcional (Lago *et al.*, 2018). Esto

concuera con la observación de que los animales *Knock-Out* para CD200 tienen una peor recuperación funcional luego de la contusión medular (Cohen *et al.*, 2017). Adicionalmente, la administración del anticuerpo bloqueante de CD200R1 localmente permitió determinar que el efecto se debe a la falta de activación de CD200R1 en la zona de la lesión, ya que el *Knock-Out* para CD200 tiene una deficiencia de la activación de CD200R1 en todo el organismo. Dado que se ha planteado en diversos estudios que CD200R1 tiene un efecto inhibitorio en la reactividad de las células que lo expresan, el bloqueo de este receptor tendría un impacto exacerbando el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de la lesión. Esto fue demostrado en el trabajo de nuestro grupo de investigación, en el cual se observó que varios parámetros de neuroinflamación presentan un aumento cuando se bloquea la activación de CD200R1 (Lago *et al.*, 2018). En el presente trabajo, se realizó el procesamiento histológico de las muestras de médula espinal extraída de los ratones a los cuales se les realizó el seguimiento funcional y mostraron una peor recuperación. El estudio histopatológico fue realizado con el fin de determinar si el efecto de la administración del anticuerpo bloqueante de CD200R1 observado en la recuperación funcional tiene una correlación con diferentes medidas del estado de la preservación del tejido nervioso. En particular, observamos que el área ocupada por la mielina y el número de somas neuronales son mínimos en el epicentro de la lesión, mientras que se observa un aumento progresivo tanto a nivel rostral como caudal. Se observó que la administración del anticuerpo bloqueante promueve una mayor pérdida de mielina y de neuronas en la médula espinal a los 28 dpl. Esto sugiere que cuando se impide la interacción de CD200 con CD200R1 localmente en el lugar de la lesión se exagera la respuesta inflamatoria, lo que lleva a un aumento de la progresión del daño secundario que desencadena una mayor pérdida de tejido nervioso. Esta mayor pérdida de tejido nervioso a causa de una respuesta inflamatoria exacerbada conduce una mayor pérdida de funciones locomotoras luego de la lesión.

En otras patologías del SNC también se observó un aumento en la severidad cuando está ausente CD200 y por lo tanto no se da la activación de CD200R1. En un modelo de neuroinflamación que consiste en la sección de nervio facial, se observó una exacerbación de la reactividad microglial en ausencia de CD200 (Hoek, 2000). En el modelo murino de esclerosis múltiple, la cual tiene su base en una reactividad de diferentes células del sistema inmune, se observó un desarrollo más severo de la patología que inicia más tempranamente en los ratones deficientes para CD200 y por lo tanto no presentan activación de CD200 (Hoek, 2000; Meuth *et al.*, 2008). A su vez, se ha observado una disfunción en la interacción entre CD200 y CD200R1 en modelos de enfermedades neurodegenerativas de Alzheimer (Walker *et al.*, 2009) y Parkinson (Zhang *et al.*, 2011), las cuales se ha planteado que tienen un componente inflamatorio determinante en el desarrollo de estas

patologías. Estas observaciones en otros modelos de neuroinflamación están en concordancia con lo observado en el presente trabajo, ya que cuando se bloquea la activación de CD200R1 en la lesión de médula espinal, los procesos de neuroinflamación se exacerbaban. En su conjunto, estas observaciones apoyan la activación del par CD200-CD200R1 como un factor atenuante de los procesos inflamatorios en el SNC, ya que en su ausencia, estos procesos se exacerbaban.

Teniendo en cuenta el rol limitante de la respuesta inflamatoria que presenta la interacción CD200-CD200R1, resulta relevante analizar la posibilidad de aumentar la activación de CD200R1 en el transcurso de los procesos inflamatorios para limitar la severidad del daño que éstos generan en el tejido nervioso. Ya ha sido demostrado en varios de los modelos de neuroinflamación previamente mencionados que aumentando la activación de CD200R1 por diferentes mecanismos, se logra atenuar el daño provocado por la respuesta inflamatoria. Administrando un agonista de CD200R1 en el modelo murino de esclerosis múltiple, se observó una atenuación en el desarrollo de la patología (Liu *et al.*, 2010), lo que concuerda con la observación de que una mayor expresión de CD200 se asocia con una disminución en los procesos inflamatorios en el desarrollo de la patología (Chitnis *et al.*, 2007a). A su vez, se observó que en un modelo de dolor neuropático la administración de un agonista de CD200R1 atenúa la reactividad glial y la respuesta inflamatoria en general, a la vez que reduce la hipersensibilidad generada por el dolor (Hernangómez *et al.*, 2016). La activación de CD200R1 por administración de un agonista también demostró una atenuación de los procesos neurodegenerativos asociados con el envejecimiento en el hipocampo de ratón, que se asocia con una menor reactividad microglial en esta región (Cox *et al.*, 2012). En vista de los efectos positivos observados por la activación del receptor CD200R1 en diferentes modelos de neuroinflamación y neurodegeneración en el SNC, se planteó evaluar el efecto que tiene la administración de agonistas de CD200R1 en el desarrollo de la patología de la lesión de médula espinal, con el fin de limitar los procesos inflamatorios que subyacen a la progresión del daño secundario que sigue a la lesión. Esto sería de particular importancia luego del trauma espinal debido a que la expresión endógena de CD200 cae rápidamente. En nuestro grupo de investigación se evaluó el efecto que tiene la administración de un agonista de CD200R1, en este caso la proteína recombinante CD200-His, dentro del tejido de la médula espinal al momento de la lesión. Se analizó el impacto que tiene esta administración sobre la recuperación funcional cuando es realizada al momento de la lesión, o cuando se atrasa la administración a las 24 horas luego de la lesión. Se observó que el agonista CD200-His promueve una mejor recuperación funcional cuando es administrado dentro del tejido al momento de la lesión, pero cuando se retrasa 24 horas la administración, el efecto positivo observado en la recuperación disminuye considerablemente aunque se mantiene una tendencia a una mejor recuperación funcional (Lago *et*

*al.*, 2018). Esto sugiere que la activación de CD200R1 puede tener efecto en otros tipos celulares además de la microglía como los macrófagos o neutrófilos, que están presentes a 1 dpl en el sitio de la lesión.

En el presente trabajo, nos propusimos analizar los mecanismos por los cuales el CD200-His promueve una mejora en la recuperación funcional, bajo la hipótesis de que al promover una atenuación de los procesos neuroinflamatorios, el daño en el tejido va a ser menor y por lo tanto al preservar mayor cantidad de tejido se puede promover una mejora en la función locomotora. Con el fin de profundizar en los mecanismos que subyacen al efecto observado por la administración de CD200-His dentro del tejido medular al momento de la lesión, se analizaron los tejidos de médula espinal de los ratones a los cuales se les realizó el seguimiento funcional hasta los 28 dpl y mostraron una mejora en la recuperación funcional. El análisis histopatológico evidenció que el tratamiento con CD200-His promueve una mayor supervivencia de neuronas en la médula espinal. Este mayor número de neuronas que sobreviven en el tejido medular lesionado podría ser al menos en parte responsable de la mejor recuperación funcional observada en los ratones tratados con CD200-His. Contrariamente, no se observó una diferencia significativa en la preservación de mielina por el tratamiento con CD200-His. Sin embargo, esto podría no estar representando los efectos de la activación de CD200R1, ya que su efecto podría radicar en mantener la capacidad que tienen las fibras nerviosas de conducción de las señales nerviosas. Por lo tanto, para determinar si el tratamiento con CD200-His tiene un efecto en mantener la funcionalidad de las fibras nerviosas se podrían realizar estudios de electrofisiología, particularmente evaluando los potenciales evocados motores y somatosensoriales, para determinar si los tractos que no se pierden luego de la lesión son capaces de conducir los impulsos nerviosos.

Para evaluar si el efecto observado por la administración del agonista en la recuperación funcional y en la preservación de tejido nervioso se correlaciona con una disminución de la respuesta inflamatoria, se analizaron varios indicadores de la respuesta inmune en la médula espinal lesionada a 3 dpl. Se observó que la mayor activación de CD200R1 generó una disminución en el número de células CD45<sup>+</sup> que corresponden a leucocitos y células microgliales en conjunto. Al analizar la población de microglía únicamente, se observó que también presentó una disminución significativa en la médula espinal a los 3 dpl debido al tratamiento con CD200-His. A pesar de que no se observó una disminución significativa en el número de las otras poblaciones celulares inmunes, todas parecieron disminuir levemente en número por el tratamiento con CD200-His. Esto concuerda con la

atenuación de la respuesta inflamatoria con la administración de un agonista de CD200R1 en los modelos de neuroinflamación mencionados anteriormente. Dado que la administración de CD200-His es realizada dentro del tejido medular al momento de la lesión cuando todavía no ingresaron células del sistema inmune desde la circulación sanguínea al sitio de la lesión, se podría considerar que gran parte de la acción de CD200-His ocurre sobre los receptores de CD200R1 presentes en la microglía de la región administrada, y tal vez sobre los macrófagos perivasculares. De acuerdo con esto, el único efecto significativo en cuanto al número de células observado fue en la población de microglía, lo que podría deberse a que la acción de CD200-His se da principalmente en esta población celular. El efecto observado en las otras poblaciones celulares podría deberse indirectamente a la disminución en la reactividad microglial mediante la activación de CD200R1, lo que en consecuencia limitaría el reclutamiento de células inmunes luego de la lesión. Los efectos sobre el reclutamiento de células inmunes se podrían medir diferentes quimiocinas atrayentes de macrófagos y neutrófilos como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y GCSF (Prendergast & Anderton, 2009) producidas por la microglía para intentar avanzar en esta hipótesis. Sin embargo, CD200-His parece no tener efecto en la reactividad microglial medida a través de los marcadores pro- y anti-inflamatorios, ya que únicamente se observó una tendencia hacia un aumento no significativo en el marcador anti-inflamatorio CD206 en esta población celular, y no se observaron cambios en iNOS y Arginasa-1. Para evaluar en mayor detalle si CD200-His tiene un efecto en limitar la reactividad microglial, se debería analizar un mayor número de marcadores característicos del fenotipo microglial recientemente bien definidos como los del estado homeostático de la microglía (Cx3Cr1, P2ry12, Tmem119) (Butovsky *et al.*, 2014; Hametner *et al.*, 2017) o los de microglía asociados a enfermedades (ApoE y Clec7a entre otros) (Deczkowska, Keren-Shaul, *et al.*, 2018). También se debería completar el estudio de estas poblaciones celulares por citometría de flujo a otros tiempos post-lesión. De esta forma se podría analizar con mayor detalle el fenotipo que adopta la microglía cuando se promueve la activación de CD200R1 luego de la lesión de médula espinal. Sin embargo, la administración de CD200-His al momento de la lesión tuvo un efecto en la población de macrófagos que ingresan de fuera del SNC, ya que se observó un aumento significativo en la expresión del marcador anti-inflamatorio CD206 en la población de macrófagos con el tratamiento con CD200-His. Esto podría indicar que la administración local podría actuar sobre los macrófagos que ingresan más tardíamente, ya sea directamente por la unión de CD200-His a los receptores CD200R1 presentes en los macrófagos, o indirectamente a través de un cambio en el fenotipo microglial, lo que puede generar la liberación de un repertorio diferente de citoquinas y otras moléculas que influyen sobre el fenotipo que adoptan los macrófagos. En una primera instancia, se había decidido analizar la población de neutrófilos a este tiempo post-lesión, ya que había sido determinado previamente por nuestro grupo que con la administración del anticuerpo bloqueante de



CD200R1 en el momento de la lesión, se observa un mayor número de neutrófilos a 3 dpl en la médula espinal lesionada. Esta observación podría indicar un defecto inducido por la falta de activación de CD200R1 en la migración de neutrófilos desde y hacia la circulación sanguínea, o en la apoptosis y fagocitosis de estos tipos celulares una vez que cumplen su función en el lugar de la lesión. En este caso, la activación de CD200R1 por CD200-His parece no afectar la población de neutrófilos a los 3 dpl en comparación con la administración de vehículo control, lo que indica que no influye considerablemente en la dinámica de la población de neutrófilos. Un análisis más detallado de su fenotipo y capacidades fagocíticas podría permitir determinar si la activación de CD200R1 no afecta su dinámica temporal, sino que afecta el fenotipo que esta población adquiere.

Considerando todos estos resultados en su conjunto, se puede concluir que al igual que lo observado en otras patologías neuroinflamatorias del SNC, la activación de CD200R1 localmente tiene un efecto atenuante del desarrollo de la patología de la lesión de médula espinal. El efecto positivo de la activación de CD200R1 probablemente sea debido a la disminución de la respuesta inflamatoria localmente en el lugar de la lesión, lo que conlleva a una reducción a largo plazo del daño secundario evidenciado por una mayor supervivencia de neuronas presentes en el tejido medular dañado y por una mejor recuperación de las funciones locomotoras.

### **3. Efecto de la administración intravenosa de agonistas de CD200R1 luego de la lesión medular.**

Teniendo en cuenta el efecto positivo en la recuperación funcional que tuvo la activación de CD200R1 a nivel local en el sitio de la lesión, se planteó evaluar la administración del agonista CD200-His por vía intravenosa con el fin de desarrollar una estrategia terapéutica con mayor relevancia clínica, que sea menos invasiva que la administración dentro del tejido medular. Adicionalmente, dado que cuando se administró CD200-His localmente en el tejido medular se observó un efecto principal en las células residentes de la microglía, se planteó este ensayo para determinar el posible efecto que tiene la activación de CD200R1 en las células del sistema inmune periférico que ingresan al sitio de la lesión en el desarrollo de la patología de la lesión medular. Para continuar con el desarrollo de una estrategia terapéutica que tenga mayor relevancia para la aplicación en la clínica, se decidió comenzar las administraciones intravenosas a las 4 horas post-lesión ya que es un tiempo que consideramos que representa el posible retraso que podría ocurrir desde que sucede la lesión hasta que una persona lesionada puede recibir un diagnóstico, y por lo tanto recibir un tratamiento. Adicionalmente, se decidió realizar tres inyecciones espaciadas en el tiempo en lugar de una única administración a modo de administrar una cantidad considerable de proteína y evitar la saturación de los receptores CD200R1

para maximizar el efecto que pueda tener. A su vez, de esta forma estaríamos actuando sobre las diferentes olas de migración de células sanguíneas hacia el parénquima nervioso.

Contrariamente a lo observado con la administración de CD200-His dentro del tejido medular, la administración de este agonista de CD200R1 por vía intravenosa demostró no tener efecto en la recuperación funcional luego de la contusión medular evaluada con la escala BMS hasta los 28 dpl. Cabe destacar que con la cantidad de proteína recombinante que teníamos disponible y a las concentraciones utilizadas, el tamaño de muestra del grupo experimental de ratones tratados con CD200-His fue reducido (n=4). Por lo tanto, para afirmar con mayor certeza que la administración de CD200-His no tiene efecto en la recuperación funcional, se tendría que aumentar el tamaño de la muestra de este grupo experimental. A pesar de esto, la ausencia de efecto observada podría estar influenciada por numerosos factores que determinan que no ocurran los procesos de neuroprotección a nivel de la lesión, lo que genera que la administración intravenosa de CD200-His no influya en limitar el daño secundario luego de la contusión medular. Una de las posibles causas es que las dosis utilizadas son insuficientes para lograr una mayor activación de CD200R1 y por lo tanto no se está modulando la respuesta inflamatoria. Al haber separado el tratamiento en tres administraciones separadas, se tuvo que utilizar una concentración menor de la proteína en cada administración, por lo que se podría evaluar el efecto de una única administración intravenosa con una concentración mayor de CD200-His para determinar si la falta de efecto observada es debida a que la dosis fue insuficiente.

Se podría considerar que la falta de efecto se deba a que CD200-His no puede atravesar la barrera hematoencefálica y por lo tanto que para lograr una mejora en la recuperación funcional se deba actuar a nivel de la lesión en el SNC. Esto se basa en el hecho de que es altamente improbable que la proteína CD200-His logre atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) en condiciones normales para llegar al SNC. Aún es discutido cuál es el límite máximo de peso molecular de las proteínas que pueden atravesar la BHE por medio de difusión transmembrana, aunque hasta el momento la proteína de mayor peso molecular que se demostró que atraviesa la BHE por difusión es de 7.8 kDa (Banks, 2009). Según la referencia de Sinobiological, empresa que produjo la proteína, CD200-His tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, lo que hace que sea muy improbable que la proteína pueda atravesar la BHE por difusión pasiva. Existen mecanismos alternativos para atravesar la BHE como el transporte activo, endocitosis, y vías extracelulares (Banks, 2009), aunque debido a la conocida estructura de la proteína, resulta improbable que atraviese la BHE por alguno de estos mecanismos. Sin embargo, cabe destacar que se ha demostrado que la integridad de la BHE se ve alterada inclusive desde las 3 horas luego de la lesión de médula espinal por contusión, y recién a los 14 dpl recupera

sus propiedades normales de barrera (Noble & Wrathall, 1989; Sharma, 2003), por lo que una proporción de CD200-His podría ingresar al SNC en el sitio de la lesión. No obstante, gran parte de la proteína administrada por vía intravenosa va actuar a nivel periférico, ya que se va a distribuir en todo el organismo por la circulación sanguínea, aunque no se puede descartar la posibilidad de que luego de la lesión una fracción de la proteína inyectada podría atravesar la BHE y llegar al sitio de la lesión. Teniendo esto en cuenta, CD200-His ejercería su efecto mayoritariamente a nivel del sistema inmune por fuera del SNC, por lo que la falta de efecto observada podría deberse a que se debe modular la respuesta inflamatoria localmente para disminuir la progresión del daño secundario luego de la lesión, en lugar de regular la respuesta inmune global.

Sin embargo, aún se encuentra en discusión si se debe modular la respuesta del sistema inmune a nivel global luego de la lesión medular o si se debería actuar únicamente a nivel de la lesión. Como fue mencionado en la introducción, el tratamiento con metilprednisolona que actúa sobre todo el sistema inmune a nivel global, demostró en modelos animales de lesión de médula espinal que promueve una mejora en la recuperación funcional. Sin embargo, cuando se utilizó en humanos este tratamiento mostró no tener un efecto significativo en la recuperación y por el contrario, demostró generar complicaciones en los pacientes debido a la depresión general del sistema inmune que generó esta droga (Hurlbert, 2000). Recientemente fue desafiada esta visión, ya que fue demostrado en humanos que si se realiza la administración de metilprednisolona antes de las 8 horas luego de la lesión medular, se observa una recuperación levemente mejor en estos pacientes, mientras que no presentaron complicaciones por la depresión general del sistema inmune (Fehlings *et al.*, 2017). Por lo tanto, se planteó que el tratamiento con metilprednisolona debe ser utilizado únicamente si se inicia antes de las 8 horas luego de la lesión. Esto pone de manifiesto la importancia de las ventanas temporales de tratamiento con agentes que modulen la inflamación sistémica y la neuroinflamación.

Siguiendo con el objetivo de desarrollar una estrategia terapéutica basada en la activación de CD200R1 que tenga relevancia clínica, se planteó diseñar una proteína recombinante que permita dirigir la modulación de la respuesta inflamatoria a nivel local en el sitio de la lesión en el SNC, en lugar de modular la respuesta del sistema inmune en todo el organismo. De este modo se puede determinar si la falta de efecto observada con la administración de CD200-His por vía intravenosa se debe a que no actúa modulando la respuesta inflamatoria a nivel del SNC, sino que a nivel global.

Teniendo esto en cuenta, se planteó diseñar una proteína recombinante que se una y active a CD200R1 y que a su vez se concentre en el SNC. Para lograr esto, se planteó utilizar una estrategia

basada en el virus de la rabia, el cual presenta tropismo por el SNC y puede atravesar la BHE y hospedarse en el SNC. El mecanismo exacto por el cual el virus entra al SNC todavía es controversial y sujeto a discusión, aunque la teoría más aceptada es que se une a los receptores de acetilcolina nicotínicos y a la molécula de adhesión celular neural (NCAM), presentes en las sinapsis neuromusculares (Schnell *et al.*, 2010). Se ha propuesto que adicionalmente se requieren de otros receptores desconocidos aún para la entrada a las neuronas. Una vez dentro de la neurona, se libera la cápside y es transportado retrógradamente hacia el soma neuronal. Otra posible vía de entrada propuesta aunque más discutida es a través de la interface neurovascular en el hipotálamo (Preuss *et al.*, 2009), aunque esta alternativa debe ser analizada en mayor detalle. Lo que ha sido ampliamente aceptado es que la glicoproteína del virus de la rabia (RVG: Rabies Virus Glicoprotein) es necesaria para la entrada y expansión del virus a través del SNC (Mebatsion *et al.*, 1996; Eteessami *et al.*, 2000). La estrategia de utilizar un dominio RVG de la proteína para dirigir moléculas hacia el SNC cuando son administradas por vía intravenosa ya fue utilizada con éxito en varios estudios (Kumar *et al.*, 2007; Alvarez-Erviti *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). Por lo tanto, en nuestro laboratorio se planteó diseñar la proteína recombinante CD200-RVG que contiene un dominio de CD200 para activar al receptor CD200R1 y un dominio RVG para atravesar la BHE y concentrarse en el SNC. Bajo esta hipótesis, esta proteína recombinante podría ser la base del desarrollo de una estrategia terapéutica basada en la activación de CD200R1 que sea menos invasiva que la administración de agonistas dentro del tejido de la médula espinal.

Por lo tanto, en primer lugar se decidió evaluar la capacidad que presenta la proteína CD200-RVG de atravesar la BHE cuando es administrada por vía intravenosa en los ratones en condiciones normales cuando la integridad de la BHE es normal. Para ello se inyectaron soluciones con concentraciones crecientes de CD200-RVG y a los 30 minutos los animales fueron perfundidos con PBS para eliminar la sangre de los tejidos y evaluar la presencia de la proteína en el SNC y en otros tejidos periféricos. En una primera instancia se analizaron las muestras mediante la técnica de *Western Blot*, ya que es una técnica que permite realizar una medida semi-cuantitativa de los niveles de una proteína dada en una muestra compleja de proteínas. En estos análisis, los controles positivos permitieron evidenciar que es posible detectar la presencia de la proteína CD200-RVG mediante esta técnica, al menos en las concentraciones analizadas. Sin embargo, a pesar de que se realizaron numerosas pruebas con diferentes concentraciones de anticuerpos primarios, secundarios y de proteína cargada en cada pocillo, no se logró detectar una señal específica de la proteína en las muestras de cerebro y médula espinal. A pesar de que no se mostró en los resultados, adicionalmente se analizaron muestras de tejido de hígado de estos animales, aunque en estas muestras tampoco se pudo evidenciar la

presencia de CD200-RVG. El hecho de que no se pudo detectar la proteína tanto en el SNC como en otros tejidos periféricos por medio de *Western Blot*, nos llevó a considerar que la proteína podría encontrarse en estos tejidos en concentraciones muy bajas y que por lo tanto la sensibilidad de detección de esta técnica en estas condiciones podría no ser suficiente para detectar la presencia de esta proteína en las cantidades a las que se encuentra. Por lo tanto se planteó el uso de la técnica de ELISA, que en algunos casos presenta mayor sensibilidad de detección y podría permitir detectar la presencia de esta proteína en concentraciones muy bajas. Mediante esta técnica se pudo detectar la presencia de esta proteína en un rango alto de concentraciones evidenciado por el alto coeficiente de determinación de la curva estándar, siendo el límite de sensibilidad de 6.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Considerando a ese valor como la mínima concentración que puede ser detectada, para haber podido detectar la proteína en la muestra de cerebro, debería haber ingresado al menos un 0.15% del total de proteína dentro todo el cerebro para el caso del ratón que fue inyectado con 150  $\mu\text{g}$  de CD200-RVG. Sin embargo, el análisis de las muestras de cerebro y otros tejidos periféricos de los ratones inyectados con CD200-RVG por vía intravenosa evidenció que si esta proteína está presente en estos tejidos, se encuentra a concentraciones muy bajas que están por debajo del límite de detección confiable del protocolo de ELISA utilizado. Una de las posibilidades es que la proteína cuando es administrada por vía intravenosa demore más de 30 minutos en entrar a los tejidos, aunque esto resulta improbable debido a lo observado con la administración de sustancias por esta vía (Nishikawa *et al.*, 2000). En otros estudios se observó que a los 30 minutos de ingresar a la circulación sanguínea, gran parte de la proteína administrada ya no se detecta en la sangre, ya que ingresó a los diferentes tejidos o fue excretada en la orina. Para determinar con mayor detalle qué es lo que sucede con la proteína CD200-RVG una vez que ingresa a la circulación sanguínea, se debería analizar la presencia de esta proteína en sangre y en la orina, para describir detalladamente la dinámica de esta proteína en la sangre y evaluar la posibilidad de que sea excretada rápidamente en la orina. Otra de las posibilidades por la cual no se pudo detectar la presencia de la proteína en ninguno de los tejidos analizados, tanto del SNC como en otros tejidos, podría ser que las concentraciones administradas fueron muy bajas, y por lo tanto como se distribuye en todo el cuerpo, se tendría que administrar una concentración mayor de esta proteína para poder detectarla. Teniendo esto en cuenta, no se puede afirmar ni negar que la proteína sea capaz de atravesar la BHE.

A pesar de que no se pudo comprobar que la proteína CD200-RVG sea capaz de atravesar la BHE, se evaluó el efecto de la administración de esta proteína por vía intravenosa luego de la lesión de médula espinal. Se realizó el mismo diseño experimental de administración que con la proteína CD200-His, la cual demostró no tener un efecto en la recuperación funcional a las dosis administradas. Se administró

la misma concentración de proteína de CD200-His y CD200-RVG, y dado que presentan un peso molecular muy similar se puede considerar que las cantidades de proteínas administradas son aproximadamente iguales en ambos casos. El seguimiento funcional de los ratones lesionados e inyectados con CD200-RVG por vía intravenosa demostró que el tratamiento con CD200-RVG a las dosis utilizadas no tiene efecto en la recuperación funcional. La falta de efecto en la recuperación funcional observada luego de la administración intravenosa de los agonistas de CD200R1, podría deberse a que las dosis de proteínas utilizadas hayan sido insuficientes para lograr una activación de CD200R1 que tenga efecto en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, para poder afirmar que no tienen efecto en modular la respuesta inflamatoria, se tendrían que evaluar diferentes parámetros del estado de inflamación del sistema inmune en diferentes tejidos luego de la administración intravenosa de estos agonistas de CD200R1. De este modo, se podría determinar si se está modulando la activación de CD200R1 a nivel del SNC o en los tejidos periféricos con las dosis utilizadas. Otra posibilidad al igual que lo planteado con el CD200-His, es que la proteína CD200-RVG administrada podría estar siendo excretadas hacia la orina rápidamente luego del ingreso a la circulación sanguínea, imposibilitando que lleguen a activar a CD200R1 en los tejidos. Otra de las posibilidades que pueden causar la falta de efecto en la recuperación funcional es que la proteína CD200-RVG se pliegue de manera defectuosa al momento de la producción que generan que el dominio CD200 pueda perder la capacidad de activar al receptor CD200R1, o en la capacidad del dominio RVG de atravesar la BHE. Al agregar el dominio RVG a la secuencia aminoacídica de la proteína recombinante, puede suceder que se den interacciones a medida que la proteína se pliega co-traduccionalmente y que generan que la proteína se pliegue de manera totalmente diferente. Esto puede generar que sitios sujetos a modificaciones post-traduccionales no queden expuestos y por lo tanto no ocurran estas modificaciones post-traduccionales como fosforilaciones, glicosilaciones o metilaciones en aminoácidos específicos, que son necesarias para que la proteína sea funcional. El control del plegamiento y las modificaciones post-traduccionales es extremadamente complejo y difícil al momento de diseñar una proteína recombinante *in silico*.

Para determinar si la falta de efecto observada sea debida a que CD200-RVG es capaz de unirse y activar a CD200R1, se podría analizar si tiene efecto cuando es administrada dentro del tejido de la médula espinal al momento de la lesión, como fue realizado con el CD200-His. De este modo, si se observa un efecto en la recuperación funcional y se observa una modulación de la respuesta inflamatoria por diferentes parámetros, se puede sugerir que esta proteína tiene la capacidad de unirse a CD200R1 y activarlo. A su vez, se puede evaluar su capacidad de activar CD200R1 en cultivos celulares que contengan microglía y determinar si disminuye la reactividad de la microglía frente a

estímulos que promueven su activación como ser el LPS (Hernangómez *et al.*, 2012). Sin embargo, dado que los anticuerpos anti-CD200 utilizados para ELISA sandwich reconocen el CD200-RVG en condiciones nativas, es probable que el dominio CD200 se encuentre activo.

Alternativamente, se puede evaluar el uso de vías de administración diferentes a la intravenosa que son menos invasivas que la administración dentro del tejido medular. Actualmente se está evaluando clínicamente el uso de inhibidores de la enzima Rho como tratamiento para la lesión medular en humanos (Fehlings *et al.*, 2018). En este estudio, el inhibidor VX-210 es administrado por vía extradural, en el que en la médula espinal se coloca tópicamente en la superficie de la duramadre un sellador de fibrina que contiene al inhibidor. Se ha observado que VX-210 difunde a través de las meninges y llega al tejido de la médula espinal, donde ejerce su efecto. Por lo tanto, esta vía de administración extradural sugiere que se pueden desarrollar estrategias poco invasivas para entregar agonistas de CD200R1 hacia el tejido medular lesionado. Otra estrategia utilizada para la administración de agonistas de CD200R1 es por vía intratecal, que demostró ser efectiva en atenuar la reactividad glial y la respuesta inflamatoria en un modelo de dolor neuropático (Hernangómez *et al.*, 2016). Esta vía de administración intratecal es más invasiva que la extratecal ya que se realiza introduciendo una cánula en el espacio subaracnoideo de la cisterna magna. Sin embargo, este procedimiento es utilizado en humanos y no presenta complicaciones mayores, por lo que representa una estrategia viable para el desarrollo de estrategias terapéuticas para la lesión de médula espinal basadas en la activación de CD200R1.

# CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que la interacción entre el receptor CD200R1 y su ligando CD200 tiene un rol fundamental en determinar la progresión del daño secundario luego de una contusión medular. Se demostró que CD200 es expresado constitutivamente en la médula espinal en condiciones normales y que luego de la lesión ocurre una disminución en los niveles de expresión que puede ser la base de una respuesta perjudicial del SNC a la lesión. Al igual que lo que sucede con otras patologías asociadas a procesos neuroinflamatorios, una disminución en la activación de CD200R1 luego de la contusión medular demostró ser perjudicial en la recuperación funcional luego de la lesión asociado a una exacerbación de la respuesta inflamatoria a nivel local en el sitio de la lesión que llevó a una mayor pérdida de mielina y neuronas. Por lo tanto, la interacción entre CD200R1 y su ligando representa un posible blanco sobre el cual actuar para el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a la modulación de la respuesta inflamatoria con el fin de mejorar la recuperación funcional luego de una lesión en la médula espinal. Interesantemente, la activación de CD200R1 a nivel local en el sitio de la lesión demostró promover una mejora en la recuperación funcional asociada a una atenuación en la respuesta inflamatoria local. Esta modulación de la respuesta inflamatoria demostró limitar la progresión del daño secundario que determinó una mayor preservación del tejido nervioso en la médula espinal lesionada. Además, podría existir una ventana temporal para actuar más allá de la inyección en el momento de la lesión. La administración intravenosa de agonistas de CD200R1 demostró no tener efecto en la recuperación funcional, por lo que se debe continuar el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la activación de CD200R1 que sean menos invasivas y tengan mayor aplicación en la clínica.



# PERSPECTIVAS

Debido a los efectos beneficiosos observados por la administración de agonistas de CD200R1 sobre la recuperación funcional luego de una lesión de médula espinal, nos planteamos continuar profundizando en los mecanismos que subyacen a este efecto cuando se da la activación de la vía CD200-CD200R1. Para ello, se plantea la utilización de animales Knock-Out de CD200R1 para analizar en mayor detalle el rol que tiene su activación en la progresión del daño secundario luego de una contusión medular.

Posteriormente, nos planteamos evaluar alternativas terapéuticas diferentes a las analizadas en el presente trabajo. Entre ellas la sobre-expresión de CD200 por medio de terapia génica con vectores lentivirales no integrativos, o también otras proteínas recombinantes que activen a CD200R1 y que puedan llegar al sitio de la lesión.

Por otro lado, nos planteamos evaluar otras vías de administración diferentes a la intravenosa y dentro del tejido medular. Entre ellas se encuentra la administración extratecal, que representa una alternativa muy poco invasiva y también permitiría profundizar en el rol que tiene la inmunidad de las meninges en el desarrollo de los procesos fisiopatológicos de la lesión de médula espinal. La otra vía de administración que se podría evaluar es la intratecal, ya que se ha demostrado que es efectiva para entregar diferentes compuestos al tejido de la médula espinal.

A su vez, se deberá profundizar en la posible ventana terapéutica sobre la cual se puede actuar para promover una mejora en la recuperación funcional por medio de una estrategia terapéutica basada en la activación de CD200R1.

# BIBLIOGRAFÍA

- Akkaya, M., Akin, M.L., Akkaya, B., & Barclay, A.N. (2013) Dissection of Agonistic and Blocking Effects of CD200 Receptor Antibodies. *PLoS One*, **8**.
- Almad, A., Sahinkaya, F.R., & McTigue, D.M. (2011) Oligodendrocyte Fate after Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*, **8**, 262–273.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakkhal, S., & Wood, M.J.A. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.*, **29**, 341–345.
- Amo-Aparicio, J., Martínez-Muriana, A., Sánchez-Fernández, A., & López-Vales, R. (2018) Neuroinflammation Quantification for Spinal Cord Injury. *Curr. Protoc. Immunol.*, 1–15.
- Badner, A., Siddiqui, A.M., & Fehlings, M.G. (2017) Spinal cord injuries: how could cell therapy help? *Expert Opin. Biol. Ther.*, **17**, 529–541.
- Banerjee, D. & Dick, A.D. (2004) Blocking CD200-CD200 receptor axis augments NOS-2 expression and aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in Lewis rats. *Ocul. Immunol. Inflamm.*, **12**, 115–125.
- Banks, W.A. (2009) Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. *BMC Neurol.*, **9**, 5–9.
- Barclay, A.N. (1981) Different reticular elements in rat lymphoid tissue identified by localization of Ia, Thy-1 and MRC OX 2 antigens. *Immunology*, **44**, 727–736.
- Barclay, A.N., Clark, M.J., & McCaughan, G.W. (1986) Neuronal/lymphoid membrane glycoprotein MRC OX-2 is a member of the immunoglobulin superfamily with a light-chain-like structure. *Biochem. Soc. Symp.*, **51**, 149–157.
- Barclay, A.N. & Ward, H.A. (1982) Purification and Chemical Characterisation of Membrane Glycoproteins from Rat Thymocytes and Brain, Recognised by Monoclonal Antibody MRC OX 2. *Eur. J. Biochem.*, **129**, 447–458.
- Bartholdi, D. & Schwab, M.E. (1995) Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. *Brain Res.*, **672**, 177–186.
- Basso, D.M., Fisher, L.C., Anderson, A.J., Jakeman, L.B., Mctigue, D.M., & Popovich, P.G. (2006) Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains. *J. Neurotrauma*, **23**, 635–659.
- Beamer, E., Göloncsér, F., Horváth, G., Bekő, K., Otrókocsi, L., Koványi, B., & Sperlágh, B. (2016) Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*, **104**, 94–104.
- Becerra, J.L., Puckett, W.R., Hiester, E.D., Quencer, R.M., Marcillo, A.E., Post, M.J.D., & Bunge, R.P. (1995) MR-pathologic comparisons of wallerian degeneration in spinal cord injury. *Am. J. Neuroradiol.*, **16**, 125–133.
- Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddel, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I.L., Chang, E.F., Li, G., Grant, G.A., Hayden Gephart, M.G., & Barres, B.A. (2016) New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, E1738–E1746.
- Bradbury, E.J., Khemani, S., Von, R., King, Priestley, J. V, & McMahon, S.B. (1999) NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3873–3883.
- Bradbury, E.J. & McMahon, S.B. (2006) Spinal cord repair strategies: why do they work? *Nat Rev Neurosci*, **7**, 644–653.
- Bradbury, E.J., Moon, L.D.F., Popat, R.J., King, V.R., Bennett, G.S., Patel, P.N., Fawcett, J.W., & McMahon, S.B. (2002) Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature*, **416**, 636–640.

- Bregman, B.S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H.N., Gao, D., & Schwab, M.E. (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature*, **378**, 498–501.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80-. )*, **303**, 1532–1535.
- Broderick, C., Hoek, R.M., Forrester, J. V., Liversidge, J., Sedgwick, J.D., & Dick, A.D. (2002) Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am. J. Pathol.*, **161**, 1669–1677.
- Bunge, M.B. (1994) Transplantation of purified populations of Schwann cells into lesioned adult rat spinal cord. *J. Neurol.*, **242**, S36-9.
- Burnstock, G. (2016) An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology*, **104**, 4–17.
- Buss, A., Pech, K., Kakulas, B.A., Martin, D., Schoenen, J., Noth, J., & Brook, G.A. (2007) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human traumatic spinal cord injury. *BMC Neurol.*, **7**, 17.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doykan, C.E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J.D., Ransohoff, R.M., Gygi, S.P., Antel, J.P., & Weiner, H.L. (2014) Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.*, **17**, 131–143.
- Cannon, J.P., O'Driscoll, M., & Litman, G.W. (2012) Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics*, **64**, 39–47.
- Cassina, P., Peluffo, H., Pehar, M., Martinez-Palma, L., Ressler, A., Beckman, J.S., Estévez, A.G., & Barbeito, L. (2002) Peroxynitrite triggers a phenotypic transformation in spinal cord astrocytes that induces motor neuron apoptosis. *J. Neurosci. Res.*, **67**, 21–29.
- Chakera, A., Bennett, S.C., Morteau, O., Bowness, P., Luqmani, R.A., & Cornall, R.J. (2012) The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin. Dev. Immunol.*, **2012**.
- Chaplin, D.D. (2010) Overview of immune response. *J Allergy Clin Immunol.*, **125**, 41.
- Chen, G., Kim, Y.H., Li, H., Luo, H., Liu, D., Zhang, Z., Lay, M., Chang, W., Zhang, Y., & Ji, R. (2017) PD-L1 inhibits acute and chronic pain by suppressing nociceptive neuron activity via PD-1. *Nat. Publ. Gr.*.
- Chen, Z., Chen, D.-X., Kai, Y., Khatri, I., Lamptey, B., & Gorczynski, R.M. (2008) Identification of an expressed truncated form of CD200, CD200tr, which is a physiologic antagonist of CD200-induced suppression. *Transplantation*, **86**, 1116–1124.
- Chitnis, T., Imitola, J., Wang, Y., Elyaman, W., Chawla, P., Sharuk, M., Raddassi, K., Bronson, R.T., & Khoury, S.J. (2007a) Elevated neuronal expression of CD200 protects Wlds mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *Am. J. Pathol.*, **170**, 1695–1712.
- Chitnis, T., Imitola, J., Wang, Y., Elyaman, W., Chawla, P., Sharuk, M., Raddassi, K., Bronson, R.T., & Khoury, S.J. (2007b) Elevated Neuronal Expression of CD200 Protects Wlds Mice from Inflammation-Mediated Neurodegeneration. *Am. J. Pathol.*, **170**, 1695–1712.
- Clark, M.J., Gagnon, J., Williams, A.F., & Barclay, A.N. (1985) MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *EMBO J.*, **4**, 113–118.
- Cohen, M., Ben-yehuda, H., Porat, X.Z., Raposo, C., Gordon, X.S., & Schwartz, M. (2017) Newly Formed Endothelial Cells Regulate Myeloid Cell Activity Following Spinal Cord Injury via Expression of CD200 Ligand. *J. Neurosci.*, **37**, 972–985.
- Cox, F.F., Berezin, V., Bock, E., & Lynch, M.A. (2013) The neural cell adhesion molecule-derived peptide, FGL, attenuates lipopolysaccharide-induced changes in glia in a CD200-dependent manner. *Neuroscience*, **235**, 141–148.
- Cox, F.F., Carney, D., Miller, A.M., & Lynch, M.A. (2012) CD200 fusion protein decreases microglial activation in the hippocampus of aged rats. *Brain. Behav. Immun.*, **26**, 789–796.
- Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., & Silver, J. (2014) Functional regeneration

- beyond the glial scar. *Exp. Neurol.*, **253**, 197–207.
- Crotti, A. & Ransohoff, R.M. (2016) Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity*, **44**, 505–515.
- David, S., Greenhalgh, A.D., & Kroner, A. (2015) Macrophage and microglial plasticity in the injured spinal cord. *Neuroscience*, **307**, 311–318.
- David, S., Kroner, A., Greenhalgh, A.D., Zarruk, J.G., & López-Vales, R. (2018) Myeloid cell responses after spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.*, **321**, 97–108.
- David, S. & Lacroix, S. (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 411–440.
- David, S., López-Vales, R., & Wee Yong, V. (2012) Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury. potential therapeutic implications. *Handb. Clin. Neurol.*, **109**, 485–502.
- Deckert, M., Sedgwick, J.D., Fischer, E., & Schlüter, D. (2006) Regulation of microglial cell responses in murine Toxoplasma encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. *Acta Neuropathol.*, **111**, 548–558.
- Deczkowska, A., Amit, I., & Schwartz, M. (2018) Microglial immune checkpoint mechanisms. *Nat. Neurosci.*, **21**, 779–786.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018) Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, **173**, 1073–1081.
- Denieffe, S., Kelly, R.J., McDonald, C., Lyons, A., & Lynch, M.A. (2013) Classical activation of microglia in CD200-deficient mice is a consequence of blood brain barrier permeability and infiltration of peripheral cells. *Brain. Behav. Immun.*, **34**, 86–97.
- Donnelly, D.J. & Popovich, P.G. (2008) Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **209**, 378–388.
- Elliott, M.R., Koster, K.M., & Murphy, P.S. (2017) Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J. Immunol.*, **198**, 1387–1394.
- Engelhardt, B. & Sorokin, L. (2009) The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.*, **31**, 497–511.
- Etessami, R., Conzelmann, K.K., Fadai-Ghotbi, B., Natelson, B., Tsiang, H., & Ceccaldi, P.E. (2000) Spread and pathogenic characteristics of a G-deficient rabies virus recombinant: An in vitro and in vivo study. *J. Gen. Virol.*, **81**, 2147–2153.
- Fehlings, M.G., Kim, K.D., Aarabi, B., Rizzo, M., Bond, L.M., McKerracher, L., Vaccaro, A.R., & Okonkwo, D.O. (2018) Rho Inhibitor VX-210 in Acute Traumatic Subaxial Cervical Spinal Cord Injury: Design of the SPinal Cord Injury Rho INhibition InvestiGation (SPRING) Clinical Trial. *J. Neurotrauma*, **35**, 1049–1056.
- Fehlings, M.G., Tetreault, L.A., Wilson, J.R., Aarabi, B., Anderson, P., Arnold, P.M., Brodke, D.S., Burns, A.S., Chiba, K., Dettori, J.R., Furlan, J.C., Hawryluk, G., Holly, L.T., Howley, S., Jeji, T., Kalsi-Ryan, S., Kotter, M., Kurpad, S., Marino, R.J., Martin, A.R., Massicotte, E., Merli, G., Middleton, J.W., Nakashima, H., Nagoshi, N., Palmieri, K., Singh, A., Skelly, A.C., Tsai, E.C., Vaccaro, A., Yee, A., & Harrop, J.S. (2017) A Clinical Practice Guideline for the Management of Patients With Acute Spinal Cord Injury: Recommendation on the Use of Methylprednisolone Sodium Succinate. *Glob. Spine J.*, **7**, 2035–2115.
- Francos-Quijorna, I., Amo-Aparicio, J., Martinez-Muriana, A., & López-Vales, R. (2016) IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury. *Glia*, **64**, 2079–2092.
- Fu, E.S. & Saporta, S. (2005) Methylprednisolone inhibits production of interleukin-1beta and interleukin-6 in the spinal cord following compression injury in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol.*, **17**, 82–85.
- Gaudet, A.D. & Fonken, L.K. (2018) Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics*, **15**, 554–577.
- Ghasemlou, N., Bouhy, D., Yang, J., López-Vales, R., Haber, M., Thuraisingam, T., He, G., Radzioch, D., Ding, A., & David, S. (2010) Beneficial effects of secretory leukocyte protease inhibitor after

- spinal cord injury. *Brain*, **133**, 126–138.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., & Merad, M. (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, **330**, 841–845.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013) Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 1–14.
- Gleiser, C., Wagner, A., Fallier-Becker, P., Wolburg, H., Hirt, B., & Mack, A.F. (2016) Aquaporin-4 in Astroglial Cells in the CNS and Supporting Cells of Sensory Organs-A Comparative Perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**.
- Gorczyński, R.M. (2005) CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **6**, 483–488.
- Gorczyński, R.M., Chen, Z., Kai, Y.Y., Lee, L., Wong, S., & Marsden, P. a. (2004) CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *J. Immunol.*, **172**, 7744–7749.
- GrandPré, T., Li, S., & Strittmatter, S.M. (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature*, **417**, 547–551.
- Griffiths, M.R., Gasque, P., & Neal, J.W. (2009) The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **68**, 217–226.
- Hackett, A.R. & Lee, J.K. (2016) Understanding the NG2 Glial Scar after Spinal Cord Injury. *Front. Neurol.*, **7**, 199.
- Halmannová, D., Koláčková, M., Kondělková, K., Kuneš, P., Krejsek, J., & Andrys, C. (2012) CD200 / CD200R Paired Potent Inhibitory Molecules Regulating Immune and Inflammatory Responses ; part II : CD200 / CD200R Potential Clinical Applications. *Acta Medica (Hradec Kral.)*, 59–65.
- Hametner, S., Wimmer, I., Zrzavy, T., Hametner, S., Wimmer, I., Butovsky, O., Weiner, H.L., & Lassmann, H. (2017) Loss of ' homeostatic ' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis Loss of ' homeostatic ' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis.
- Hayakawa, K., Pham, L.D.D., Seo, J.H., Miyamoto, N., Maki, T., Terasaki, Y., Sakadžić, S., Boas, D., Van Leyen, K., Waeber, C., Kim, K.W., Arai, K., & Lo, E.H. (2015) CD200 restrains macrophage attack on oligodendrocyte precursors via toll-like receptor 4 downregulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **36**, 781–783.
- Hernangómez, M., Klusáková, I., Joukal, M., Hradilová-Sviženská, I., Guaza, C., & Dubový, P. (2016) CD200R1 agonist attenuates glial activation, inflammatory reactions, and hypersensitivity immediately after its intrathecal application in a rat neuropathic pain model. *J. Neuroinflammation*, **13**, 43.
- Hernangómez, M., Mestre, L., Correa, F.G., Loría, F., Mecha, M., Iñigo, P.M., Docagne, F., Williams, R.O., Borrell, J., & Guaza, C. (2012) CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation. *Glia*, **60**, 1437–1450.
- Herz, J., Filiano, A.J., Smith, A., Yogev, N., & Kipnis, J. (2017) Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity*, **46**, 943–956.
- Hoek, R.M. (2000) Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science (80-. )*, **290**, 1768–1771.
- Huang, R., Lan, Q., Chen, L., Zhong, H., Cui, L., Jiang, L., Huang, H., Li, L., Zeng, S., Li, M., Zhao, X., & Xu, F. (2018) CD200Fc Attenuates Retinal Glial Responses and RGCs Apoptosis After Optic Nerve Crush by Modulating CD200/CD200R1 Interaction. *J. Mol. Neurosci.*, **64**, 200–210.
- Hubbard, J.A., Hsu, M.S., Seldin, M.M., & Binder, D.K. (2015) Expression of the Astrocyte Water Channel Aquaporin-4 in the Mouse Brain. *ASN Neuro*, **7**.
- Hurlbert, R.J. (2000) Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg*, **93**, 1–7.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol. Brain Res.*, **57**, 1–9.
- Jalalvand, E., Robertson, B., Tostivint, H., Löw, P., Wallén, P., & Grillner, S. (2018) Cerebrospinal Fluid-

- Contacting Neurons Sense pH Changes and Motion in the Hypothalamus. *J. Neurosci.*, **38**, 7713–7724.
- Jassam, Y.N., Izzy, S., Whalen, M., McGavern, D.B., & El Khoury, J. (2017) Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*, **95**, 1246–1265.
- Jay, T.R., Miller, C.M., Cheng, P.J., Graham, L.C., Bemiller, S., Broihier, M.L., Xu, G., Margevicius, D., Karlo, J.C., Sousa, G.L., Cotleur, A.C., Butovsky, O., Bekris, L., Staugaitis, S.M., Leverenz, J.B., Pimplikar, S.W., Landreth, G.E., Howell, G.R., Ransohoff, R.M., & Lamb, B.T. (2015) TREM2 deficiency eliminates TREM2<sup>+</sup> inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.*, **212**, 287–295.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011) Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.*, **91**, 461–553.
- Koning, N., Swaab, D.F., Hoek, R.M., & Huitinga, I. (2009) Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **68**, 159–167.
- Kos, O., Hughson, R.L., Hart, D.A., Clément, G., Frings-Meuthen, P., Linnarsson, D., Paloski, W.H., Rittweger, J., Wuyts, F., Zange, J., & Gorczynski, R.M. (2013) Elevated serum soluble CD200 and CD200R as surrogate markers of bone loss under bed rest conditions. *Bone*, **60**, 33–40.
- Kretz-Rommel, A. & Bowdsh, K.S. (2008) Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: new concepts in blocking immune suppression. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **8**, 5–15.
- Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Hee Kim, M., Davidson, B.L., Kyung Lee, S., Shankar, P., & Manjunath, N. (2007) Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*, **448**, 39–43.
- Kumar, R., Lim, J., Mekary, R.A., Rattani, A., Dewan, M.C., Sharif, S.Y., Osorio-Fonseca, E., & Park, K.B. (2018) Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurg.*, **113**, e345–e363.
- Kurimoto, T., Yin, Y., Habboub, G., Gilbert, H.-Y., Li, Y., Nakao, S., Hafezi-Moghadam, A., & Benowitz, L.I. (2013) Neutrophils Express Oncomodulin and Promote Optic Nerve Regeneration. *J. Neurosci.*, **33**, 14816–14824.
- Lago, N., Pannunzio, B., Amo-Aparicio, J., López-Vales, R., & Peluffo, H. (2018) CD200 modulates spinal cord injury neuroinflammation and outcome through CD200R1. *Brain. Behav. Immun.*, **73**, 416–426.
- Lee, B.B., Cripps, R.A., Fitzharris, M., & Wing, P.C. (2014) The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: Update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord*, **52**, 110–116.
- Li, Y., Field, P.M., & Raisman, G. (1997) Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*, **277**, 2000–2002.
- Ling, E.A., Kaur, C., & Lu, J. (1998) Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc. Res. Tech.*, **41**, 43–56.
- Liu, Y., Bando, Y., Vargas-Lowy, D., Elyaman, W., Khoury, S.J., Huang, T., Reif, K., & Chitnis, T. (2010) CD200R1 Agonist Attenuates Mechanisms of Chronic Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *J. Neurosci.*, **30**, 2025–2038.
- Liu, Y., Kim, D., Himes, B.T., Chow, S.Y., Schallert, T., Murray, M., Tessler, A., & Fischer, I. (1999) Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *J. Neurosci.*, **19**, 4370–4387.
- Loh, K.H., Stawski, P.S., Draycott, A.S., Udeshi, N.D., Lehrman, E.K., Wilton, D.K., Svinkina, T., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Stevens, B., Carr, S.A., & Ting, A.Y. (2016) Proteomic Analysis of Unbounded Cellular Compartments: Synaptic Clefts. *Cell*, **166**, 1295–1307.e21.
- Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., & Tuszynski, M.H. (2003) Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **181**, 115–129.

- Lyons, A., Downer, E.J., Costello, D.A., Murphy, N., & Lynch, M.A. (2012) Dok2 mediates the CD200Fc attenuation of A $\beta$ -induced changes in glia. *J. Neuroinflammation*, **9**, 1.
- Lyons, A., Minogue, A.M., Jones, R.S., Fitzpatrick, O., Noonan, J., Campbell, V.A., & Lynch, M.A. (2017) Analysis of the Impact of CD200 on Phagocytosis. *Mol. Neurobiol.*, **54**, 5730–5739.
- Manich, G., Recasens, M., Valente, T., Almolda, B., González, B., & Castellano, B. (2018) Role of the CD200-CD200R axis during homeostasis and neuroinflammation. *Neuroscience*,.
- Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H., & Ohnishi, H. (2009) Functions and molecular mechanisms of the CD47–SIRP $\alpha$  signalling pathway. *Trends Cell Biol.*, **19**, 72–80.
- Mebatsion, T., König, M., & Conzelmann, K.K. (1996) Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell*, **84**, 941–951.
- Meuth, S.G., Simon, O.J., Grimm, A., Melzer, N., Herrmann, A.M., Spitzer, P., Landgraf, P., & Wiendl, H. (2008) CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J. Neuroimmunol.*, **194**, 62–69.
- Mihrshahi, R., Barclay, A.N., & Brown, M.H. (2009) Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. *J. Immunol.*, **183**, 4879–4886.
- Mihrshahi, R. & Brown, M.H. (2010) Downstream of tyrosine kinase 1 and 2 play opposing roles in CD200 receptor signaling. *J. Immunol.*, **185**, 7216–7222.
- Mullen, R.J., Buck, C.R., & Smith, A.M. (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, **116**, 201–211.
- Nathan, P.W., Smith, M., & Deacon, P. (1996) Vestibulospinal, reticulospinal and descending propriospinal nerve fibres in man. *Brain*, **119**, 1809–1833.
- Nesic, O., Guest, J.D., Zivadinovic, D., Narayana, P.A., Herrera, J.J., Grill, R.J., Mokkalapati, V.U.L., Gelman, B.B., & Lee, J. (2010) Aquaporins in spinal cord injury: the janus face of aquaporin 4. *Neuroscience*, **168**, 1019–1035.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-. )*, **308**, 1314–1318.
- Nishikawa, M., Yamauchi, M., Morimoto, K., Ishida, E., Takakura, Y., & Hashida, M. (2000) Hepatocyte-targeted in vivo gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system. *Gene Ther.*, **7**, 548–555.
- Noble, L.J. & Wrathall, J.R. (1989) Distribution and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res.*, **482**, 57–66.
- Ojo, B., Rezaie, P., Gabbott, P.L., Davies, H., Colyer, F., Cowley, T.R., Lynch, M., & Stewart, M.G. (2012) Age-related changes in the hippocampus (loss of synaptophysin and glial-synaptic interaction) are modified by systemic treatment with an NCAM-derived peptide, FGL. *Brain. Behav. Immun.*, **26**, 778–788.
- Orr, M.B. & Gensel, J.C. (2018) Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics*, **15**, 541–553.
- Orts-Del'Immagine, A., Trouslard, J., Airault, C., Hugnot, J.P., Cordier, B., Doan, T., Kastner, A., & Wanaverbecq, N. (2017) Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons. *Neuroscience*, **343**, 39–54.
- Oudega, M. & Hagg, T. (1996) Nerve Growth Factor Promotes Regeneration of Sensory Axons into Adult Rat Spinal Cord. *Exp. Neurol.*, **140**, 218–229.
- Pankratova, S., Bjornsdottir, H., Christensen, C., Zhang, L., Li, S., Dmytriyeva, O., Bock, E., & Berezin, V. (2016) Immunomodulator CD200 Promotes Neurotrophic Activity by Interacting with and Activating the Fibroblast Growth Factor Receptor. *Mol. Neurobiol.*, **53**, 584–594.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., & Gan, W.B. (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, **155**, 1596–1609.
- Petracca, Y.L., Sartoretti, M.M., Di Bella, D.J., Marin-Burgin, A., Carcagno, A.L., Schinder, A.F., & Lanuza, G.M. (2016) The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord. *Development*, **143**, 880–891.

- Pocock, J.M. & Kettenmann, H. (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci.*, **30**, 527–535.
- Prendergast, C.T. & Anderton, S.M. (2009) Immune cell entry to central nervous system-current understanding and prospective therapeutic targets. *Endocr. Metab. immune Disord. drug targets*, **9**, 315–327.
- Preston, S., Wright, G.J., Starr, K., Barclay, A.N., & Brown, M.H. (1997) The leukocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages. *Eur. J. Immunol.*, **27**, 1911–1918.
- Preuss, M.A.R., Faber, M.L., Tan, G.S., Bette, M., Dietzschold, B., Weihe, E., & Schnell, M.J. (2009) Intravenous inoculation of a bat-associated rabies virus causes lethal encephalopathy in mice through invasion of the brain via neurosecretory hypothalamic fibers. *PLoS Pathog.*, **5**.
- Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., & Ransohoff, R.M. (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.*, **14**, 1227–1235.
- Profyris, C., Cheema, S.S., Zang, D.W., Azari, M.F., Boyle, K., & Petratos, S. (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol. Dis.*, **15**, 415–436.
- Qiu, J., Cai, D., Dai, H., McAtee, M., Hoffman, P.N., Bregman, B.S., & Filbin, M.T. (2002) Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron*, **34**, 895–903.
- Ransohoff, R.M. & Perry, V.H. (2009) Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 119–145.
- Rijkers, E.S.K., de Ruiter, T., Baridi, A., Veninga, H., Hoek, R.M., & Meyaard, L. (2008) The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol. Immunol.*, **45**, 1126–1135.
- Rygiel, T.P. & Meyaard, L. (2012) CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. *Curr. Opin. Immunol.*, **24**, 233–238.
- Rygiel, T.P., Rijkers, E.S.K., de Ruiter, T., Stolte, E.H., van der Valk, M., Rimmelzwaan, G.F., Boon, L., van Loon, A.M., Coenjaerts, F.E., Hoek, R.M., Tesselaar, K., & Meyaard, L. (2009) Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *J. Immunol.*, **183**, 1990–1996.
- Saghazadeh, A. & Rezaei, N. (2017) The role of timing in the treatment of spinal cord injury. *Biomed. Pharmacother.*, **92**, 128–139.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., & Stevens, B. (2012) Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, **74**, 691–705.
- Schafer, D.P. & Stevens, B. (2013) Phagocytic glial cells: Sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **23**, 1034–1040.
- Schäfer, M., Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M., & Martini, R. (1996) Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. *Neuron*, **16**, 1107–1113.
- Schenkel, J.M. & Masopust, D. (2014) Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity*, **41**, 886–897.
- Schnell, M.J., McGettigan, J.P., Wirblich, C., & Papaneri, A. (2010) The cell biology of rabies virus: Using stealth to reach the brain. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 51–61.
- Sharma, H.S. (2003) Pathophysiology of the Blood-Spinal Cord Barrier in Traumatic Injury. *Blood-Spinal Cord Brain Barriers Heal. Dis.*, 437–518.
- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., Rolls, A., Mack, M., Pluchino, S., Martino, G., Jung, S., & Schwartz, M. (2009) Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.*, **6**, e1000113.
- Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., Kim, K.-W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., Lira, S.A., Jung, S., & Schwartz, M. (2013) Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*, **38**, 555–569.
- Shrivastava, K., Gonzalez, P., & Acarin, L. (2012) The immune inhibitory complex CD200/CD200R is developmentally regulated in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.*, **520**, 2657–2675.



- Singh, A., Falk, M.K., Hviid, T.V.F., & Sørensen, T.L. (2013) Increased Expression of CD200 on Circulating CD11b+ Monocytes in Patients with Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, **120**, 1029–1037.
- Singh, A., Tetreault, L., Kalsi-Ryan, S., Nouri, A., & Fehlings, M.G. (2014) Global Prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin. Epidemiol.*, **6**, 309–331.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., & Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76–85.
- Snelgrove, R.J., Goulding, J., Didierlaurent, A.M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., Gwyer, E., Sedgwick, J.D., Barclay, A.N., & Hussell, T. (2008) A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat. Immunol.*, **9**, 1074–1083.
- Sofroniew, M. V (2014) Astroglia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a020420.
- Sonnenberg, G.F. & Artis, D. (2015) Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat. Med.*, **21**, 698–708.
- Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A.M., Lambris, J.D., Smith, S.J., John, S.W.M., & Barres, B.A. (2007) The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*, **131**, 1164–1178.
- Thuret, S., Moon, L.D.F., & Gage, F.H. (2006) Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 628–643.
- Valente, T., Serratos, J., Perpiñá, U., Saura, J., & Solà, C. (2017) Alterations in CD200-CD200R1 System during EAE Already Manifest at Presymptomatic Stages. *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 1–15.
- Varnum, M.M., Kiyota, T., Ingraham, K.L., Ikezu, S., & Ikezu, T. (2015) The anti-inflammatory glycoprotein, CD200, restores neurogenesis and enhances amyloid phagocytosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*, **36**, 2995–3007.
- Voehringer, D., Rosen, D.B., Lanier, L.L., & Locksley, R.M. (2004) CD200 receptor family members represent novel DAP12-associated activating receptors on basophils and mast cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 54117–54123.
- Walker, D.G., Dalsing-hernandez, J.E., Campbell, N.A., & Lue, L. (2009) Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: A potential mechanism leading to chronic inflammation Douglas. *Exp. Neurol.*, **215**, 5–19.
- Walker, D.G. & Lue, L.-F. (2013) Understanding the neurobiology of CD200 and the CD200 receptor: a therapeutic target for controlling inflammation in human brains? *Futur. Neurol*, **8**, 997–1003.
- Waller, A. (1850) Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philos. Trans. R. Soc. London*, **140**, 423–429.
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., & Sofroniew, M. V (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, **33**, 12870–12886.
- Warrington, R., Watson, W., Kim, H.L., & Antonetti, F. (2011) An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma Clin. Immunol.*, **7**, S1.
- Watson, C. & Harrison, M. (2012) The Location of the Major Ascending and Descending Spinal Cord Tracts in all Spinal Cord Segments in the Mouse: Actual and Extrapolated. *Anat. Rec.*, **295**, 1692–1697.
- Webb, M. & Barclay, A.N. (1984) Localisation of the MRC OX-2 Glycoprotein on the Surfaces of Neurones. *J. Neurochem.*, **43**, 1061–1067.
- Wohleb, E.S. (2016) Neuron-microglia interactions in mental health disorders: “For better, and for worse.” *Front. Immunol.*, **7**, 1–13.
- Wolf, H.K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P.K., Pietsch, T., Wiestler, O.D., & Blümcke, I. (1996) NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J. Histochem.*

*Cytochem.*, **44**, 1167–1171.

- Wong, K.K., Brenneman, F., Chesney, A., Spaner, D.E., & Gorczynski, R.M. (2012) Soluble CD200 is critical to engraft chronic lymphocytic leukemia cells in immunocompromised mice. *Cancer Res.*, **72**, 4931–4943.
- Wright, G.J., Cherwinski, H., Foster-Cuevas, M., Brooke, G., Puklavec, M.J., Bigler, M., Song, Y., Jenmalm, M., Gorman, D., McClanahan, T., Liu, M.-R., Brown, M.H., Sedgwick, J.D., Phillips, J.H., & Barclay, A.N. (2003) Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J. Immunol.*, **171**, 3034–3046.
- Wright, G.J., Jones, M., Puklavec, M.J., Brown, M.H., & Barclay, A.N. (2001) The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology*, **102**, 173–179.
- Wright, G.J., Puklavec, M.J., Willis, A.C., Hoek, R.M., Sedgwick, J.D., Brown, M.H., & Barclay, A.N. (2000) Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity*, **13**, 233–242.
- Xiang, L., Zhou, R., Fu, A., Xu, X., Huang, Y., & Hu, C. (2011) Targeted delivery of large fusion protein into hippocampal neurons by systemic administration. *J. Drug Target.*, **19**, 632–636.
- Yeh, F.L., Hansen, D. V., & Sheng, M. (2017) TREM2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol. Med.*, **23**, 512–533.
- Yi, M.-H., Zhang, E., Kang, J.W., Shin, Y.N., Byun, J.Y., Oh, S.-H., Seo, J.H., Lee, Y.H., & Kim, D.W. (2012) Expression of CD200 in alternative activation of microglia following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Brain Res.*, **1481**, 90–96.
- Yi, M.-H., Zhang, E., Kim, J.-J., Baek, H., Shin, N., Kim, S., Kim, S.R., Kim, H.-R., Lee, S.J., Park, J.B., Kim, Y., Kwon, O.-Y., Lee, Y.H., Oh, S.-H., & Kim, D.W. (2016) CD200R/Foxp3-mediated signalling regulates microglial activation. *Sci. Rep.*, **6**, 34901.
- Yick, L.W., Cheung, P.T., So, K.F., & Wu, W. (2003) Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC. *Exp. Neurol.*, **182**, 160–168.
- Zhang, S., Cherwinski, H., Sedgwick, J.D., & Phillips, J.H. (2004) Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J. Immunol.*, **173**, 6786–6793.
- Zhang, S., Wang, X.-J., Tian, L.-P., Pan, J., Lu, G.-Q., Zhang, Y.-J., Ding, J.-Q., & Chen, S.-D. (2011) CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation*, **8**, 154.
- Zhao, R.R. & Fawcett, J.W. (2013) Combination treatment with chondroitinase ABC in spinal cord injury - Breaking the barrier. *Neurosci. Bull.*, **29**, 477–483.