



Universidad de la República
Facultad de ciencias



Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Caracterización de la función del receptor CD300f en el mantenimiento de la homeostasis del SNC y su papel durante la neuroinflamación post-traumática.

M^o LUCIANA NEGRO DEMONTEL

Orientador: Hugo Peluffo, PhD

Co-orientador: Joan Sayós, PhD, UAB, Barcelona.

Tribunal: Raúl Russo, Nathalia Vitoreira, Mercedes Segovia

Montevideo, Uruguay

Marzo de 2018

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título: Caracterización de la función del receptor CD300f en el mantenimiento de la homeostasis del SNC y su papel durante la neuroinflamación post-traumática.

Autora: Luciana Negro

Tutor: Dr. Hugo Peluffo

Co-tutor: Dr Joan Sayós

Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas

Puntaje: Aprobado con mención

Tribunal:

Profesor

Dr. Raúl Russo.....

Profesor

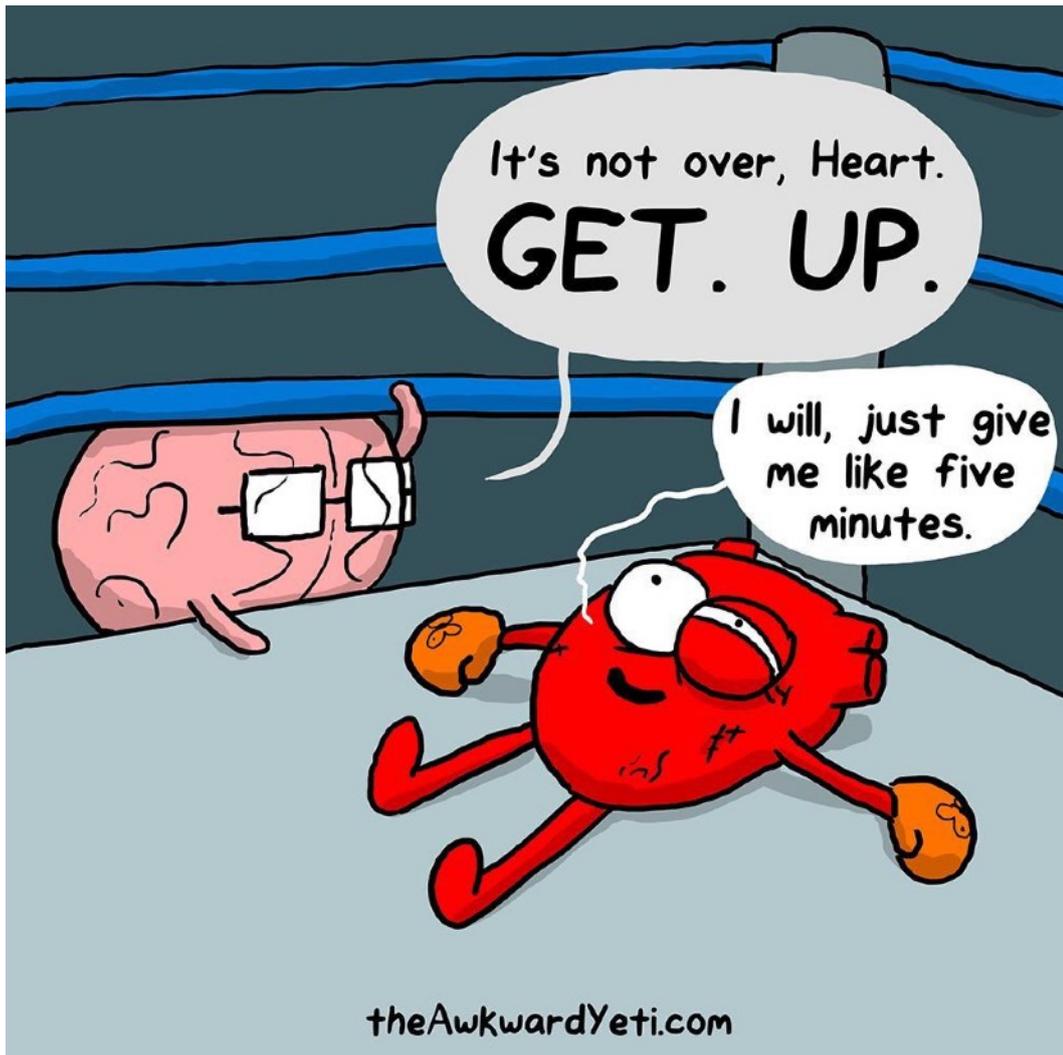
Dra.Nathalia Vituraira.....

Profesor

Dra. Mercedes Segovia.....

Montevideo, 21/03/2018

A los genios de mis padres...



AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a los miembros del tribunal por disponer de su tiempo para corregir mi trabajo.

A Hugo por confiar siempre en mi y ayudarme en este proceso de crecimiento profesional y humano. Por apoyarme y ayudarme a abrir puertas, por ser mi mentor hace tantos años y enseñarme lo que es la ciencia.

A Joan, un gran científico con quien también aprendí mucho y me hizo sentir parte de su laboratorio en Barcelona desde la primera vez que entré, hace ya muchos años.

A Dorian y los miembros de su laboratorio en el NIH, que me integraron, enseñaron y ayudaron a realizar los maravillosos experimentos de dos fotones. Por el voto de confianza para empezar una nueva etapa en mi carrera.

A mis compañeros de laboratorio. A Andrés, mi primer estudiante de grado, quien colaboró con la realización de varios de los experimentos aquí expuestos. Daniela, con quien compartimos muchas charlas y experimentos. Fernanda, quien realizó los tests comportamentales específicos. Natalia, quien colaboró con la descripción de varios de los genes aquí mencionados y siempre tuvo buena disposición para aconsejar y tener charlas críticas sobre mi proyecto. A Bruno, quien siempre está dispuesto a ofrecer una mano si alguien la necesita. A Monique con quien compartimos la realización de un artículo aquí citado. A mi gran amigo y colaborador Pavol Genzor, quien me sacó de muchos

apuros durante mi estadía en el NIH, y me acompañó a la distancia durante todo este proceso de escritura, aconsejando y ayudándome en el pensamiento crítico y exposición de resultados, y quien además de realizar los hermosos heatmap, colaboró con los modelos aquí expuestos. A mis amigos, Sole, Dani, Andy, Elena, Paty, Diego, Tiziano, Agus, Mari, Nico, por estar siempre pendientes en mis momentos de encierro, y acompañarme en los otros.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto Pasteur y de la cátedra de Histología de la Facultad de Medicina, con quienes siempre pude contar cuando necesité algo. A la Pata, quien también colaboró en mi formación científica y docente y dejó las puertas abiertas para mi retorno. A Ernesto, Seba, Laura y Vale, los cuales me han soportado todos estos años, casi siempre con una sonrisa.

Y sobretodo a mi familia.

A mis sobrinos queridos que siempre me llenan de alegría y orgullo. A mi hermana y amiga que nunca me deja caer. A Juan, que no podía haber encontrado un hermano mejor. A mi querida abuela Laura que tan orgullosa de mi estaría.

A mis padres, amigos incondicionales y compañeros de vida, que siempre creyeron en mi y me dieron para adelante en las buenas y en las no tan buenas, brindándome todo su apoyo y confianza a lo largo de todo este proceso y mucho más. Sin ellos no hubiese llegado hasta acá.

Los voy a extrañar a todos!!

Gracias!!

Tabla de contenido

PÁGINA DE APROBACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	v
Tabla de contenido	vii
RESUMEN	x
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 La microglía	4
1.1.1 Origen	4
1.1.2 Métodos de estudio	5
1.1.3 Dinámica microglial	9
1.1.4 Fenotipos microgliales	11
1.1.5 Funciones Homeostáticas	14
i) Muerte neuronal	14
ii) Supervivencia neuronal y neurogénesis	18
iii) Homeostasis sináptica	19
1.1.6 Funciones fisiopatológicas	22
i) El concepto de Neuroinflamación	22
ii) Neuroinflamación aguda	22
Infecciones bacterianas:	22
Daño mecánico:	24
iii) Neuroinflamación crónica	28
Enfermedades neurodegenerativas:	28
Desórdenes Psiquiátricos:	29
1.1.7 Comunicación con el entorno	32
Marcadores moleculares	35
i) Receptores de reconocimiento de señales	36
ii) Receptores ITAM/ITIM	40
iii) Receptores y señales de “cómeme”	42
iv) Receptores y señales de “no me comas”	46
v) La microglía como APC	47
vi) Receptores para neurotransmisores	47
vii) Citoquinas (y quimioquinas)	48
1.1.8 El paradigma “M1-M2”	50
1.2 La familia de receptores CD300	54
1.2.1 Receptores Inhibitorios	57
1.2.2 CD300 y fagocitosis	59
1.2.3 CD300f en patologías	60
1.2.4 CD300f en el SNC	61
1.3 Lesiones agudas del SNC: Trauma Encéfalo-craneano	66
1.3.1 Epidemiología del trauma	69
1.3.2 Modelos animales	71
i) Trauma severo	72
ii) Trauma moderado	72

1.3.3 Respuesta neuroinflamatoria post-traumática	73
i) Neuroinflamación Aguda	75
DAMPs	75
Excitotoxicidad mediada por Glutamato	76
Disfunción mitocondrial	77
Daño vascular	78
Respuesta celular	79
ii) Neuroinflamación crónica	84
1.3.4 Neuromodulación: blancos terapéuticos	87
1.4 Objetivos	89
1.5 Hipótesis	90
Capítulo II	91
MATERIALES Y MÉTODOS	91
2.1 Modelos Animales	92
2.1.1 Modelos de Trauma encéfalo-craneano (TEC):	92
i) Trauma moderado - mTBI	92
ii) Trauma severo - Impactor cortical controlado (CCI)	95
2.1.2 Inoculación repetitiva de LPS	97
2.1.3 Modelo de envejecimiento	98
2.4 Análisis comportamentales	99
i) Test del Parallel Rod Floor	99
ii) Test de campo abierto	100
iii) “Splash test” con sacarosa	100
iv) Test de suspension por la cola	101
v) “Marble burying test”	101
2.2 Análisis histológicos	103
2.2.1 Histología clásica	103
2.2.2 Inmunohistoquímica	105
2.2.3 Preparados de meninges enteras	105
2.2.4 Microscopía	106
i) Análisis por microscopía de epifluorescencia	106
iii) Análisis por microscopía óptica.	107
iv) Análisis por microscopía confocal	107
v) Análisis in vivo por microscopía de 2 fotones (2P)	107
2.3 Análisis de la expresión génica	108
2.3.1 Preparación de muestras y cuantificación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)	108
i) Purificación del ARNm	109
ii) Retrotranscripción	110
iii) Amplificación	110
2.4 Softwares	111
2.5 Análisis Estadísticos	112
Anexo	113
CAPÍTULO III	115
RESULTADOS	115

3.1	Papel del receptor CD300f en la fisiología normal del SNC.....	116
3.1.1	Análisis comportamentales de los animales CD300f KO	116
3.1.2	Estudios fenotípicos de la microglía naïve en animales CD300f KO:	123
	i) Análisis histológicos de la microglía CD300f KO	123
	ii) Firma molecular de la microglía CD300f KO naïve.....	128
	iii) Dinámica microglial in vivo por microscopía 2P.....	138
3.2	CD300f en la neuroinflamación.....	140
3.2.1	Tratamiento con LPS	140
	i) Análisis de marcadores de la inflamación luego de la inyección de LPS.....	148
3.2.2	Papel del receptor CD300f en el trauma moderado - mTBI...	152
	i) Visualización de la microglía post-traumática en el modelo mTBI 153	
	ii) Análisis de la inflamación a nivel de las meninges	162
3.2.3	Estudios del trauma a largo plazo.....	170
	i) Puesta a punto del Modelo CCI-Test del Parallel Rod Floor ..	170
3.2.4	Papel del receptor CD300f en el modelo de trauma severo - CCI	177
	i) Análisis comportamentales.....	177
	ii) Análisis histológicos	182
	iii) Análisis moleculares.....	186
3.3	Experimentos en marcha	199
3.3.1	CD300f en el envejecimiento	199
CAPÍTULO IV		204
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES		204
4.1	Papel del receptor CD300f en condiciones fisiológicas	206
4.2	Papel del receptor CD300f en un modelo de trauma severo	223
4.3	Conclusiones	239
ABREVIACIONES		241
BIBLIOGRAFÍA.....		242

RESUMEN

La regulación del fenotipo microglial ha cobrado gran importancia en el campo de la neurociencia en los últimos años. Los avances en las tecnologías de visualización, aislamiento y análisis transcriptómicos han brindado herramientas fundamentales para la identificación de moléculas clave para la regulación del fenotipo microglial, tanto en condiciones homeostáticas como asociado a patologías. Recientemente se han caracterizado varias de estas moléculas enriquecidas en la fracción microglial dentro del cerebro, que le permiten a la microglía cumplir sus funciones fisiológicas normales definiendo el fenotipo homeostático, así como la des-regulación de otras moléculas que las dirigen hacia un fenotipo patológico o DAM (*disease associated microglia*) en varias condiciones neurodegenerativas.

Por otra parte, el estudio de inmuno-receptores presentes en la membrana microglial tales como TREM2 (del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) y Siglec E y su asociación con el desarrollo de distintas patologías como la enfermedad de Alzheimer (AD) y Nasu-Hakola o durante el envejecimiento, han resaltado la importancia de estas moléculas en la regulación de la función microglial.

En este sentido, la familia de receptores activadores/inhibitorios CD300 expresados principalmente en la membrana de células mieloides posee roles importantes en varios modelos de enfermedades tales como lupus,

EAE (del inglés *experimental autoimmune encephalomyelitis*), alergia o colitis entre otras. Varios miembros de esta familia interactúan con moléculas adaptadoras como DAP12 que les permiten mediar señales activadoras, mientras que otros como CD300a presentan funciones inhibitorias. Por su parte, CD300f funciona como un receptor dual, ya que es capaz de desencadenar señales tanto inhibitorias mediante el reclutamiento de fosfatasas SHP1/SHP2 (del inglés *Src-homology 2 domain (SH2)-containing protein tyrosine phosphatases 1 y 2*), como activadoras por su interacción con la PI3K (fosfatidilinositol 3 kinasa), FcγR2 o Grb2. Sin embargo, el papel de CD300f en la dinámica microglial *in vivo* en condiciones fisiológicas o patológicas no ha sido aún dilucidado.

En este trabajo mostramos que la deficiencia en CD300f conlleva a desórdenes comportamentales que se relacionan con patologías de tipo depresivas u obsesivo compulsivas. Además, estos animales poseen un aumento significativo en el número de células microgliales, y éstas presentan un fenotipo homeostático levemente alterado, si bien tampoco adquieren el característico fenotipo DAM. Mediante un modelo de trauma moderado (mTBI) utilizando microscopía de dos fotones (2P) pudimos corroborar que la función fagocítica microglial *in vivo* se encuentra disminuida, lo cual podría explicar las deficiencias comportamentales observadas en condiciones basales. Sin embargo, utilizando un modelo de neuroinflamación “limpio” basado en la inyección repetitiva con LPS

observamos que los cerebros de estos animales no presentan un perfil más pro-inflamatorio, contrario a lo que se observa a nivel periférico.

Para analizar su papel en la respuesta en condiciones inflamatorias más severas utilizamos un modelo de trauma cerebral por impacto cortical controlado (CCI). Observamos que los animales CD300f KO presentan una alteración en el patrón comportamental a corto y largo plazo, con un aumento en la ataxia generada a raíz del trauma. Sin embargo, estos animales muestran una reducción en la pérdida de tejido cerebral a largo plazo comparados con Wt. Análisis transcriptómicos en la fase aguda de la respuesta post traumática mostraron escasos cambios a nivel de la respuesta pro-inflamatoria, pero alteraciones importantes en los niveles de expresión de moléculas relacionadas con la regulación de la función microglial fagocítica en los animales KO. Esto podría representar errores en el podado sináptico/sinaptofagia capaces de explicar las deficiencias motoras observadas.

Los resultados aquí obtenidos colocarían a CD300f como un actor clave en la regulación del fenotipo microglial homeostático en condiciones basales y en la promoción de un estado pro-reparador luego de un trauma.

Palabras clave: microglía; fenotipo homeostático; neuroinflamación; inmuno-receptores, fagocitosis; fagoptosis; sinaptofagia; depresión; trauma encéfalo-craneano.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso central (SNC) ha sido históricamente considerado como un órgano inmuno-privilegiado, tanto por carecer de drenaje linfático como por su reducida capacidad de presentación de antígenos. Por otra parte, la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE) que limita el acceso de componentes sanguíneos al parénquima cerebral reforzó esta idea. Sin embargo, hoy en día se sabe que esto no es del todo cierto (1, 2). El SNC contiene nichos específicos como los plexos coroideos, las meninges y los espacios perivascuales, los cuales poseen células inmunes innatas -macrófagos y células dendríticas- capaces de orquestar potentes respuestas inflamatorias, mientras que las responsables de la inmunidad innata en el parénquima nervioso son las células microgliales (figura 1.1). En condiciones fisiológicas estas últimas se encuentran en un estado clásicamente denominado “quiescente” en comparación con macrófagos específicos de otros tejidos. Estas son capaces de responder a estímulos inflamatorios como daño, isquemia o infecciones mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento y/o fagocitosis (3). Además, recientemente se descubrió que el SNC posee un sistema de drenaje linfático a través de vasos situados en las meninges, los cuales sensan los componentes del líquido céfalo-raquídeo (LCR) (4). Asimismo, este sistema se asocia fuertemente con el espacio perivascular, los ventrículos y espacio subaracnoideo para conformar el sistema glinfático, capaz de barrer o limpiar el parénquima del SNC durante el sueño (5).

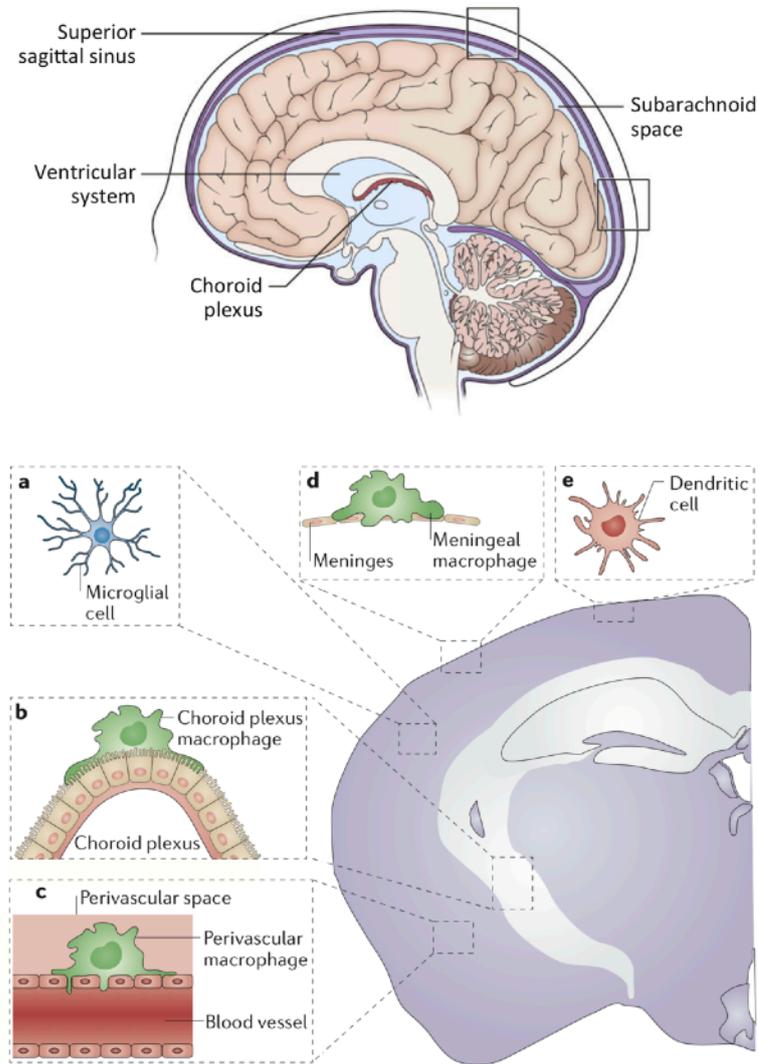


Figura 1.1_ Esquema representativo de cerebro y meninges: nichos de células inmunes. En condiciones homeostáticas, el cerebro posee poblaciones heterogéneas de células mieloides que se localizan en distintas regiones donde ejecutan sus funciones vigilantes y homeostáticas. En el parénquima nervioso, la microglía **(a)** con sus finos procesos monitorea activamente el espacio intraneuronal de posibles amenazas, mientras que los macrófagos pueden ser encontrados en los límites exteriores del cerebro, como plexo coroideo **(b)**, el espacio perivascular **(c)** y las meninges **(d)**. Las células dendríticas derivadas de la sangre **(e)** se encuentran presentes en bajos números en las mismas regiones que macrófagos. *Modificado de Russo & McGavern, Trends in Immunology 2015, y Prinz & Priller, Nat Rev Neuroscience 2014.*

1.1 La microglía

1.1.1 Origen

Las células microgliales son un tipo de célula glial que se encuentra a lo largo del SNC, tanto en cerebro como en médula espinal y la retina. Estas fueron identificadas originalmente por Franz Nissl en 1899 como “células en forma de bastón” y clasificadas más tarde por Pío del Río Hortega en el año 1919, considerado el padre de la microglía, a quien debemos su nombre (6, 7).

Pese a que su origen ha sido ampliamente discutido, estudios de determinación de destino celular han demostrado que las células microgliales se originan durante el desarrollo embrionario a partir de precursores mieloides tempranos localizados en el saco vitelino (figura 1.2), los cuales migran hacia el tubo neural en desarrollo, proliferan y colonizan el parénquima nervioso (8). Estas células subsisten durante toda la vida del individuo dividiéndose lentamente, a diferencia del resto de los macrófagos del organismo, los cuales se originan a partir de precursores mieloides presentes en la médula ósea y poseen una rápida tasa de renovación (7-10).

Las células microgliales constituyen cerca del 10% del total de células del SNC y corresponden a los fagocitos mononucleares más abundantes del mismo, siendo las principales efectoras del sistema inmune dentro del

SNC. Están involucradas en la ejecución de la inmunidad innata y participan también en respuestas adaptativas, siendo capaces de responder a todo tipo de daño o lesión mediante cambios morfológicos y transformaciones funcionales, aunque también cumplen funciones clave el mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso, el neurodesarrollo y la plasticidad sináptica (10, 11). Se caracterizan por poseer un pequeño soma y escaso espacio perinuclear, cubierto por una gran cantidad de finos procesos muy ramificados. Son células capaces de auto renovarse y presentan resistencia a la radiación (12). Estas células funcionan como sensores de señales bioquímicas relacionadas con cambios en su microambiente. Si bien la visión más clásica sobre este tipo celular postula que en respuesta a estímulos inflamatorios como trauma, isquemia o infecciones cambian hacia un estado reactivo, el cual se ve reflejado en cambios fenotípicos que incluyen variaciones morfológicas y de patrones de expresión génica, contribuyendo de esta manera a la defensa y regeneración del tejido nervioso (13, 14), actualmente se sabe que adicionalmente cumplen un rol clave en el funcionamiento del SNC en condiciones fisiológicas como veremos más adelante.

1.1.2 Métodos de estudio

Dada la complejidad de interconexiones del sistema nervioso, el estudio de las células microgliales *in vitro* ha sido cuestionado y no es del todo aceptado (14). La remoción de estas células de su microambiente puede

liberarlas de sus “frenos normales” que cumplen un rol tan crítico en su fenotipo. Uno de los problemas más relevantes es la incapacidad de mantenerlas dentro del fenotipo ramificado en cultivo (figura 1.3), lo cual impide su correcta clasificación o estudio (11).

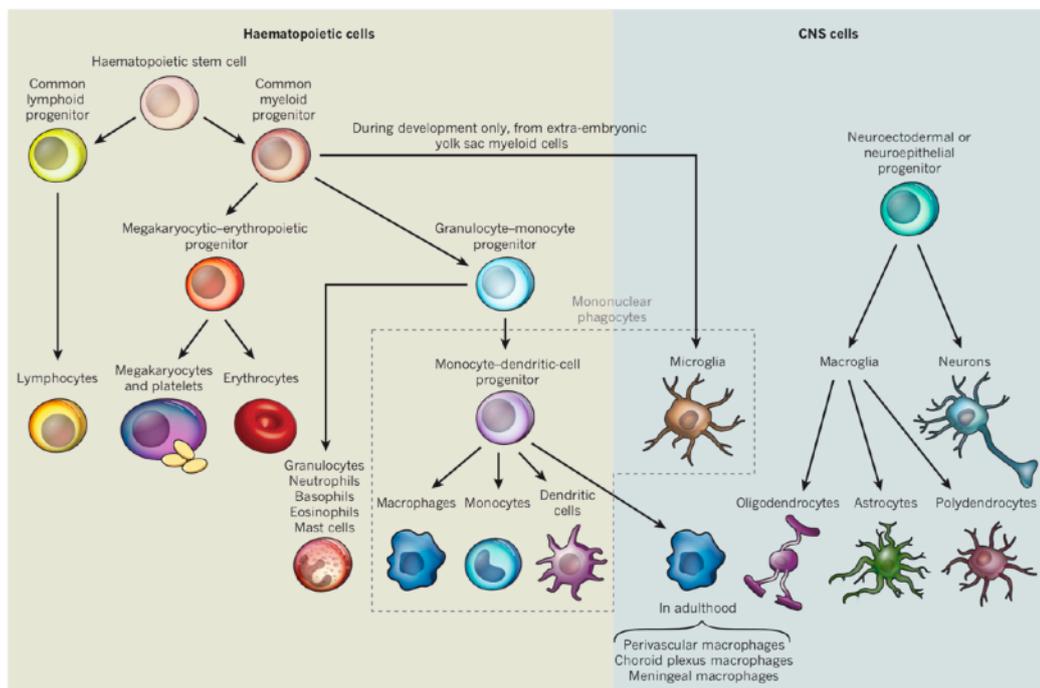


Figura 1.2_ Origen de las células microgliales. Las células microgliales se originan a partir de un progenitor mieloide común que migra durante el desarrollo a través del saco vitelino extraembrionario hacia el SNC. Estas son las únicas células de origen mieloide presentes en el parénquima del SNC.

Tomado de Rahsohoff y Cardona, Nature 2010.

Existen al menos 3 aspectos sobre la microglía a tener en cuenta para su estudio:

1. La microglía reside tras la BHE, con lo cual, las señales de daño provenientes del suero sanguíneo significan la ruptura de la misma y la entrada de la microglía en un estado de alerta.
2. Las células microgliales pertenecen a la familia de fagocitos mononucleares, pero también son células gliales nerviosas, por lo tanto variaciones en la actividad neuronal/sináptica pueden afectar su estado de activación y viceversa.
3. Quizás como consecuencia de vivir entre células tan sensibles como las neuronas, la microglía presenta un fenotipo altamente reprimido (ver figura 1.8), con lo cual la remoción de estos estímulos inhibitorios, provenientes entre otros de las neuronas, constituyen una señal de daño indicativa de que la función neuronal ha sido afectada (11).

Debido a esto, el cultivo de la microglía en condiciones que permitan su estudio a niveles fisiológicos resulta todo un desafío. Muchos grupos realizan grandes esfuerzos por caracterizarlas e intentar poner a punto protocolos o sistemas que permitan cultivarlas sin interferir en su fenotipo homeostático (15). Recientemente, el grupo de Ben Barres definió un marcador específico de función desconocida, presente en la membrana de células microgliales desde estadios embrionarios tempranos hasta el adulto, y luego de una estimulación inmunológica: el Tmem119 (16). Este ha resultado una herramienta de gran importancia tanto para su

identificación como para su purificación y caracterización, sin embargo la validez de los resultados obtenidos en cultivo continúa siendo controversial.

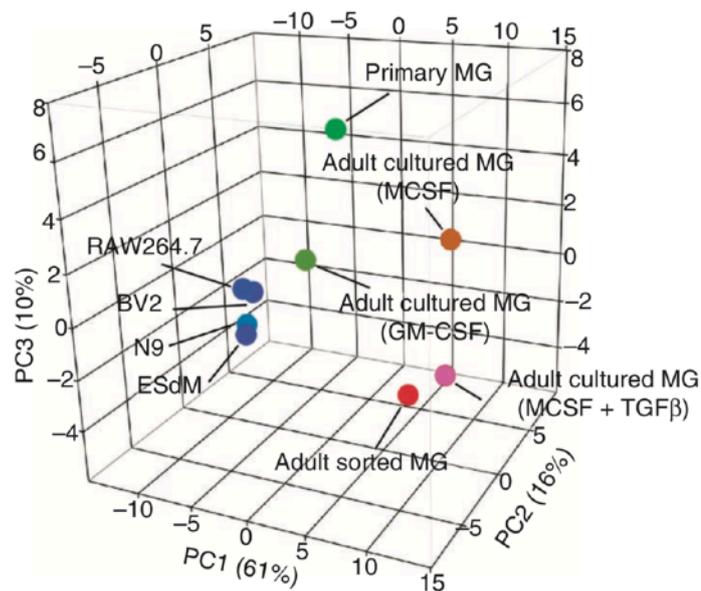


Figura 1.3_ Análisis del componente principal (PCA) de diferentes poblaciones microgliales basado en su perfil de expresión génica. Se muestra la comparación de las diferentes poblaciones de microglía basada en su perfil de expresión génica; cultivos primarios de animales adultos incubados con distintos factores de maduración (GM CSF, MCSF y GM CSF+TGFβ), microglía adulta obtenida por cell sorting en agudo; distintos tipos de líneas celulares de microglía/macrófagos (RAW264.7, BV2, N9); microglía obtenida a partir de células madre embrionarias (ESdM). Tomado de Butovsky et al. Nature Neuroscience 2014.

Hasta ahora, la manera más adecuada para el estudio de la microglía en su ambiente natural ha sido la microscopía en vivo de dos fotones (2P).

Esta permite la visualización del tejido nervioso *in vivo* con alta resolución, a profundidades de hasta 100-200 μm y sin producir fotobleaching o daño celular, ya que las longitudes de onda de excitación utilizadas están en el rango infrarrojo.

La visualización de las células microgliales se logra utilizando ratones transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en uno de los loci del receptor de fractalkina (CX3CR1) presente en microglía (*Cx3cr1^{+/GFP}*).

1.1.3 Dinámica microglial

Nimmerjahn, en el año 2005 (17), fue el primero en observar estas células en su entorno natural al analizar un cerebro en condiciones fisiológicas *in vivo* utilizando la técnica de 2P. En su estudio mostró que se trata de células muy dinámicas, lejos del estado clásicamente denominado como “quiescente”, y cuyas múltiples ramificaciones se extienden y retractan desde el soma con el fin de explorar su entorno (en contraste con la estabilidad casi estática de la gran mayoría de los procesos neuronales en las mismas ventanas temporales). Esto se corresponde con el fenotipo vigilante ramificado mal denominado “quiescente” de la microglía que encontramos en cerebros sanos. Dado que la velocidad de extensión/retención de las proyecciones es de alrededor de 1.47 $\mu\text{m}/\text{min}$, sus datos sugieren que en unas pocas horas estas células son capaces de monitorear el parénquima cerebral en su totalidad.

Dichas ramificaciones contactan con neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos, explorando constantemente el microambiente que las contiene con el fin de limpiar el parénquima de productos metabólicos de baja difusión y componentes tisulares deteriorados, además de evaluar estado funcional de las sinapsis (10, 17, 18). En este sentido, al realizar una micro-lesión en el parénquima aumentando la intensidad del laser del microscopio 2P, Nimmerjahn mostró cómo estas células responden inmediatamente extendiendo sus procesos hacia la zona de daño, aumentando el grosor de las extremidades de los mismos y con el tiempo cambiando su morfología hacia un fenotipo de tipo “ameboide” o redondeado pero sin migración celular.

Por otra parte, en el mismo año, Davalos publicó un manuscrito en donde muestra cómo la dinámica de los procesos microgliales se ve alterada inmediatamente luego de realizar un daño mecánico-traumático mediante la introducción de un micro electrodo en la corteza cerebral. Este observó el mismo efecto que el mediado por la ablación con laser, y notó que este efecto podía ser mimetizado al inyectar localmente adenosil trifosfato (ATP), sugiriendo que la respuesta microglial a este tipo de estímulos está mediada por liberación de purinas por parte de las células dañadas. Estas purinas son detectadas eficientemente por distintos receptores purinérgicos presentes en la membrana de la microglía (18). Volveremos a retomar este tema más adelante.

1.1.4 Fenotipos microgliales

Las células microgliales fueron originalmente definidas como un tipo celular diferente del SNC basándose únicamente en su morfología. De acuerdo a estudios de histología clásicos basados en técnicas de tinción con carbonato de plata, del Río Hortega las clasificó en 3 tipos: ramificada, ameboide e intermedia (19, 20). La denominada microglía **ramificada**, basándose en la apariencia de sus procesos altamente ramificados, corresponde a la microglía vigilante homeostática del SNC sano; la morfología **reactiva** que observamos tras un insulto incluye el agrandamiento del soma y retracción y acortamiento de sus procesos; mientras que la microglía **ameboide**, aparece cuando su activación es aún mayor, tratándose de células redondeadas con escasos procesos, móviles y con capacidad fagocítica. Recientemente, un cuarto fenotipo morfológico fue identificado; la microglía **distrófica** presenta una morfología particular donde se ve marcada reducción del soma y procesos con aspecto perlado. Este fenotipo se ha relacionado con la disfunción microglial en el proceso de envejecimiento (21). Estudios morfométricos de la microglía en el cortex cerebral de humanos (22) muestran la gran similitud con las características fenotípicas observadas en ratón (figura 1.4).

Hoy en día sabemos que el cambio morfológico no ocurre dentro de un rango lineal bifásico (inactivo-activo) sino que depende del estímulo y

contexto, lo cual induce la diferenciación celular por la activación de distintas vías de expresión génica, resultando en un cambio en su fenotipo funcional (12, 23). Las células parten de un estado vigilante, y como centinelas del SNC inician una respuesta inflamatoria designada para proteger al tejido nervioso del daño, adquiriendo un perfil reactivo (efector) que contribuye a retornar el sistema a la homeostasis. Estos cambios pueden ocurrir en el rango de minutos o segundos, y hasta los cambios masivos en el perfil de expresión génica ocurren en pocas horas (18). Estos cambios en el perfil de expresión conllevan a la liberación de distintos factores que puede ser acompañada (o no) de fagocitosis, dependiendo del blanco celular, de los receptores involucrados en el reconocimiento y sobre todo del contexto inflamatorio. Por ejemplo, cuando la microglía es expuesta a una invasión bacteriana se activan tanto las vías fagocíticas como la liberación de moléculas pro-inflamatorias (24, 25), mientras que para la remoción de células apoptóticas o restos de mielina luego de un daño mecánico es importante mantener el estado anti-inflamatorio, lo que se conoce como inflamación estéril (26, 27).

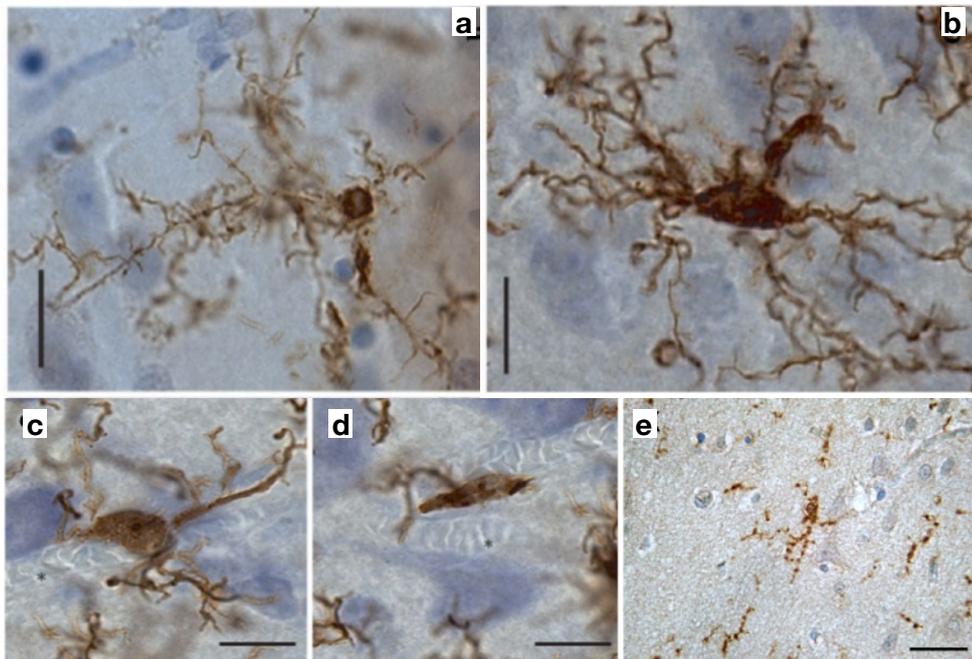


Figura 1.4_ Distintos grados de activación de la microglía en la sustancia gris de humanos. Cinco fenotipos principales representan las poblaciones de las células Iba-1 en la sustancia gris de la corteza humana. La microglía ramificada **(a)** muestra un soma pequeño y circular con procesos ampliamente ramificados. La microglía “preparada” **(b)** corresponde al fenotipo previo a la microglía reactiva, posee un soma menos redondeado y de mayor tamaño que la ramificada, con patrones de ramificación similares. La microglía reactiva **(c)** posee un soma de tipo ameboide pero continúa presentando pocos procesos ramificados comparados con el fenotipo ameboide **(d)**, en donde podemos observar un máximo de 2 procesos no ramificados o ninguno. Por último **(e)** que corresponde a la microglía distrófica, donde se ve una marcada reducción del soma y procesos con aspecto perlado. La barra (a-d) corresponde a 10 μm (e) 5 μm . Modificado de *Torres-Platas et al. Journal of neuroinflammation 2014* y *Boche et al. Neuropathology and applied neurobiology 2013* [e].

Muy recientemente, el establecimiento de nuevas tecnologías de aislamiento rápido asociadas a tecnologías de genómica provocaron el florecimiento en el área de la caracterización de fenotipos celulares, en particular de la microglía, haciendo posible por primera vez describir los genes específicos que las diferencian de las distintas poblaciones de macrófagos del organismo (figura 5 a) , permitiendo de esta manera definir los genes esenciales para su funcionamiento en condiciones fisiológicas del SNC. Al mismo se le ha denominado el fenotipo microglial **homeostático** (15, 28), y como consecuencia surge el concepto del fenotipo microglial **patológico o DAM** (del inglés *disease associated microglia*) (figura 1.5 b), en donde ocurre la disminución de la expresión de varios de esos genes que definen el fenotipo homeostático y otro grupo de genes son inducidos, independientemente de la patología de la que se trate (envejecimiento, modelos de Alzheimer, ALS o EM-EAE) (29, 30).

1.1.5 Funciones Homeostáticas

i) Muerte neuronal

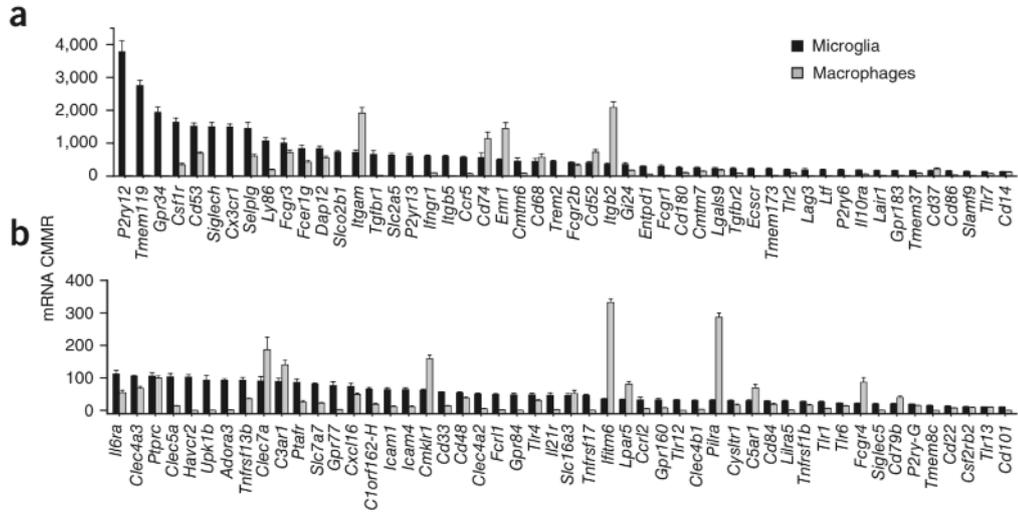
El desarrollo del SNC es caracterizado por excesos, tanto en producción de conexiones sinápticas como en generación de células. Alrededor de la mitad de las neuronas inmaduras de ciertas poblaciones mueren durante el desarrollo del SNC (2, 31), principalmente por muerte celular programada (apoptosis). Entre estas se destacan aquellas neuronas

Figura 1.5_ Enriquecimiento de genes en células microgliales: Identificación de genes microgliales homeostáticos. (a-b) Comparación de los niveles de expresión de genes pertenecientes al “sensoma” y aquellos involucrados en la regulación de la respuesta inmune en microglía vs macrófagos, identificados por ARNseq. Se observan genes enriquecidos en microglía o macrófagos y genes compartidos por ambos tipos celulares. **(c)** Firma molecular de la microglía sana vs envejecida o patológica por ARNseq. Durante la patología se ve el aumento de ciertos grupos de genes que en la microglía sana se encontraban reprimidos (cluster 2) y la disminución de otros que se encontraban sobreexpresados (cluster 1). *Tomado de Hickman et al. Nature neuroscience 2013, y Krasemann et al. Immunity 2017.*

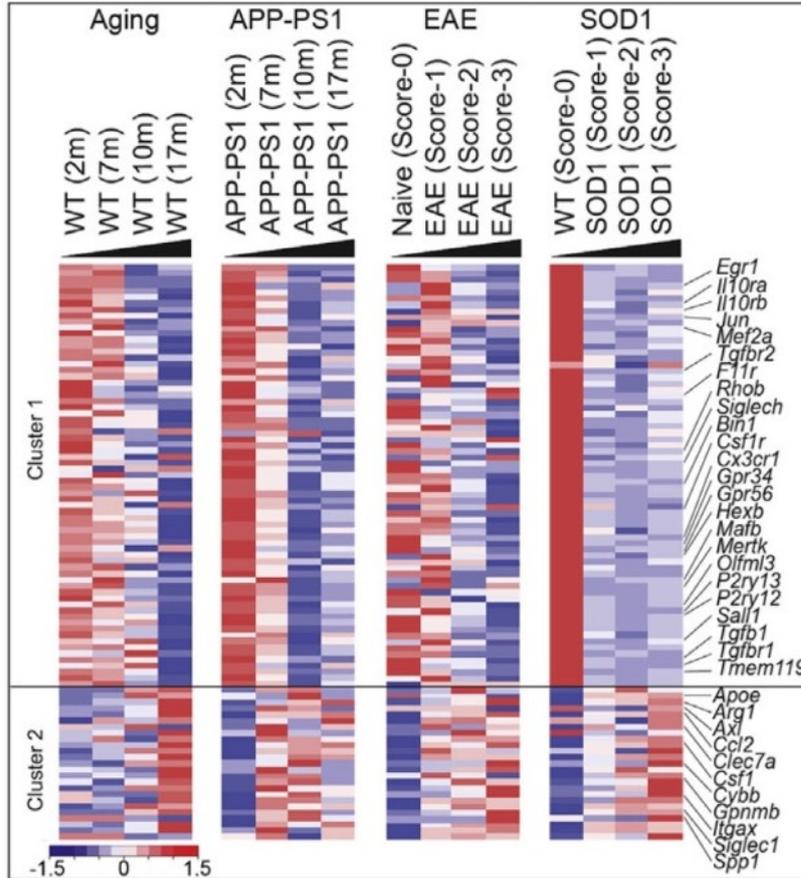
incapaces de formar circuitos neuronales adecuados o las que poseen

funciones transitorias.

La muerte neuronal puede ser iniciada bien por factores intrínsecos de la neurona, o por células accesorias como la microglía, la cual es capaz de inducir la apoptosis y limpiar los restos celulares resultantes. Tal es el ejemplo de las células nerviosas de la retina de pollo, donde la liberación del factor de crecimiento nervioso (NGF) por parte de la microglía es capaz de inducir su apoptosis actuando a través del receptor p75 (32). Este mecanismo de inducción de apoptosis de neuronas de la retina es considerado parte del programa de desarrollo normal del ojo; o como sucede en el desarrollo del cerebelo de ratón, donde la eliminación de la microglía reduce la muerte celular de las células de Purkinje (33), en parte tras la reducción de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS). En este sentido, la microglía actúa como promotora activa del proceso de apoptosis neuronal, al menos en ciertas regiones del cerebro en desarrollo, encargándose además de la remoción de restos celulares mediante la activación de la maquinaria fagocítica, sin iniciar una respuesta inflamatoria (34). Las neuronas estresadas o en proceso de muerte liberan factores que son capaces de reclutar a células microgliales para su fagocitosis, proceso muy importante tanto durante el desarrollo como en el mantenimiento de redes neuronales sanas en el adulto, el cual describiremos en detalle más adelante. Sin esta función vital, la salud del SNC puede deteriorarse y dar lugar a disfunciones neurológicas (2).



Microglia signature in aging/disease



ii) Supervivencia neuronal y neurogénesis

Las células microgliales no solo son capaces de asistir en la maduración del SNC durante el desarrollo mediante la inducción de muerte neuronal, sino que también secretan factores neurotróficos. Estos promueven la supervivencia, diferenciación y neurogénesis de linajes neuronales específicos y de células gliales (oligodendrocitos o astrocitos), así como la formación de circuitos neurales, funcionando tanto en el desarrollo como en el SNC adulto (23, 35). La microglía es capaz de secretar una amplia gama de factores tróficos, como por ejemplo el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), el cual promueve la supervivencia de las neuronas corticales de la capa V durante el desarrollo postnatal (36); el factor de crecimiento fibroblástico (FGF); el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y NGF, los cuales juegan un rol importante no solo en el desarrollo neuronal, sino en el mantenimiento y función nerviosa en el adulto (37-39).

Por lo tanto la microglía posee un efecto dual, siendo capaz de inhibir la neurogénesis cuando está asociada a la inflamación (35), o promoviéndola bajo el efecto de ciertas citoquinas anti inflamatorias como la IL-4 o factores tróficos (40).

iii) Homeostasis sináptica

Pocos años atrás, la idea de que las actividades celulares de la microglía se extendían mas allá del rol inmunitario como centinelas y efectores fue cobrando importancia:

Beth Stevens y su grupo (41) demostraron la participación de estas células en la organización, maduración, refinamiento y plasticidad sináptica en el sistema retino-geniculado de animales postnatales. Ellos postularon que el podado de las sinapsis por parte de la microglía (o sinaptofagia (42)) depende de la actividad neuronal y está mediada por factores pertenecientes a la cascada de complemento (CR3/C3), ya que la eliminación en las proteínas del complemento C1q o C3 conlleva a defectos en la eliminación de las sinapsis y exceso en la inervación del núcleo geniculado lateral por neuronas de la retina (41, 43-45). Si bien C1q disminuye su expresión en etapas adultas, ellos mostraron que durante procesos degenerativos, como el glaucoma, C1q aumenta su expresión y se relocaliza en las sinapsis en etapas tempranas de la enfermedad previas a la neurodegeneración evidente. Estudios llevados a cabo por otro grupo demostraron la importancia de estas células en el podado de las sinapsis en exceso en el hipocampo de ratón durante el desarrollo; ellos estudiaron el mutante knock out (KO) para el receptor de fractalkina Cx3cr1 (en el SNC la fractalkina se expresa en neuronas mientras que su receptor es expresado en microglía) y observaron que en etapas postnatales tempranas este posee transitoriamente un número reducido de células microgliales, así como un retardo en el podado

sináptico. Esto resulta en un aumento en el número de espinas dendríticas y una conectividad cerebral inmadura que si bien con el tiempo era capaz de restaurarse a niveles normales, estos animales resultaban con un déficit en comportamientos sociales (46, 47).

Estudios recientes muestran que el exceso en esta actividad durante el desarrollo conlleva a desórdenes psiquiátricos o cognitivos del tipo esquizofrénico (48, 49) o epiléptico, mientras que su falla define fenotipos de tipo autista (47, 50, 51) (figura 1.6). Por otra parte, se ha visto que estas células están involucradas en la regulación de la plasticidad sináptica y formación de memoria en adultos, a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias clásicas como IL-1 β y TNF α (52), especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO), así como por la liberación de factores tróficos (10, 53). En este sentido, la alteración del funcionamiento de la microglía en el adulto puede resultar en procesos neurodegenerativos, donde la característica principal es la vasta pérdida de neuronas y/o conexiones sinápticas (figura 1.6) (51, 54-56).

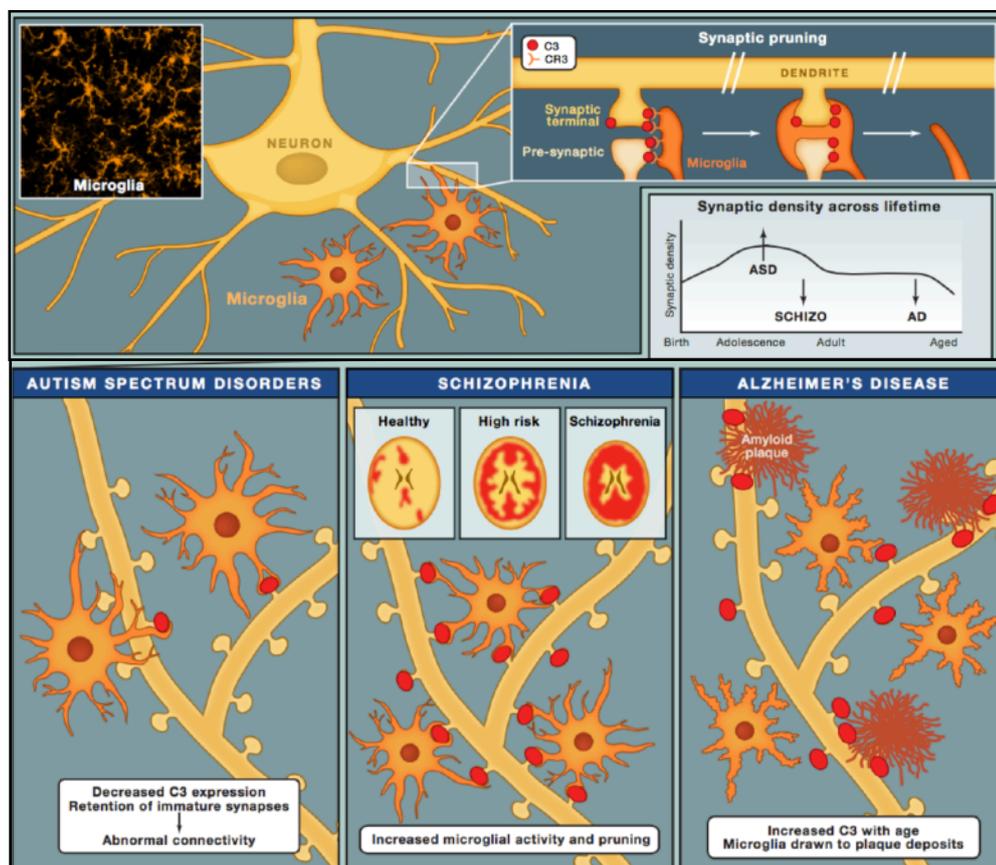


Figura 1.6_ La microglía y el podado sináptico. Representación esquemática de la función de la microglía en el podado de las sinapsis y las consecuencias de su mal funcionamiento durante el desarrollo (autismo y esquizofrenia), o en el envejecimiento (Alzheimer). La cascada del complemento es crucial no solo para la remoción de patógenos y restos celulares sino para el podado sináptico y refinamiento de la conectividad neuronal en el cerebro normal. La presencia de C3 “etiqueta” las sinapsis no deseadas para ser reconocidas y eliminadas por la microglía. Cuando este sistema se altera, ya sea en menos (autismo) o en más (esquizofrenia-Alzheimer) da lugar a las patologías aquí presentadas. C3-CR3: complemento y receptor 3 del complemento, presente en microglía. *Tomado de Beggs y Salter. Cell 2016*

1.1.6 Funciones fisiopatológicas

i) El concepto de Neuroinflamación

Como fue mencionado anteriormente, las células microgliales, por su rol como centinelas del SNC son muy sensibles a cambios en el entorno y por ende están involucradas en un gran número de patologías nerviosas que van desde infecciones del SNC, enfermedades neurodegenerativas, desórdenes psiquiátricos hasta daños mecánicos. Su respuesta está determinada por la naturaleza del estímulo, el repertorio de receptores que este involucra y el estado de activación previo de las células. Por lo tanto, sus funciones en la fisiopatología del SNC dependen del contexto, resultando imposible generalizar la forma y amplitud de las respuestas que estas células llevan a cabo. En el cerebro, la respuesta inflamatoria, denominada **neuroinflamación**, es fundamental para la protección del tejido nervioso, sin embargo, una neuroinflamación no controlada o prolongada es potencialmente nociva y puede resultar en daño celular y neurodegeneración (7, 57).

En este manuscrito trataremos el rol de la microglía en algunas situaciones fisiopatológicas relevantes.

ii) Neuroinflamación aguda

Infecciones bacterianas:

Las células microgliales son capaces de responder a casi todas las infecciones del SNC dada su distribución ubicua en el parénquima

nervioso. En respuesta a infecciones bacterianas, las células microgliales proliferan y llevan a cabo una variedad de funciones que incluyen la detección del patógeno, promoción de la inflamación, fagocitosis y neuroprotección. Algunas de estas respuestas pueden llegar a resultar en abscesos o meningitis, que generalmente conllevan a problemas neurológicos causados por el daño al SNC inflingido por la respuesta inflamatoria (2). Como detallaremos más adelante, las células microgliales poseen un repertorio de receptores de tipo toll (TLRs) que detectan lipopéptidos bacterianos, lipopolisacáridos (LPS) y DNA (CpG), cuya estimulación durante la infección del SNC puede tener efectos tanto positivos como negativos; la activación de vías pro-inflamatorias pueden llevar al daño neuronal (58), mientras que la activación de vías fagocíticas y lisis intracelular del patógeno resultan en su protección (59).

Durante la infección, la microglía secreta una serie de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β y distintas quimioquinas (7) capaces de promover el reclutamiento de células mielo-monocíticas (neutrófilos y monocitos) hacia el SNC (60). La producción de NO y ROS que actúan como mediadores antimicrobianos, facilita la destrucción de bacterias, pero también inhibe funciones importantes del SNC como la neurogénesis a nivel del giro dentado, lo cual puede conllevar a desórdenes cognitivos (61). La activación de otras vías innatas como el complemento, facilitan el reconocimiento de bacterias y su destrucción.

Por otra parte, con el fin de proteger al SNC inflamado luego de la infección, la microglía puede secretar proteínas neuroprotectoras como la

activina A, miembro de la familia TGF- β , que pueden modular la supervivencia neuronal y diferenciación glial, además de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias (62).

Daño mecánico:

El daño mecánico al SNC induce una respuesta inflamatoria que involucra la participación de células inmunes residentes (microglía y macrófagos perivasculares) y periféricas (monocitos, neutrófilos y Linfocitos T). La microglía y macrófagos residentes automáticamente reaccionan ante moléculas liberadas por el daño e inician una respuesta inflamatoria que involucra la liberación de citoquinas y quimioquinas, que provocan la infiltración de células inmunes horas o días más tarde. La activación de la microglía es fundamental para limpiar la zona de células apoptóticas, mielina y restos celulares. Sin embargo, su sobre-activación puede resultar patogénica y persistir por años luego de un trauma craneano (TEC), derivando en patologías neurodegenerativas.

En este sentido, se han visto pacientes con distintos tipos de demencia y desórdenes psiquiátricos luego de un TEC o traumas repetitivos. Recientemente ha cobrado mucha importancia el descubrimiento de una nueva patología degenerativa causada por la exposición repetitiva a contusiones cerebrales (63). Se la conoce como encefalopatía traumática crónica (CTE por su nombre en inglés) y sus síntomas incluyen cambios comportamentales, problemas cognitivos y de humor. Estos empiezan años más tarde de la/s injurias y pueden empeorar con el tiempo

resultando en demencia. Generalmente se ha visto asociada a deportes de contacto como fútbol, boxeo, o fútbol americano, así como en soldados expuestos a golpes en la cabeza o explosiones, y seguramente afecte en mayor medida aún a la población civil durante los conflictos armados.

La patología del trauma encéfalo- craneano (TEC) se ha visto asociada con la liberación de ROS (64) y el reclutamiento de monocitos periféricos de manera dependiente del receptor de quimioquinas CCR2 (65), ya que su bloqueo mejora notoriamente el desempeño motor y disminuye el volumen de la lesión en modelos de TEC. Sin embargo, el fracaso en los tratamientos de pacientes con drogas inmunosupresoras en fase III de ensayos clínicos (66, 67) sugiere que, al menos en parte, la neuroinflamación en etapas agudas del TEC es necesaria para limpiar la zona de los restos celulares y promover la reparación y recuperación del tejido dañado, y que una regulación más fina de estos procesos es necesaria para por ejemplo estimular la fagocitosis inhibiendo la producción de ROS (57). El tejido necrótico induce reacciones inmunes estériles, en parte por la liberación de ATP y otros nucleótidos. La microglía, como explicaremos más adelante, expresa varios tipos de receptores purinérgicos, que le permiten extender sus procesos hacia la zona dañada en cuestión de minutos, migrar y activar las vías de fagocitosis (2, 17, 18) tras el reconocimiento de marcadores o alarminas, como la presencia de fosfatidilserina en la membrana de las células en proceso de muerte (figura 1.7). Estudios *in vivo* con microscopía 2P

llevados a cabo por el grupo de McGavern (68, 69) utilizando un modelo suave de contusión de meninges (mTBI) muestran que la liberación de ATP por parte de astrocitos superficiales de las limitantes gliales induce a la microglía subyacente a adquirir dos tipos de morfologías - de tipo panal de abejas o "*Honeycomb*" con una función de barrera de contención - y de tipo medusa o "*Jellyfish*" con función fagocítica. La inhibición de cualquiera de estos receptores puede afectar de forma negativa la respuesta microglial (68) aumentando la muerte neuronal en el parénquima .

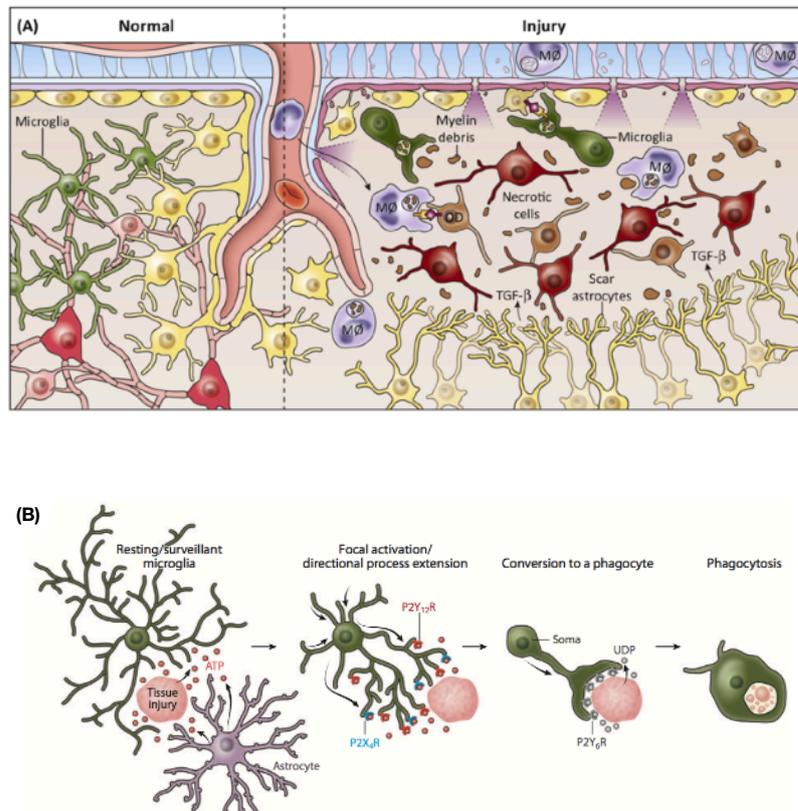


Figura 1.7_ Función fagocítica de la microglía en el SNC luego de una injuria mecánica. a) Células muertas y restos celulares como mielina son removidos del sitio de lesión por la microglía residente y macrófagos periféricos. La fagocitosis es mediada en parte por el reconocimiento de PS en la membrana de las células muertas por receptores “scavenger”. Los astrocitos activados rodean el área de lesión para formar la cicatriz glial que actúa como una barrera física para las células infiltrantes, y también pueden secretar citoquinas anti-inflamatorias o factores de crecimiento (TGFβ). b) Ilustración de la activación de la microglía focal resultante de una lesión estéril. La microglía en el SNC “naïve” es muy ramificada y explora continuamente el parénquima como parte de su programa homeostático. Luego del daño focal que induce la muerte por necrosis, el tejido dañado y astrocitos circundantes liberan ATP el cual estimula la activación de receptores purinérgicos específicos expresados por la microglía. La detección del ATP a través de P2RY12 y P2RX4 induce la extensión de procesos hacia el epicentro de la lesión y la concomitante retracción del resto de los procesos. EL grado de daño al tejido dictamina la rapidez de la microglía en convertirse en un fagocito y participar de la limpieza de la lesión. La detección de UDP mediante P2RY6 induce un cambio conformacional en la microglía que conlleva a la formación de un único proceso fagocítico, seguido de la retracción del soma hacia el mismo. El fagocito resultante participa de la limpieza de los restos celulares. Tomado de Russo et al. *Trends Immunology* 2015 y Nayak et al. *Annu Rev Immunology* 2014.

iii) Neuroinflamación crónica

Enfermedades neurodegenerativas:

Como fue mencionado anteriormente, la respuesta inflamatoria debe ser controlada para que los procesos de reparación del tejido puedan llevarse a cabo. Al contrario de la inflamación aguda, la neuroinflamación crónica es una respuesta persistente que se inicia tras un estímulo o la acumulación de estímulos inflamatorios puntuales capaces de autopropagarse mediante la liberación de señales de daño producidas por microglía o astrocitos.

Debido a la íntima relación existente entre microglía y neuronas, las células microgliales son capaces de responder a condiciones neurodegenerativas orquestadas por neuronas defectuosas y exacerbarlas. Esto lleva a un incremento de la neuroinflamación y a un mayor grado de reactivación glial en un proceso de retroalimentación positiva. Esta inflamación de bajo grado puede resultar a largo plazo en el deterioro del SNC, con efectos que van desde la pérdida de sinapsis a desórdenes cognitivos y neurodegeneración (7, 70, 71).

Enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer (AD), Parkinson (PD), Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ALS) se caracterizan por la existencia de agregados proteicos en neuronas capaces de iniciar una respuesta microglial, que eventualmente contribuye a el estado neuroinflamatorio del SNC, pese a que su función inicial sea neuroprotectora (2). Dada la importancia de la microglía en las

funciones fisiológicas del SNC es de esperar que exista una correlación positiva entre la alteración de genes microgliales y desórdenes neurológicos o psiquiátricos. Tal es el caso del receptor TREM2 (10, 30, 72), el cual se ha vinculado con el desarrollo de distintos tipos de demencia en humanos (73-75) y en modelos de ratón, definiendo el fenotipo patológico de la microglía (30). Estudios utilizando ratones deficientes en TREM2 en modelos de AD mostraron un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y en la acumulación de beta amiloide (β A) debido a una disfunción en la respuesta microglial fagocítica (72, 76). La deposición de placas amiloides lleva al mal funcionamiento de la microglía, disminución de la movilidad de sus procesos y de su capacidad fagocítica *in vivo* (77), y se ha visto que estas células en lugar de proliferar se tornan apoptóticas (72). Por otra parte la neurotoxicidad mediada por β A *in vitro* podría ser inducida por la liberación de mediadores pro-inflamatorios como ROS y peroxinitrito de las células microgliales (78).

Desórdenes Psiquiátricos:

Desórdenes en el neurodesarrollo y trastornos psiquiátricos del tipo autista u obsesivo-compulsivo (TOC) han sido históricamente considerados de origen neuronal. Sin embargo, dado el papel de la microglía en la regulación de la fuerza sináptica y refinamiento de las conexiones nerviosas, hoy en día sabemos que este tipo de patologías se encuentra estrechamente relacionado con la disfunción microglial.

El primer experimento en mostrar que un desorden comportamental podría corresponderse con una disfunción microglial fue realizado por Chen *et al.* 2010 (79). Ellos postularon que la expresión del gen homeobox *Hoxb8* en la microglía se relaciona con desórdenes de tipo TOC; ratones KO para este gen invierten el doble de tiempo en el acicalamiento comparados con Wt, lo que conlleva a la pérdida capilar y lesiones cutáneas¹ (80). Estos ratones presentan una reducción del 15% en el número de células microgliales, fenotipo que puede ser revertido mediante irradiación y restauración con médula ósea Wt (79). Estudios recientes utilizando tomografía de emisión de positrones (PET) en pacientes con TOC mostraron patrones de activación microglial alterados en las distintas áreas analizadas (81). Para estos ensayos se utilizó un radioligando que se une específicamente a la proteína translocadora (TSPO) microglial, la cual aumenta tras su activación.

Por otra parte, existe evidencia que relaciona a las microgliopatías como causantes del desarrollo de los trastornos depresivos. Estos estudios postulan que la desviación de la homeostasis causada tanto por la activación durante procesos inflamatorios (daños mecánicos, infecciones, estrés, o neurodegeneración) como por la disfunción o senescencia (durante el envejecimiento o estrés crónico) pueden llevar a la depresión (82). En este sentido, tanto la activación intensa -por estrés, actividad de citoquinas pro-inflamatorias, aumento de neurotransmisores o disminución de factores tróficos- así como la reducción y supresión de la función de

¹ Comparable con el patrón comportamental de humanos con tricotilomanía, una forma de TOC.

células microgliales - niveles reducidos de marcadores de la inflamación como CRP (83), pérdida de la función fagocítica o de producción de factores tróficos- en algunas áreas del cerebro de pacientes o modelos experimentales, serían la causa de algunas formas de depresión. Estas microgliopatías pueden ser tratadas o bien con inmunosupresores (NSAIDs² o minociclina³) o con activadores (como LPS (84) o citoquinas pro-inflamatorias (85)) según el caso. La microglía distrófica, asociada a la supresión de la activación y senescencia (86), se encuentra tanto en humanos como en modelos animales, en condiciones de envejecimiento, AD y estrés crónico, las cuales están altamente asociadas con una alta prevalencia de trastorno depresivo (22, 82, 86).

Independientemente del estímulo inflamatorio, ya sea por una infección o una daño estéril, el proceso regenerativo del sistema nervioso requiere de la disminución de las señales pro-inflamatorias. La actividad fagocítica estéril de la microglía es necesaria para la resolución de la neuroinflamación y restablecimiento de la homeostasis, como ocurre en los procesos de degeneración Wallerina (87). Las vías anti inflamatorias deben activarse tempranamente para preservar al tejido nervioso del posible daño citopático. Sin embargo, estas no siempre son efectivas, por lo que el daño debe ser reparado o contenido. Por otro lado, independientemente del estímulo, las señales pro-inflamatorias

² (NSAIDs)= Drogas anti-inflamatorias no esteroideas

³ La minociclina es un antibiótico con efectos inhibidores de la activación de la microglía.

sostenidas en el tiempo pueden impedir el proceso de reparación. En este sentido, la capacidad fagocítica reducida de la microglía comprometida a una respuesta pro-inflamatoria puede resultar en el desarrollo de patologías crónicas (88)(7).

1.1.7 Comunicación con el entorno

Como mencionamos anteriormente, una de las características distintivas de la microglía, además de su morfología, es la regulación diferencial de moléculas que modulan su activación en comparación con macrófagos de otros tejidos (15, 28). El fenotipo microglial está regulado tanto por factores solubles como citoquinas, prostaglandinas, y neurotransmisores, como por interacciones con células de su entorno mediante pares de receptor/ligando. En este sentido, los complejos procesos celulares llevados a cabo por la microglía requieren de un alto grado de regulación con el fin de mantener la homeostasis del SNC. Esto se logra mediante mecanismos que pueden “encenderlas” o “apagarlas” de ser necesario, varios de los cuales se ven alterados en patologías degenerativas o psiquiátricas.

La microglía homeostática posee un gran número de moléculas presentes en su membrana plasmática que le permiten explorar y comunicarse con el ambiente que las rodea, manteniéndolas en un estado alerta pero “quiescente” en condiciones fisiológicas (figura 1.8). Ante la presencia de

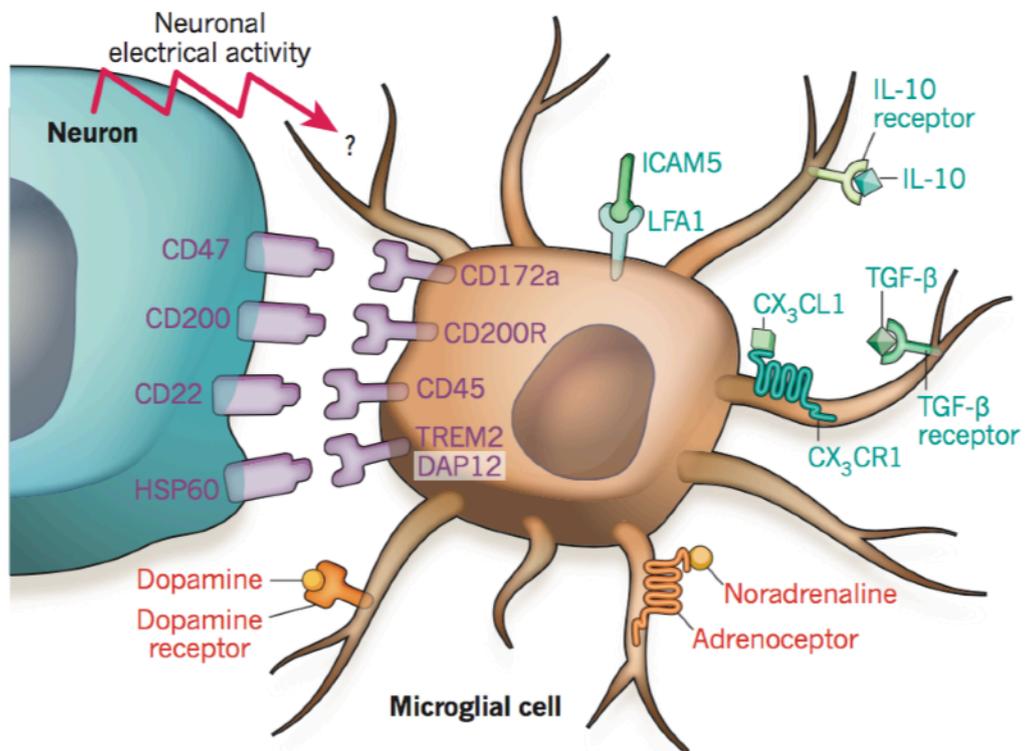


Figura 1.8_Influencias inhibitorias neuronales hacia la microglía. Las neuronas inhiben a la microglía de varias maneras. La inhibición por contacto se muestra en violeta. Citoquinas solubles inhibitorias o moléculas de adhesión y sus receptores se muestran en turquesa, y neurotransmisores inhibitorios y sus receptores en rojo. Tomado de Ransohoff & Cardona et al., Nature 2010.

cambios en el entorno o señales de peligro, la expresión de los receptores homeostáticos se ve modificada y se activan cascadas moleculares que le permiten responder de forma muy variada y precisa frente a distintos estímulos, modificando su morfología y dinámica. La combinación de estos dos parámetros reflejan sus respuestas a una gran variedad de estímulos como mencionamos anteriormente.

Varias de estas moléculas están siendo actualmente caracterizadas, ya que si bien estas células se describieron hace más de un siglo, la descripción de su fenotipo en términos funcionales y moleculares es relativamente nueva y se debe en parte a los grandes avances en las técnicas de análisis como la secuenciación masiva (RNAseq) y microscopía de 2P.

El primer trabajo que estudió las moléculas microgliales que median interacción con ligandos endógenos y elementos patógenos fue publicado en el 2013 por Suzanne Hickman, y a esto lo definió como el “*sensoma* microglial”. Ellos analizaron el perfil de transcripción de la microglía sana y en proceso de envejecimiento mediante RNAseq y proteómica y lo compararon con otras células del parénquima nervioso y macrófagos de diferentes zonas del organismo. En este artículo describen al adaptador DAP12 (del cual hablaremos en mas detalle en la siguiente sección) como molécula clave en la organización de la respuesta microglial, siendo el centro de una red de moléculas encargadas de explorar su entorno.

Marcadores moleculares

Ya mencionamos varias de las señales o condiciones capaces de desencadenar la transformación de la microglía desde su estado vigilante a uno reactivo.

En este sentido, las células microgliales están equipadas para el reconocimiento de una gran variedad de señales homeostáticas (péptidos, glicoproteínas, lipoproteínas y nucleótidos) (figura 1.8) así como de diversas señales de peligro.

La respuesta microglial se desencadena en base a dos principios:

-La aparición de factores que usualmente no ve -componentes del suero o estructuras microbianas, componentes intracelulares, complejos antígeno-inmunoglobulina o complemento-. Estas señales son reconocidas por una variedad de receptores específicos los cuales desencadenan respuestas que llevan a la activación de la microglía, como es el caso de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR).

-La interrupción de señales constitutivas con influencias inhibitorias, muchas de las cuales son producidas por neuronas (11, 23, 42). En este caso la interrupción de la señal de "off" causa la reactivación de las células microgliales (23).

Muchos receptores de superficie han sido descritos para la regulación de la activación de la microglía regulando finamente las funciones normales

como movilidad, fagocitosis, producción de mediadores inflamatorios o factores tróficos.

i) Receptores de reconocimiento de señales

Tal como sucede en la periferia, en el SNC la mayoría de las respuestas inmunes comienzan con receptores de reconocimiento de patrones que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) vía receptores de tipo Toll (TLRs) receptores de tipo RIG (RLRs), receptores de tipo NOD (NLRs) o de tipo C-lectina (CLR), presentes todos en células microgliales.

La unión de los PAMPs a estos receptores activa al factor de transcripción NFkB lo cual induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α , las cuales median las vías de remoción de patógenos y restauración de la homeostasis (89, 90).

Existen PRRs tanto de membrana como intracelulares: En el primer grupo se encuentran algunos TLRs como el TLR-4, TLR-1/2, TLR-6 (23), y receptores "scavenger", los cuales facilitan la vigilancia del ambiente extracelular; mientras que dentro del segundo grupo encontramos receptores NLRs, RLRs y algunos TLRs (TLR-3, TLR-9), los cuales se activan mediante estímulos inflamatorios internalizados. Ciertos componentes de la pared bacteriana como lipopolisacáridos (LPS) o

peptidoglicanos son detectados por receptores del inflamasoma⁴ como NLRP3 y NLRC4, los cuales forman estructuras oligoméricas en el citoplasma, reclutan caspasa-1 y facilitan el corte proteolítico de la pro-IL-1 β y pro-IL-18 a sus formas activas de secreción (91).

Por otra parte las células inmunes también son capaces de detectar y responder a daños estériles que alteran la homeostasis del SNC. La mayoría de los modelos de daño traumático al SNC como trauma encéfalo-craneano (TEC) o daño espinal (SCI) inducen dos fases de daño: una fase primaria que corresponde al daño mecánico directo, y una secundaria, donde el daño es propagado por la presencia de mediadores neurotóxicos como ROS, glutamato y calcio entre otros (69). Estos son reconocidos mediante PRRs que se unen a DAMPs (por su sigla en inglés damage-disease associated molecular patterns) (92), también conocidos como alarminas, los cuales representan a una gran variedad de proteínas intracelulares y ácidos nucleicos que son liberados luego del estrés o necrosis celular (93). Muchos de los receptores de las familias TLR, RLR y NLR son capaces de reconocer tanto PAMPs como DAMPs (93). Por ejemplo, TLR4 reconoce LPS de la pared bacteriana, o proteínas de shock térmico como Hsp60 y Hsp70, fibronectina o fibrinógeno tras un daño tisular. En un modelo de trauma severo (CCI= impactor cortical controlado) (94, 95) el SNC de animales KO para TLR4 se producen

⁴ Inflamasoma: complejo multiproteico de gran tamaño que activa a la caspasa-1, la cual es necesaria para el clivaje enzimático y maduración de precursores de IL-1 β e IL-18 (Martinon et al 2002).

lesiones cerebrales reducidas, disminución de la inflamación secundaria y mejoría en la función neuronal respecto a animales Wt.

Otro tipo de DAMP liberado luego de una injuria al SNC es el ATP, actuando como amplificador de la inflamación y agente quimiotáctico de fagocitos. Esta molécula puede ser liberada por células estresadas o en proceso de muerte (necrosis), o bombeado activamente hacia el exterior de células intactas a través de hemicanales de conexinas o panexinas por parte de células apoptóticas (96, 97). El ATP y sus derivados como ADP (adenosina difosfato) o adenosina son detectados mediante receptores purinérgicos de las familias P1, P2Y y P2X. Estos receptores generalmente median respuestas opuestas, por lo que la respuesta celular resultante va a depender del balance de concentración de ADP y ATP/adenosina, así como de los niveles relativos de expresión de sus receptores (97). En células microgliales encontramos receptores purinérgicos tales como **P2RY₁₂**, **P2RY₆** y **P2X₄** presentes en la membrana celular, los cuales median las acciones inmunes estériles en el tejido nervioso. Esto desencadena cambios conformacionales en células microgliales como la extensión de sus procesos hacia los sitios de daño, migración y fagocitosis (2, 18, 68, 98, 99). En particular, el receptor **P2RY₆** ha sido descrito como un gen microglial homeostático y funciona como un sensor específico de fagocitosis: cuando es activado por su agonista endógeno UDP induce cambios en el citoesqueleto de actina de células microgliales que conducen hacia la fagocitosis (100). Por otra parte, su

expresión aumenta tras el contacto con neuronas dañadas (98). Se ha visto que el bloqueo del receptor P2RY₆ o de conexinas aumenta la ruptura de las limitantes gliales y la muerte celular en la corteza cerebral luego de un modelo de TEC suave (mTBI), sugiriendo que esta respuesta inflamatoria temprana al daño cerebral focal es neuroprotectora (68, 69). Por otra parte, el receptor homeostático **P2RY₁₂** funciona como una señal de “encuéntrame” (101), un sensor de ATP que tras su unión desencadena la extensión de procesos en células microgliales (100). La disminución en su expresión se ha relacionado con un fenotipo microglial neurodegenerativo (30).

Los receptores de tipo C-lectina funcionan también como receptores tanto de PAMPs como de DAMPs y son utilizados por las células mieloides para orquestar sus respuestas. Los ligandos de estos receptores incluyen carbohidratos, proteínas y lípidos; componentes tanto de patógenos como propios, y desencadenan respuestas variadas tales como endocitosis, fagocitosis, y cascadas anti o pro-inflamatorias (102). En el caso de **Clec7a**, presente en la membrana de células microgliales, esta molécula se ve sobreexpresada en el transcurso de patologías neurodegenerativas y se encuentra dentro de los genes distintivos de microglía asociados a condiciones degenerativas (DAM) tales como ALS, AD, PD, EAE y envejecimiento descriptos recientemente (30). Por otra parte el receptor de manosa (CD206) se sobreexpresa durante la resolución de la inflamación. La unión de este receptor a sus ligandos generalmente inicia

la fagocitosis y activa vías inmunosupresivas (disminución de TNFa e IL-12) y anti-inflamatorias (IL-10 e IL-1Ra), promoviendo la reparación del SNC (103).

Los receptores “scavenger” como **MARCO, CD36 o CD163** representan una parte importante de la inmunidad innata actuando como PPR promiscuos (104). En la microglía actúan como receptores fagocíticos, mediando la fagocitosis o endocitosis de células apoptóticas, agregados proteicos o elementos no opsonizados (lipoproteínas de baja densidad (LDL), chaperonas, LPS etc). En el caso de MARCO, incluso se ha descrito que puede actuar también como co-receptores de TLR, modulando su respuesta pro-inflamatoria (105, 106). En el caso de CD163, si bien algunos autores postulan que éste está presente únicamente en macrófagos perivasculares y otros macrófagos pero no en microglía (11, 29), Hickman muestra su sobre-expresión en la microglía envejecida (28). Sus niveles se ven aumentados en macrófagos reclutados hacia el sitio de daño luego de una lesión traumática (7), donde su función “scavenger” que capta principalmente hemoglobina es fundamental. Otros resultados indican que este promueve la fagocitosis de β A en modelos de AD (107).

ii) Receptores ITAM/ITIM

El estado de activación de muchos tipos celulares del sistema inmune está en parte determinado por los niveles relativos de expresión de

receptores con motivos ITAMs (del inglés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) o ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs) (13, 108). Como regla general, luego de su unión con el ligando, los receptores con motivos ITAM son fosforilados por proteínas quinasas de la familia Src, lo cual conlleva a su interacción con dominios SH2 de proteín-quinasas Syk (spleen tyrosine kinase) y a la activación de cascadas intracelulares. Mientras que la activación de los receptores con motivos ITIM media el reclutamiento de fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP, que se unen a los motivos ITIM fosforilados. Esta unión produce la activación de fosfatasas, que promueven la inhibición o disminución de la activación intracelular, desfosforilando componentes clave de las cascadas activadoras (11).

La microglía se encuentra contactando constantemente con la superficie de neuronas cumpliendo con su función homeostática. En condiciones fisiológicas, son contenidas por un gran número de señales inhibitorias que actúan como señales de “no me comas”, las cuales señalizan mediante la expresión de moléculas solubles o mediando interacciones de contacto con moléculas de superficie. Cuando la microglía encuentra señales de “comeme” (figura 1.9) expuestas en la membrana de neuronas rápidamente las reconocen, fagocitan y digieren a través de una secuencia de eventos que llevan a la remodelación del citoesqueleto mediante el reclutamiento de miembros de la familia RHO-GTPasas y posterior fusión de fagosomas con lisosomas para la digestión (101, 109).

iii) Receptores y señales de “cómeme”

Una señal crucial requerida para la fagocitosis es la fosfatidilserina (PS) (42, 110, 111). Este fosfolípido se encuentra usualmente confinado a la monocapa interna de la membrana plasmática, ya que es translocado activamente desde la monocapa externa de células viables por la acción de enzimas translocasas. Las translocasas neuronales pueden ser inhibidas como resultado de estrés oxidativo, aumento en niveles de calcio o depleción de ATP (111). La exposición de PS no es tóxica para neuronas pero las marca para ser fagocitadas por la microglía.

Las células microgliales expresan una serie de familias de receptores que ante la presencia de su ligando activan directa o indirectamente la fagocitosis y endocitosis de células apoptóticas, agregados proteicos y partículas de lipoproteínas actuando como señales de “cómeme”. Estos receptores o bien poseen dominios ITAM en sus colas citoplasmáticas o actúan mediante la interacción con moléculas adaptadoras como DAP12 o FcγR que los poseen. Receptores como SIRP-β1 y TREM2 (112) actúan mediante la activación de DAP12, el cual media la activación de cascadas que llevan a la fagocitosis a través del reclutamiento de quinasas (Syk) que terminan en la activación de Rac1 y el reordenamiento del citoesqueleto para la fagocitosis (42, 113). SIRP-β1 se relaciona con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, encontrándose sobreexpresada en pacientes y modelos transgénicos de AD (114) y EAE (115). De la misma manera, TREM2 se ha relacionado con la progresión

de enfermedades neurodegenerativas como Nasu-Hakola, AD, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), PD y también en envejecimiento (30, 76, 116). Estudios recientes muestran que la microglía de animales TREM2-KO no solo ve afectada su capacidad fagocítica sino también la quimiotaxis hacia células apoptóticas (117) y resultan en la regulación positiva de citoquinas pro-inflamatorias (11, 76). Este receptor se une a varios fosfolípidos polares de membrana incluyendo fosfatidiletanolamina (PE), PS y cardiolipina (118) de manera directa o indirecta. Recientemente se ha visto que su activación también está mediada por la unión con APOE (10, 42), el cual funciona como una opsonina⁵ al unirse a la fosfatidilserina (PS) expuesta en la membrana externa de células apoptóticas.

Asimismo, los receptores tirosina-quinasa como **MERTK** desencadenan la fagocitosis de la microglía tras su unión con opsoninas como **GAS-6** (119) o **GAL-3** (120). Esta última se une a glicoproteínas que han perdido sus ácidos siálicos (121) y aumenta su expresión luego de un daño traumático como señal de alarma (122).

⁵Una opsonina es normalmente una proteína soluble que cuando se une a la superficie de una célula estimula la acción de un fagocito.

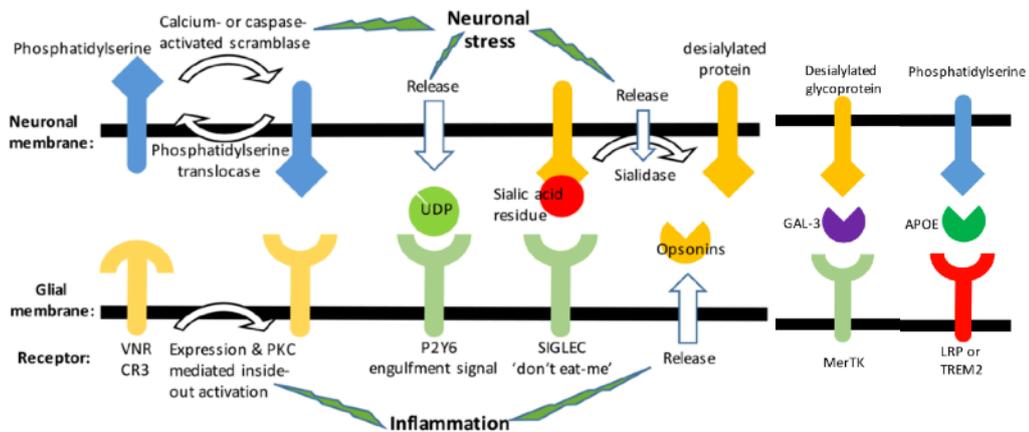


Figura 1.9_Regulación de las señales fagocíticas intercelulares. Las neuronas exponen en sus superficies señales de “cómeme” para promover la fagocitosis usualmente mediante opsoninas que hacen de puente entre la superficie neuronal y los receptores fagocíticos en células microgliales (o astrocitos). La exposición de PS está mediada por calcio o scramblasas activadas por caspasas, mientras que su re-internalización está mediada por translocasas inhibidas por caspasas, calcio, agentes oxidantes o la depleción ATP. El estrés neuronal también puede causar la liberación de UDP, el cual activa al receptor fagocítico microglial P2RY6. La inflamación glial causa la liberación y expresión de opsoninas y la proteína kinasa C (PKC) media la activación de receptores integrinas CR3 que median la fagocitosis mediante la activación de DAP12. Tomado de Villalta & Brown, *FEBS J* 2017.

Por otra parte, las proteínas poli-sializadas en la superficie de neuronas previenen la fagocitosis a través de la activación de miembros de la familia de receptores SIGLEC (inmunoglobulinas de unión a ácido siálico de tipo lectinas) de la superficie de células gliales, incluyendo SIGLEC-11 en humanos y SIGLEC-E en ratón (111, 123). La remoción de residuos de ácido siálico del glicocalix neuronal mediante la acción de sialidasas (como neuraminidasas), las convierten de señales “no me comas” en señales “cómeme” (pese a que existen excepciones como SIGLEC-H y SIGLEC-1 que promueven la fagocitosis o endocitosis por unión con proteínas sializadas (123, 124)). Las células apoptóticas (121) así como las neuronas estresadas (42) poseen actividad sialidasa que des-sializa las proteínas y lípidos de superficie promoviendo la fagocitosis ya sea por acción del complemento, o por opsonización (por ejemplo GAL-3 y activación de MERTK) (42).

iv) Receptores y señales de “no me comas”

Dentro de estos receptores encontramos al par CD200-CD200R (125, 126) y CD47-SIRP- α (113, 115, 127). Este último posee dominios inhibitorios ITIMs en su cola citoplasmática (108, 113). En modelos murinos de esclerosis múltiple (EAE) se ha visto una disminución en la expresión de CD200 y CD200R en etapas tempranas de la patología (128). En la misma línea, ratones KO para CD200 muestran un mayor número de células microgliales con un fenotipo más reactivo, (cambios en su morfología y expresión de MHC de clase II) promoviendo el agravamiento de la condición de EAE (125).

Por otra parte CD47 se encuentra en la membrana de neuronas, oligodendrocitos y mielina (129) y se ha visto que el bloqueo de su interacción con SIRP- α promueve la fagocitosis de la mielina por parte de células microgliales (129). SIRP- α ha sido relacionada con la inhibición la fagocitosis mediante la acción de la fosfatasa SHP-1(115).

Asimismo, las células microgliales se encuentran tónicamente reprimidas por la expresión neuronal de la quimioquina CX₃CL1 (fractalkina), que señala mediante la unión al receptor CX₃CR1 presente en microglía actuando como una señal de “no me comas”. Esta proteína puede ser o bien liberada cuando es cortada por la metaloproteasa ADAM, actuando a distancia, o encontrarse en su forma unida a membrana mediando la adhesión celular (11, 12, 130, 131). Cardona y colaboradores mostraron

que la señalización a través del receptor de fractalkina reduce el daño neuronal mediado por la microglía en modelos de LPS, AD y ALS (132).

Estos pares de receptor/ligando funcionan como señales de “no me comas” ya que al unirse con su receptor median la inhibición de la fagocitosis por parte de la microglía (42).

v) La microglía como APC

La microglía es considerada como una célula presentadora de antígeno profesional (APC) del SNC debido a la expresión de antígenos MHC (del inglés *major histocompatibility complex*) de clase II y su capacidad fagocítica. Éstas, a diferencia de astrocitos, presentan además ligandos coestimuladores como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). Mientras la expresión de estos ligandos se incrementa tras la estimulación con algunas citoquinas pro-inflamatorias como IL-2 e INF γ , IL-10 produce el efecto contrario (20).

vi) Receptores para neurotransmisores

Las células microgliales poseen además receptores para neurotransmisores y neuropéptidos liberados por las neuronas, los cuales influyen en su estado de activación actuando como indicadores del estado funcional de las neuronas que las rodean. Por un lado estos receptores permiten la supervisión de la actividad neuronal guiando los procesos microgliales hacia las sinapsis e influyendo en la plasticidad sináptica y la

densidad de espinas dendríticas. Por otra parte, median la detección y eliminación de neuronas dañadas, así como la liberación de factores neurotróficos fundamentales para la regeneración neuronal. Estos receptores son capaces de desatar cascadas inflamatorias o de inducir un fenotipo neuroprotector en células microgliales (133).

Entre los receptores de neurotransmisores más relevantes encontramos los receptores purinérgicos previamente mencionados; Receptores Dopaminérgicos (D1, D2) que aumentan la actividad migratoria y atenúan la liberación de NO inducida por LPS en experimentos *ex vivo* (134); Receptores β -adrenérgicos (Noradrenalina) que inhiben la respuesta inflamatoria (medida por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6) y mediadores como el NO, y modulan la proliferación de la microglía (134); Receptores GABAérgicos los cuales ejercen efectos neuroprotectores (135); y receptores Glutamatérgicos, tanto metabotrópicos como ionotrópicos, los cuales son capaces de mediar respuestas neurotóxicas o protectoras respectivamente (133, 136, 137).

vii) Citoquinas (y quimioquinas)

En el SNC, tanto las células gliales como las neuronas y las células endoteliales son capaces de secretar distintos tipos de citoquinas y expresar sus receptores, por lo que éstas actúan como mediadores solubles de la comunicación parácrina y autócrina entre distintas poblaciones celulares del tejido nervioso.

Las citoquinas, una gran familia de péptidos solubles y proteínas liberadas por las células inmunes, son moléculas clave para la regulación de la inmunidad innata y adaptativa. Estas moléculas participan en un amplio rango de respuestas biológicas que incluyen el crecimiento, desarrollo y modulación de la inflamación y de respuestas inmunes, así como la resolución de la inflamación y regulación de la homeostasis. Las quimioquinas son una super familia de pequeñas citoquinas pro-inflamatorias (8-10 kDa) inducibles y secretadas que median una variedad de respuestas inflamatorias, actuando principalmente como quimio-atrayentes y activadores de tipos específicos de leucocitos.

Las células microgliales elaboran y secretan una gran gama de citoquinas pro y anti-inflamatorias, cuyo balance en el cerebro, así como en los órganos sistémicos, regula la intensidad y duración de la respuesta al estímulo inmune. La microglía, utilizando la gran variedad de receptores mencionados anteriormente, es capaz de iniciar la respuesta inflamatoria citotóxica expresando citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-12, CCL2 (7, 10, 21), y MIP-1 α (138). Estas citoquinas a su vez influyen en el aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular y liberación de quimioquinas, resultando en la activación consecuente de células inflamatorias. Por otra parte, estas células son capaces de expresar citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 o IL-1Ra (139), encargadas de la resolución de la inflamación. Muchas de estas moléculas, además de su función canónica como mediadores de la

inflamación poseen un rol neuromodulatorio, como fue mencionado anteriormente.

Las células microgliales además presentan receptores para las citoquinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN γ , TNF α y TGF β , y los receptores de quimioquinas CCR3, CCR5, CXCR2, CXCR, CXCR4, CXCR8 (23).

1.1.8 El paradigma “M1-M2”

Pese a que las citoquinas pro y anti-inflamatorias son capaces de polarizar a la microglía hacia distintos estados de activación, las funciones específicas de estos estados continúan siendo un área de intenso debate. El término “activación” es una simplificación de un rango de diferentes estados efectores que encontramos en la microglía. Como se mencionó antes, no se puede considerar a la activación de la microglía como un estado discreto sino que funciona como un continuo entre distintos estados de activación. Pese a esto, siguiendo el criterio utilizado para categorizar a las respuestas mediadas por los linfocitos Th (Th1-Th2), muchos autores a efectos prácticos organizan a las respuestas microgliales en “M1 y M2” o “activación clásica y alternativa” actuando como el “Ying y el Yang” de la respuesta inmune. Sin embargo, hoy en día esto resulta una interpretación simplista de los fenotipos efectores de la microglía y los datos emergentes indican que el paralelismo con los macrófagos de la periferia es inadecuado (11, 14).

-La activación clásica o “M1” de la microglía lleva a un estado pro-inflamatorio y neurotóxico inducido por la estimulación de las vías TLR e IFN γ . En este contexto, la microglía produce citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12 y CCL2. Por otra parte, esta expresa NADPH oxidasa (del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), la cual genera superóxido y ROS, e iNOS (del inglés *inducible nitric oxide synthase*) que convierte la arginina en NO. El NO aumenta el efecto tóxico del glutamato potenciando la neurotoxicidad mediada por los receptores NMDA (del inglés *N-Methyl-D-aspartic acid or N-Methyl-D-aspartate*). La microglía M1 también expresa altos niveles de MHCII y moléculas co-estimuladoras (como CD86), receptores Fc e integrinas. De esta manera, la microglía M1 es capaz de inducir inflamación y neurotoxicidad (7, 10, 103).

-La activación M2 o alternativa describe las actividades anti-inflamatorias y reparadoras de la microglía. Puede ser inducida por IL-4, IL-13, IL-10, por el contacto de receptores Fc con inmunocomplejos o por la detección de células apoptóticas. La activación M2 promueve la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , e induce la expresión de la enzima arginasa 1 (Arg-1) que promueve la conversión de arginina en poliaminas, utilizando al mismo tiempo la arginina esencial para la producción de óxido nítrico. La microglía M2 secreta factores de crecimiento como IGF-1, FGF y CSF1, así como de factores neurotróficos como NGF, BDNF, GDNF y neurotrofinas 4/5, que actuando a través de receptores Trk, regulan la fuerza y actividad sináptica (7, 10, 103).

Pese a que estas categorías han servido para conceptualizar las actividades de la microglía *in vitro*, este paradigma es inadecuado para describir su activación *in vivo*, ya que estas células rara vez presentan un sesgo significativo hacia uno u otro estado. Como mencionamos antes, los estudios *in vitro* no tienen en cuenta la relación de las células inmunes con su entorno ni el contexto inflamatorio, el cual es fundamental para el desarrollo de su fenotipo efector. Es por esto que resulta más adecuado referirse al fenotipo microglial como una “firma molecular”, basándose en consideraciones que incluyan los perfiles transcriptómicos y proteómicos, la heterogenicidad regional, dimorfismo sexual, y las funciones en el tejido nervioso sano (desde el desarrollo hasta el envejecimiento) o los cambios en los patrones de respuesta ante estímulos que van desde el trauma físico, infección, inflamación sistémica, tumores, isquemia o neurodegeneración (10, 14).

En resumen, las células microgliales son los centinelas del SNC. Son células mieloides muy dinámicas que se encuentran explorando constantemente su entorno, contactando con la superficie de neuronas y otras células para cumplir con su función homeostática. Tras un insulto, las señales de peligro o activación son rápidamente reconocidas y las señales inhibitorias son liberadas, resultando en una respuesta inmunológica pro o anti-inflamatoria que lleva a la liberación de citoquinas y quimioquinas y/o fagocitosis y a la digestión de elementos celulares a

través de una secuencia de eventos que llevan a la remodelación del citoesqueleto (101, 109).

En base a lo anterior, podemos decir que el estado anti inflamatorio no es un estado pasivo que resulta de la ausencia de estímulos inflamatorios, sino una condición activa en la que participan una serie de moléculas reguladoras de la respuesta inmune que mantienen a dichas células en estado “vigilante”. Esto define un patrón de expresión característico de microglía homeostática (firma homeostática) que se ve desbalanceado en varias patologías mencionadas como enfermedades neurodegenerativas, trauma, infecciones, desórdenes psiquiátricos entre otros. En este sentido, resulta clave comprender mejor las señales que regulan el mantenimiento del fenotipo homeostático y las señales que estimulan la reactividad microglial pro-regenerativa, con el fin de generar terapias adecuadas para tratar las distintas afecciones neuroinflamatorias.

En este contexto, nuestro grupo trabaja desde hace varios años intentando revelar la función del inmuno-receptor CD300f, el cual se expresa en células de la línea mieloide y posee una función dual, ya que posee en su cola citoplasmática tanto dominios ITIM como dominios activadores de cascadas de señalización.

1.2 La familia de receptores CD300

Los receptores CD300 son una familia de glicoproteínas transmembrana de tipo I expresados principalmente en la superficie de las células de la línea mieloide (140). La familia humana de receptores CD300 se encuentra agrupada en una región del cromosoma 17 (17q25.1) (141) y está compuesta por 8 miembros, CD300a/IRP60, CD300b/IREM3, CD300c/CMRF35, CD300d, CD300e/IREM2 (142), CD300f/IREM1 (143), CD300g (144) y el recientemente identificado CD300h (145). Estos comparten una región extracelular con un único dominio tipo-Inmunoglobulina V (IgV), que posee un motivo aminoacídico conservado -YWCR- y dos puentes disulfuro (en lugar de uno) lo cual es indicador de una fuerte presión evolutiva para mantener los dominios de tipo CD300 desde vertebrados ancestrales en adelante (140). En este sentido, CD300a es el segundo gen con mayor presión selectiva entre humano y chimpancé (146, 147).

Por otra parte, las moléculas CD300 presentan homología estructural con los receptores TREM (148, 149), los cuales poseen también dos puentes disulfuro en sus dominios IgV, definiendo una superfamilia de Ig con un ancestro común (140).

A excepción de CD300a, CD300f y CD300g, los receptores de la familia CD300 poseen un residuo cargado en sus segmentos transmembrana que facilitan su interacción con proteínas adaptadoras con dominios

activadores como DAP-12 o FcγR. Por el contrario, CD300a y CD300f poseen la particularidad de presentar una larga cola citoplasmática con una variedad de motivos ITIM capaces de reclutar fosfatasa y mediar por tanto señales inhibitorias (143, 150). Además, CD300f presenta una función dual por poseer también motivos capaces de interactuar con PI3K y Grb2 (149), o FcγR (151) mediando así la activación de cascadas de señalización intracelulares. CD300g por su parte no posee dominios de señalización intracelular (150) (Figura 1.10).

En general, los miembros de la familia CD300 poseen un patrón de expresión restringido a la línea mieloide, sin embargo hay excepciones, con algunos miembros particulares expresados también en subtipos de linfocitos (CD300a) y en células endoteliales (CD300g) entre otros (150). Recientemente se ha visto que los receptores CD300 son capaces de formar complejos entre sí en la superficie celular a través de la interacción de sus dominios extracelulares de inmunoglobulina (152). La combinación de estos receptores modula diferencialmente la señalización intracelular, sugiriendo que los complejos CD300 podrían regular la activación de las células mieloides al interactuar con sus ligandos naturales. Esto le suma otro grado de complejidad a la señalización intracelular mediada por cada uno de ellos por separado.

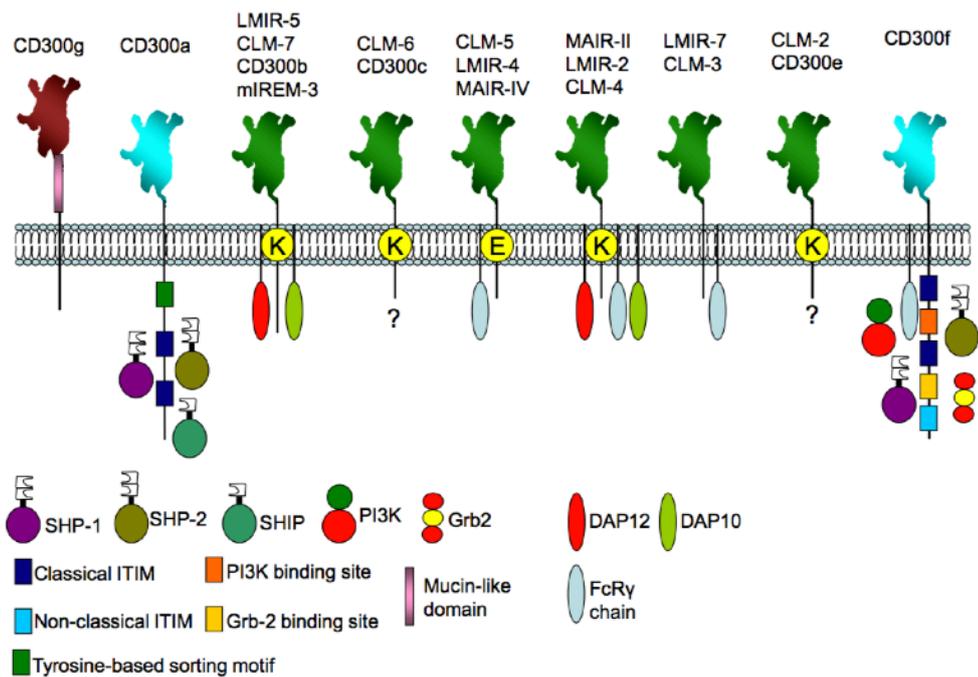


Figura 1.10_ Representación esquemática de los receptores CD300 en ratón. El dominio extracelular de los receptores que contienen ITIM en turquesa, y el de los no-ITIM en color verde. El dominio extracelular de CD300g en marrón. Se indican los motivos de señalización de cada receptor, y se muestra la interacción con fosfatasa, las moléculas adaptadoras y quinasas. *Tomado de Borrego, Blood 2013.*

1.2.1 Receptores Inhibitorios

Como mencionamos antes, los únicos receptores de la familia CD300 con capacidad inhibitoria son CD300a y CD300f; CD300a posee cuatro residuos de tirosina en su cola citoplasmática, tres de los cuales corresponden a ITIMs clásicos y el cuarto a uno no clásico o permisivo. Este receptor está presente tanto en células mieloides como linfoides - NK, linfocitos T (CD4⁺ Th1, CD8⁺ efectoras) y B (naive y memoria)-. Su acción está mediada mayoritariamente por el reclutamiento de SHP-1. Cuando se une a sus ligandos fosfatidilserina (PS) o fosfatidiletanolamina (PE) inhibe la secreción de citoquinas y mediadores pro-inflamatorios (153), además de inhibir la proliferación de linfocitos B y la citotoxicidad de NK. Su expresión aumenta tras estímulos inflamatorios para regular negativamente la respuesta.

El receptor CD300a ha sido identificado como un marcador específico de colitis ulcerativa (154), mientras que un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en este receptor, que obstruye su sitio de unión al ligando, ha sido asociado a la susceptibilidad a la psoriasis (155). Además, CD300a ha sido implicado en el desarrollo de AD mediante estudios de asociación de genómica amplia (GWAS) (156).

Por su parte, CD300f posee cinco residuos de tirosina en su cola citoplasmática que constituyen motivos para la asociación con fosfatasas o kinasas; dos de ellos corresponden a ITIMs clásicos (Y205 e Y249) y un

tercero (Y284) a un ITIM no clásico o ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switching motif). Los otros dos (Y236 e Y263) corresponden a motivos capaces de unir a p85 α , la subunidad reguladora de la PI3K, y uno de estos es capaz de unir a la proteína 2 de unión a factores de crecimiento (Grb2) (143, 149). Sus motivos ITIM son capaces de reclutar diferentes fosfatasa -SHP-1, SHP-2 y SHIP- dependiendo del tipo celular analizado (149, 151, 157) mediando diferentes respuestas específicas de cada tipo celular que lo contiene. Por otra parte, la versión de CD300f de ratón es capaz de asociarse con Fc γ R (151) mediando respuestas activadoras que potencian la acción del TLR4 tras la estimulación con LPS en mastocitos. Análisis *in vitro* utilizando cultivos primarios de células microgliales postnatales muestran el aumento en su expresión luego del tratamiento con LPS, así como su potencial rol activador tras el aumento de la producción de mediadores pro-inflamatorios luego de la estimulación con LPS (158).

El ligando natural de este receptor son fosfolípidos de membrana, mayoritariamente PS (159, 160) y en menor grado esfingomielina (EM). Su identificación ha sido muy controversial y varios artículos consideran también a la ceramida (161, 162) y lipoproteínas de baja y de alta densidad (LDL y HDL respectivamente) (161). En cultivos de mastocitos incubados con liposomas de ceramida, se vio que la unión del receptor con sus ligandos inhibe la producción de IL-6. Además, CD300f es capaz de asociarse con el receptor de IL-4 (IL-4R α) actuando como co-receptor, y amplificar las respuestas inducidas por IL-4/IL-13 tanto *in vivo* como *in*

vitro (163). Datos publicados por el grupo de Munitz muestran que los macrófagos de varios tejidos, incluyendo poblaciones del colon, tejido adiposo y peritoneo, presentan muy bajos niveles de CD300f, mientras que en poblaciones de macrófagos alveolares o esplénicos se encuentra altamente expresado. Los autores muestran que la expresión de CD300f en macrófagos está regulada por la acción de la citoquina IL-4, mientras que los niveles de CD300a se mantienen constantes (163).

1.2.2 CD300 y fagocitosis

Tanto CD300a como CD300f son capaces de reconocer señales de “cómeme” como la PS expuesta en células apoptóticas. Sin embargo, mientras que CD300a inhibe la fagocitosis de células apoptóticas/necróticas tras el reconocimiento de su ligando (153, 164), CD300f es capaz de mediar la limpieza de células apoptóticas tanto *in vitro* como *in vivo* (159, 160). Su expresión aumenta la capacidad fagocítica de fibroblastos (159) y de macrófagos en cultivo (160) mediante el reclutamiento de la subunidad p85a de la PI3K y subsecuentes cambios en la organización del citoesqueleto. Por otra parte, se ha visto que la función reparadora y remodeladora de macrófagos requiere de la presencia de IL-4 junto con células apoptóticas (165), con lo cual la capacidad de CD300f de sinergizar con IL-4 previamente citada (163) liga fuertemente la acción de CD300f a este proceso.

1.2.3 CD300f en patologías

La creciente importancia del receptor CD300f se evidencia por diferentes observaciones:

La deficiencia de este receptor en modelos murinos de alergia, exagera las respuestas mediadas por mastocitos incluyendo anafilaxis, inflamación de las vías aéreas y dermatitis. Los autores concluyen que CD300f regula negativamente la desgranulación de mastocitos mediante la activación de fosfatasas por sus motivos ITIM (161).

En macrófagos, la disminución de la capacidad fagocítica de células apoptóticas (eferocitosis) mediada por la deficiencia del receptor CD300f resulta en una predisposición a la autoinmunidad evidenciada por la aceleración de la patología en un modelo de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (160). Por otra parte, las células dendríticas deficientes en CD300f presentan una mayor actividad fagocítica, lo cual puede resultar en una mayor presentación de autoantígenos, exacerbando así la enfermedad autoinmune (166), pero puede ser muy útil en tratamientos de inmunoterapia contra el cáncer.

Además, la inhibición mediada por este receptor se ha visto relacionada con la progresión de enfermedades inflamatorias del intestino; tanto el bloqueo de la interacción de CD300f con su ligando como el uso de animales KO para CD300f presentan una patología más severa en modelos de colitis comparados con Wt (167, 168), dado por la hiperactivación de mastocitos (167) y de células dendríticas (168). Por

otra parte, la deficiencia de este receptor resulta protectora en un modelo de sépsis debido al mayor reclutamiento de neutrófilos mediado por el aumento en quimioquinas secretadas por mastocitos y neutrófilos (169). Por último, SNPs (del inglés *single nucleotide polymorphism*) en CD300f han sido también asociados con la etiología de la psoriasis y enfermedades vasculares (170, 171), así como a la predisposición a la EM (172, 173).

Su función regulatoria ha sido caracterizada en muchos tipos celulares y diferentes situaciones patológicas mostrando su función dual inhibitoria/activadora (151, 160, 161, 166, 168, 174). La singular presencia de dominios inhibidores y activadores en el mismo receptor hacen que su función sea específica del tipo celular que lo presente y talvez integradora de diversas señales. Sin embargo su rol en el SNC, en particular en microglía "*in vivo*", no ha sido aún estudiado.

1.2.4 CD300f en el SNC

El inmuno-receptor CD300f es particularmente interesante ya que ha sido identificado como uno de los receptores transmembrana con motivos ITIM más relevantes en la patología de la esclerosis múltiple; un estudio genómico identificó a CD300f como el receptor Ig con dominios ITIM más sobreexpresado en células mieloides en el modelo murino de EAE. En este modelo se observó que el bloqueo de CD300f (animales knock out o

por inyección de la proteína de fusión CD300f-IgG2a) induce un aumento de óxido nítrico y de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, junto con una exacerbación de la enfermedad. En este estudio se identificó al receptor CD300f como un regulador anti-inflamatorio de las células efectoras mieloides en la desmielinización autoinmune (175), sin embargo su presencia no fue detectada en células microgliales sino en monocitos/macrófagos CD11c+ infiltrantes.

Como mencionamos previamente, el immuno-receptor más conocido, y que posee muchas similitudes con CD300f es TREM2. Este receptor, conjuntamente con su adaptador DAP12 son expresados en microglía. El patrón de expresión del mRNA para TREM2 y DAP12 en células en cultivo es muy similar al descrito por nuestro grupo para CD300f, es decir, elevados niveles de expresión en microglía, menor expresión en oligodendrocitos, muy poca en neuronas y ausencia en astrocitos (176, 177). Sin embargo, los niveles de expresión de este tipo de immuno-receptores in vivo en microglía ramificada son bajos, por lo cual su descripción no ha sido fácil a pesar de contar con anticuerpos específicos. Los recientes avances en las tecnologías de detección de proteínas y transcritos tales como RNAseq, RNAseq de células únicas (single cell RNAseq) o técnicas proteómicas avanzadas como citometría de masa (CyTOF) han aportado a la identificación de subpoblaciones microgliales y marcadores de baja expresión como TREM2 o CD300f (15, 16, 28-30). Datos no publicados de nuestro grupo, utilizando la purificación de microglia CD11b⁺/CD45^{low} por FACS asociada a QPCR, muestran la

detección de la expresión del ARNm para CD300f en microglía *in vivo*. Por otra parte, la reciente creación de la plataforma web diseñada por el grupo de Ben Barres http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html aportó una herramienta fundamental para el análisis y comparación del perfil transcripcional de varios tipos de células del cerebro incluyendo neuronas, oligodendrocitos, astrocitos, microglía y células endoteliales, en base a resultados obtenidos por separación celular por FACS seguida de RNAseq (178). Aquí se muestra a CD300f como un gen expresado específicamente en microglía dentro del SNC.

Recientemente, estudios genómicos de microglía aislada de diferentes regiones del cerebro mostraron distintas identidades microgliales dependientes de la región, determinadas principalmente por vías bioenergéticas e inmunoregulatorias (179). Entre los genes diferencialmente regulados durante el envejecimiento se destacan los inmuno-receptores ITIM-ITAM, entre los cuales se encuentra CD300f. Por otra parte, el grupo de Ido Amit en su reciente publicación en la que describen al fenotipo microglial DAM (29) muestran como la expresión de CD300f disminuye a la mitad en la población DAM, mientras que en la microglía sana y macrófagos perivasculares se mantiene a niveles constantes. Además, los dos receptores inhibidores de la familia, CD300f y CD300a se encuentran entre los 10 genes con mayor cambio de nivel de expresión luego de una lesión traumática medular por contusión (180). Resultados no publicados de nuestro grupo muestran que su expresión aumenta en cerebro a los 3 y 7 días luego de un trauma focal en rata,

donde podemos observar la co-localización de CD300f con Lectina de tomate, específica para la detección de microglía/macrófagos (Figura 1.10).

Por otra parte, la sobre-expresión de este gen por terapia génica luego de una lesión excitotóxica en rata resultó en una reducción significativa del volumen de lesión (177). Así mismo, el bloqueo de CD300f utilizando la proteína de fusión CD300f-IgG2a luego de una lesión de nervio ciático resultó en un retardo en la regeneración del nervio y de la recuperación funcional de los animales tratados comparados con el control IgG2a (87).

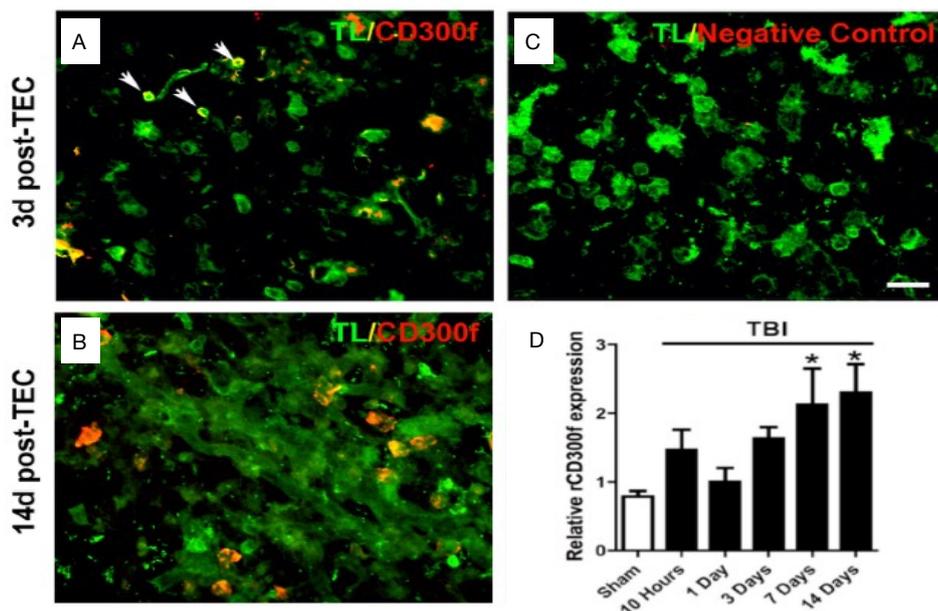


Figura 1.11_ Expresión de CD300f luego de un TEC. (a-c) Imágenes obtenidas por Inmunofluorescencia a los 3 y 14 días luego de un TEC, utilizando un anticuerpo específico para CD300f y Lectina de Tomate (TL) que se une tanto a macrófagos como a microglía. Se ve colocación de CD300f en células TL+ y negativas (flechas). (d) Expresión relativa de CD300f por PCR en tiempo real a distintos tiempos luego de un TEC (10 horas, 1, 3, 7 y 14 días). La expresión de CD300f aumenta con el tiempo. La barra corresponde a 10 μ m.

En este sentido, cabe destacar que CD300f es uno de los genes más sobreexpresados en nervio luego de una lesión de nervio periférico (181). Además, una variante truncada de este receptor se ha visto asociada a un caso familiar de autismo (29), y es uno de los genes más sobreexpresados en el cerebro luego de una inyección intraperitoneal de LPS (16). A pesar de las evidencias, no se han encontrado diferencias fenotípicas marcadas en estado fisiológico general en los animales KO para el receptor CD300f, en particular a nivel de inflamación sistémica (160, 161, 175).

En base a lo descripto anteriormente, podemos decir que CD300f es un actor clave tanto en el control del desencadenamiento de las reacciones inflamatorias como en el proceso posterior de resolución de la inflamación, y esto lo logra mediante la combinación de señalizaciones positivas y negativas mediadas por sus dominios activadores e inhibidores.

Pese a esto, no hay estudios que muestren su actividad directa en la regulación de la homeostasis y/o de las respuestas inflamatorias en el SNC.

Con el objetivo de dilucidar el papel que juega el receptor CD300f en el fenotipo microglial basal ramificado o ante estímulos inflamatorios agudos utilizamos en la presente tesis distintos modelos animales bien caracterizados.

1.3 Lesiones agudas del SNC: Trauma Encéfalo-craneano

El trauma encéfalo-craneano (TEC) es caracterizado por una lesión en el cerebro, resultado de una fuerza externa como un violento impacto en la cabeza, la cual causa la ruptura mecánica inmediata del tejido nervioso, y junto con eventos patogénicos retardados (secundarios), median colectivamente un proceso de neurodegeneración progresiva (68, 182-184).

Muchos de los mecanismos desencadenados por la lesión traumática incluyen alteración de la barrera hemato-encefálica (BHE), edema cerebral, aumento de presión intracraneal, alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral, hipoxia, alteraciones iónicas y metabólicas, apoptosis y necrosis de las células nerviosas, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otros (69, 185). Distintos tipos celulares se encuentran involucrados en estos procesos en el SNC incluyendo la microglía, astrogía, oligodendroglía, células endoteliales, neuronas y células leucocitarias que son reclutadas al SNC (186).

El daño primario del tejido nervioso puede ser difuso, focal o una combinación de ambos. El daño causado directamente por un impacto en la cabeza es considerado focal, y resulta en una contusión cortical, daño vascular, hemorragias e isquemia (187). En los daños focales, se establecen dos zonas de lesión en función espacio-temporal: una zona temprana o núcleo de la lesión y otra adyacente más tardía y periférica, llamada penumbra (185).

El núcleo de la lesión consiste en células necróticas o apoptóticas muriendo rápidamente debido al trauma y/o al entorno hipóxico/isquémico. Este último se genera a causa del daño en la perfusión cerebral y la oxigenación, la respuesta excitotóxica y la oclusión microvascular focal (188, 189). Los cambios neuropatológicos en el núcleo de la lesión ocurren muy rápidamente, determinando una zona muy difícil de rescatar. A nivel macroscópico, el daño incluye la ruptura de los tractos de sustancia blanca, contusiones focales, hematomas extra e intracerebrales y edema. A nivel celular, los eventos tempranos del trauma incluyen microporación de membranas, pérdida de iones y cambios conformacionales en proteínas (185).

La zona de lesión secundaria o penumbra es donde el tejido nervioso se encuentra menos seriamente comprometido (fig. 1.11). En esta zona ocurren cambios más graduales y progresivos que llevan a una muerte celular predominantemente de tipo apoptótica.

La lesión secundaria que ocurre en la zona de penumbra se desarrolla al cabo de horas a días de ocurrida la lesión, y comprende complejos mecanismos fisiopatológicos, bioquímicos y estructurales que se desencadenan luego del daño primario. Esta se ve afectada por la liberación de neurotransmisores, generación de ROS, liberación de calcio, activación génica, disfunción mitocondrial y activación de la respuesta inflamatoria (184, 185).

El TEC produce consecuencias tanto agudas como crónicas que pueden persistir por meses o años luego de la injuria primaria, llevando a

discapacidades permanentes que reducen la expectativa y calidad de vida. Las consecuencias directas de un TEC simple o repetitivo en su fase crónica puede resultar en patologías secundarias como depresión, epilepsia, desórdenes del sueño, enfermedades neurodegenerativas, desregulación neuroendócrina y problemas psiquiátricos (184, 190).

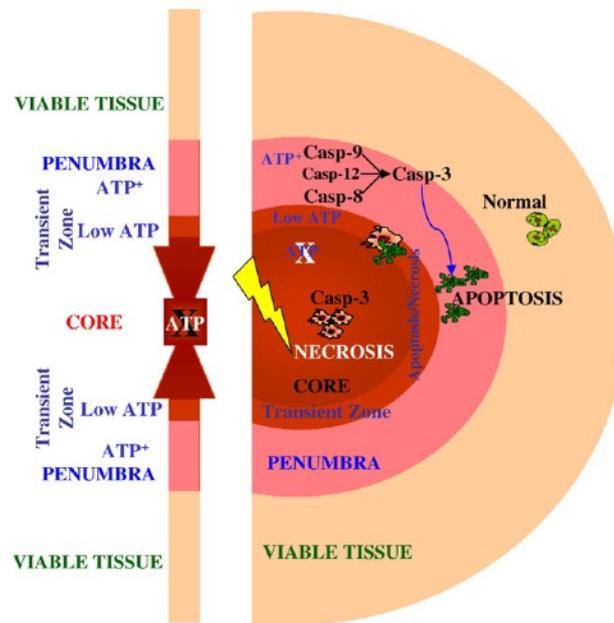


Figura 1.11_ Daño cerebral post-traumático. En la figura se representan las distintas regiones que se definen luego de una lesión cerebral de tipo focal: La región central o núcleo, representa zona donde las células sufren necrosis. La región que rodea al núcleo es llamada penumbra, un sitio de muerte celular retardada (de tipo apoptótica) debido entre otras cosas a la disponibilidad de ATP. Una zona de transición entre el centro de la lesión y la penumbra se mezclará con el centro si el flujo sanguíneo cerebral no es restaurado a tiempo. Esta zona puede ser rescatada cuando se trata en una ventana temporal adecuada. La penumbra se encuentra rodeada por una región de tejido viable. *Tomado de Mehta et al., Brain Research Review. 2007.*

1.3.1 Epidemiología del trauma

El TEC, considerado una “epidemia silenciosa”, continúa siendo la causa principal de muerte e invalidez de los países industrializados (184, 187) y un problema aún mayor en los países en desarrollo (187, 191, 192). También constituye un importante problema de salud pública en nuestro país ya que afecta a individuos más jóvenes que otras enfermedades, con lo cual es la principal entidad causante de años de vida productiva potencialmente perdidos, con un promedio de 28,8 años por lesión traumática (193, 194).

Este implica no solo los casos de accidentes de tránsito o laborales, sino que hay una creciente preocupación a nivel global por el desarrollo de patologías asociadas al TEC en deportistas, militares y civiles expuestos repetitivamente a traumas en la cabeza (69, 195).

Cabe destacar que en el 60% de los casos de muerte por TEC, ésta ocurre en el lugar del trauma y el otro 40% a nivel hospitalario; de los que llegan a hospitalizarse, alrededor de un 30% muere en las primeras 24 horas y el resto en el transcurso del mes post trauma (datos tomados de la UNASEV)

Las estadísticas internacionales con respecto al TEC muestran datos interesantes; sólo en EEUU anualmente alrededor de 2 millones de personas sufren un TEC, de los cuales 50.000 fallece en la etapa aguda y 100.000 permanece con defectos neurológicos a largo plazo (192),

existiendo un total de 5.3 millones de personas con discapacidad generada a raíz de un TEC (184).

Estos números pueden estar subestimando el hecho de que éste representa un riesgo para el desarrollo posterior de desórdenes neuropsiquiátricos como depresión/ansiedad, estrés post-traumático, déficit de memoria e inflamación crónica, así como enfermedades neurodegenerativas tales como CTE, AD, PD y ALS (190, 195, 196), los cuales no son reportados pero aumentan la incidencia del TEC (184, 192). El daño post-traumático a largo plazo se caracterizado histológicamente por la formación de agregados neurofibrilares y acumulación de β amiloide, mostrando una relación directa entre el trauma encefálico y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas del tipo AD (184).

Los tratamientos se focalizan en la interrupción o inhibición de las cascadas de eventos de la injuria secundaria ya que la muerte celular resultante del impacto inicial en el tejido nervioso es inmediata e irreversible. Asimismo, la lesión secundaria al ser más lenta y progresiva, ofrece opciones terapéuticas y una ventana temporal que permite actuar para revertir o frenar el daño. No obstante, pese a los grandes esfuerzos, a la fecha no existen tratamientos neuroprotectores efectivos capaces de reducir o revertir los daños causados por un TEC (190, 197, 198).

Numerosos fármacos han sido administrados a animales de experimentación obteniendo resultados exitosos a nivel de recuperación funcional, histológica y bioquímica del tejido nervioso. Sin embargo, estos

han fracasado en los ensayos clínicos (57, 185). Esto se debe en parte a la complejidad y heterogeneidad de la patología en la clínica, donde parámetros como la edad, el sexo y la genética del paciente, así como el tipo y severidad de la injuria primaria, son determinantes cruciales de la progresión de la inflamación. En este sentido, no existe un único modelo capaz de replicar por completo todos los aspectos del TEC (184, 196). En el caso concreto de los tratamientos que actúan sobre la inflamación, cabe destacar que su falta de efecto protector en pacientes podría deberse entre otras razones a que se han utilizado moléculas anti-inflamatorias de amplio espectro como la metilprednisona perdiéndose la selectividad de la regulación neuroinflamatoria o actuando sobre la inmunodepresión ya de por sí presente en este tipo de pacientes, lo cual afecta negativamente otros procesos concomitantes como infecciones respiratorias muy frecuentemente asociadas a los pacientes neurocríticos.

1.3.2 Modelos animales

El uso de modelos animales es esencial para el estudio de los procesos inflamatorios y para el desarrollo de nuevas terapias. Un gran número de modelos murinos han sido desarrollados para reproducir los aspectos del TEC focal vistos en la clínica (95, 187, 199). El modelo clásico más utilizado en el pasado con este fin fue la contusión inducida por la caída de una pesa (del inglés “*weight-drop injury*”), sin embargo actualmente han cobrado mayor relevancia los modelos de lesión cerebral por percusión de

fluido (FPI) y el trauma severo inducido por contusión cortical controlada (CCI) (95, 187) por ser más reproducibles y estables. Asimismo, recientemente se han introducido nuevos modelos de trauma suave (mTBI) sin apertura del cráneo (68, 196) que se asemejan a los encontrados en la clínica a causa de la práctica de deportes por contacto o lesiones difusas de diversa índole (figura 1.12).

i) Trauma severo

Las ventajas del modelo CCI frente a los otros modelos mencionados es que éste permite la manipulación y homogenización de variables como la duración, velocidad y profundidad del impacto, mediante la utilización de un equipo llamado “impactor cortical” (Fig 1.12 a). Este equipo nos permite generar un golpe mediante un mecanismo de pistón con variables controladas por un software. El modelo de CCI reproduce los efectos neuropatológicos de las lesiones traumáticas focales observadas en humanos como la producción de edema, cambios en la microvasculatura cerebral, infiltración leucocitaria, daño neuronal y daño axonal, así como déficit comportamentales significativos (95, 200).

ii) Trauma moderado

Este modelo se basa en la generación de un trauma sin ruptura del cráneo ni meninges. Para ello se afina el cráneo, hasta un espesor de 30 μm y se comprime con una microcuchilla. Esto permite la visualización del parénquima y meninges por microscopía de 2P sin causar daño o

inflamación en el cerebro (figura 1.12 b). Este modelo permite estudiar las dinámicas de la inflamación y los mecanismos que desencadenan la muerte celular inmediatamente luego de un trauma focal. Unos 30 minutos luego de producido el trauma, se pueden observar niveles elevados de ROS en las meninges y la muerte de macrófagos meningeales debido a la compresión. Por otra parte aparecen agujeros en las limitantes gliales debido a la muerte de astrocitos de la BHE. Con el fin de preservar la integridad del SNC la microglía adquiere distintos tipos de morfología descritos previamente; de tipo panal de abeja para evitar la ruptura de la barrera (honeycomb) y de tipo medusa para eliminar los restos de astrocitos una vez que mueren (Jellyfish). La muerte en el parénquima nervioso recién se observa unas 5-6 horas luego de producido el trauma, comprometiendo indiscriminadamente neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía (68, 69).

1.3.3 Respuesta neuroinflamatoria post-traumática

La neuroinflamación es una de las reacciones más prominentes causadas por el TEC. Como dijimos previamente, el daño causado al SNC desata respuestas inflamatorias llevadas a cabo por astrocitos, microglía y macrófagos residentes del parénquima nervioso, así como por leucocitos periféricos infiltrantes; monocitos, neutrófilos y linfocitos T. Estas respuestas son referidas como reacciones inmunes estériles, las cuales al menos en un principio poseen un rol protector pero pueden transformarse en nocivas en determinadas situaciones (69).

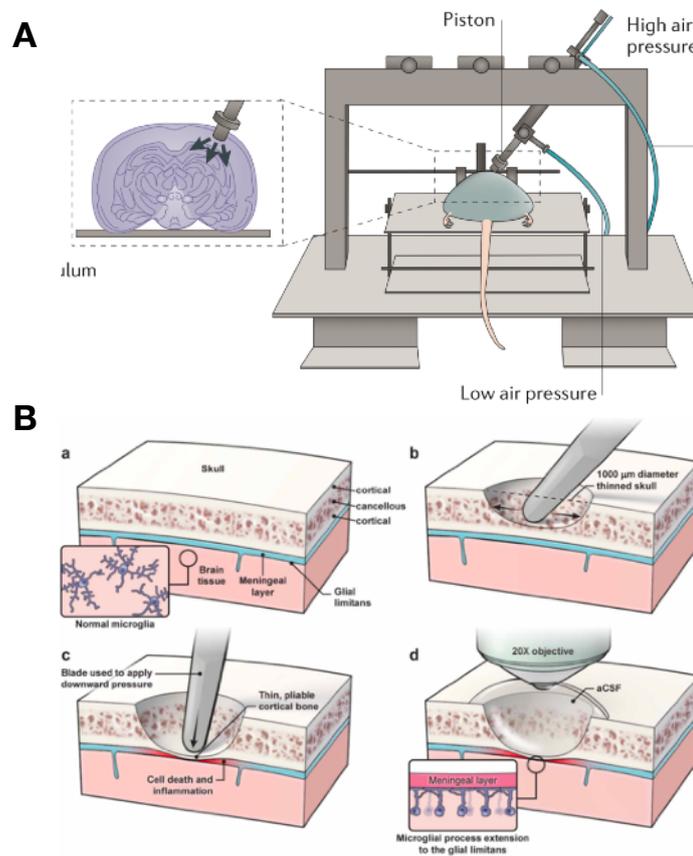


Figura 1.12_ Diseño de los modelos animales de TEC. A) El modelo impactado cortical controlado (CCI) utiliza un pistón aéreo o electromagnético para penetrar en el cerebro a una distancia y velocidad conocida luego de realizar una craniotomía. Tomado de Xiong et al., Nature 2013. **B)** Modelo de mTBI por compresión. **a)** El cráneo intacto del ratón consiste en 3 capas: cortical, esponjoso, cortical. **b)** Para el afinamiento del hueso se utiliza un micro-taladro y una micro-cuchilla hasta alcanzar los 30 µm de espesor en la capa cortical inferior. El diámetro de el área afinada es de unos 1000 µm. Esta preparación permite la visualización intravital de las meninges y parénquima cerebral intáctos. **c)** La lesión por compresión se induce luego del afinamiento, utilizando el extremo romo de una cuchilla de microcirugía para aplicar la mínima presión que promueve la concatividad de la región. **d)** Este procedimiento es realizado en 1-2 minutos, luego de los cuales se puede registrar la respuesta celular al daño por compresión mediante microscopía de 2P. Tomado de Roth et al., Nature 2014.

En términos generales, luego de la lesión inicial son inducidos secuencialmente mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, los cuales llevan a la resolución posterior del proceso reparativo tisular y de la respuesta inflamatoria en sí, mientras que las quimioquinas liberadas llevan a la activación y reclutamiento de células inmunes hacia la lesión (184). Las cascadas de respuestas inflamatorias inducidas tras la lesión primaria, contribuyen en conjunto a la determinación de la patogénesis de la lesión secundaria (figura 1.13). Es por este motivo que los procesos inflamatorios y sus mecanismos son de vital importancia para la determinación del daño histopatológico y neurológico/funcional final del individuo (201).

i) Neuroinflamación Aguda

DAMPs

Las células residentes son las primeras en responder tras el reconocimiento de DAMPs o alarminas como ATP, ácidos nucleicos o proteínas liberadas por las células necróticas (69). La señalización por DAMPs lleva a la producción de citoquinas, quimioquinas y mediadores pro-inflamatorios que afectan el microambiente nervioso y producen la infiltración de células inmunes periféricas (57). A pocas horas de producido el trauma, distintas citoquinas son liberadas desde células residentes y leucocitos infiltrantes. En esta fase aguda se desata la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias con potencial neurotóxico como

IL-1 β , IL6, TNF α Y TGF β (201, 202), así como la liberación de mediadores pro-inflamatorios como NO y la activación del inflamasoma (203). Esto conduce a la apertura de la BHE, edema, muerte celular mediada por el complemento y apoptosis. Este proceso inflamatorio, si bien es necesario para limpiar los restos celulares luego de un daño, cuando es producido en exceso o durante un período prolongado puede resultar en la muerte neuronal y neurodegeneración progresiva.

La naturaleza dual de la inflamación fue demostrada en modelos experimentales donde el KO para TNF (204) o el bloqueo farmacológico de iNOS (205) luego de un trauma llevó al empeoramiento de la función motora o cognitiva y a lesiones de mayor tamaño pocas semanas después del TEC durante la fase crónica.

Excitotoxicidad mediada por Glutamato

Otra respuesta que sigue al daño primario es la liberación de glutamato y otros aminoácidos excitatorios, lo cual lleva al daño neuronal excitotóxico tras la activación de receptores de tipo NMDA o AMPA (184, 186). Por otra parte, la liberación de glutamato lleva al influjo de calcio al interior celular y consecuente despolarización en ondas que se propagan desde el centro de la lesión hacia la penumbra. Las células del centro de la lesión están destinadas a morir debido a la falta de energía, mientras que las células de la penumbra son capaces de repolarizarse y ser rescatadas.

Además, los receptores glutamatérgicos cambian su patrón de expresión, distribución y función tras la inducción de TNF e IL-1 β , y son capaces de inducir la expresión de mediadores inflamatorios, los cuales a su vez regulan la cantidad de transportadores de glutamato en astrocitos, afectando así su recaptación (206). En este sentido, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) es capaz de disminuir la necrosis y el subsecuente daño cerebral luego de una isquemia focal (207). En respuesta al glutamato se liberan grandes cantidades de adenosina endógena a través de la hidrólisis del ADP, la cual posee propiedades neuroprotectoras y anti-inflamatorias actuando a través del receptor A1.

Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial y generación ROS causadas por el daño son también factores importantes en el transcurso de la neuroinflamación post-traumática. La mitocondria juega un papel muy importante en la regulación de la apoptosis por actuar como un reservorio de proteínas apoptogénicas como citocromo C o proteínas de unión a caspasas. La apoptosis dependiente de mitocondrias se desata en respuesta al estrés celular como daños al ADN, perturbación de la membrana mitocondrial y la caída de factores tróficos (186). Por otra parte, existen DAMPs mitocondriales que median la mitofagia, como la exposición de cardiolipina en la membrana mitocondrial externa. La alteración del proceso mitofágico resulta en muerte celular y liberación de esos DAMPs al exterior celular, generando respuestas locales y sistémicas mediante la

interacción con receptores inmunes como el TLR9 (184). El estrés oxidativo generado por la liberación de radicales libres luego de un TEC contribuye al daño neuronal y puede ser revertido por la administración de antioxidantes como el glutatión (68), el cual mostró alta efectividad en la reducción de la lesión luego de un trauma moderado en ratones.

Daño vascular

El daño vascular resultado de la lesión primaria lleva a la ruptura de la BHE por perturbación de los complejos de uniones ocluyentes de las células endoteliales y degradación de la lámina basal mediada por las metaloproteinasas de la matriz dependientes de zinc (MMP). Esto lleva a la liberación de componentes de la sangre y plasma como complemento y hemoglobina (*cell free hemoglobin*) al parénquima cerebral consecuentes al aumento en la permeabilidad de la BHE. Por otra parte, el aumento en la permeabilidad de la BHE inicia la acumulación, adhesión e infiltración de leucocitos, promoviendo el inicio de cascadas inflamatorias que conducen al daño cerebral (186).

Los complejos de hemoglobina libre y haptoglobina son liberados en las áreas traumatizadas y son internalizados mediante receptores "scavenger" CD163 en microglía y macrófagos, los cuales adquieren consecuentemente un fenotipo anti inflamatorio (208). Por este motivo, la liberación de hemoglobina podría resultar terapéutica luego del daño.

Respuesta celular

Como fue mencionado previamente, los eventos inflamatorios de la respuesta post trauma llevan a la acumulación de citoquinas pro-inflamatorias, iNOS, y moléculas de adhesión como selectinas, integrinas e inmunoglobulinas, lo cual contribuye al daño irreversible. Estas moléculas son producidas por células endoteliales, astrocitos, microglía y leucocitos y llevan al reclutamiento de leucocitos al sitio del daño.

Las primeras células en infiltrar al SNC luego de un trauma son los neutrófilos de manera dependiente de P2RX7; llegan a la zona lesionada de las meninges alrededor de una hora luego de producida la lesión en un modelo de trauma moderado (69), y tienen un pico entre las 24 y 48 horas luego de producido el daño en el modelo de CCI, que luego decae (209). Al parecer, luego del trauma estas células infiltran a través de las meninges y del plexo coroideo, el cual produce quimioatrayentes como CXCL1, CXCL2 y CXCL3, y se acumulan en el tercer ventrículo, así como en el espacio subaracnoideo cerca del sitio de la lesión, por donde entran hacia el parénquima dañado (210). Si bien se consideran una población pro-inflamatoria, tiene efectos pro-reparadores por contribuir a la fagocitosis y en el reclutamiento de otros leucocitos. En modelos de trauma severos (CCI) donde hay disrupción de meninges, estas células contribuyen a la formación del edema post-traumático y ruptura de la BHE por liberación de mediadores pro-inflamatorios, y su bloqueo exhibe efectos beneficiosos (69, 186). Por ejemplo, el bloqueo de la infiltración de

neutrófilos con anticuerpos anti Gr-1 reduce el edema y volumen de lesión en un modelo de CCI (211). Sin embargo en modelos de trauma moderado (mTBI) sin apertura de cráneo, el reclutamiento de neutrófilos tiene carácter neuroprotector al reducir la muerte celular a nivel de las meninges.

Por otra parte, los monocitos/macrófagos juegan también un rol importante en la patogénesis del trauma. Los macrófagos meningeales son las primeras células en morir luego de un trauma focal cortical y son fuente de alarminas y ROS (69). Los macrófagos derivados de monocitos infiltrantes alcanzan su pico máximo a las 24-48 horas de producida la lesión. Estos también responden a quimioquinas producidas por el epitelio del plexo coroideo como CCL2 y CX3CR1. En animales KO para CCL2 se describió un efecto neuroprotector a las pocas semanas de producido el trauma, sugiriendo un efecto neurotóxico mediado por estas células en la fase crónica de la patología (212). En el caso de CX3CR1, el KO resultó en reducción del volumen de lesión y mejorías motoras a corto plazo (1-15 días) que con el tiempo revertían (mayor muerte neuronal y disfunción cognitiva en los KO a los 30 días), mostrando un patrón temporal en la respuesta mediada por CX3CR1/CX3CL1 luego de un trauma (213). Los autores ven una relación entre los efectos de la deficiencia del receptor y los cambios en el fenotipo microglial que van de

un fenotipo más anti-inflamatorio a corto plazo, a uno pro-inflamatorio al final del estudio.

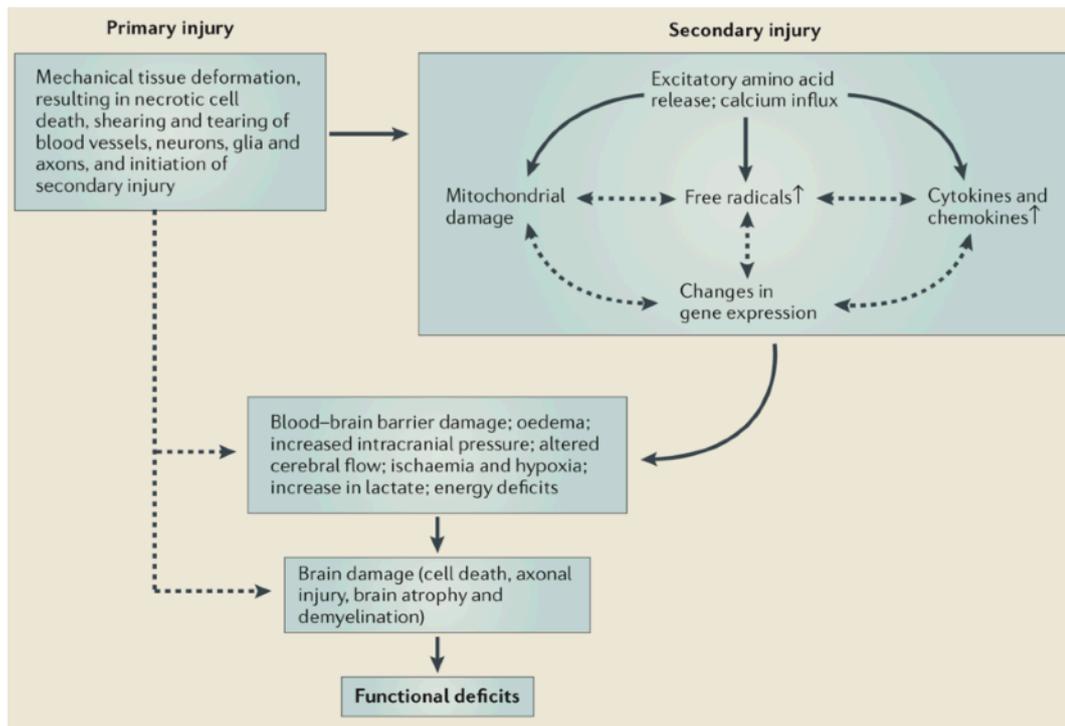


Figura 1.13_ Evolución del daño post-traumático. Patología post-traumática simplificada. Luego de un TEC, la lesión primaria, la cual resulta de la fuerza externa, involucra la deformación mecánica del tejido. Esto conlleva al inicio de la lesión secundaria la cual involucra la despolarización neuronal y liberación de neurotransmisores excitatorios (glutamato y aspartato), los cuales se unen a sus receptores e inducen un influjo masivo de calcio. El calcio activa fosfolipasas dependientes de calcio, proteasas y endonucleasas que degradan lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El secuestro de calcio por las mitocondrias lleva a un desbalance de calcio, déficits energéticos, formación de radicales libres e inicio de apoptosis. El aumento en la formación de ROS y especies reactivas de nitrógeno oxidan a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos luego del TEC. El TEC aumenta la expresión de muchos factores de transcripción, mediadores inflamatorios y genes neuroprotectores, pero disminuye los receptores de neurotransmisores y mecanismos de liberación. La expresión aumentada de citoquinas detrimentales y quimioquinas inducen el edema cerebral, el daño a la BHE y la muerte celular. El resultado de estas complejas cascadas luego del TEC es eventualmente el daño y muerte celular, las cuales causan déficits funcionales. Muchos experimentos y datos clínicos indican que el cerebro adulto

ii) Neuroinflamación crónica

La evaluación histopatológica de tejido humano luego de un TEC también muestra la existencia de eventos inflamatorios crónicos o prolongados que pueden durar hasta años luego de la lesión (184, 190, 214-217) (figura 1.14). En autopsias de pacientes sobrevivientes de TEC, a más de un año de producido el daño se han visto niveles aumentados de microglía ameboides en tractos de sustancia blanca cortical con respecto a controles (217, 218), las cuales se han asociado al afinamiento del cuerpo calloso. Estudios por PET también muestran niveles alterados de microglía activada en sobrevivientes hasta 17 años luego de un trauma (216). Por otra parte, los niveles de citoquinas en suero también demuestran la activación inmune crónica luego del TEC; niveles elevados de IL-1 han sido reportados en pacientes semanas luego de un TEC, indicando que los eventos inflamatorios continúan siendo importantes en etapas tardías del trauma (219). Además, se han relacionado los niveles elevados crónicos de TNF α encontrados en suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes a un año de producido el TEC con el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas y tendencias suicidas (220).

En modelos animales, por otra parte, se ha visto activación crónica de la microglía, con sobre-expresión de marcadores tales como MHC II, CD68 (213) y NADPH oxidasa a un año del CCI (184). Luego de un año, los ratones muestran neurodegeneración progresiva con marcado aumento

del volumen de lesión, estrés oxidativo persistente, desmielinización y desórdenes cognitivos.

Desde el punto de vista funcional, estudios recientes demuestran que hasta los daños traumáticos más moderados son capaces de causar anomalías comportamentales y motoras en ratones, incluyendo déficits en interacciones sociales, memoria espacial y coordinación motora a largo plazo (221). Por otra parte, estudios en cerdo utilizando un modelo de trauma moderado han mostrado que el empeoramiento en el desempeño cognitivo de los animales está asociado con la severidad del daño axonal en la sustancia blanca (222).

Por otra parte una de las características patológicas más importantes del TEC es el daño axonal difuso. Los axones en la sustancia blanca son especialmente vulnerables al daño debido a la carga mecánica del cerebro durante el TEC. El daño axonal difuso existe en todas las severidades del TEC y comprende un espectro de anomalías que van desde la ruptura mecánica del citoesqueleto del axón, hasta la interrupción del transporte, edema y proteólisis mediadas por cambios fisiológicos secundarios. Estas anomalías pueden presentarse de forma inmediata o persistir como disfuncionalidades cognitivas dependiendo de la severidad del trauma. La degeneración axonal puede continuar durante años luego de la lesión en humanos y parece jugar un papel importante en el desarrollo de patologías degenerativas relacionadas con el

Alzheimer (223). La distribución del daño axonal no es difusa como dice su nombre, sino que es estereotipada y multifocal. Esta involucra preferencialmente los tractos medios de sustancia blanca como cuerpo calloso, cápsulas internas, tronco y pedúnculos cerebrales (224).

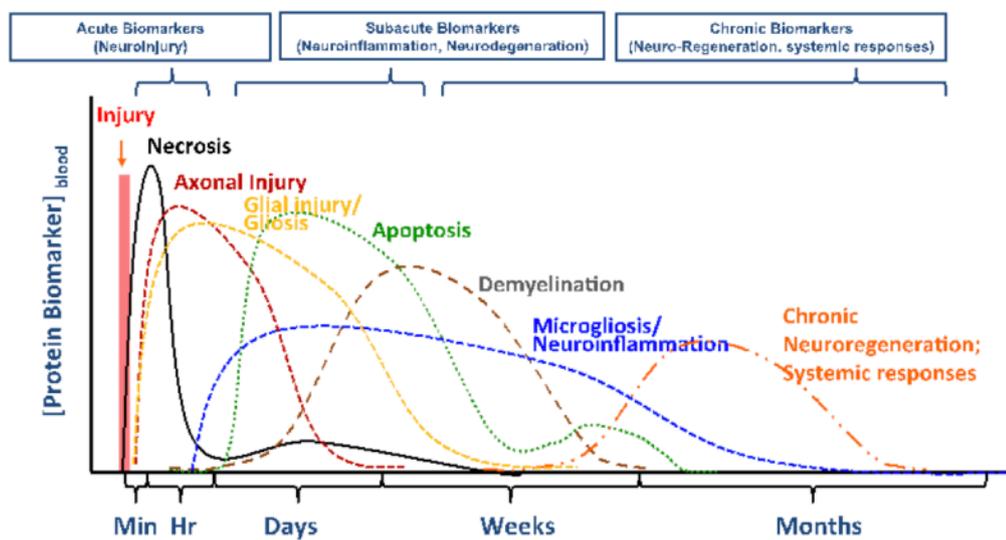


Figura 1.14_ Patología del TEC crónico. La imagen muestra la detección en sangre de distintos biomarcadores relacionados con los procesos fisiopatológicos que describen la respuesta post traumática. Lo más relevante a destacar de esta figura es que la respuesta al trauma puede perdurar por meses (o años) luego de producido el mismo. En particular la microgliosis se manifiesta desde tempranas horas post trauma y se pueden encontrar biomarcadores relacionados con la misma durante meses posteriores. Tomado de Bramlett et al., *Journal of Neurotrauma* 2015.

1.3.4 Neuromodulación: blancos terapéuticos

Los avances en el conocimiento de las respuestas crónicas a largo plazo han ayudado a la identificación de nuevos potenciales blancos terapéuticos, así como a la expansión de la ventana terapéutica para tratar el TEC (95) si bien no hay tratamientos efectivos a la fecha. El balance de la expresión de citoquinas determina el destino de las neuronas lesionadas hacia mecanismos de supervivencia o muerte celular. La sobre-expresión de factores neurotróficos y citoquinas luego de producida una lesión determina la neuroprotección de la etapa inicial, mientras que la caída en la expresión de los factores neurotróficos en conjunto con el aumento continuo de citoquinas pro-inflamatorias, el estrés oxidativo, el edema masivo y la alteración en la función de neurotransmisores endógenos, promueven la neurodegeneración característica de las etapas crónicas del TEC (183).

Por otra parte, las señales inflamatorias juegan un papel importante en la regeneración del tejido nervioso por encargarse de la limpieza del tejido dañado y generar un ambiente propicio para la promoción de la reparación. Es por esto que resulta importante considerar la dualidad de las reacciones inmunes desatadas por un TEC al momento de buscar terapias efectivas.

El desvío del perfil de expresión de citoquinas hacia una fase pro-supervivencia (activación de la fagocitosis de células apoptóticas/restos celulares, citoquinas anti-inflamatorias, resolución de la inflamación)

podría incrementar la neuroprotección y regeneración del SNC luego de un TEC (183). Asimismo, un aumento de citoquinas pro-inflamatorias puede potenciar el daño secundario, por lo cual este efecto debe ser minimizado (225). Sin embargo, el hecho de que el bloqueo de la respuesta inflamatoria mediante el uso de drogas inmunosupresoras como corticoides hayan fallado en ensayos clínicos, nos da la pauta de que al menos en parte la inflamación primaria es necesaria para promover la reparación del tejido luego de una injuria cerebral (57).

Podemos decir entonces que si bien la función de la respuesta inflamatoria es preservar la integridad del tejido, un desbalance en la respuesta inmune post-traumática puede generar consecuencias nocivas a mediano y largo plazo, por lo cual debe estar finamente regulada. Esto se logra mediante la participación de inmunomoduladores tales como mediadores solubles y receptores de membrana de las células involucradas en la respuesta inmunitaria. La clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas está en la promoción de la reparación del tejido dañado, inhibiendo la neuroinflamación degenerativa, la disfunción sináptica y el daño axonal a largo plazo. Es por este motivo que los inmuno-receptores son consideradas blancos terapéuticos prometedores, ya que juegan un importante papel en la modulación de la respuesta inflamatoria y en los procesos degenerativos y reparadores desencadenados tras el daño (184).

1.4 Objetivos

Objetivo general:

Se busca contribuir a la comprensión de la función de las células microgliales en la fisiología homeostática del SNC y en los procesos inflamatorios activados durante la neuroinflamación post-traumática. Para ello, analizaremos del papel del receptor CD300f en el establecimiento del fenotipo microglial homeostático ramificado y su influencia en algunos procesos básicos de la fisiología del sistema nervioso, así como en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y el restablecimiento de la homeostasis luego de un trauma cerebral.

Objetivos específicos:

- 1- Analizaremos la función de CD300f en el establecimiento de patrones comportamentales en el animal naïve y luego del trauma cerebral mediante el uso de animales KO para este receptor.
- 2- Caracterizaremos las consecuencias de la ausencia de CD300f en el fenotipo microglial, analizando el perfil de expresión y características morfológicas en el contexto homeostático y neuroinflamatorio.
- 3- Finalmente, apuntamos a la obtención de blancos moleculares capaces de intervenir en la regulación fina de las respuestas neuroinflamatorias para su utilización posterior en el diseño de estrategias de Terapias Avanzadas.

1.5 Hipótesis

Como fue descrito en los apartados anteriores, los puntos de control del fenotipo microglial son esenciales tanto para su correcta función homeostática como para su función luego de lesiones o estímulos inflamatorios. Estos puntos de control integran la señalización proveniente de diversos receptores inmunes activadores e inhibitorios, contribuyendo fuertemente a la determinación del fenotipo celular. Esto sugiere que la familia de receptores CD300 también participa en esta regulación fina a través de sus miembros activadores e inhibitorios. CD300f resulta particularmente interesante debido a su función dual, presentando los clásicos dominios inhibitorios ITIM así como dominios activadores de unión a PI3K y FcγR, por lo cual podría representar un nodo determinante del fenotipo microglial.

Nuestra hipótesis es que este receptor es un mediador clave tanto en el control del desencadenamiento de las reacciones inflamatorias microgliales como en el proceso posterior de resolución de la inflamación, evitando la cronificación de estos procesos.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Modelos Animales

Los estudios experimentales in vivo fueron avalados por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) y la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (CHEA-UDELAR) (Exp. N° 071140-000813-12, Exp. N° 070153-000528-14) y llevados a cabo según las directivas de la Federación de las Asociaciones de Ciencia de Animales de Laboratorio (FELASA).

Los distintos modelos neuroinflamatorios se llevaron a cabo en ratones adultos macho (y hembra según especificado) de entre 3 y 6 meses de edad, de la cepa C57BL/6 provistas por la unidad de reactivos y biomodelos de experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina UDELAR, y la Unidad de Animales Transgénicos de Experimentación (UATE) del Instituto Pasteur de Montevideo. Los animales se mantuvieron en cajas individuales a temperatura adecuada (22-26°C), con agua y comida *ad libitum* y con un ciclo luz oscuridad 12:12 horas. Para los experimentos realizados en el NIH, Bethesda, USA, se utilizaron ratones macho de la misma cepa de 8-10 semanas de edad.

2.1.1 Modelos de Trauma encéfalo-craneano (TEC):

i) Trauma moderado - mTBI

Para el modelo de trauma encéfalo-craneano suave se siguió el protocolo detallado en Roth *et al* .2014 (68). Para llevarlo a cabo, realicé una serie

de pasantías en el laboratorio del Dr. McGavern el cual describió este protocolo. Brevemente, se anestesió a los animales CD300f Wt o KO con una solución inicial de Ketamina (25%) - Xilazina (20%) - Acepromazina (6%) (KXA) en PBS (5µl/g) y se afinó el cráneo hasta alcanzar un espesor de 30 µm, para realizar posteriormente el trauma por compresión. El trauma se realizó bajo la lupa, mediante la utilización de una micro-cuchilla con la cual se comprimió el cráneo afinado evitando su ruptura (figura 2.1). Luego de esto se procedió al análisis del tejido por 3 metodologías diferentes (figura 3.10):

- 1. Para estudiar la dinámica microglial in vivo por microscopía de 2P se utilizaron ratones de la cepa CX3CR1^{+/-GFP} cruzados con los de la cepa CD300f-KO y WT, con el fin de visualizar la microglia fluorescente. Luego de anestesiados, estos ratones fueron inyectados con 200 µl de una solución acuosa de Ioduro de propidio 1mg/mL (PI) intraperitoneal (i.p) visualizados inmediatamente luego de producida la lesión con el fin de analizar la dinámica microglial en las primeras horas posterior al trauma y evidenciar la muerte celular o los vasos sanguíneos (figura 3.11).
- 2. Otro grupo fue mantenido bajo anestesia KXA⁶ durante 5 horas, incubando con líquido céfalo-raquídeo artificial (aCSF) sobre la lesión, el cual fue reemplazado media hora previo a la perfusión (con PFA 4%)

⁶ Dosis de mantenimiento subcutáneas con una dilución 1/4 de la dosis original = [peso x 10] - 20 µl, durante las siguientes horas posterior al trauma

por la solución acuosa de PI utilizada en el grupo anterior para el análisis de la muerte celular inducida por la lesión. Las cabezas fueron luego disecadas, crio-protegidas con sacarosa al 30% e incubadas durante 24 horas con EDTA con el fin de “ablandar” el cráneo para realizar cortes finos al crióstato incluyendo el hueso. La muerte celular cerebral fue analizada utilizando el software Imaris Bitplane a partir de imágenes obtenidas por microscopía confocal en el centro de la lesión. Se cuantificaron las células que incorporaron PI y su co-localización con la señal de DAPI que permite identificar núcleos necróticos/apoptóticos (figura 3.13).

- 3.a. El tercer grupo, siguiendo el procedimiento anterior, fue perfundido PFA 4% y se procesaron meninges 6 horas luego del trauma para su análisis por microscopía confocal (ver sección procesamiento de muestras para histología y preparados de meninges enteras). En este grupo se utilizaron tanto ratones transgénicos cruzados con CX3CR1^{+/GFP} CD300f KO y Wt como ratones transgénicos simples CD300f KO y Wt (figura 3.14 y 3.15).
- 3.b. También se analizaron los cerebros de ratones KO y Wt GFP mediante microscopía de 2P para cuantificar el número de células muertas a nivel de las meninges (figura 3.16).

Por otra parte se utilizó esta metodología en ratones CX3CR1^{+/GFP} CD300f Wt y KO naïve (con el cráneo afinado para permitir la visualización por 2P, pero sin compresión) con el fin de estudiar los efectos del receptor CD300f en la dinámica microglial normal (figura 3.6).

ii) Trauma severo - Impactor cortical controlado (CCI)

El procedimiento se llevó a cabo como detallado en Richter et al. 2017 (200) (Anexo). Los ratones fueron anestesiados por vía respiratoria con 3% de isoflurano (Abbott, Abbott Park, IL, USA) y 0.8% de O₂, y mantenidos durante el procedimiento en 2-2.5%. Posteriormente se colocó en posición prona, fijándose al sistema quirúrgico estereotáxico y se procedió al abordaje de la región cefálica mediante una incisión mediana amplia de modo de abordar el cráneo. Utilizando un pequeño taladro dental con fresa de diamante se realizó una craneotomía lateral derecha de 3 mm de diámetro en forma circular entre Bregma y Lambda, inmediatamente adyacente a la sutura coronal y a 0.5 mm de la sutura sagital, manteniendo intacta la duramadre. La topografía exacta del centro de la craneotomía es 1.75 mm lateral y -0.75 mm antero-posterior respecto a bregma. A nivel cerebral, esta zona incluye principalmente al área motora y somato-sensorial primaria. Para generar las lesiones traumáticas cerebrales unilaterales se utilizó un sistema de impacto cortical controlado (PinPoint™ Precision Cortical Impactor Model PCI3000 Hatteras Instruments, Cary, NC, USA). Este equipo nos permite homogeneizar las lesiones cerebrales y generar así un modelo fiable y reproducible (226, 227). Consiste en un pistón que impacta en el cerebro con determinadas condiciones prefijadas por el operador. Para la puesta a punto de este ensayo se utilizó la cepa de ratones Thy1-YFP-H que expresan la proteína fluorescente amarilla en un bajo porcentaje de neuronas y haces, y se probaron 3 profundidades de impacto distintas:

0.5 mm, 1.0 mm y 2.0 mm. Los animales fueron luego evaluados mediante el ensayo comportamental “Parallel Rod floor Test”, y el daño cerebral fue analizado mediante inmunohistoquímica .

Para el estudio comparativo de los animales CD300f-KO y WT se utilizó un pistón de 2.5 mm, fijado a una velocidad, profundidad y tiempo de impacto de 2 m/seg, 2 mm y 150 msec respectivamente, ya que permite la realización de una lesión con efectos comportamentales evaluables (228). Luego de provocada la lesión encefálica, se suturó la piel que cubre el sitio de la lesión y el animal permaneció en reposo a 37°C durante unos minutos, controlando hasta que despertó de la anestesia.

La conducta de los animales fue evaluada durante los 90 días luego de producido el trauma mediante el “Parallel rod floor test” (explicado más adelante en la sección de resultados).

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y perfundidos con PFA 4% o en salino a 4°C para el análisis histológico o molecular del tejido nervioso respectivamente a distintos tiempos; 1, 5 y 90 días post lesión (dpi). La perfusión con solución salina fría es clave para los estudios moleculares, especialmente de QPCR, para asegurar un mínimo de contaminación con componentes sanguíneos, los cuales impiden establecer cuales moléculas se expresan en el cerebro en cada momento.

Ver diseño experimental en la figura 3.18 a.

Modelo mTBI

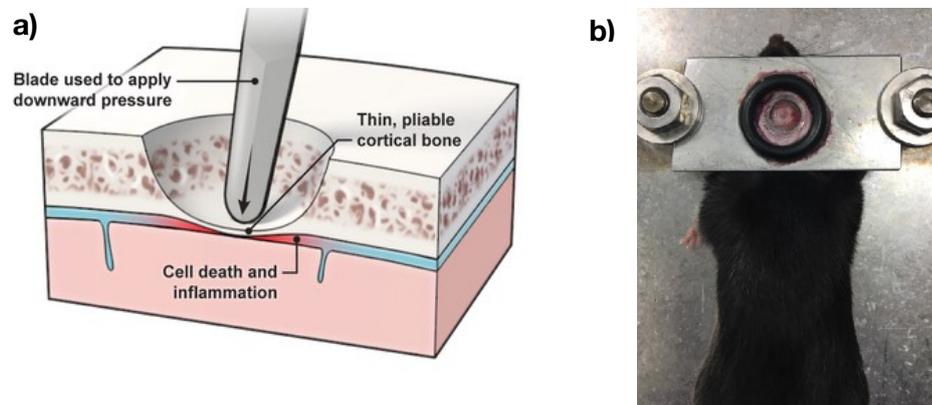


Figura 2.1_Modelo de trauma moderado- mTBI. a) Representación esquemática del modelo del trauma moderado (mTBI): afinamiento del cráneo hasta $30\ \mu\text{m}$ y la posterior compresión utilizando una microcuchilla; b) Imagen del sistema de inmovilización del animal durante el proceso de trauma. Se siguió la metodología de estudio luego del trauma especificada en la figura 3.10 en ratones CD300f Wt y KO macho de 8-10 semanas de edad.

2.1.2 Inoculación repetitiva de LPS

Para la realización de este modelo se siguió el protocolo especificado en Chen *et al.* 2012 (229). Brevemente, se inoculó a los animales durante 4 días consecutivos con 1mg/kg de LPS i.p (L2880 Sigma, Lipopolysaccharides *Escherichia coli* 055:B5) o vehículo (PBS) como control. Se evaluó la conducta basal de estos animales con el Test del Parallel rod floor al día 1, previo a la primer inyección, y al día 5, previo a su sacrificio.

Al 5º día, los animales fueron perfundidos con salino o PFA 4% y sus cerebros procesados para qPCR e histología respectivamente. Para el análisis por qPCR el cerebro fue dividido en 2 en el plano sagital y se utilizó un único hemisferio para la extracción de ARNm.

Para el análisis histológico se utilizó el marcador anti Iba-1-HRP para la cuantificación del área ocupada por la microglía, y anti Iba-1-AF488 para el análisis de proliferación microglial por co-localización con el marcador de proliferación celular Ki67. Ver diseño experimental en la figura 3.7 a.

2.1.3 Modelo de envejecimiento

Para la realización de este modelo se mantuvieron 3 cohortes de animales CD300f Wt y KO, machos y hembra, en los bioterios de la Facultad de Medicina (URBE) e Instituto Pasteur de Montevideo (UATE) durante un período de 2.5 años.

Durante este período se evaluaron los pesos de los animales y la cantidad de canas en su pelaje (solo en machos). Para la evaluación del pelaje requerimos de la participación de 3 investigadores independientes (2 a ciegas y uno al tanto de los genotipos), donde cada uno de ellos puntuó a los animales según su criterio, remitiéndose a un “score” arbitrario del 1 al 5, donde 5 es el máximo de canas y 1 es pelaje sin canas. La puntuación fue luego promediada y los resultados graficados (figura 3.27 b).

Por otra parte se les realizó a los animales ensayos de conducta mediante el Test del Parallel Rod Floor, y se evaluaron parámetros como ataxia y

actividad locomotora espontánea (figura 3.28). Por último se evaluó la tasa de supervivencia de los animales graficando el % de supervivencia en función del tiempo (semanas) y se utilizó el test de Mantel-Cox (log rank) para analizar los resultados (figura 3.29).

2.4 Análisis comportamentales

i) Test del Parallel Rod Floor

Se utilizó el Test del Parallel Rod Floor como descrito previamente en Richter *et al.* 2017 (200) para evaluar el comportamiento de animales CD300f KO y WT naïve (figura 3.1), los efectos de la inoculación con LPS (figura 3.8 a) y los efectos del CCI a corto y largo plazo (figura 3.18 b-c).

Este se basa en la colocación del animal en un sistema cerrado donde se le permite caminar libremente sobre un suelo compuesto por barras paralelas separadas de una placa metálica (suelo estándar) o separadas de una rejilla (suelo nuevo) (figura 3.17 a), y cada vez que el ratón comete un error, este es cuantificado automáticamente al entrar en contacto con el suelo, dado que se cierra un circuito. Este test permite la evaluación de parámetros como ataxia (por la cuantificación de los errores/m cometidos por los animales colocados en la arena) y actividad locomotora espontánea (medida como la distancia total recorrida por los animales) en un tiempo de 10 minutos. La arena fue limpiada entre los animales utilizando EtOH 70%.

Los resultados de Errores/m (E/m) relativos fueron normalizados con respecto a los E/m basales de cada grupo= 1.

ii) Test de campo abierto

Este fue llevado a cabo para estudiar la actividad locomotora y los niveles de ansiedad. El sistema consiste en una caja de acrílico de 40 cm x 60 cm x 50 cm de altura. Los animales fueron expuestos a la arena durante 6 minutos y se evaluó la distancia total recorrida y el tiempo que permanecieron en la periferia y el centro de la arena mediante el uso del software Any Maze (figura 3.2 a-b). La arena fue limpiada con 10% EtOH entre cada animal para evitar rastros del animal anterior que pudieran perturbar los resultados.

iii) “*Splash test*” con sacarosa

En este test, una solución de 10% de sacarosa fue rociada en el torso de los animales. Esta solución viscosa ensucia al animal, el cual inicia el comportamiento de acicalado.

Luego de aplicar la solución de sacarosa, el comportamiento de los animales fue registrado individualmente durante 5 minutos y se evaluó la latencia al inicio del acicalado y el tiempo total invertido en el mismo (figura 2.2 a y 3.2 c-d), lo cual es indicativo del estado motivacional del cuidado personal y el estado anhedónico (al estímulo de refuerzo) respectivamente (230, 231).

iv) Test de suspension por la cola

En este test los ratones fueron sometidos a un estrés moderado y una situación sin escape que se basa en la suspensión del animal por la cola a 10 cm del suelo, sostenidos por la punta de la cola mediante cinta adhesiva (figura 2.2 b y 3.2 e). Se registró y evaluó el tiempo de inmovilidad (en segundos) durante 6 minutos.

Se considera inmovilidad a la falta de intento de escape a esa situación aversiva (232).

v) “*Marble burying test*”

Este test fue propuesto inicialmente para evaluar la actividad de tipo ansiolítica. Sin embargo, debido a la respuesta mediada por inhibidores de la recaptación de serotonina, hoy en día se considera un test adecuado para evaluar desórdenes de tipo obsesivo compulsivo (un tipo de desorden de ansiedad).

El test fue llevado a cabo de acuerdo a los descrito por Deacon (233) con leves modificaciones. Una jaula individual fue llenada con una cama de 5 cm de viruta y 12 bolitas de vidrio fueron distribuidas en la superficie con un patrón de separación de aproximadamente 4 cm entre cada una (figura 2.2 c y 3.2 f). Cada ratón fue colocado individualmente en la esquina de la jaula y se le permitió explorar durante 30 minutos, luego de los cuales se contaron el número de bolitas totalmente enterradas o enterradas a 2/3 de la superficie. Las bolitas fueron limpiadas con 10%

EtOH entre los animales y la cama fue reutilizada entre los animales del mismo grupo.

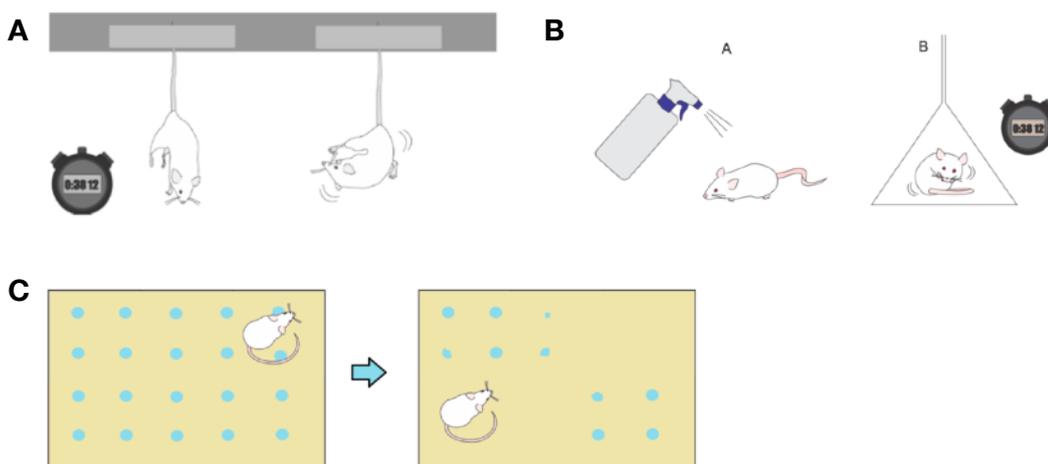


Figura 2.2_ Tests comportamentales: a) Test de suspensión por la cola - los animales son suspendidos por la cola a 10 cm del suelo y se contabiliza el tiempo que demoran en comenzar a luchar para salir de esa situación de estrés; b) Splash Test con sacarosa - los animales son rociados con una solución de sacarosa y se registra el tiempo que demoran en comenzar el acicalamiento y el tiempo invertido en el mismo; c) Marbel Burying Test - los animales son situados individualmente en una jaula con 5 cm de viruta y bolitas distribuídas en la superficie a una distancia de 4 cm . Se evalúa cuántas bolitas fueron enterradas luego de 30 minutos. Por Fernanda N. Kauffman.

2.2 Análisis histológicos

Los cerebros fueron disecados, post-fijados en PFA 4% en tampón fosfato durante 4 hs, crio-preservados en sacarosa 30% durante 48 horas y congelados en nitrógeno líquido para su posterior procesamiento. Se realizaron cortes coronales seriados de 30 μm de espesor en el crióstato Leica CM1850 UV, obteniendo un total de 10 series:

-10 series en portaobjetos para el análisis del CCI 5dpl.

-5 series en portaobjetos y 5 en flotación para el análisis del CCI 90dpl y del modelo LPS.

Los cortes fueron conservados a -20°C hasta su posterior uso.

2.2.1 Histología clásica

Los cortes fueron analizados mediante la tinción histoarquitectural de Nissl (azul de toluidina) como descrito previamente por Peluffo *et al.* 2012, (177, 200, 234), con el fin de cuantificar el volumen de lesión post traumática a los 5 y 90 dpl.

Se colorearon las secciones coronales paralelas de 30 μm de espesor, separadas cada 300 μm (cada 11 secciones) representativas de todo el cerebro mediante la técnica de Nissl, a los 5 (Figura 3.18) y 90 dpl. Se cuantificó el área de la lesión y el área del hemisferio contralateral e ipsilateral en cada corte utilizando el software Fiji (National Institutes of Health, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) plugin “freehand

selection” y “analyze measurments, area” en paralelo con la observación al microscopio utilizando el objetivo 40x. El área de la lesión y el área total del hemisferio fueron utilizados para calcular el volumen de lesión y el volumen total del hemisferio. Para el caso de los cerebros a 5dpl el volumen de lesión incluye el área de pérdida de tejido y el área periférica donde el tejido estuviese comprometido: áreas pálidas de sustancia gris, cuerpos neuronales atrofiados y sustancia blanca hiper-celular y desorganizada (figura 3.19). Se estableció el punto 0 de coordenada en el eje céfalo-caudal como el primer corte en el que se pueden distinguir los ventrículos laterales. Los datos fueron expresados como % del área lesionada en cada corte (figura 3.20 a) y % de volumen del hemisferio lesionado (figura 3.20 c), realizando la sumatoria del área lesión en cada corte con respecto al volumen total del hemisferio lesionado. Para los 90 dpl se calculó el % de tejido conservado y su inverso (área de pérdida de tejido) calculando el área de tejido remanente del hemisferio lesionado en comparación con el área del hemisferio contralateral en cada corte. Los datos fueron expresados como % de área de pérdida de tejido en cada corte (figura 3.18 b) y % del tejido perdido del hemisferio lesionado (=volumen de lesión) (figura 3.18 d) como el inverso del promedio del % área conservada en cada corte.

2.2.2 Inmunohistoquímica

Se realizaron inmuno-marcajes en cortes coronales de cerebro de animales sometidos a los distintos modelos, y en los preparados de meninges enteras que se explicarán a continuación.

Se siguió el protocolo de inmunohistoquímica como el detallado en Peluffo *et al.* 2015 (87). Los cortes preservados a -20°C se retiraron del freezer y se dejaron a temperatura ambiente (TA) durante 20 minutos, luego de los cuales se procedió al lavado con PBS, permeabilización con PBS-Tritón (1% para cortes de cerebro; 0.1% para meninges) y bloqueo de las interacciones inespecíficas con Buffer de bloqueo (PBS - Tritón 1% - FBS 10%). Se utilizaron los anticuerpos indicados en la tabla 2.1. Para el caso de Ki67 se hizo desenmascaramiento del antígeno incubando las secciones en Buffer citrato 10 mM pH6.0 durante 10 minutos seguidos del enfriamiento a TA durante 20 minutos.

Posterior al bloqueo se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios durante el tiempo especificado para cada uno, seguido por el secundario correspondiente.

2.2.3 Preparados de meninges enteras

Para el análisis de las poblaciones celulares de las meninges se siguió el protocolo como detallado en Louveau *et al* 2015 (235). Se mantuvo a los ratones anestesiados durante 6 horas luego de producido el mTBI. En los casos indicados se procedió a la inyección intraperitoneal (i.p) de 200 µl

de la solución de PI 1mg/ml (figura 3.14), o a la inyección retro-orbital de 50 µl de Lectina GS II -AF647 (figura 3.15) previo al sacrificio del animal. Luego de perfundir a los animales con PFA 4% se procedió a la disección del cerebro para histología y a la extracción de la superficie del cráneo que contiene las meninges (duramadre y aracnoides) intentando mantenerlas intactas y evitando que permanezcan adheridas al cerebro.

Estas fueron post-fijadas durante toda la noche (ON) con PFA 4% en una placa de 24 pocillos, y se siguió con el protocolo de inmunofluorescencia como detallado en la sección previa. Finalmente se disecaron las meninges separando delicadamente estas membranas del cráneo y se montaron en un portaobjetos para ser analizadas por microscopía confocal. Para el análisis de la infiltración de neutrófilos se utilizó el anticuerpo anti LyG6-PB y se utilizó el anticuerpo anti Laminina para evidenciar los vasos sanguíneos.

Se cuantificó el número de neutrófilos infiltrados y el número de macrófagos meningeales utilizando la herramienta surfaces y spots del software Imaris 9.0 Bitplane.

2.2.4 Microscopía

i) Análisis por microscopía de epifluorescencia

Para los estudios de co-localización de la inmunoreactividad de Iba-1 y Ki67 se utilizó un microscopio Olympus IX81 provisto con una cámara OLYMPUS DP-71 y el software Cell*F, con los objetivos 4x y 10x.

iii) Análisis por microscopía óptica.

Para la evaluación del área de lesión en cortes teñidos con la técnica de Nissl se utilizó el microscopio Nikon SMZ1000 provisto con la lente TV 0.55x DS Nikon Japón, y el software Micrometrics® LE TM, versión 1.0, Accu-Scope, Inc.

iv) Análisis por microscopía confocal

Para el análisis confocal se utilizó un microscopio Olympus FV1200 laser scanning equipado con 4 detectores, 6 láseres (405, 458, 488, 515, 559, and 635nm) y 5 objetivos (4x/0.16 NA (apertura numérica), 10x/0.4 NA, 20x/0.75 NA, 40x/0.95 NA y 60x/1.4 NA).

v) Análisis *in vivo* por microscopía de 2 fotones (2P)

Se utilizó un microscopio Leica modelo SP8 equipado con un escáner resonante de 12.000-Hz, un objetivo de inmersión en agua 25X (1.0 NA) un detector externo HyD, un laser DeepSight Mai Tai HP (Spectra Physics) fijado a 910 nm y un laser Insight DS (Spectra Physics) fijado a 1050 nm. La emisión de fluorescencia atravesó espejos dicroicos customizados (Semrock). Para la mayoría de los estudios se utilizaron los espejos dicroicos 476 nm-LP, 484 nm-LP, 552 nm-LP.

Se escanearon los cerebros de ratones anestesiados con KXA. Se analizó la dinámica microglial con una resolución de 1024 x 1024, una profundidad (z) de 60 μm (para las películas) o 200 μm y mosaicos de

2x2 (para los stacks), y un promedio de 1 cuadro/min para el caso de las películas y 6-8 cuadros para los stacks.

Se cuantificó el número de Jellyfish microglía (figura 3.11) analizando los videos en el programa Imaris Bitplane y cuantificando la aparición de estas células de forma manual. Se cuantificó la muerte celular en las meninges (figura 3.16 e) utilizando la herramienta “orthoslicer” (para seleccionar la ROI => las primeras 50 micras luego del cráneo) y “spots” del programa Imaris Bitplane. El área ocupada por la señal CX3CR1 en las meninges (figura 3.16 f) fue calculada utilizando el programa FIJI, convirtiendo las imágenes de la región ocupada por las meninges a 8 bit y utilizando la herramienta *Threshold* (umbral).

2.3 Análisis de la expresión génica

2.3.1 Preparación de muestras y cuantificación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)

Se evaluaron los niveles de expresión génica de marcadores de la respuesta inflamatoria en cerebros i) CD300f Wt y KO naïve, ii) tratados con LPS o PBS como control, iii) y a las 24 hs o 5 días luego de un trauma por CCI (CCI 1 y 5 dpl).

En el caso de los cerebros naïve y tratados con LPS-PBS se extrajo el ARNm de uno de los hemisferios cerebrales enteros. Para el caso del

modelo de trauma, se extrajo el ARNm de una sección del cerebro de 2 x 2,5 mm, conteniendo el centro de la lesión y la periferia (figura 3.19 a).

i) Purificación del ARNm

Luego de perfundir a los animales con PBS a 4°C para evitar la contaminación de los tejidos con sangre periférica, se procedió a la disección y congelado rápido de los cerebros en nitrógeno líquido, los cuales fueron mantenidos a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Para la extracción del ARNm procedió a la homogenización del tejido nervioso utilizando el homogenizador manual Turrax® (Para el caso de cerebros LPS o CCI 5dpl) o el sistema FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals (para el caso de las muestras CCI 1dpl y naïve). Durante la homogenización se utilizó el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher #15596026) para la lisis de las muestras y posterior separación de las fases de ADN-ARN-proteína, según el protocolo indicado por el fabricante. Una vez obtenida la fase acuosa transparente conteniendo el ARN se utilizaron los Kits RNeasy Mini Kit (QIAGEN, #74104), Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel #740955.50) o GenElute™ Total RNA purification Kit (Sigma #RNB100) para su purificación por columnas, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

ii) Retrotranscripción

Para la retrotranscripción a ADNc se utilizó la enzima M-MLV RT (Thermo Fisher #28025013), el Kit iScript™ (BioRad #1708890) y el Kit SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher #18091050). Se retrotranscribió 1 µg de ARNm por reacción, previamente tratado con DNAsa (libre de RNAsa) y cuantificado por Nanodrop.

iii) Amplificación

Para la amplificación en tiempo real de los genes a partir del ADNc se utilizaron 3 metodologías diferentes:

1. TaqMan® Universal Master Mix II (Thermo Fisher #4440040)
2. SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix for ABI PRISM® (Thermo Fisher #11760100)
3. “PrimePCR™ *plates*” pre-diseñadas para la respuesta de inflamación aguda y fagocitosis para su utilización con SYBR® Green (BioRad #10029393 y # 10047257)

Para 1- se utilizó el termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) y las condiciones de ciclado especificadas por el fabricante.

Para 2 y 3- se utilizó el termociclador Bio-Rad CFX96. Las condiciones de ciclado para las PCR individuales se muestran en la tabla 2.1.

Para todos los casos se siguieron las condiciones indicadas por el fabricante

Para la amplificación génica utilizando las placas PrimePCR™ de fagocitosis e inflamación aguda se utilizó el programa de ciclado incluido en su protocolo.

Tabla 2.1 Condiciones de ciclado utilizado en 2.

Temperatura	Tiempo
1 - 95°C	10 min
2 - 95°C	10 seg
3- ____	10-20 seg (T hibridización)
4 - 72°C	15 seg
** 2-4 39X	
5 - 95°C	10 seg
6 - 0.5-95°C	5 seg por incremento para generar la curva de fusión

Los resultados de los niveles de expresión génica para animales naïve, CCI 1dpl y CCI 5 dpl fueron relativizados con respecto al gen housekeeping GAPDH, 18s, o Actina y normalizados con respecto al promedio de WT (de cada grupo) =1.

En el caso de las figuras 3.23, 3.24, 3.25 y 3.26 b-c, que muestran el curso temporal de la expresión de diferentes genes, los resultados de la expresión de estos genes en CCI 1dpl (y 5dpl) fueron normalizados con respecto a WT naïve =1.

2.4 Softwares

-Las imágenes de microscopia confocal y de 2 fotones fueron procesadas utilizando el software Imaris 9.0. (Bitplane).

-Las imágenes de histología clásica y epifluorescencia se procesaron utilizando el software FIJI con la herramienta ROI y cell counter respectivamente.

-Se utilizó el software ANY-Maze (Stoeling Co, USA) para la evaluación del comportamiento de los animales en los distintos test llevados a cabo.

-Los resultados fueron graficados y analizados utilizando el software GraphPad Prism.

-Para la realización de los heatmaps se utilizó el programa R 3.4.4, "The R Project for Statistical Computing".

2.5 Análisis Estadísticos

Se utilizaron los test ANOVA de medidas repetidas de 1 y 2 vías, y el post test bonferroni para los gráficos de E/m relativos y actividad locomotora espontánea de los animales post trauma. Se utilizó el Test de student de dos colas para la expresión génica. En el caso de que las varianzas no fueran comparables se utilizó el test no paramétrico de Welch.

Para la cuantificación de diferentes variables que pudieran depender del operador, tales como densidad de marcaje para Iba1, número de microglía, volumen de lesión etc, primero se ocultaron los rótulos de los tratamientos de forma tal que las cuantificaciones fueran a ciegas.

Anexo

Tabla 2.2 Anticuerpos y marcadores utilizados para Histología

Marcador	[Concentración]	Compañía y # cat	Secundario
Rabbit anti Iba-1	1:1000	Wako # 019-19741	Anti-rabbit HRP 1:250 ó AF488 1:500
rabbit anti-Ki67	1:5000	abcam # ab15580	Anti-rabbit AF647 1:500
Mouse anti-LyG6- PB	1:500	Biologends # 127612	—
Rabbit anti Laminina	1:500	Abcam #ab11575	Anti-rabbit AF647 1:1000
Lectina GS II -AF 647	50 µl retro-orbital	Thermo Fisher # L32451	—
Ioduro de Propidio	1mg/ml; 200 µl i.p o tópico	Thermo Fisher # P3566	—
Vectashield - DAPI	—	Vector Laboratories # H1200	—
Azul de Toluidina			—

Tabla 2.3 Cebadores utilizados con SYBR® GreenER™

Gen	Cebador Fw	Cebador Rv	T hibrid
Actina	AGC TCA TTG TAG AAG GTG TGG	GTG GGA ATG GGT CAG AAG G	54 . 7 °C
Mip-1α	GAT TCC ACG CCA ATT CAT CG	TTC AGT TCC AGG TCA GTG ATG	60 . 3 °C
P2ry6	TCTAGC TTG CTC CAG TTC TTG	AGC CAT GTT CTT TCA GTC ACC	60 . 2 °C
P2ry4	AAT TGG GAC TGG AAG GTG TG	CAA GAG GGT GAA GTT TTC TGC	60 . 2 °C
P2ry7	TGG ATG ACA AGA ACA CGG ATG	CAG GAT GTC AAA ACG GAT GC	60 . 0 °C
Gal-3	CAG TGA AAC CCA ACG CAA AC	TTC CTT TCC CCA GTT ATT GTC C	60 . 3 °C
Cd206	ATC TCT GTC ATC CCT GTC TCT GTT C	AAG TTG CCG TCT GAA CTG AGA TGG	60 . 0 °C
Arg-1	AAG AAA AGG CCG ATT CAC CT	CAC CTC CTC TGC TGT CTT CC	60 . 3 °C
Bdnf	TGC AGG GGC ATA GAC AAA AGG	CTT ATG AAT CGC CAG CCA ATT CTC	61 . 7 °C

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Papel del receptor CD300f en la fisiología normal del SNC

3.1.1 Análisis comportamentales de los animales CD300f KO

Para comenzar con la caracterización de la función del receptor CD300f en el mantenimiento de la homeostasis del SNC analizamos distintos parámetros comportamentales en los animales deficientes en dicho receptor en condiciones naïve⁷. Esto nos permite evaluar el estado funcional de los animales en base a tests bien caracterizados que se relacionan con distintas patologías vistas en la clínica. Como fue descrito previamente, muchas condiciones patológicas/psiquiátricas se basan en el mal funcionamiento de receptores microgliales como TREM2 (30, 73, 236, 237), CD33 (238) o Cx3CR1 (132). Considerando que CD300f se encuentra expresado en la membrana de la microglía dentro del SNC, y dada nuestra hipótesis de que éste es un receptor involucrado en la regulación del fenotipo microglial, esperamos encontrar diferencias comportamentales entre los KO comparados con WT.

Utilizamos el “Test del Parallel rod floor” descrito previamente para su uso en la evaluación de déficits neurológicos asociados a ataxia, y lo validamos así mismo para la medida de la actividad locomotora general. Este nos permite analizar parámetros como actividad locomotora espontánea, ataxia⁸ (medida como los errores cometidos por los animales

⁷ Durante la tesis utilizaremos el término naïve en referencia a los animales no tratados.

⁸ Trastorno caracterizado por la disminución de la capacidad de coordinar los movimientos.

en un campo abierto) y giros netos, en un período de tiempo estipulado por el investigador.

Analizamos la actividad locomotora espontánea de los animales adultos CD300f-KO vs WT midiendo la distancia que recorren en sesiones de 10 minutos (figura 3.1a). Como podemos observar, la presencia del receptor CD300f influye directamente en la actividad locomotora de los animales: los animales KO recorren una distancia un 21% menor en el campo abierto comparados con Wt, con un promedio de 11.3 m recorridos por los Wt y 8.9 m los KO (Resultados obtenidos en tres experimentos diferentes, n Wt=51, n KO=49).

Por otra parte, utilizando el mismo dispositivo analizamos los niveles de ataxia como el número de errores por metro cometidos por los animales Wt y KO en 10 minutos (figura 3.1b). En este caso no encontramos correlación entre la presencia del receptor CD300f y la capacidad de coordinación motora, ya que no existen diferencias significativas entre los 2 grupos.

Por último evaluamos la capacidad exploratoria de estos animales cuando son puestos en la misma arena 4 días más tarde para estudiar la habituación al entorno, una respuesta bien conocida (figura 3.1c). Definimos habituación como la disminución en la intensidad de una respuesta ante la falta de novedad en un entorno conocido. En este caso vemos que los animales Wt muestran una disminución significativa de aproximadamente un 25% en su actividad locomotora espontánea como

fue descrito previamente, mientras que los animales KO el día 4 recorren una distancia similar al día 0, por lo que podemos decir que estos últimos no se habitúan a la arena. Déficits en la habituación se han visto relacionados con enfermedades psiquiátricas como esquizofrenia y autismo, así como en déficit de memoria a corto plazo.

A raíz de estos resultados decidimos profundizar en el análisis del comportamiento de los animales CD300f KO en condiciones naïve. Para ello iniciamos una colaboración con el grupo de la Dra. Manuela P. Kaster del Departamento de Bioquímica-CCB de la Universidad Federal de Santa Catarina, quien se especializa en análisis comportamentales. A partir de esta colaboración surgió una nueva línea de investigación llevada adelante por una de sus estudiantes en nuestro laboratorio⁹. Parte de este proyecto era someter a los animales naïve a tests de conducta específicos incluyendo el “Campo abierto” regular, el “Test de suspensión por la cola” y el “*Splash test*” (Figura 3.2). Como comentábamos arriba, el test del campo abierto nos permite evaluar la actividad locomotora en una arena que se diferencia de la utilizada previamente en el el test del Parallel Rod Floor en el tipo de suelo, el tamaño de la arena y el tiempo total evaluado. De esta manera pudimos confirmar por otro método la relación negativa existente entre la ausencia del receptor CD300f y la distancia recorrida por los animales (figura 3.2 a). Por otra parte, el tiempo que los animales permanecen en el centro de la arena es una manera de

⁹ Fernanda N. Kaufmann, quien realizó los test comportamentales de la figura 3.2

medir su ansiedad. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos por lo que podemos decir en principio que la ausencia de CD300f no está relacionada con alteraciones en los niveles ansiedad (figura 3.2 b). El “*Splash test*” se basa en rociar a los animales con agua azucarada y por un lado medir el tiempo que demoran en comenzar a acicalarse, lo cual está relacionado con el estado de motivación de los animales (figura 3.2 c), y por otro el tiempo que invierten en el acicalamiento, lo cual, al tratarse de agua azucarada funciona como un refuerzo positivo y está ligado a la capacidad de sentir placer (figura 3.2 d). En el caso de los animales KO, si bien demoran el mismo tiempo en comenzar el acicalamiento, estos invierten menos tiempo en acicalarse, por lo cual podemos decir que la ausencia del receptor está ligada a la anhedonia.

Por otra parte, el test de suspensión por la cola se basa en la suspensión del animal a unos 10 cm del suelo, cronometrando el tiempo que permanece inmóvil hasta intentar escapar de esa situación de estrés. De esta manera, este test permite evaluar patrones depresivos/ motivacionales de los animales. Como podemos ver en la figura 3.2 e los animales CD300f KO muestran una tendencia a presentar conductas del tipo depresivas o de falta de motivación al presentar un mayor tiempo de inmovilidad con respecto a WT, el cual resulta significativo al separar a los animales por género (no mostrado).

Por último, el “*Marble burying*” test se utiliza para analizar comportamientos del tipo obsesivo-compulsivo en roedores. Este basa en

analizar cuántas “bolitas” esconden los animales entre la viruta luego de un período de 30 minutos. En base a este test podemos inferir que la ausencia del receptor CD300f probablemente esté ligada a desórdenes de tipo obsesivo-compulsivo.

El empleo de los test comportamentales aquí expuestos nos permite concluir que la carencia del receptor CD300f está ligada a cambios comportamentales tanto motores como motivacionales.

Los animales KO no solo recorren una distancia menor en un campo abierto (figura 3.1a y 3.2a) sino que poseen dificultades al habituarse a un ambiente conocido (figura 3.1b) y también presentan rasgos claros de depresión y falta de motivación (figura 3.2a-c) además de características obsesivo-compulsivas (figura 3.2d). Por otra parte, no encontramos relación entre la ausencia del receptor y desórdenes de ansiedad o ataxia. Más tests deben realizarse con el fin de evaluar la capacidad de memoria a corto plazo de estos animales como el test de “*novel object recognition*”.

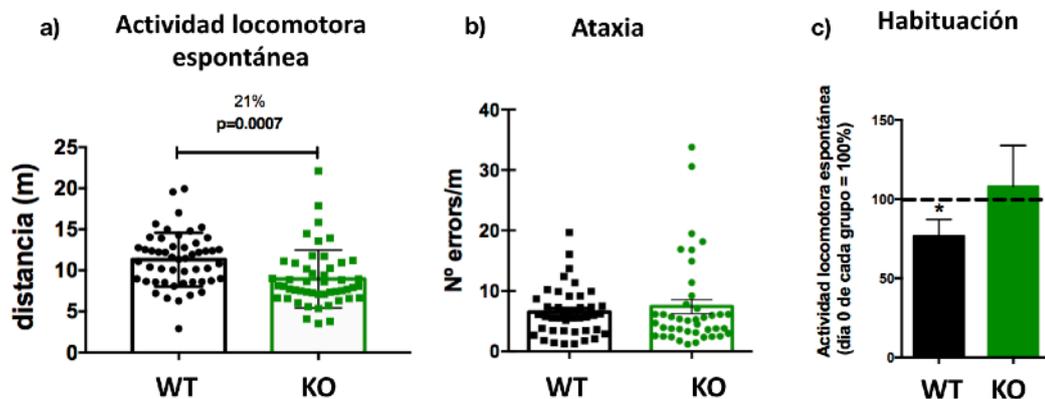


Figura 3.1_ Análisis comportamentales de los animales Wt y CD300f KO evaluados mediante el “Test del *Parallel Rod floor*”. a) Distancia recorrida en 10 minutos en 3 sets de experimentos diferentes; Los animales KO caminan un 21% menos en el campo abierto comparados con WT. b) Ataxia; no se ven diferencias significativas en el nº de errores por metro en ambos grupos. c) Problemas de habituación; los animales KO no se habitúan al entorno en comparación a los WT. Cuando son sometidos a la misma prueba 4 días más tarde, los KO no muestran diferencias en la distancia recorrida con respecto al día 0 (100%). * $p < 0.05$ t student de 2 colas WT día 0 vs WT día 4. Para a y b utilizamos animales macho y hembras de entre 3 y 6 meses de edad, no encontramos diferencias significativas entre las edades ni sexos. a) nWT= 51; nKO = 49. b) nWT = 42; nKO = 41 c) nWT= 9; nKO = 8.

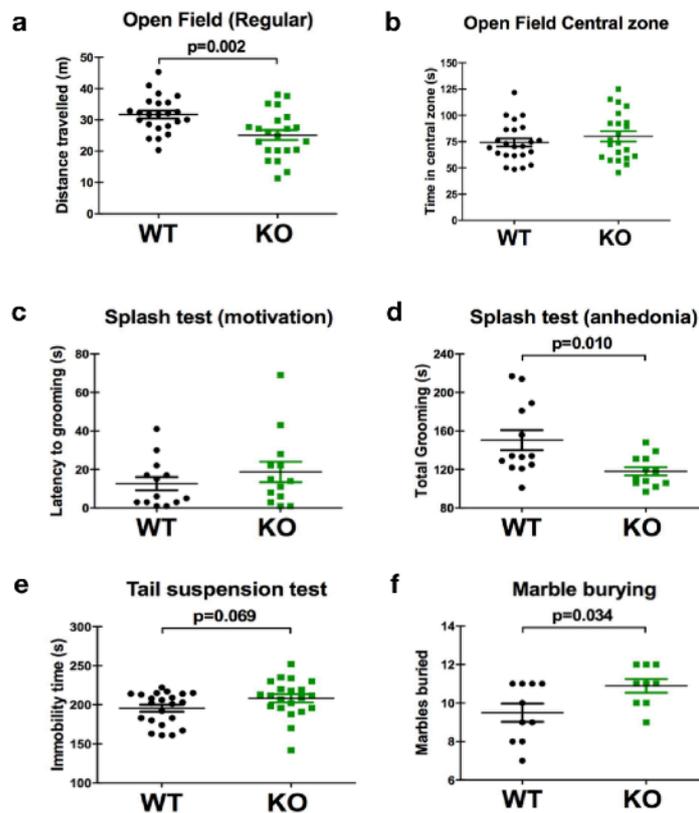


Figura 3.2_ Análisis comportamentales de los animales Wt y CD300f KO muestran que los animales deficientes en CD300f resultan en comportamientos del tipo depresivo y de pérdida de motivación. a, b) Open Field test: a) los animales KO recorren una distancia significativamente menor que los Wt. b) no encontramos diferencias significativas en el tiempo que los animales de ambos grupos permanecen en el centro de la arena. c,d) Splash test: no se ven diferencias en el tiempo que demora en comenzar a acicalarse (c), pero los animales KO invierten menos tiempo en el acicalamiento, lo cual está relacionado con la anhedonia o incapacidad de sentir placer (d). e) Test de suspensión por la cola: Los animales KO permanecen más tiempo suspendidos por la cola sin ofrecer resistencia comparados con los Wt, lo cual está indicando un patrón comportamental relacionado con falta de motivación/depresión f) *Marble burying test*= Los animales KO esconden un mayor número de “bolitas” comparados con WT, relacionado con comportamientos de tipo obsesivo-compulsivo. Los ensayos fueron realizados por *Fernanda N. Kaufmann* utilizando animales hembra adultos de 4-5 meses de edad debido a la mayor prevalencia de desórdenes depresivos en hembras.

3.1.2 Estudios fenotípicos de la microglía naïve en animales CD300f KO:

Los datos anteriores sugieren la existencia de claras diferencias a nivel comportamental por la sola carencia del receptor CD300f. Al ser un receptor presente únicamente en la línea mieloide decidimos analizar las características fenotípicas de la microglía en los cerebros de los animales KO y Wt para este receptor. Considerando que CD300f funcionaría como un regulador del fenotipo microglial, esperamos encontrar diferencias entre la microglía de los animales Wt y KO.

i) Análisis histológicos de la microglía CD300f KO

Analizamos las características histológicas de la corteza motora primaria (M1) y secundaria (M2) en cortes de cerebros Wt y KO de animales naïve mediante técnicas de inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo Iba1 específico para microglía/macrófagos. Esto nos permite analizar por un lado el grado de reactividad microglial mediante análisis morfológicos o calculando el área ocupada por la microglía, y por otro lado cuantificar la densidad microglial o número de células microgliales en los distintos cerebros.

Los resultados de la figura 3.3 muestran que los animales deficientes en CD300f presentan un incremento del ~18% en el número de células Iba1 positivas comparado con Wt (figura 3.3 a-c). Este mismo incremento en el número de células microgliales en los animales KO fue observado en

hipocampo por otros miembros del laboratorio mediante citometría de flujo¹⁰ para células CD11b⁺/CD45^{low}. Sin embargo, con respecto al área ocupada por células Iba1⁺, si bien podemos observar una tendencia al aumento en los animales CD300f KO, este no es significativo debido a la gran dispersión de los resultados. Deberíamos poder determinar si existen cambios sutiles en su morfología, como fueron descritos en diferentes modelos de depresión (82). Estos resultados podrían explicar en parte las diferencias observadas a nivel comportamental, ya que como comentamos antes, varios modelos animales de enfermedades psiquiátricas muestran un incremento en la densidad microglial incluyendo depresión, suicidio y esquizofrenia (82, 239-242). De todas maneras, no podemos descartar la existencia de diferencias en la densidad de otros tipos celulares del sistema nervioso incluyendo neuronas, astrogliá y oligodendrocitos, los cuales serán analizados más adelante.

Este resultado dejó abierta la interrogante de si el incremento en el número de células microgliales observado en los animales deficientes en CD300f ocurre en fases tempranas del desarrollo, cuando se establece la población microglial definitiva, o si esto se debe al aumento de la tasa proliferativa de la microglía en el adulto CD300f KO. Cabe destacar la existencia de progenitores microgliales en el adulto, que junto a eventos apoptóticos permiten la renovación de estas células varias veces durante la vida del ratón o humano, sin modificar el número total de células en condiciones fisiológicas (243).

¹⁰ Natalia Lago realizó estos experimentos.

Para contestar esta pregunta realizamos un inmunomarcaje utilizando el anticuerpo Ki67, el cual se utiliza como un marcador de proliferación, y analizamos su colocalización con el anticuerpo Iba1 a nivel de la corteza M1 y M2. Como control positivo utilizamos cortes de hipocampo (Figura 3.4), donde la unión del anticuerpo evidenciaría la neurogénesis característica de la zona subgranular.

No detectamos marcaje de células proliferantes en la corteza de ambos genotipos (no mostrado), surgiendo la duda de si realmente no está ocurriendo una mayor proliferación de células microgliales en animales KO, o si nuestro método de detección es el indicado para analizarlo. Para profundizar más en este estudio deberíamos marcar las células proliferantes con BrDU, el cual es un método más fiable que permite analizar la proliferación celular en una ventana temporal más amplia, ya que si bien estas células poseen una tasa proliferativa mayor a la que se pensaba antes (243), probablemente pueda no estar ocurriendo en ese momento discreto en el que fueron realizados los cortes. Sin embargo, fuimos capaces de detectar proliferación celular a nivel del hipocampo como muestra la figura 3.4, donde se observan tres células KI67+ (flechas), una de las cuales colocaliza con el marcaje de Iba1 (flecha inferior), por lo que corresponde a una microglía proliferativa; mientras que las otras dos son Iba1- y probablemente, por su ubicación, se trate de progenitores neurales, las cuales son características de esta región del cerebro.

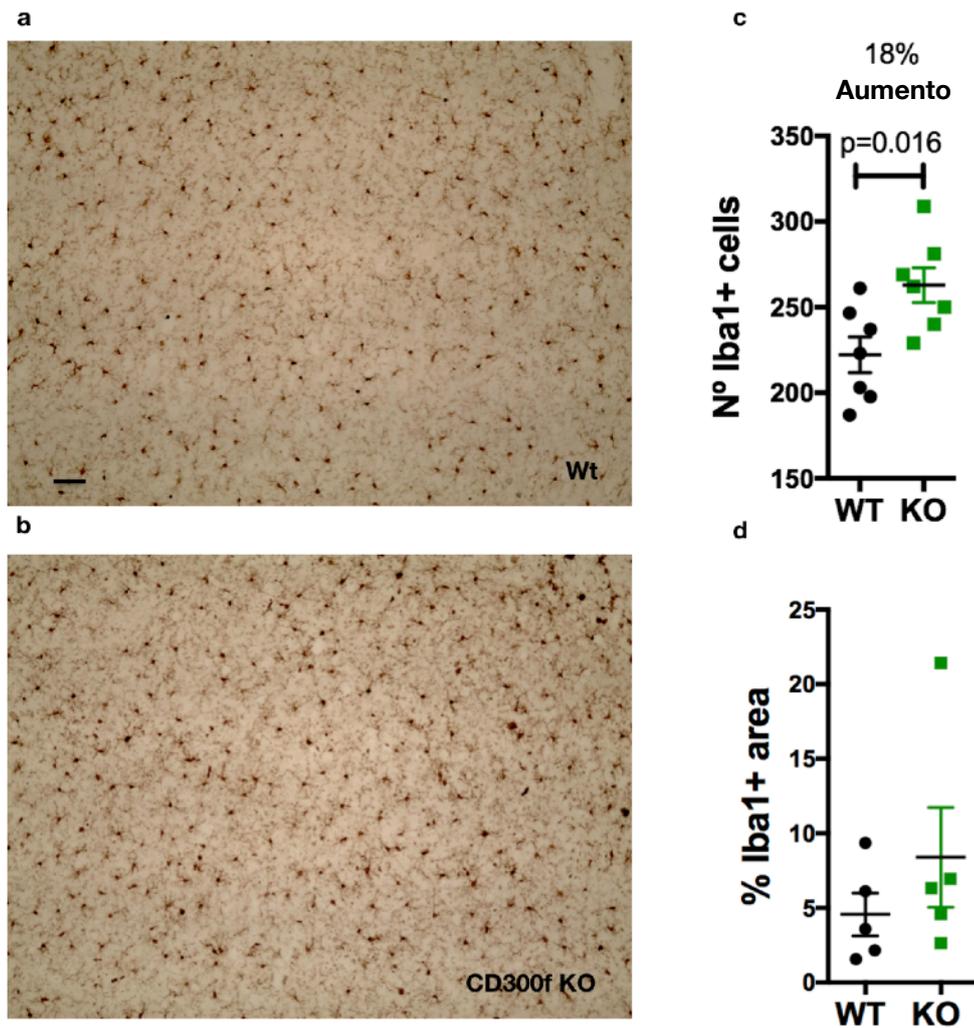


Figura 3.3_ Cuantificación de la microglía en cortes de cerebros naïve de animales WT y CD300f KO mediante inmunohistoquímica. a-b) Microfotografías de la corteza M1/M2 de cerebros naïve Wt (a) y CD300f KO (b) marcados con el anticuerpo anti Iba1-HRP. **c)** Cuantificación del número de células Iba1+ por inmunohistoquímica, los resultados corresponden a 2 sets de experimentos diferentes. **d)** Área ocupada por la microglía en la corteza M1/M2. La barra corresponde a 20 µm. Para el conteo se utilizaron ratones macho de 3-5 meses de edad.

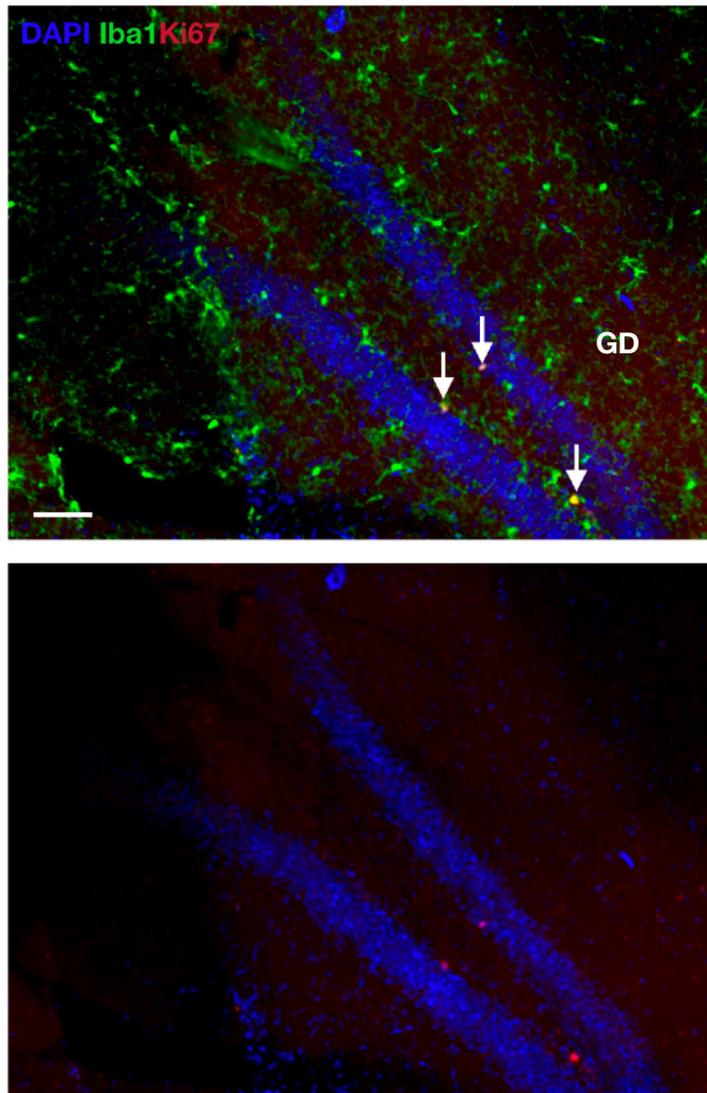


Figura 3.4_ Ensayos de proliferación celular. Inmunofluorescencia de cortes de hipocampo utilizando el anticuerpo anti-Iba1 revelado con Alexa fluo 488 y KI67 revelado con Alexa fluo 546. En la figura observamos la presencia de 3 células KI67+, una de las cuales colocaliza con Iba1. En azul DAPI, en verde Iba1, en rojo KI67. La barra corresponde a 50 μ m. GD= giro dentado.

ii) Firma molecular de la microglía CD300f KO naïve

Los animales CD300f KO mostraron un incremento en la densidad microglial, pero esto no nos habla del fenotipo funcional de estas células. La reciente descripción del fenotipo homeostático microglial, el cual es clave para el correcto funcionamiento del SNC, nos dio la pauta para investigar el perfil de expresión génica de los cerebros WT y CD300f KO y analizar los genes considerados como parte de la “firma homeostática” de la microglía, así como la expresión de genes pro-inflamatorios y genes asociados a patologías (DAM) (28-30) (figura 3.5).

Para ello utilizamos placas de amplificación génica (PrimePCR™) que nos permitieron evaluar la expresión de alrededor de 200 genes asociados a distintas vías, con una gran sensibilidad, eficiencia de amplificación y especificidad. En nuestro caso, vista la correlación descrita previamente entre la regulación de la inflamación y la expresión de CD300f (160, 161, 166, 175) utilizamos las placas para evaluar la expresión de genes implicados en las vías de inflamación aguda y fagocitosis. Algunos de los resultados fueron validados utilizando PCR cuantitativa (qPCR), y también se analizaron por este método genes específicos de microglía que no estaban presentes en las placas. Debe destacarse que los animales fueron perfundidos con solución salina fría inmediatamente antes de ser sacrificados con el fin de disminuir al máximo la contaminación por sangre de las muestras de cerebro.

Dada nuestra hipótesis que postula a CD300f como un importante regulador del fenotipo microglial, esperamos encontrar diferencias en el perfil de expresión génica en cerebros Wt y CD300f KO, con un desbalance de los genes de la firma microglial en los cerebros naïve.

Los resultados obtenidos mediante la amplificación del ARNm total de cerebros naïve Wt y CD300f KO (figura 3.5 c, tabla 3.1) no muestran alteraciones en la mayoría de los genes homeostáticos de la microglía, tales como *Tmem119*, *Tgfβ1*, *Il1α*, *Ccr5* o *SiglecH*, aunque sí se observa un leve aumento de *P2ry12* ($p=0.05$) y una tendencia al aumento de *Cx3cr1*, lo cual podría estar ligado al aumento en el número de células microgliales vistas en la corteza M1/M2 de animales KO. Esto sugiere que las funciones básicas de la microglía no se encuentran alteradas, si bien encontramos una disminución en la expresión del gen *P2ry6* ($p=0.08$).

Por otra parte, estudiando la asociación de la microglía CD300f con el fenotipo degenerativo o DAM (28-30) (figura 3.5 d, tabla 3.1) observamos que existen cambios en los niveles de expresión de ciertos genes como *Clec7a* ($p=0.09$), *Arg1* ($p=0.008$), *Lpl* ($p=0.01$), *Siglec1* ($p=0.01$) y *MertK* ($p=0.06$), involucrados en su mayoría en la función fagocítica de la microglía la cual discutiremos más adelante. Observamos que varios de estos genes presentan un patrón de expresión inverso en cerebros CD300f KO al visto en las diferentes patologías del sistema nervioso; genes como *ApoE*, *Trem2*, *Axl*, *Csf1*, que en las patologías como ALS o

AD y envejecimiento tienden a aumentar, en los animales CD300f KO se mantienen constantes, mientras que otros como *Clec7a* o *Arg1* en lugar de aumentar como se ve en la patología incluso disminuyen. Por otra parte *P2ry12*, uno de los principales genes homeostáticos de la microglía, el cual disminuye en el fenotipo DAM, en los animales KO se encuentra levemente aumentado. Los únicos genes asociados a las DAM que incrementan su expresión acorde con lo descrito para las diferentes patologías son *Siglec1* y *Lpl*.

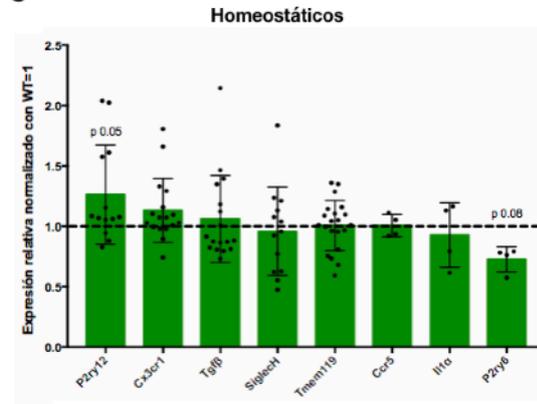
Figura 3.5_ Perfil de expresión de marcadores microgliales homeostáticos y genes implicados en las vías inflamatorias y fagocíticas de cerebros CD300f KO naïve comparados con Wt. (a) Se utilizó uno de los hemisferios cerebrales para la cuantificación de la expresión génica por qPCR. **(b)** Heatmap mostrando los cambios de expresión de KO con respecto a Wt (log2 fold change). Expresión de **(c)** genes microgliales homeostáticos; **(d)** genes asociados a patología (DAM); **(e)** genes involucrados en la respuesta fagocítica; **(f)** genes implicados en la inflamación aguda; **(g)** genes involucrados en la comunicación interleucocitaria y PVM. Los datos están normalizados con respecto a Wt = 1. p = p-value T test de dos colas.

Expresión génica en cerebros Naïve

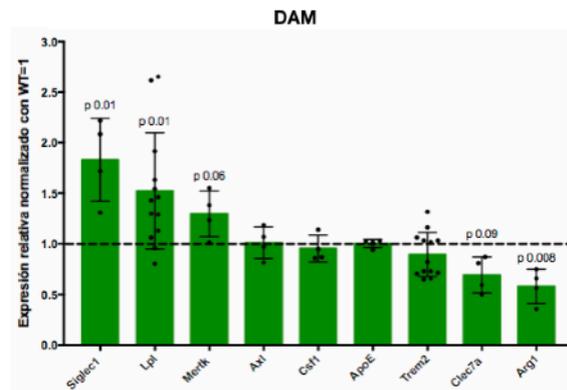
B Naive



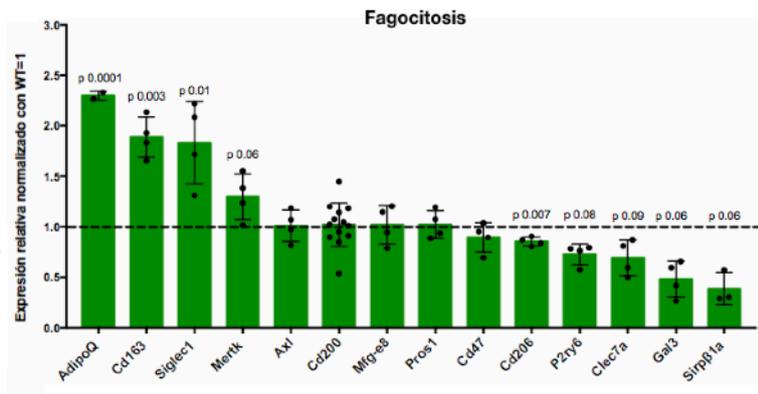
C



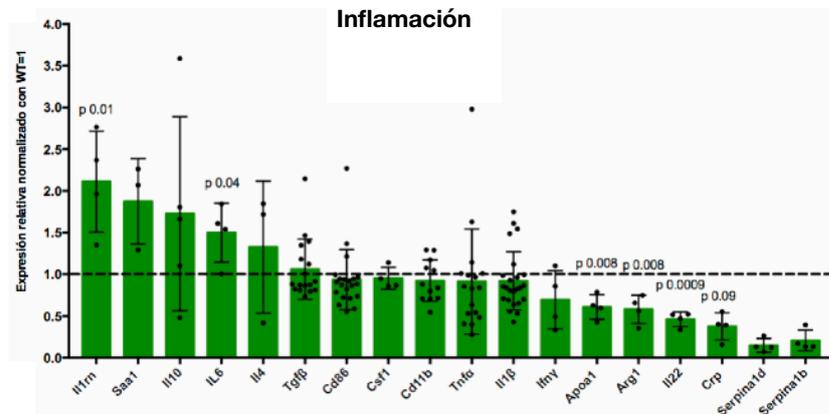
D



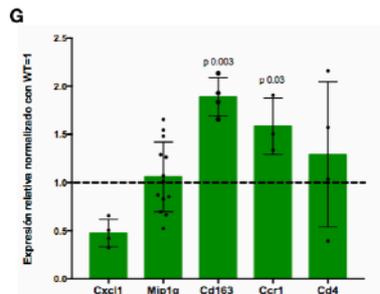
E



F



Comunicación interleucocitaria



Retomando los cambios encontrados en el perfil de expresión de marcadores asociados a la fagocitosis (figura 3.5 e), varios de los previamente mencionados como el receptor purinérgico *P2ry6* y *Clec7a* se ven disminuidos. Vemos también variaciones en los niveles de expresión de otros genes implicados en las vías fagocíticas como la opsonina *Gal3* ($p=0.06$) o el receptor *Sirpβ1a* ($p=0.05$) los cuales disminuyen su expresión en cerebros KO, mientras que *Siglec1* y *MertK* poseen una alta tendencia a la sobre-expresión. Otros genes como *Axl*, *Mfg-e8*, *Cd47* y *Cd200* permanecen inalterados. Por otra parte

observamos cambios en varios genes involucrados en el metabolismo lipídico como *Apoa1*, la cual disminuye su expresión en los cerebros KO y *Saa1* (marcador característico de la inflamación aguda, la cual posee una tendencia al aumento). También *Adipoq*, el gen que codifica para la Adiponectina, se encuentra muy sobre-expresado ($p=0.0001$), siendo este un regulador negativo de la fagocitosis con propiedades anti-inflamatorias (244).

Por otra parte, en la mayoría de los modelos animales en los que se analizó la función de *CD300f*, se observó que se trata de un regulador negativo de la inflamación. Para contestar a la pregunta de si su ausencia induce la neuroinflamación *per se* como ha sido descrito para la ausencia de otros receptores que restringen la reactividad microglial como el par *CD200-CD200R1* (125), o *Trem2* (30), analizamos el perfil de expresión de genes asociados con la inflamación. Analizando la expresión de los genes pro-inflamatorios (figura 3.5 f) pudimos observar que ciertas citoquinas clave en la fase aguda de la inflamación como *Il1 β* , *Tnfa* y *Cd86* no varían su expresión comparadas con *Wt*, mientras que *Infy* posee una leve tendencia a la disminución. Por otra parte, *Il6* se encuentra sobre expresada ($p=0.04$).

Parte de estos genes son las denominadas proteínas de fase aguda -*Saa* y *Apoa1*-, las cuales se expresan luego de una lesión. Algo que nos llamó la atención es que tres de estos mensajeros, *Il22*, *Apoa1* y *Crp* tuvieran perfiles de expresión más bajos en los cerebros KO ($p=0.0009$, $p=0.08$ y

p=0.09 respectivamente), mientras que los niveles de *Saa1* tienden a ser más elevados.

Analizando la expresión de los genes anti-inflamatorios clave observamos que *Il1rn* (el antagonista de la *Il1β*) se encuentra sobre-expresado al doble comparado con Wt (p=0.01), y existe también una gran tendencia a la sobre-expresión de *Il10*, mientras que *Il4* se mantiene estable y *Cd206* se encuentra levemente disminuido (p=0.007). Por otra parte, las *Serpinas 1d* y *1b* poseen una tendencia a la disminución; estas proteínas son inhibidoras de las serina-(o cisteína)-proteasas y funcionan en la inhibición tanto de enzimas proteolíticas como la elastasa de neutrófilos, como en la inhibición de la activación del complemento a través de la inhibición de las serina proteasas C1. Niveles disminuidos de estas proteínas se han visto relacionados con casos de demencias como AD y encefalopatías (245).

Si bien en los cerebros naïve no hay reclutamiento de células periféricas por la existencia de la BHE, estudiamos la expresión de ciertas quimioquinas y receptores vinculados con la comunicación inter-leucocitaria. Observamos cambios en los niveles de expresión de algunos genes ligados al reclutamiento y activación de neutrófilos (figura 3.5 g) como el gen de la quimioquina *Cxcl1*; este posee una tendencia a la disminución en los cerebros KO comparados con Wt. Por otra parte el gen que codifica para el receptor CCR1 presente principalmente en macrófagos perivasculares (PVM) se encuentra altamente

sobreexpresado ($p=0.03$). En este sentido, también está aumentada la expresión del gen "scavenger" *Cd163* ($p=0.003$), el cual está descrito en la literatura como específico de PVM (29). Esto sugiere que los animales CD300f KO podrían presentar un incremento en el número o grado de activación de los PVM. Por otro lado, no encontramos diferencias significativas en la expresión de la quimioquina inflamatoria de macrófagos *MIP1 α* , lo cual indicaría que tal vez las diferencias observadas en los otros receptores de PVM se deban a un incremento en su densidad. De todas maneras, deberíamos realizar ensayos específicos para cuantificar los PVM en los cerebros de los animales KO, ya sea por técnicas de FACS o inmunohistoquímica. Por último, no vemos diferencias en la expresión de *Cd4*, representante de la población de linfocitos T helper.

En resumen, si bien muchos de los genes analizados no son específicos de la microglía dentro del SNC, pudimos evaluar los cambios en varios de los genes característicos que definen el fenotipo microglial homeostático. En base a esto podemos concluir que la microglía naïve deficiente en CD300f posee una firma molecular levemente diferente a la descrita para el fenotipo homeostático, con alteraciones en la expresión de los genes *P2ry12* y *P2ry6*, los cuales son clave para el mantenimiento de la función de detección de señales de peligro y fagocitosis en la fisiología normal del SNC (68, 98, 100), mientras que la mayoría de los genes homeostáticos se mantienen inalterados, manteniendo otras funcionalidades básicas de

estas células. Por otra parte, nuestros resultados tampoco concuerdan con la descripción del fenotipo patológico o DAM (Tabla 3.1) , ya que además de las tendencias opuestas en el patrón de expresión génica entre la microglía DAM y la CD300f KO, la tendencia de las primeras es presentar una fagocitosis aumentada, mientras que la microglía CD300f KO parece tener comprometida la capacidad fagocítica. En este sentido, la microglía CD300f KO lejos de presentar un fenotipo reactivo/pro-inflamatorio, parecería presentar un fenotipo mas “hipoinflamado” o distrófico, con bloqueo o disminución de la actividad fagocítica. En resumen, nuestros datos sugieren la existencia una relación directa entre el receptor CD300f y la función fagocítica estéril de la microglía normal, lo cual resulta muy importante para el mantenimiento de la fisiología del SNC.

Tabla 3.1 Marcadores homeostáticos en CD300f KO y su asociación con el fenotipo DAM

	CD300f KO/WT	DAM	Cita #	Función
P2ry6	T ↓	=	28	Fagocitosis
P2ry12	↑	↓	28, 30	Fagocitosis-quimiotaxis
Tmem119	=	↓	28, 30	?
Cx3cr1	T ↑	↓	28, 30	Regulador Inhibitorio
SiglecH	=	↓	28	Inh inflamación (konishi2017)
Tgfβ	=	↓	15, 30	Anti-inflamatorio
Il1α	=	↓	29	Pro-inflamatorio
Ccr5	=	↓	29	Pro-inflamatorio
MertK	T ↑	↓	30	Fagocitosis
Lpl	↑	↑	29	Metabolismo lipídico y fago
ApoE	=	↑	29, 30	Metabolismo lipídico y fago
Csf1	=	↑	29, 30	Inflamatorio
Arg1	↓	↑	30	Anti-inflamatorio
Axl	=	↑	29, 30	Fagocitosis
Trem2	=	↑	30, 29	Anti-inflamatorio-Fagocitosis
Siglec1	↑	↑	30	Fagocitosis
Clec7a	T ↓	↑	30	Fagocitosis

Tabla 3.1_ Perfil de expresión de marcadores microgliales homeostáticos y DAM en cerebros CD300f KO naïve comparados con Wt. En la primera parte de la tabla se muestran los genes microgliales homeostáticos (genes enriquecidos en células microgliales), los cambios en su expresión en cerebros CD300f KO comparados con Wt y sus cambios en la microglía asociada a patologías degenerativas (DAM). En la segunda parte de la tabla se muestran los genes asociados a la microglía DAM y los cambios en la expresión en cerebros CD300f KO comparado a Wt. T = tendencia.

iii) Dinámica microglial *in vivo* por microscopía 2P

Para hilar más fino en el análisis de la dinámica microglial deficiente en CD300f, comenzamos estudios en animales naïve Cx3cr1^{+/GFP} Wt y CD300f KO mediante microscopía de 2P. La visualización del parénquima nervioso es posible gracias a el afinamiento del cráneo hasta un límite de 30 µm sin llegar a producir lesión, y la utilización de ratones que expresan la proteína GFP en la microglía, lo cual permite su visualización *in vivo* al microscopio de 2P.

Estos análisis fueron realizado en el contexto de una pasantía en el laboratorio del Dr. John Coligan, pionero en el estudio de los receptores de la familia CD300, y del Dr. Dorian McGavern, especialista en el estudio de las células microgliales y la neuroinflamación inducida tras el trauma cerebral.

Por razones técnicas y de disponibilidad de animales CD300f KO/CX3CR1-GFP únicamente obtuvimos un video por cada genotipo (Figura 3.6. Es por esto que los resultados deben tomarse con mucha cautela y serán complementados en el futuro cercano ya que realizaré mi postdoctorado en el laboratorio de Dorian MacGavern justamente en este tema. Los resultados preliminares nos muestran por un lado, un notorio enriquecimiento en el tráfico celular a nivel de los vasos sanguíneos de los animales Wt de células que probablemente correspondan a monocitos no clásicos CX3CR1⁺ que patrullan el tejido normalmente en condiciones homeostáticas; y por otro lado la microglía de los animales Wt parece tener también mayor cantidad de ramificaciones y más móviles.

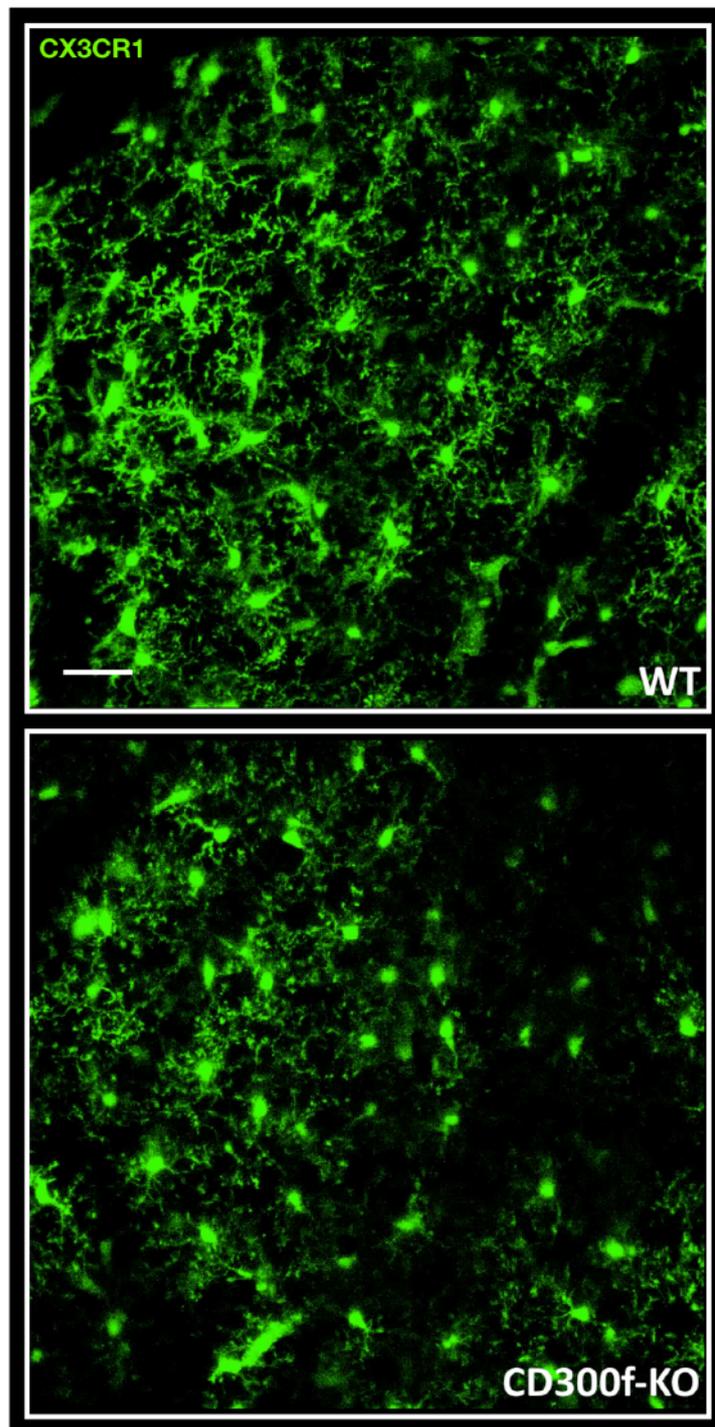


Figura 3.6: Análisis de la dinámica microglial por microscopía de 2P. Utilizamos ratones que expresan la proteína GFP bajo el promotor de CX3CR1 en animales Wt y KO para CD300f. Micrografías obtenidas a partir de los videos de la microglía naïve *in vivo*. La barra corresponde a 20 μ m. (Tomadas de Videos suplementarios 0 y 1).

3.2 CD300f en la neuroinflamación

En base a lo anteriormente descrito para la microglía naïve de los ratones CD300f KO, y con el fin de investigar la función de este receptor en la neuroinflamación, decidimos “empujar” un poco más el sistema y evaluar la alteración en la función de la microglía deficiente en el receptor CD300f luego de diferentes estímulos inflamatorios al SNC de distinta intensidad.

3.2.1 Tratamiento con LPS

Como una primera aproximación decidimos realizar el modelo de inoculación intraperitoneal (i.p) de LPS. Este es un modelo de neuroinflamación limpio, sin rotura de BHE y sin entrada importante de células inmunes circulantes ni inducción de muerte neuronal, al menos a corto plazo. Este modelo está bien caracterizado (229, 246) y se basa en la administración intraperitoneal i.p de dosis bajas de LPS diarias, durante 4 días consecutivos (1mg/kg/día) para activar globalmente la microglía del SNC (Figura 3.7). Además, este genera una inflamación sistémica acompañada de síntomas de enfermedad o “*sickness behaviour*”. Su utilidad se basa en la noción de que el sistema inmune periférico posee un gran efecto sobre el SNC, existiendo un alto riesgo documentado a desarrollar diferentes tipos de demencia (246) o depresión (3) luego de una infección sistémica.

Las imágenes de la figura 3.7 b muestran secciones de cerebro teñidas mediante inmunohistoquímica contra Iba1, evidenciando la inducción de la neuroinflamación mediada por la inoculación de LPS i.p durante 4 días consecutivos. Como control se utilizaron ratones inyectados con el mismo volumen de PBS (vehículo). Podemos observar un claro incremento en la intensidad del marcador Iba1 en los cerebros tratados con LPS en comparación con los PBS. Además, hay un notorio aumento en el tamaño del soma microglial y en el grosor de sus proyecciones.

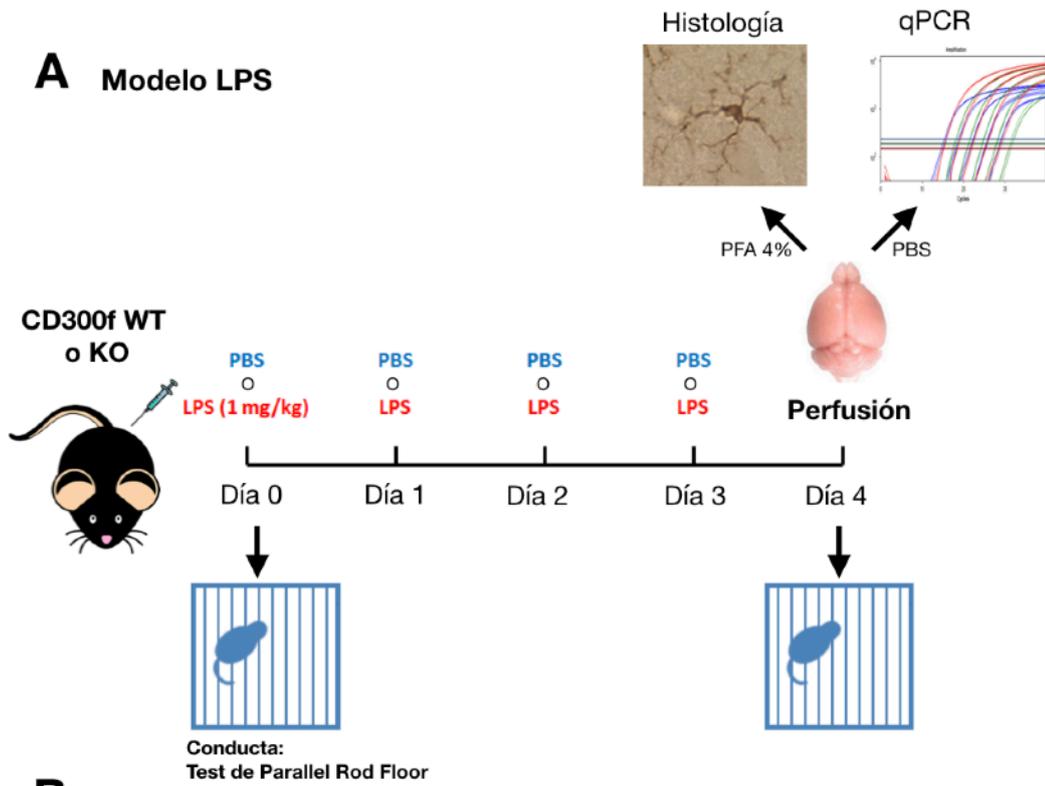
Analizamos distintos parámetros característicos en los animales WT o CD300f KO tratados con LPS o salino como pérdida de peso, peso del bazo y *sickness behaviour*¹¹ (figura 3.8). Este último fue analizado en base a la medida de la actividad locomotora espontánea, utilizando el Test del Parallel Rod floor previamente descrito. Realizamos análisis histológicos de células microgliales (figura 3.8 d) y de expresión génica por qPCR (figura 3.10) para evaluar los niveles de reactividad microglial y neuroinflamación en general en ambos grupos. Esperábamos que los animales deficientes en CD300f presentaran una inflamación exacerbada que se reflejara en el comportamiento y el fenotipo microglial o los niveles de expresión de marcadores pro-inflamatorios.

¹¹ Término utilizado para describir cambios drásticos en la experiencia subjetiva y comportamiento que ocurre en pacientes y animales enfermos. Respuesta adaptativa del organismo para sobrellevar una infección y conservar energía para la recuperación.

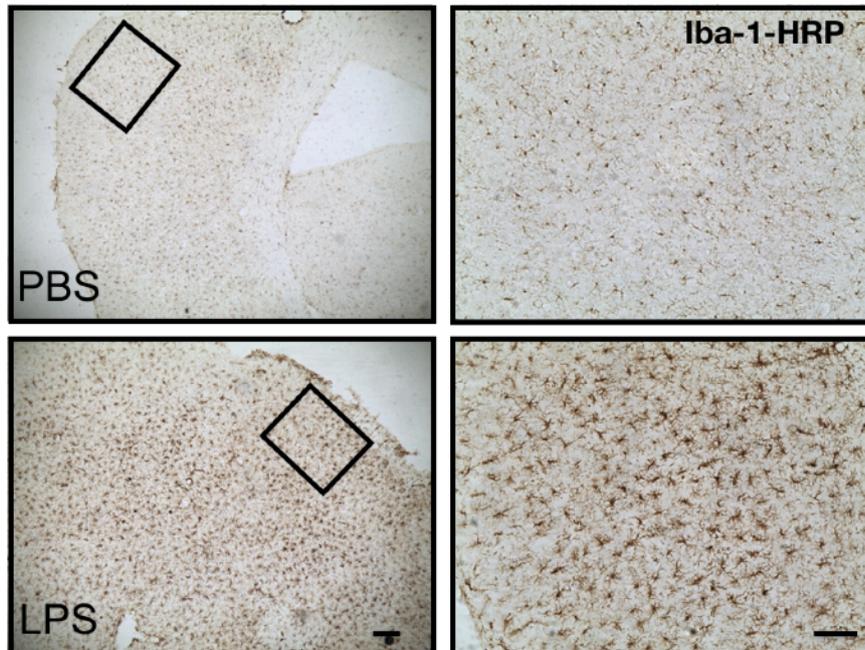
Figura 3.7_ Modelo de neuroinflamación tras el tratamiento sistémico con LPS. a)

Diseño experimental: Los animales fueron inoculados con 1mg/kg de LPS o vehículo durante 4 días consecutivos y luego perfundidos para el análisis histológico o del perfil expresión de mensajeros pro-inflamatorios del cerebro. En los días 0 (previo a la primera inoculación) y 4 (previo al sacrificio) se analizó el comportamiento de estos animales mediante el test del Parallel Rod Floor. **b)** Inmunomarcaje con el anticuerpo anti Iba-1-HRP. Las imágenes inferiores muestran una clara inducción de la reactividad microglial en los cerebros de los animales inyectados con LPS durante 4 días consecutivos en comparación con los tratados con PBS. Además del aumento en la intensidad del marcaje de Iba1 se nota un claro incremento en el tamaño del soma y el grosor de las proyecciones. La barra de la izquierda corresponde a 200 μm (imágenes a 40X) y la de la derecha a 40 μm (imágenes a 100X).

A Modelo LPS



B



De acuerdo a nuestra hipótesis de que el receptor CD300f es anti-inflamatorio, cuando evaluamos la distancia recorrida por los animales en la arena durante 10 minutos (Figura 3.8 a) -o actividad locomotora espontánea- al comienzo del tratamiento (día 0) y 24 horas mas tarde de la última inyección (día 4), notamos que si bien luego del tratamiento con LPS ambos grupos recorren una distancia significativamente menor con respecto al día 0, en los animales CD300f KO existe una elevada tendencia a la reducción de la actividad locomotora espontánea ($p=0.06$), mayor que la observada en los animales Wt. Esto se relaciona con cierto nivel de depresión generado por la inoculación del LPS -o *sickness behaviour* (3)-, la cual se ve exacerbada en los animales KO.

Este comportamiento se dispara tras una infección por la liberación de mediadores solubles producidos en el sitio de infección por células inmunes accesorias. Estos mediadores corresponden a citoquinas pro-inflamatorias como la $IL-1\alpha$ y β , $TNF-\alpha$ e $IL-6$, las cuales no solo ejercen sus efectos a nivel sistémico, sino que actúan en el cerebro para causar estos síntomas de enfermedad o *sickness behaviour*. Estas citoquinas no solo producen síntomas de enfermedad sino también desórdenes depresivos en pacientes físicamente enfermos sin historia previa de desórdenes mentales (3), y de hecho la inoculación de LPS se utiliza como modelo de depresión en roedores (82, 247). Si bien hubiese sido interesante obtener el dato de la concentración de estas citoquinas circulantes en la sangre de los roedores, esto no nos fue posible en ese

momento. Como parte de la sintomatología de la enfermedad analizamos el peso de los animales KO en comparación con los Wt, y si bien el tratamiento indujo una pérdida importante de peso, no observamos diferencias significativas entre ambos grupos (figura 3.8 b). Por otra parte, evaluamos el peso del bazo de los animales luego de su eutanasia (figura 3.8 c), no encontrando diferencias entre los grupos. El peso del bazo es un indicativo de la respuesta inmune sistémica, con lo cual sugiere que, al menos en este modelo, dicha respuesta no estaría involucrada a grosso modo en las diferencias de comportamiento observadas en los animales CD300f KO.

Por último, analizamos el nivel de activación microglial y de neuroinflamación. Comenzamos por cuantificar los inmunomarcajes con el anticuerpo Iba1-HRP en cerebros de animales Wt y CD300f KO tratados con LPS con el fin de detectar diferencias en el número de microglía o reactividad microglial entre ambos grupos (figura 3.8 d). Debido a la excesiva reactividad microglial inducida por el tratamiento con LPS nos fue imposible cuantificar el número de células microgliales en ninguno de los dos genotipos, ya que era muy difícil distinguir el soma de una célula de las proyecciones engrosadas de las células adyacentes, y determinar si su soma se encontraba en el plano de la sección (ver figura 3.7 b, LPS). Los procesos se veían muy entremezclados y daba lugar a la sobre-estimación o sub-estimación del número real.

De todas maneras, fuimos capaces de cuantificar del área ocupada por las células microgliales -indicativo del estado de reactivación microglial- pero en este caso no resaltaron diferencias significativas entre ambos genotipos.

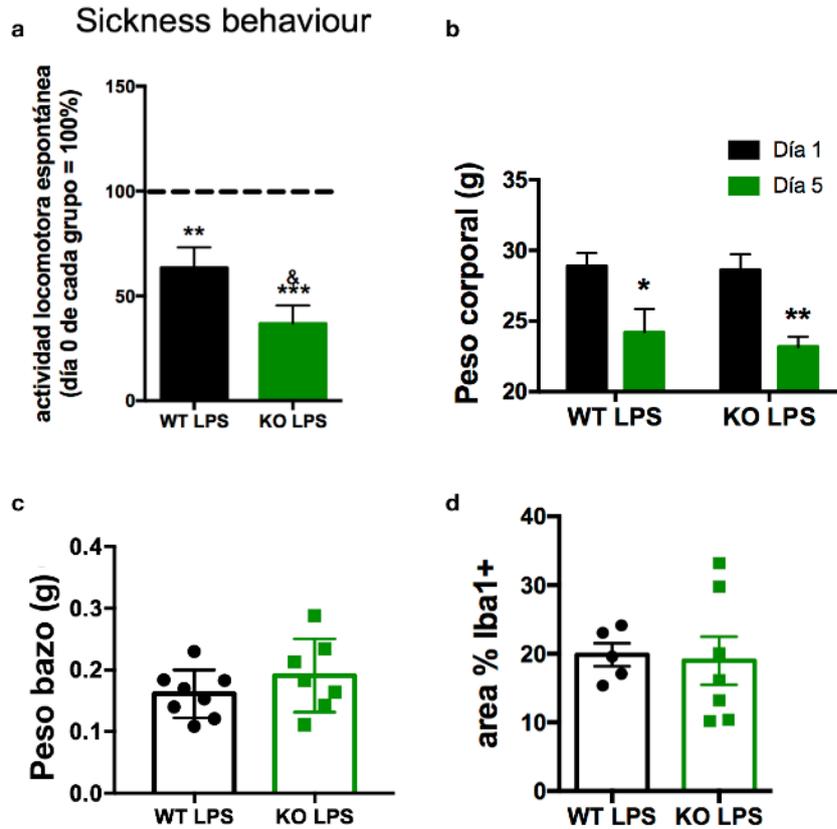


Figura 3.8. Efectos del tratamiento con bajas dosis de LPS en animales Wt y CD300f KO. **a)** Actividad locomotora espontánea. Los ensayos funcionales se realizaron al comienzo del tratamiento (día 0) y 24hs luego de la última inyección (día 4). Los resultados fueron normalizados con respecto al promedio de la actividad locomotora basal (día 0=100%). ** $p < 0.01$ T test de dos colas Wt LPS día 0 vs Wt LPS día 4. *** $p < 0.01$ t student de 2 colas KO LPS día 0 vs KO LPS día 4. & $p < 0.05$ ANOVA de una vía KO PBS día 4 vs KO LPS día 4 seguido del test Kruskal-Wallis nWT = 11, nKO = 10. **b)** Peso corporal de los animales Wt y CD300f KO al principio del tratamiento (día 0) y 24 horas luego del fin del tratamiento (día 4). * $p < 0.05$ Wt LPS día 4 vs WT LPS día 0. ** $p < 0.01$ KO LPS día 0 vs KO LPS día 4, t student de dos colas. nWT = 11, nKO = 10. **c)** Peso del bazo de animales Wt y KO previo a su sacrificio al final del tratamiento (día 4) nWT=8, nKO=7. y **d)** Niveles de reactividad microglial de animales Wt y KO para CD300f tras la administración de 1 dosis diaria LPS (1mg/kg) durante 4 días seguidos nWT = 5, nKO = 7. Los animales utilizados para este ensayo fueron machos de 3-4 meses de edad.

i) Análisis de marcadores de la inflamación luego de la inyección de LPS

Para asegurarnos de que no existe variación en la reactividad microglial entre los genotipos, el siguiente paso fue analizar el perfil de expresión génica de marcadores pro-inflamatorios en los cerebros Wt y CD300f KO luego del tratamiento con LPS.

Estudiamos los niveles de expresión del marcador específico de microglía *Tmem119* y varios marcadores de inflamación; CD86, CD11b e IL-1 β (figura 3.9) en cerebros de ratones Wt y CD300f KO sometidos al tratamiento de LPS o control PBS mediante qPCR.

La proteína de membrana *Tmem119* es específica de la microglía y está caracterizada por mantener sus niveles estables desde etapas postnatales tempranas hasta la adultez, viéndose inalterada tras el tratamiento con LPS, si bien los niveles de su mensajero aumentan en estas condiciones (16).

Como podemos observar en la figura 3.9, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de *Tmem119* en animales Wt o CD300f KO tratados con PBS, si bien existe una tendencia al aumento en su expresión tras el tratamiento con LPS, la cual es equivalente para ambos genotipos. Por otra parte, los niveles de expresión de los genes pro-inflamatorios en animales Wt tratados con PBS y animales Wt naïve son casi idénticos, mientras que encontramos diferencias en la expresión

de los genes pro-inflamatorios de los cerebros de animales CD300f KO tratados con PBS comparados con Wt PBS o naive; *Cd86* y *Cd11b* poseen una tendencia a la disminución, mientras que el ARNm de IL-1 β es unas 3 veces más abundante en los animales KO tratados con PBS comparado con WT PBS y alrededor de 6 veces mayor que los KO naïve. Estas diferencias entre los cerebros Wt y KO tratados con PBS probablemente puedan deberse al leve estrés generado por la manipulación de los animales durante los días de inyección i.p. A raíz de estos resultados, surgió una nueva línea de investigación para analizar el efecto del receptor CD300f en la vulnerabilidad al estrés, lo cual está ligado al desarrollo de la patología depresiva. De hecho, muchos de los modelos de depresión en roedores se basan en la generación de un estrés crónico (248).

Siguiendo con el análisis de la figura 3.9, observamos que el efecto de la inoculación de LPS i.p. induce en el cerebro un estado pro-inflamatorio a nivel molecular, con un aumento significativo en la expresión de los distintos marcadores inflamatorios analizados, tal como era de prever en base a lo observado por inmunohistoquímica (figura 3.7). Por otra parte, el tratamiento con LPS no indujo diferencias en el perfil de expresión de estos genes entre ambos genotipos, lo cual condice con los resultados obtenidos a partir de la cuantificación del área ocupada por células Iba1+ (figura 3.7d).

Los resultados obtenidos a partir de este modelo mostraron la vulnerabilidad al estrés leve de los animales control tratados con PBS tras la deficiencia del receptor CD300f, la cual se traduce en niveles alterados de varios mediadores pro-inflamatorios. Por otra parte, los animales CD300f KO tratados con la endotoxina bacteriana poseen probablemente una inflamación periférica aumentada que induce cambios en algún área cerebral relacionada con el *sickness behaviour*. Sin embargo, estos animales no parecen presentar diferencias en el estado de reactivación microglial a nivel histológico o molecular en el cerebro a nivel global. Esto puede deberse a una sobre estimulación inflamatoria generada por la inoculación repetitiva de LPS que podría estar enmascarando los efectos mediados por el receptor CD300f, o bien a que el fenotipo comportamental esté ligado a otra vía regulada por este receptor. Para contestar esta pregunta decidimos utilizar un modelo de neuroinflamación mas directo que nos permitiera visualizar in situ el efecto de CD300f a nivel de la respuesta microglial. Para ello desarrollamos una colaboración con el Dr. Dorian McGavern quien se destaca entre otras cosas por la generación de un modelo de trauma moderado en donde es posible visualizar la dinámica microglial *in vivo* por microscopía de 2P inmediatamente luego de producido el trauma (68).

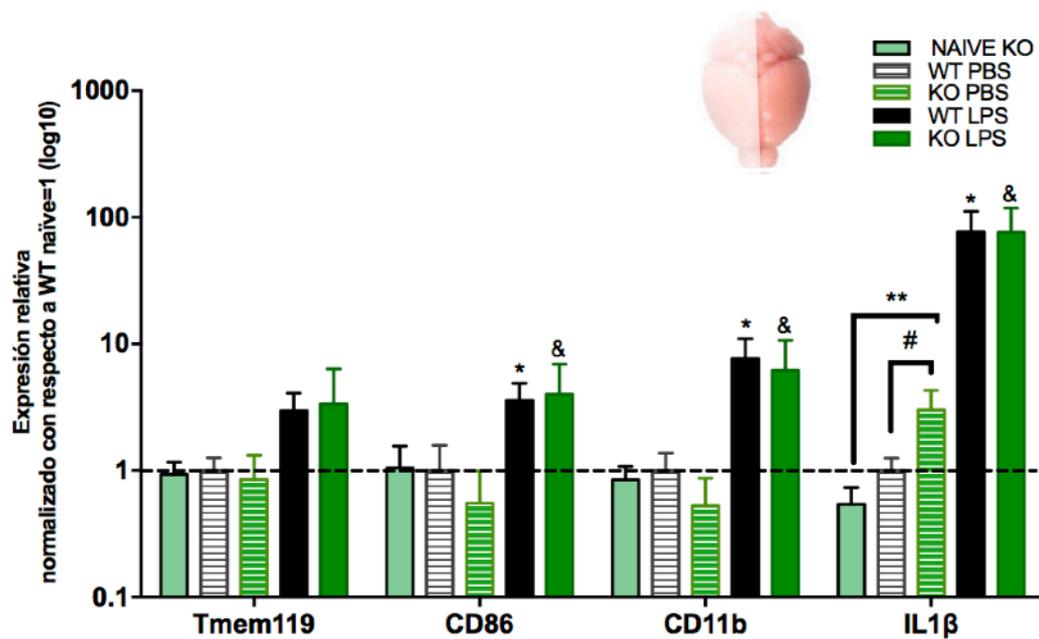


Figura 3.9: Expresión relativa del ARNm de cerebros Wt y CD300f KO en un modelo de neuroinflamación limpia. Se evaluaron los niveles de expresión del marcador específico de microglía Tmem119, y de genes relacionados a procesos inflamatorios CD86, CD11b, IL1- β y NLRP3 luego del tratamiento con LPS o PBS. Se muestra el valor relativo al gen ribosomal 18S y normalizado con respecto a WT naïve =1 (línea punteada). Se observan diferencias en los niveles de expresión de genes pro-inflamatorios de animales tratados con LPS respecto a PBS independientemente de su genotipo. No se observan diferencias significativas entre los genotipos salvo para IL1 β , el cual aumenta tras el tratamiento con PBS con respecto a Wt PBS y KO naïve . * $p < 0.05$ respecto a su control PBS, & $p < 0.05$ respecto a su control PBS - ANOVA de una vía. ** $p < 0.05$ respecto a CD300f KO naïve, # $p < 0.05$ respecto a Wt PBS - t student de dos colas. nWT naïve = 7, nKO naïve=8, nWT PBS = 4, nKO PBS = 4, nWt LPS = 8, nKO LPS = 8.

3.2.2 Papel del receptor CD300f en el trauma moderado - mTBI

Para investigar cual es la función de este receptor en situaciones inflamatorias mas complejas, con rotura de la BHE y daño tisular directo, realicé dos modelos de neurotrauma en ratón, uno de trauma focal severo (Controlled Cortical Injury, CCI) en nuestro laboratorio de la Facultad de Medicina, y otro de trauma moderado (mTBI), para lo cual realicé una serie de pasantías en el laboratorio del Dr. McGavern. Este se basa en el afinamiento del cráneo hasta aproximadamente 30 μm y la posterior compresión del tejido. Esto produce instantáneamente la muerte celular a nivel de las meninges, la cual se extiende progresivamente hacia el parénquima. A nivel del parénquima, este modelo induce una respuesta celular controlada y bien definida en donde comienza a comprometerse la integridad de la BHE por degeneración y muerte subsecuente de los astrocitos que la integran. En este proceso, la microglía subyacente extiende sus procesos hacia los sitios dañados intentando cubrir los espacios dejados por los astrocitos comprometidos, y fagocitándolos una vez que mueren con el fin de mantener la barrera funcional. Una de las ventajas de este modelo, aparte de permitir la visualización de la microglía *in vivo* dado que se utilizan ratones CX3CR1^{+/GFP}, es que no hay una infiltración masiva de células periféricas en el parénquima nervioso inmediatamente luego del trauma, por lo que es posible aislar el efecto agudo de la respuesta microglial.

En este contexto, realizamos una serie de experimentos que nos permitieron dilucidar el papel de este receptor en la respuesta post-traumática moderada (figura 3.10).

i) Visualización de la microglía post-traumática en el modelo mTBI

Realizamos el modelo de mTBI en ratones CX3CR1^{+/GFP} Wt y CD300f KO cruzados especialmente para este proyecto, e inmediatamente analizamos la lesión al microscopio de 2P durante una hora. Inyectamos a los animales con una solución Ioduro de Propidio (PI) i.p. para poder identificar a las células necróticas/apoptóticas con la integridad de su membrana plasmática alterada. Realizamos una serie de videos de la dinámica microglial post-trauma de donde obtuvimos las imágenes de la figura 3.11. Estas imágenes muestran el curso temporal de la respuesta en el minuto 5, 25, 45 y 65 luego del trauma. La señal del PI era tan intensa que hubo que extraerla de las figuras para poder analizar la morfología microglial.

Cabe recordar que en este modelo la respuesta microglial inmediata se caracteriza por el cambio de morfología o bien hacia el fenotipo *Honeycomb*, el cual protege los límites gliales de la BHE reforzando la acción de los astrocitos comprometidos por la compresión, o hacia el fenotipo *Jellyfish*, que representa a la microglía comprometida a la fagocitosis de los astrocitos (y otras células del parénquima nervioso) una vez que estos mueren.

Modelo mTBI

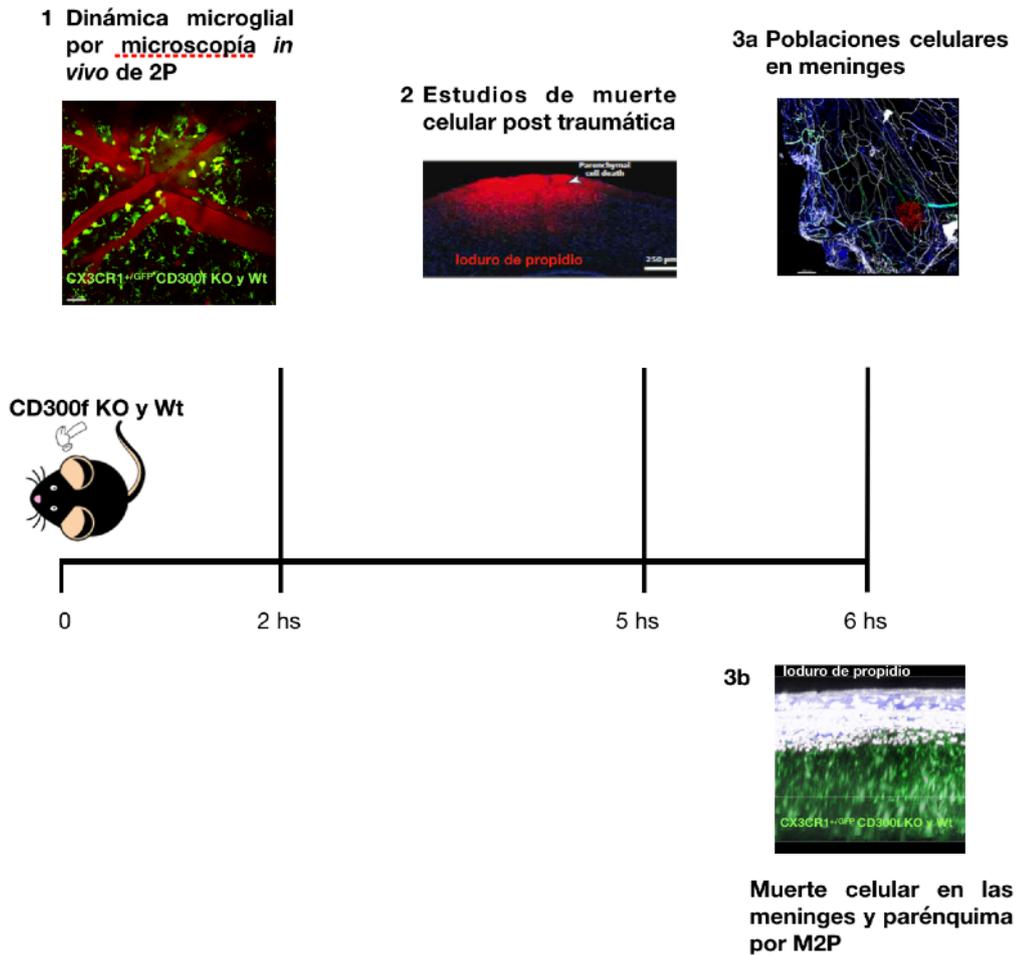
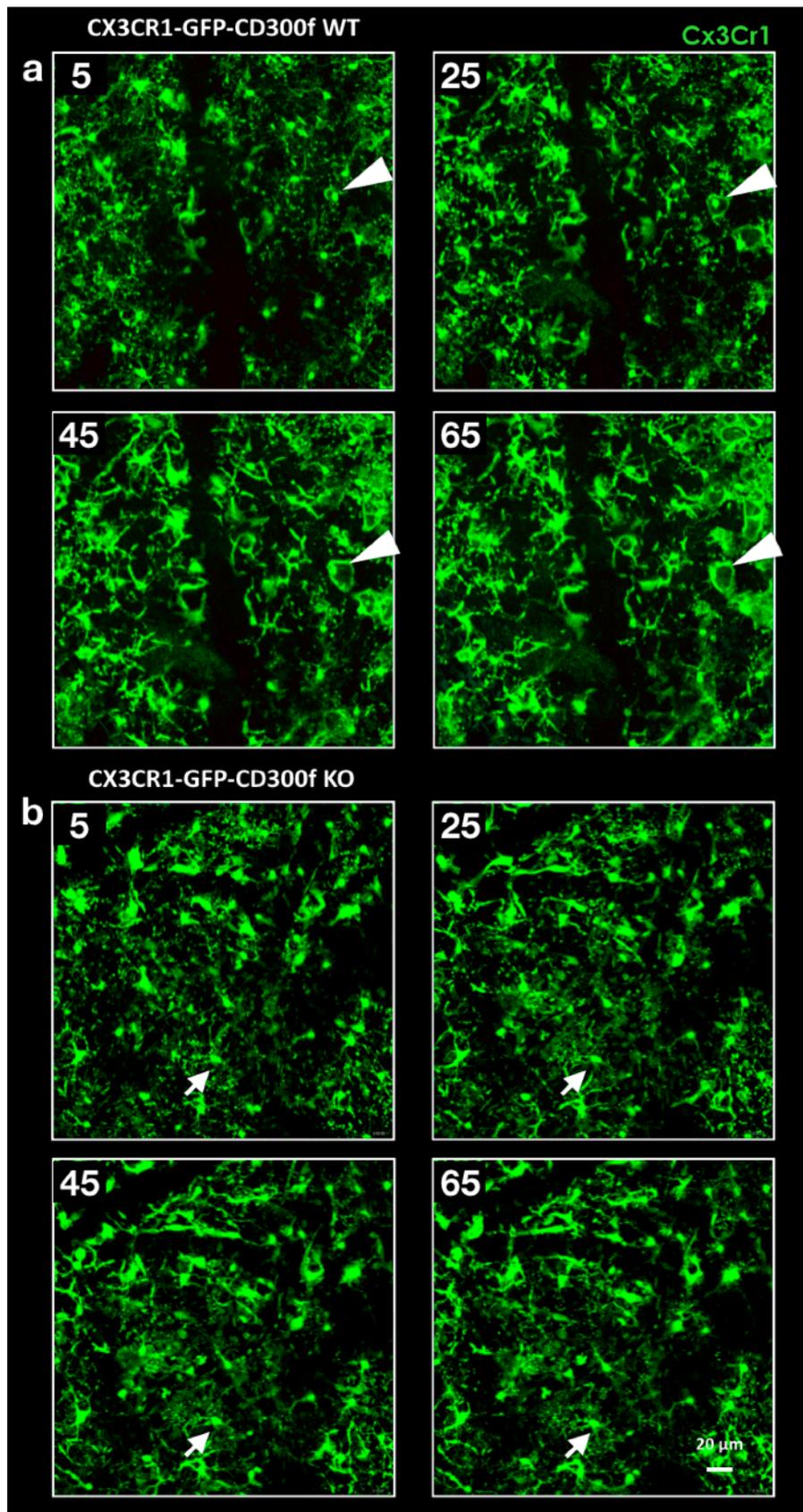


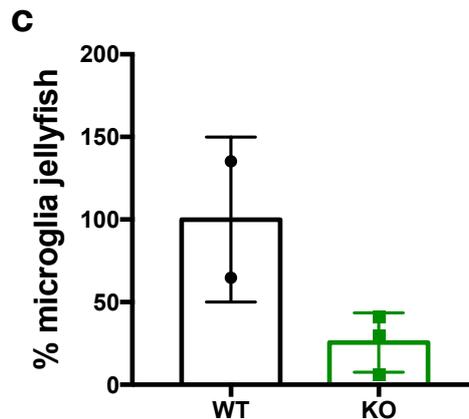
Figura 3.10_ Diseño experimental del modelo de mTBI en ratones CD300f Wt y KO.

1- Inmediatamente luego de realizado el trauma a animales CX3CR1^{+/GFP}-CD300f-Wt y KO se escanearon los cerebros al microscopio 2P para analizar la respuesta microglial temprana durante 2 horas; **2-** 5 horas luego de realizado el trauma se analizó el número de células muertas en el parénquima nervioso mediante la incorporación de PI; **3a-** Estudio de las poblaciones celulares de las meninges a 6 horas luego de realizado el trauma; **3b-** Estudio de la muerte celular a nivel de las meninges y parénquima nervioso por microscopía de 2P 6 horas luego de realizado el trauma.

Al visualizar la microglía de los animales luego del trauma, notamos que si bien en los animales Wt un gran número de estas células sufren cambios morfológicos hacia el fenotipo “*Jellyfish*” unos 15 minutos luego de realizada la lesión, este efecto no se observa en animales KO para CD300f, o al menos no de manera tan pronunciada (figura 3.11, video 2 y 3). La cuantificación del número de *Jellyfish* (figura 3.11 c) muestra una fuerte tendencia a la disminución de este fenotipo microglial en los animales KO ($p=0.08$), con una reducción de alrededor del 75% de *jellyfish* observadas. Esperamos confirmar este resultado con mayor número de animales.

Figura 3.11_ Visualización de la microglía CD300f Wt y KO al microscopio de 2P luego de un trauma moderado. Curso temporal de la respuesta WT **a)** y KO **b)** a los 0, 20, 40 y 60 minutos luego de producido el trauma. La microglía *Jellyfish* está indicada en **a** con las flechas. En verde CX3CR1. **c)** Cuantificación del % de microglía *Jellyfish* respecto a Wt (=100%). Videos adquiridos durante una hora luego de producido el trauma. Los animales KO poseen una reducción del 75% del número de microglía *Jellyfish* total. n Wt=2, n KO=3; $p=0.08$; t student de dos colas.





Esta morfología fagocítica muestra cambios drásticos en la disposición de su citoesqueleto que le permiten adquirir una forma redondeada y de mayor tamaño (~20 μm) (68). Los procesos de la microglía ramificada se retractan y un gran proceso único se extiende hacia el sitio del daño, adquiriendo un aspecto similar a una medusa (de ahí su nombre en inglés). Esta morfología está inducida mediante la activación de los receptores purinérgicos P2RY6 presentes en la membrana microglial, los cuales detectan la presencia de UDP liberado en este modelo principalmente por los astrocitos que conforman la BHE luego de su muerte por la compresión (68). Esto está acorde con los resultados obtenidos mediante el análisis molecular de la microglía CD300f KO naïve, donde vemos una gran disminución en la expresión del mensajero de P2RY6, y afirma nuestra hipótesis de que la microglía CD300f KO posee la función fagocítica alterada. No se observaron

diferencias notorias en el otro tipo de morfología microglial descrito en este modelo, la microglía *honeycomb*.

Una vez finalizado el experimento de 2P realizamos crio-secciones de los cerebros Wt y KO y analizamos la morfología general de la microglía en el sitio del trauma por microscopía confocal (figura 3.12). Como podemos observar en la figura, las células microgliales contactan íntimamente con células PI+. En el caso del Wt, la morfología microglial parece más reactiva, con procesos engrosados que dan al soma aspecto difuso y de mayor tamaño en comparación con KO.

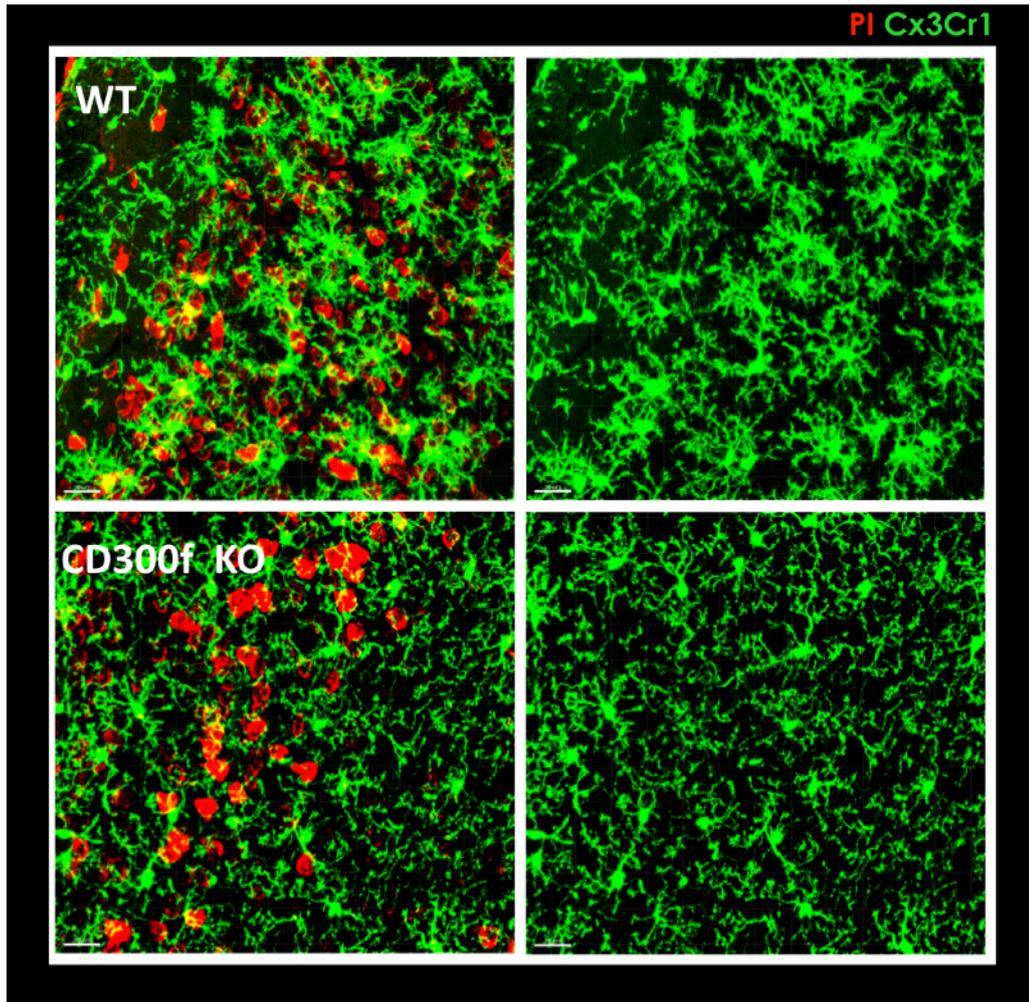


Figura 3.12_ Morfología de la microglía CD300f Wt y KO luego de un trauma moderado. Imágenes de secciones de cerebros 2 horas luego de realizado el trauma obtenidas al microscopio confocal. Se observan cambios morfológicos de las células microgliales entre ambos genotipos, indicativos de una mayor reactividad en la microglia Wt en el sitio del trauma con respecto a KO. En verde, CX3CR1, en rojo PI. La barra corresponde a 20 micras.

En base a estos resultados realizamos otra serie de experimentos para evaluar el daño traumático a través del análisis del número de células en proceso de muerte en los animales Wt y CD300f KO luego del mTB (figura

3.13). Para ello mantuvimos anestesiados a los ratones traumatizados durante 5 horas, tiempo suficiente para que se extienda la muerte celular a nivel del parénquima nervioso, y previo a su eutanasia incubamos durante media hora una solución de IP en el sitio del trauma. Una vez finalizado este tiempo, los animales fueron perfundidos con PFA y se realizaron crio-secciones para su análisis histológico (figura 3.13 a-b). Esto permite el análisis y cuantificación de las células que incorporan el IP por microscopía confocal (figura 3.13 c). Como podemos observar en la figura, existe una diferencia del 40% entre el número de células apoptóticas encontradas en la corteza subyacente al trauma de animales Wt y KO, siendo más intensa la marca de IP en los animales deficientes para el receptor CD300f. Esto puede deberse i) o bien al aumento de apoptosis en los animales KO, ii) o a la disminución de la actividad fagocítica de la microglía en estos animales.

Si bien no pudimos analizar aún el efecto del receptor CD300f en la apoptosis celular, nuestros resultados hasta ahora apuntan a que el efecto de CD300f está relacionado, al menos en parte, con la respuesta fagocítica disminuída en la microglía (diminución de P2RY6, alteración en los niveles de expresión de otras proteínas involucradas en los procesos fagocíticos y disminución del fenotipo *Jellyfish*).

Para completar este ensayo deberíamos realizar marcajes específicos de distintos tipos celulares con el fin de evaluar en más detalle: i) si realmente mueren más células luego del mTBI, ii) la existencia de

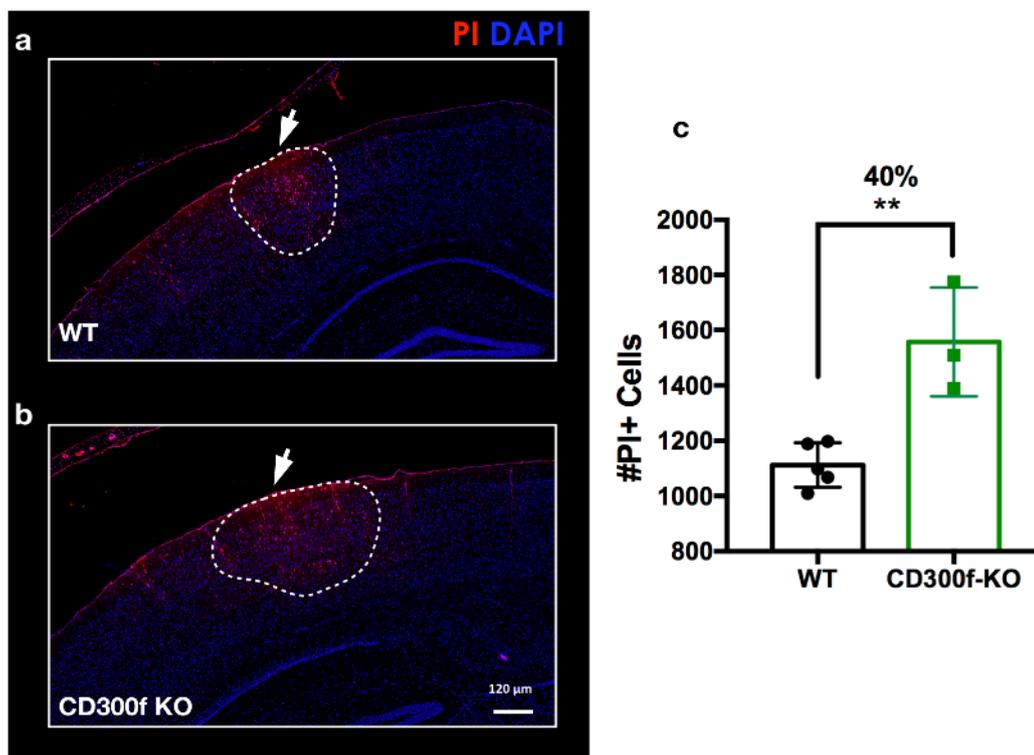


Figura 3.13_ Cuantificación del número de células apoptóticas luego de una lesión traumática moderada. Se cuantificaron las células apoptóticas positivas para la presencia IP en el centro de la lesión, luego de realizar el modelo de trauma cerebral moderado en animales CD300f Wt (a) o KO (b). El número de células en proceso de muerte en los animales CD300f KO resultó un 40% mayor que el de los controles Wt (c). Lo que se observa en el extremo superior izquierdo de las imágenes es el cráneo afinado y meninges. En rojo, células apoptóticas PI+, en azul DAPI. ** $p < 0.01$ T Student de dos colas. Análisis realizado e ratos macho de 8-10 semanas de edad, nWT= 5, nKO=3.

apoptosis dirigida hacia algún tipo celular en particular, y iii) evaluar los niveles de ROS producidos por ambos genotipos, los cuales están caracterizados como un mediador central en la inducción de la apoptosis en este modelo de trauma moderado (68). En particular, el conteo de

neuronas a tiempos más largos nos permitiría en forma complementaria determinar si existe mayor pérdida de neuronas en los KO o únicamente un retraso en la fagocitosis.

ii) Análisis de la inflamación a nivel de las meninges

En este modelo de trauma, la respuesta inmune a nivel de las meninges posee un efecto bien caracterizado (68, 69) y claramente distinguible al observado a nivel del parénquima nervioso.

Las meninges son tres capas membranosas de tejido conjuntivo que rodean al SNC, incluyendo cerebro y médula espinal, y cuya función principal es protegerlo y contribuir al flujo del líquido cefalorraquídeo. Estas membranas en íntimo contacto con el SNC son de particular interés ya que funcionan como nexo entre la respuesta inmune periférica y central. Sin embargo, muchos aspectos de su fisiología e inmunobiología continúan sin conocerse, y constituyen por lo tanto un área de activa investigación (249), en particular luego de lesiones traumáticas. De hecho se han descubierto recientemente vasos linfáticos en este tejido tanto en ratón como en humanos, que drenan a ganglios cervicales y permiten la detección de las moléculas del espacio intersticial del tejido nervioso por las células del parénquima de estos ganglios (4, 250).

En base a esto y aprovechando la experiencia en esta área del laboratorio de McGavern, estudiamos además otras poblaciones de células mieloides que expresan el receptor CD300f y que están involucradas en la patología

del trauma moderado a nivel de las meninges mediante la preparación de montajes de meninges enteras de animales Cx3CR1^{+/GFP} CD300f Wt y KO luego de producido el trauma. Este método descrito recientemente (235) se basa en extraer y montar en un portaobjetos las membranas meningeales (duramadre y aracnoides) que quedan adheridas a la base del cráneo, luego de perfundir el animal con PFA y realizar las tinciones correspondientes *in situ*.

Por un lado analizamos la infiltración de neutrófilos hacia el sitio de lesión en las meninges, respuesta bien caracterizada en este modelo, la cual posee un pico a las 5-6 horas luego de producido el trauma (68, 69) (figura 3.14). Para ello utilizamos el anticuerpo contra Ly6G que reconoce específicamente esta población celular. Además, marcamos los vasos sanguíneos con laminina y las células apoptóticas con PI, y en verde podemos ver la señal de Cx3Cr1-GFP presente en la población de macrófagos meningeales (MM).

Por otro lado evaluamos el número y morfología de los macrófagos meningeales en sitios distales a la lesión (figura 3.15). En este caso están marcados en rojo los vasos sanguíneos tras la administración de lectina intravenosa previo a la perfusión, y los MM se ven en verde mediante la señal de Cx3Cr1-GFP.

Como podemos observar en la figura 3.14, si bien resulta muy delicado extraer las meninges enteras de animales traumatizados, este método fue efectivo para la visualización de los neutrófilos infiltrantes luego del

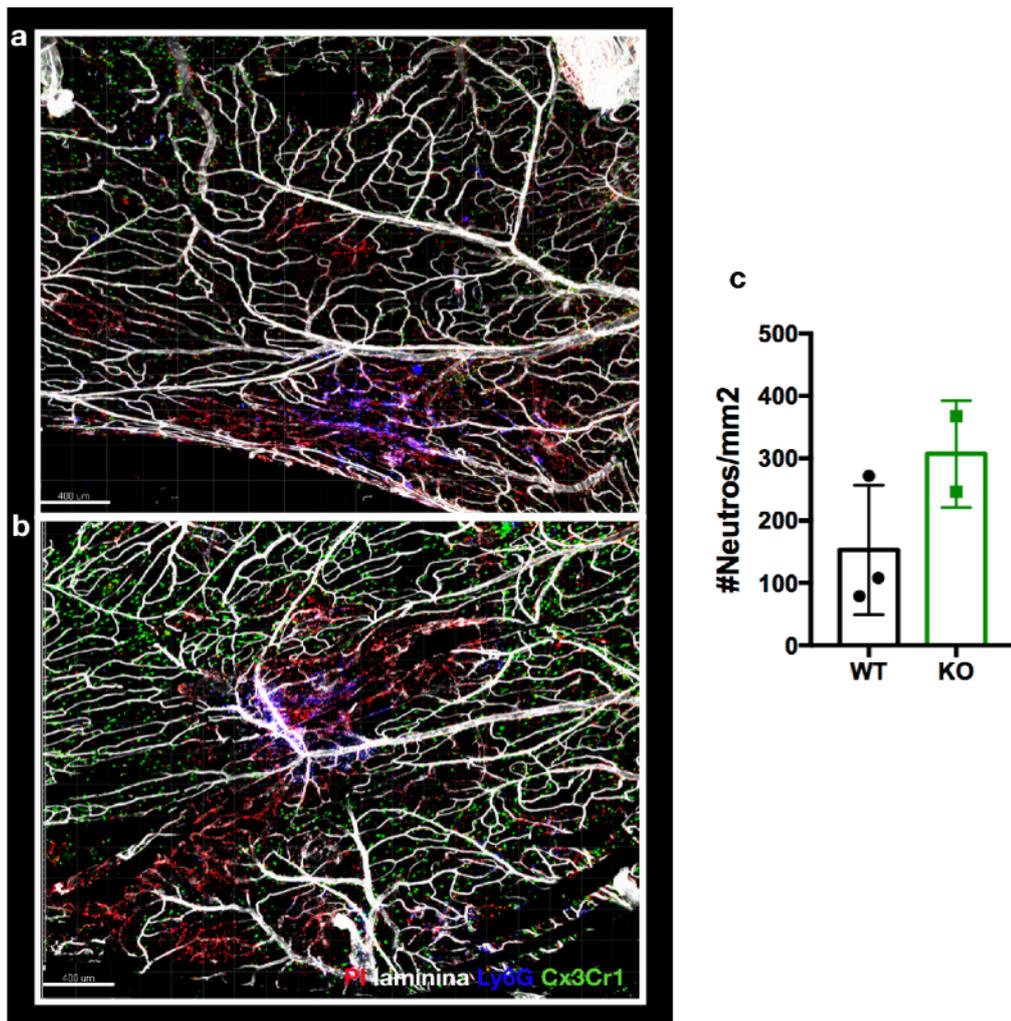


Figura 3.14_ Visualización de neutrófilos infiltrantes por microscopía confocal en un montaje de meninges enteras. Infiltración de neutrófilos en las meninges de animales Cx3Cr1^{+/GFP} CD300f Wt (a) y KO (b) a as 5 horas post-trauma. En rojo las células apoptóticas marcadas con PI, en blanco los vasos sanguíneos marcados con laminina, en azul neutrófilos marcados con Ly6G, en verde macrófagos meningeales marcados con Cx3Cr1. Experimento realizado en animales de 8-10 semanas de edad, nWT=3, nKO=2.

trauma en animales Wt y KO (figura 3.14 a y b). El marcaje con laminina y PI permite ubicarnos en la zona de la lesión, y además se ve una clara

acumulación de células LY6G+ en el centro del trauma.

La cuantificación de los neutrófilos infiltrantes en los animales CD300f Wt y KO (Figura 3.14 c) fue realizada utilizando el software Imaris 9.1. En este caso, aunque se ve una tendencia al aumento de infiltración en los animales CD300f KO, los resultados no llegan a ser significativos probablemente debido al bajo número de meninges obtenidas para la cuantificación (n WT=3; n KO=2). Este posible aumento podría ser un indicativo de la existencia de un mayor reclutamiento de neutrófilos en animales KO, lo cual influiría en la respuesta inmune generada en las meninges tras un trauma moderado (68, 69). Este efecto se estudiará en más detalle durante la realización de mi post-doctorado en el laboratorio de McGavern.

La figura 3.15 muestra la distribución de los MM dos horas luego del trauma. Como podemos observar en la figura, el sitio de la lesión queda completamente desprovisto de estas células, que mueren instantáneamente a causa de la compresión (área punteada). Los resultados preliminares no permitieron sacar conclusiones con respecto al número de MM en sitios distales a la lesión en animales CD300f Wt y KO (figura 3.15 b) si bien vamos a investigar las características de esta población en experimentos a futuro.

Por último, evaluamos los niveles de muerte celular a nivel de las meninges en animales CX3CR1^{+GFP} CD300f Wt y KO por microscopía *in*

vivo de 2P luego del mTBI. Para ello, luego de realizado el trauma mantuvimos a los animales anestesiados durante 6 horas, y durante la última hora y media incubamos una solución de PI directamente sobre la

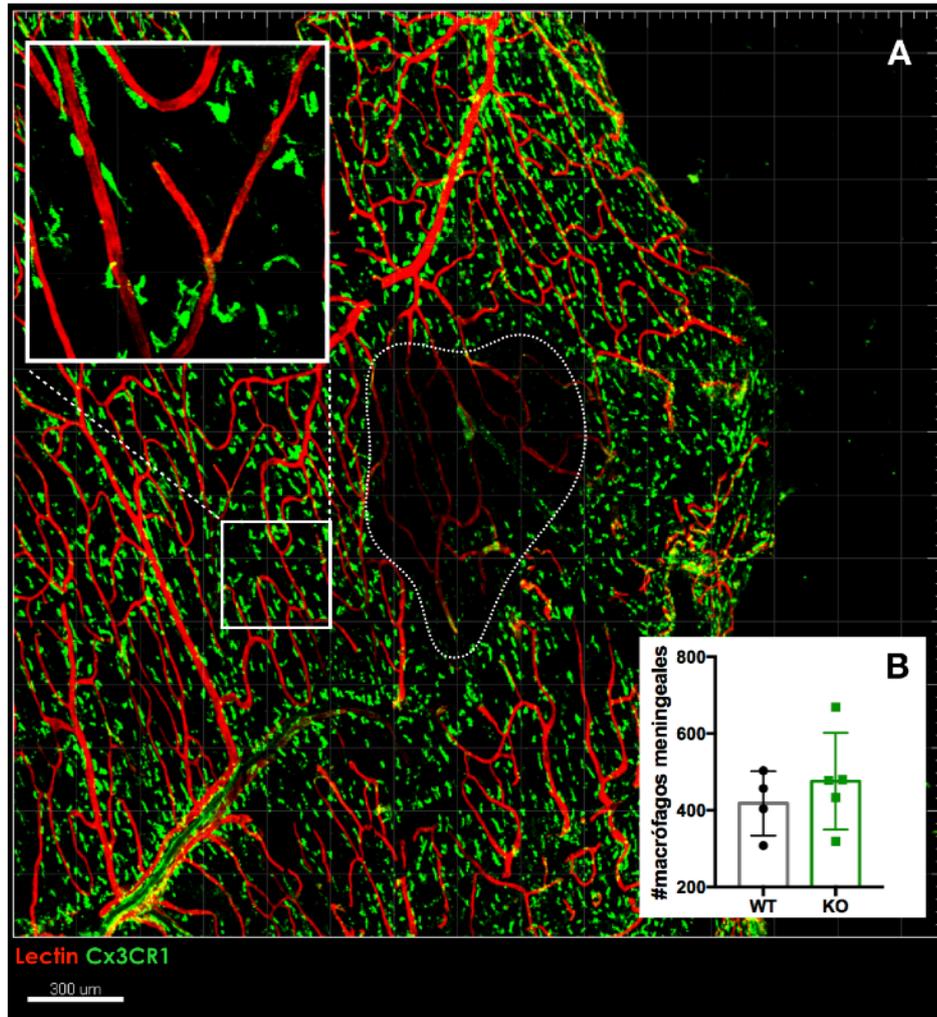
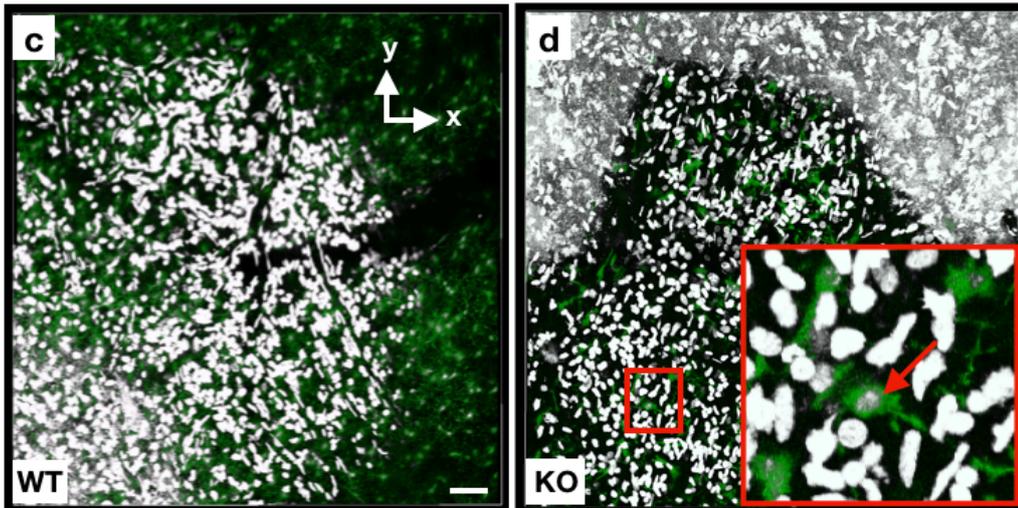
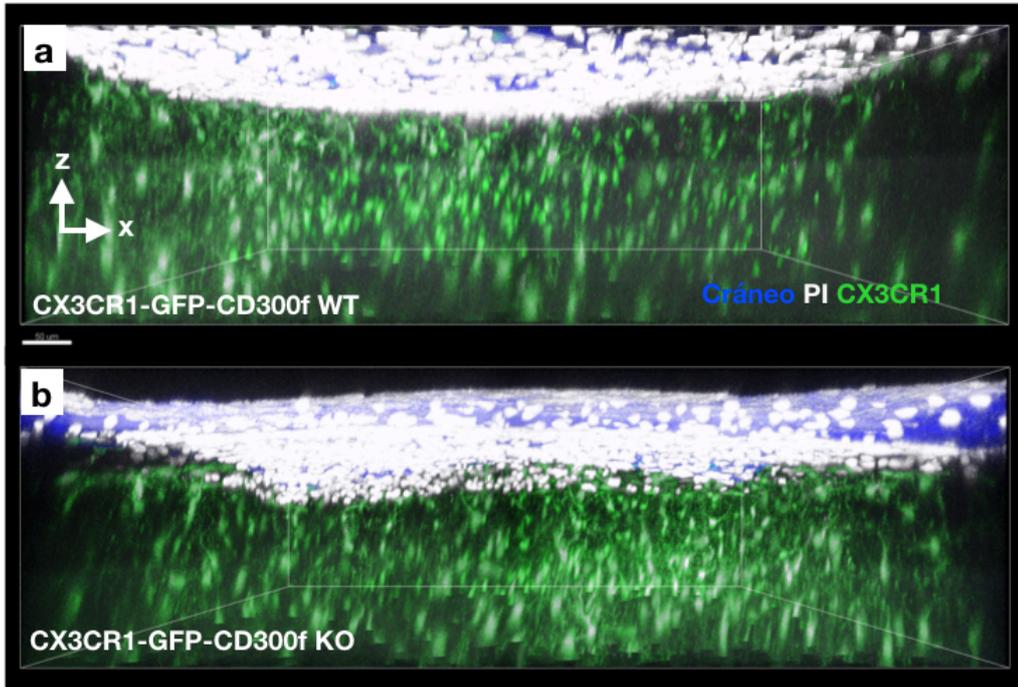


Figura 3.15_ Distribución de MM (Cx3Cr1+) en montajes de meninges enteras de animales CD300f Wt y KO. a) Montaje de meninges enteras, donde se pudo localizar el sitio de la lesión desprovisto de células Cx3Cr1+ (flecha). Se cuantificó la cantidad de macrófagos meningeales (MM) en sitios distales a la lesión **a)**, recuadro blanco; **b)** no encontrando diferencias entre ambos genotipos en cuanto a su densidad. La barra corresponde a 300 μm.

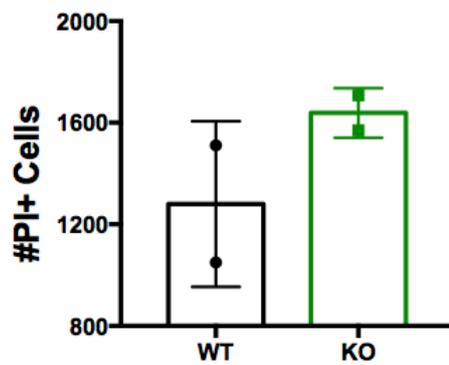
lesión con el fin de marcar las células en proceso de muerte como fue descrito más arriba (figura 3.16). Realizamos *stacks* de alta resolución con una profundidad de 200 μm para poder visualizar la muerte a nivel del parénquima nervioso (figura 3.16 c, d y f) y en las meninges, las cuales ocupan las primeras 50 micras a partir de la superficie del cráneo (figura 3.16 a y b).

Las imágenes 3.16 a-b muestran la proyección del cerebro en el plano z; la parte superior que corresponde al cráneo del animal, inmediatamente por debajo las meninges, donde se ve abundancia de células apoptóticas teñidas con PI (en blanco), y por último el parénquima nervioso donde observamos en verde la señal de la microglía y en blanco células apoptóticas. La muerte celular en las meninges de los animales CD300f Wt y KO fue cuantificada utilizando el software Imaris (figura 3.16 e). Si bien se puede apreciar una leve tendencia al aumento de muerte celular en animales KO, esta no resultó significativa, probablemente por el reducido número de animales que pudimos analizar.

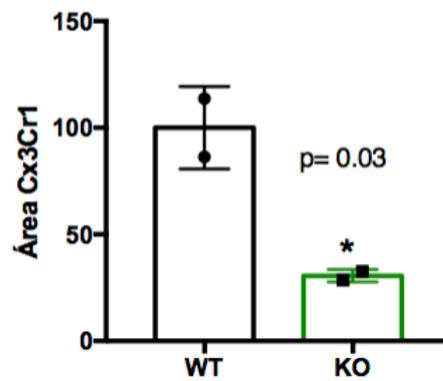
Figura 3.16_ Muerte celular a nivel de las meninges y parénquima nervioso 6 horas luego de un mTBI. Imágenes obtenidas mediante microscopía *in vivo* de 2P en animales CX3CR1-GFP CD300f WT **a)** y KO **b)**; **c-d)** Muerte celular en el parénquima de animales WT **(c)** y KO **(d)** correspondientes a distintos planos de las imágenes a y b. En **e)** cuantificación de la muerte celular a nivel de las meninges. En **f)** magnificación de la imagen d, donde se pueden observar células microgliales fagocíticas en animales KO (flecha). La barra corresponde en ambos casos a 50 μm . nWt y KO=2



e Muerte celular en meninges



f 30um 6hpt



Por otra parte, en la sección c-d de la figura 3.16 se muestra la muerte celular a nivel del parénquima en animales CD300f Wt (figura 3.15 c) y KO (figura 3.16 d) a las 6 horas de producido el trauma. No cuantificamos la muerte celular en el parénquima mediante microscopía de 2P debido a que esta no es la aproximación más adecuada para hacerlo ya que puede dar lugar a la subestimación del marcaje en niveles de profundidad mayores a los 100 μm debido a la pérdida de intensidad de la señal. La imagen magnificada (figura 3.16 d recuadro rojo) muestra células PI+ dentro de una microglía, lo cual puede interpretarse como una célula muriendo siendo fagocitada por la microglía (flecha). Con esto podemos decir que si bien la actividad fagocítica de la microglía deficiente en CD300f está alterada basándonos en nuestros resultados anteriores, esta no está completamente bloqueada, y al menos a las 6 horas luego de producido el trauma podemos observar células fagocíticas competentes. Por último la sección f de la figura 3.16 muestra la señal de CX3CR1 en las 30 micras superiores del *stack*, a nivel de las meninges. El área ocupada por el marcador es un indicativo de la reactividad de los macrófagos meningeales, la cual parece ser mayor en animales KO.

En base a estos resultados preliminares podemos sugerir que la respuesta inflamatoria a nivel de las meninges en animales deficientes de CD300f podría mostrar diferencias con respecto a los animales Wt. De todas formas, únicamente hemos podido evidenciar tendencias que habría que estudiar en más detalle a nivel del reclutamiento de neutrófilos

y la morfología de macrófagos meningeales, que podrían estar influyendo en la respuesta mediada por células microgliales que observamos a nivel del parénquima nervioso en animales KO. La expresión de diferentes marcadores pro-inflamatorios, así como alteraciones en la vasculatura y BHE serían también interesantes de evaluar.

En resumen, el abordaje aquí empleado resultó muy adecuado para analizar la respuesta inmediata de la microglía CD300f KO ante un trauma moderado, donde al menos en las primeras etapas no hay ruptura de la BHE ni infiltración de células mieloides. Los análisis por 2P nos permitieron visualizar el efecto de la deficiencia de CD300f en las células microgliales, las cuales vieron afectada su función fagocítica, resultando en una menor proporción de microglía *Jellyfish* y mayores niveles de muerte celular en el parénquima nervioso de animales KO. Esta metodología de 2p es clave en el estudio de la fagocitosis in vivo, ya que no existen marcadores proteicos o de otro tipo que puedan utilizarse como indicadores fiables del nivel de fagocitosis celular.

3.2.3 Estudios del trauma a largo plazo

i) Puesta a punto del Modelo CCI-Test del Parallel Rod Floor

Los resultados obtenidos a partir del modelo de mTBI fueron muy importantes para determinar el tipo de respuesta mediada por CD300f en la microglía en la fase aguda luego de un trauma moderado. No obstante,

en muchos casos las alteraciones derivadas del trauma cerebral se desarrollan en días, semanas y meses, llegando incluso a ser crónicas. Recientemente se ha descrito que esta se trata de una patología progresiva, donde se observan cambios tisulares, degeneración axonal y neuroinflamación, persistentes durante meses y hasta años luego del trauma (190, 217, 251) derivando en patologías psiquiátricas y distintos tipos de demencia (184). Es por esto que el análisis de las alteraciones inducidas por el TEC se ha extendido crecientemente hacia tiempos de supervivencia mayores.

La evaluación a largo plazo en roedores es compleja, tanto a nivel de lesiones axonales como comportamentales (252). El grado de injuria es evaluado mediante técnicas histológicas y neurológicas que requieren de entrenamiento y tiempos de dedicación elevados; muchos de los test utilizados precisan de experiencia por parte del investigador y entrenamiento previo de los animales como el rotarod (253, 254), o los errores cometidos por los animales al caminar por una grilla (254), y se basan en la observación de registros de video lo cual no solo duplica el tiempo dedicado al ensayo sino que los resultados pueden estar sesgados por el investigador.

En la presente tesis, contribuimos a describir dos nuevas metodologías de análisis de lesiones axonales y alteraciones neurológicas, principalmente motoras, a largo plazo (3 meses) (ver artículo adjunto "Thy1-YFP-H mice

combined with parallel rod floor test evidence short and long-term traumatic brain injury progression.”) (252).

Se utilizó el modelo de trauma severo descrito previamente, el impactor cortical controlado o CCI, donde es posible evaluar los efectos del daño a largo plazo, tanto a nivel funcional como histológico (95, 252). Este modelo se basa en la apertura de una ventana en el cráneo, ubicada entre bregma y lambda (sobre la corteza sensorimotora primaria), a través de la cual un pistón hidráulico impacta directamente sobre la duramadre y corteza cerebral con una velocidad, profundidad y tiempo de impacto controlado, determinados por el investigador. Por otra parte, la disrupción casi inmediata de la BHE en este modelo nos permite evaluar el papel que juega la infiltración de otras células inmunes en la patología del trauma. La evaluación de las lesiones neurológicas se realizó mediante la utilización del Test del Parallel Rod Floor, el cual resultó ser un ensayo robusto y no sesgado que permite evaluar el potencial neuroprotector de moléculas candidatas en modelos animales de TEC.

El desarrollo de este modelo implicó la adquisición y puesta a punto del sistema de impacto el cual no estaba disponible en nuestro país, así como la selección del abordaje adecuado para la evaluación del daño a nivel funcional. El sistema de impacto fue puesto a punto primero para ratas, lo cual fue parte de mi trabajo de maestría (227), y luego para ratones, lo cual arrojó una reciente publicación donde evaluamos la histología y función neurológica de animales Thy1-YFP-H luego de un trauma a largo

plazo (252). Por otra parte, para evaluar la disfunción motora generada a raíz del trauma, pusimos a punto el test del Parallel Rod Floor (figura 3.17), el cual si bien había sido utilizado previamente para medir la ataxia a consecuencia de la intoxicación con alcohol (255), nunca antes había sido utilizado para evaluar la patología traumática a corto o largo plazo (200). Este se basa en un sistema cerrado donde el ratón camina sobre un suelo con barras paralelas separadas de una placa metálica (suelo estándar) o separadas de una rejilla (suelo nuevo) (figura 3.17 a), y cada vez que el ratón comete un error, este es cuantificado automáticamente al entrar en contacto con el suelo dado que se cierra un circuito.

Para evaluar la capacidad de este test en discriminar entre animales naïve y CCI utilizamos un set de 12 animales de la cepa C57/BL6, 6 de los cuales se mantuvieron en condiciones naïve y los otros 6 les realizamos un trauma por CCI. Los animales fueron evaluados por el Test del Parallel Rod Floor durante una semana; en el día 0 previo al trauma y a los 1, 3 y 7 días luego del mismo.

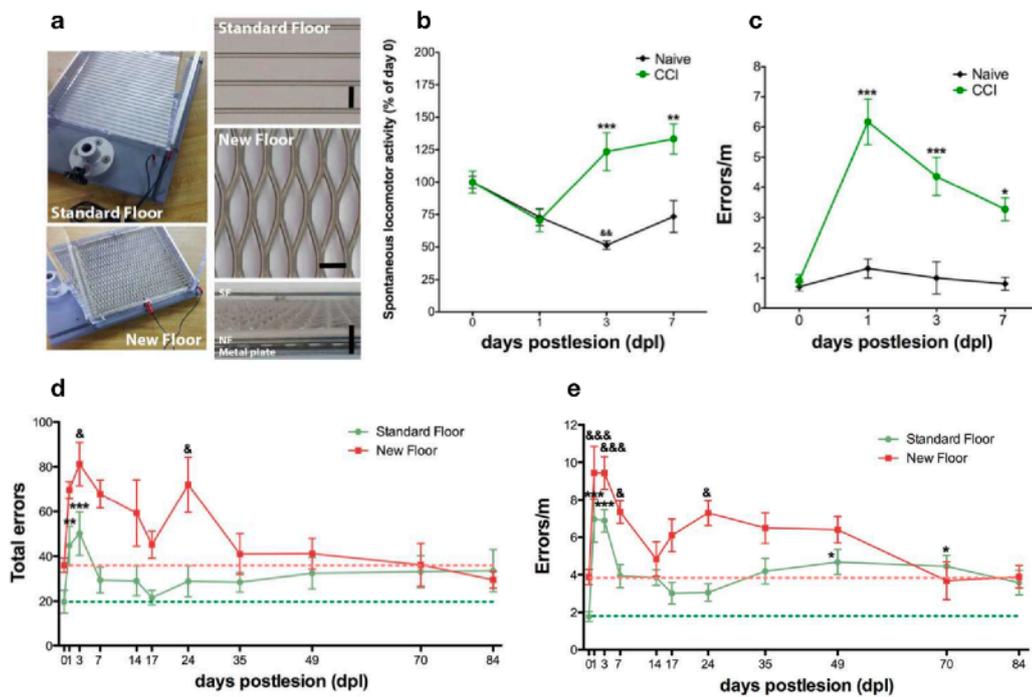


Figura 3.17_ El test del Parallel Rod Floor detecta déficits motores y comportamentales luego de un TEC. a) SF: suelo estándar, NF, suelo nuevo, barras de calibración 6.5 mm. Los ratones C57/BL6 sometidos a CCI con una profundidad de contusión de 2mm, y puestos en el piso estándar muestran un incremento en la actividad locomotora espontánea **b)** y en el número de errores/m **c)** cuando son comparados con naïve (b-c * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.01$ Naïve vs CCI, Test de ANOVA de dos vías para medidas repetidas seguido de Bonferroni, y & $p < 0.01$ vs Naïve 0dpl, Test de comparación múltiple de Dunnett, ANOVA de una vía para medidas repetidas); **d-e)** ambos tipos de suelo detectan errores con un perfil bifásico similar pero con leves diferencias de sensibilidad. Test de comparación de Dunnett, medidas repetidas ANOVA de una vía, * $p < 0.05$ vs suelo estándar 0dpl, & $p < 0.05$ vs suelo nuevo. $n=6$ en ambos estudios.

Analizando la actividad locomotora espontánea (figura 3.17 b) podemos ver que los animales naïve muestran una aclimatación al medio reduciendo su actividad locomotora espontánea ($p < 0.01$), mientras que los animales sometidos al CCI muestran diferencias significativas en los días 3 y 7 luego del trauma ($***p < 0.01$ y $**p < 0.01$ respectivamente), como ha sido reportado previamente en diversos estudios. Por otro lado, analizando los errores cometidos por metro recorrido entre los animales naïve y CCI (figura 3.17 c) podemos notar que las diferencias aparecen a partir el día 1 post trauma hasta el día 7 ($***p < 0.001$ $**p < 0.01$ $*p < 0.05$), sugiriendo que el Test del Parallel Rod Floor es capaz de diferenciar entre el comportamiento de animales sometidos a un trauma por CCI vs naïve, al menos durante la primera semana, resultando en un aumento de la actividad locomotora espontánea y los errores por metro cometidos luego del trauma.

Por otra parte, realizamos un estudio comportamental a largo plazo luego del trauma por CCI utilizando animales Thy1-YFP-H¹². Este ensayo nos permitió además comparar las diferencias entre el uso del suelo estándar y el suelo nuevo (creado por la compañía Stoelting, figura 3.17 a), el cual no había sido hasta ahora testeado en ningún otro trabajo.

Utilizando el suelo estándar para la evaluación de el comportamiento de los animales YFP luego de un trauma podemos ver que a corto plazo

¹² Los ratones de la cepa Thy1-YFP-H expresan la proteína fluorescente amarilla (YFP) en un ~5% de las neuronas piramidales de la capa V y en menor proporción de la capa III.

estos se comportan tal como los animales WT de la gráfica 3.17 c, donde hay un incremento inmediato en el número de errores/m luego del CCI.

Por otra parte, el análisis a largo plazo muestra que esta afección en el desempeño motor persiste en el tiempo, mostrando cambios progresivos en la curva de errores totales y errores/m de los animales traumatizados al menos hasta los 85 días de evaluado (figura 3.17 d-e, línea verde). Es importante relativizar el nº errores con el total de metros caminados para descartar posibles variables adicionales como que un animal con menor o mayor ansiedad camine distancias mayores o menores, lo cual influiría *per se* en el nº de errores cometidos.

Luego de modificar el test incluyendo un nuevo suelo (figura 3.17 d-e, línea roja), observamos el mismo tipo de comportamiento comparado con el suelo estándar. Según podemos ver en la figura, ambos tipos de suelo son capaces de detectar los errores de los animales traumatizados con perfiles similares, observándose en ambos casos una curva bifásica con un rápido incremento del número de errores total y errores/m durante los tres primeros días luego del trauma, seguido de un pico que se retarda en el tiempo al utilizar el suelo estándar.

Estos resultados permiten concluir que el uso de CCI combinado con el Test del Parallel Rod Floor es una buena aproximación para estudiar las etapas agudas y crónicas del TEC del punto de vista funcional. El patrón de nº errores/m relativos descrito en la etapa aguda post-trauma es

similar para ambos genotipos analizados. Por otra parte, este comportamiento varía según los tiempo estudiados, encontrando dos picos separados en el tiempo, donde el desempeño motor de los animales empeora; esto puede deberse a las variaciones en la respuesta inflamatoria, picos en la degeneración axonal o cambios en la capacidad regenerativa del tejido nervioso, entre otras razones posibles. Este es un efecto interesante del CCI que debemos estudiar en más detalle.

En este contexto, nos enfocamos en el estudio del KO CD300f para evaluar la participación de las células inmunes que contienen este receptor en la respuesta inflamatoria post-traumática a corto y largo plazo.

3.2.4 Papel del receptor CD300f en el modelo de trauma severo - CCI

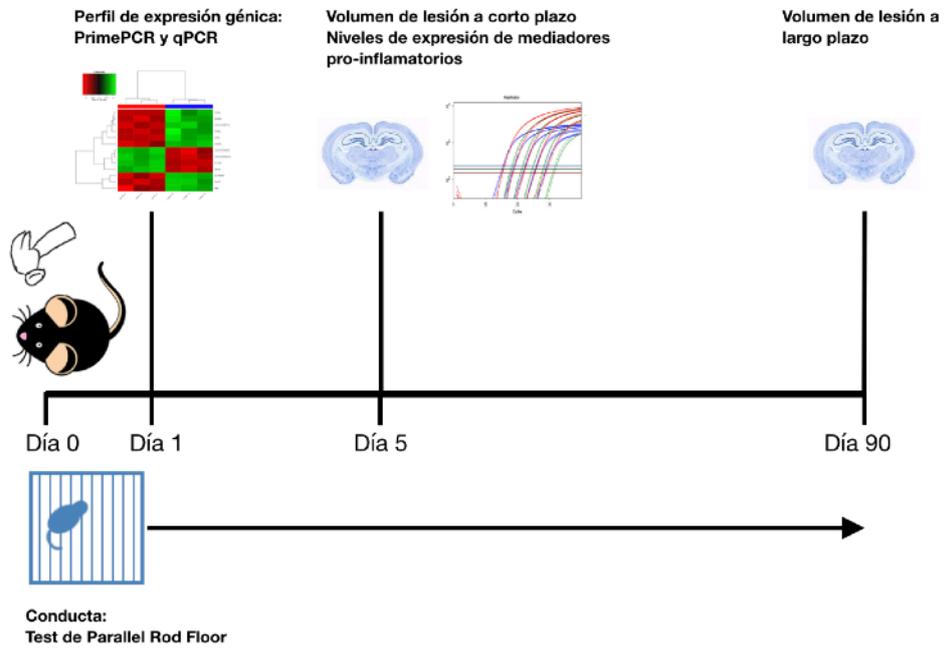
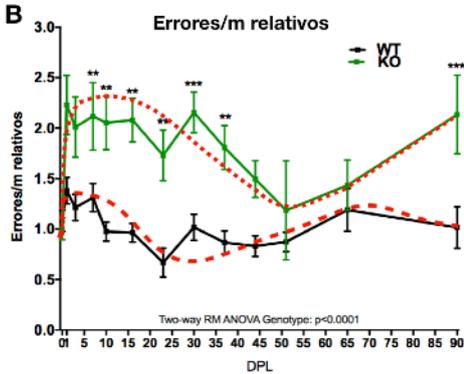
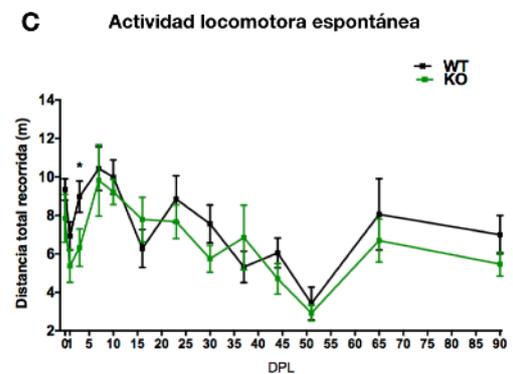
i) Análisis comportamentales

Comenzamos este estudio analizando el patrón de respuesta comportamental de los animales CD300f Wt y KO durante 3 meses luego de realizarles un trauma por CCI (figura 3.18). Para ello, utilizamos el Test del Parallel Rod Floor como fue descrito previamente.

Comparando con los resultados obtenidos en el análisis anterior (figura 3.17) podemos decir que el patrón de errores por metro cometidos por los animales en ambos estudios es similar, observándose los dos picos característicos en el tiempo.

Al analizar la gráfica de nº errores/m cometidos luego del trauma (figura 3.18 b), lo que más nos llama la atención es el exagerado aumento en el número de errores/m que observamos en los ratones KO comparados con los Wt. Este aumento se sostiene en el tiempo, y los animales KO no alcanzan nunca la recuperación a niveles basales como ocurre con los Wt. Vemos también un desfasaje hacia la derecha en la curva bifásica de errores de los animales KO, que muestran una respuesta no solo mayor en tiempos iniciales, sino una afectación retardada mayor. Esto muestra una clara diferencia entre ambos genotipos, y demuestra la participación del receptor CD300f en vías que directa o indirectamente afectan la coordinación motora de los animales luego de un trauma.

Figura 3.18_ Estudio a largo plazo del desempeño motor de ratones CD300f WT vs. KO luego de un trauma por CCI. a) diseño experimental para el estudio de la influencia del receptor CD300f en la respuesta post-traumática a corto y largo plazo. Se analizaron los cerebros de los animales mediante técnicas de amplificación de ARNm e histología a diferentes tiempos. Se evaluó el desempeño motor de los animales a lo largo de todo el experimento. Se utilizaron ratones macho Wt y CD300f KO de 3-6 meses de edad. Se estudió el comportamiento de animales durante 90 días posteriores al CCI. **b)** Comparación de los errores cometidos por metro recorrido, relativos al promedio de errores basales de cada grupo. Los animales KO (línea verde) cometen más errores/m que los WT (línea negra) a lo largo de todo el ensayo. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ ANOVA de dos vías seguido del test de Bonferroni. **c)** Actividad locomotora espontánea = distancia total recorrida durante 10 minutos en el campo abierto. El patrón de actividad locomotora espontánea es el mismo para ambos genotipos aunque se ve una tendencia a la disminución en los animales KO. * $p < 0.05$ T test. n WT=13, n KO=13 en 3 sets de experimentos diferentes.

A**Modelo CCI****B****C**

Cuando analizamos detalladamente los errores por metro cometidos por los ratones CD300f KO con el de los Wt (figura 3,18 b) vemos que en ambos ocurre una respuesta inmediata al daño desde el día 1 post lesión (dpl), que en los Wt es capaz de resolverse hacia una fase de recuperación más rápidamente que en los KO, mientras que en estos últimos, el daño cognitivo-motor muestra ser mucho mayor, y luego de alcanzar el pico máximo de errores por metro se mantiene en una meseta que recién disminuye al día 40 pl, donde se ve una recuperación motora llegando a un pico mínimo de errores para el día 50, y vuelven a empeorar hacia el día 90 pl. En los animales Wt sin embargo, vemos que luego de la respuesta inmediata al daño, estos animales muestran una mejoría motora ya en la primer semana posterior al trauma, alcanzando un pico mínimo al día 25, y nuevamente empeoran hacia el día 65 y para el día 90 pl ya resolvió, alcanzando nuevamente niveles de errores similares a los basales. Como podemos ver en la gráfica, el segundo pico en los animales KO no solo alcanza niveles mayores comparado con Wt, sino que tiene un efecto retardado. El primer valle en la curva de errores por metro se encuentra en el día 25 pl para Wt y 50 para KO

Analizando la gráfica de actividad locomotora espontánea (figura 3.18 c), observamos que el patrón de respuesta en el tiempo es similar para ambos grupos. Únicamente se observa una tendencia a una mayor afectación locomotora en los primeros días en animales KO con respecto a los Wt.

De acuerdo al patrón observado en el desempeño motor de los animales luego de un CCI elegimos 3 tiempos clave para estudiar la influencia del receptor CD300f en la respuesta al trauma. En este sentido, decidimos evaluar distintos parámetros de la respuesta post-traumática en animales CD300f Wt y KO en los días 1, 5 y 90 luego de un TEC; i) elegimos el día 1 pl por representar la fase aguda de la respuesta inflamatoria al daño mecánico directo, por lo que puede brindarnos información sobre las vías inflamatorias que se activan a corto plazo y las consecuencias de la ausencia de CD300f del punto de vista molecular. En relación al patrón comportamental, a este tiempo vemos un aumento en el número de errores y disminución de la distancia recorrida en ambos grupos ii) al día 5, la respuesta inflamatoria aguda comienza estabilizarse y comienza una fase de reparación/regeneración del tejido nervioso (184). Con respecto al análisis comportamental, se observa que en animales Wt este tiempo se corresponde con el comienzo de la disminución en el primer pico de la curva de n° errores/m, sin embargo, los animales CD300f KO se encuentran en la meseta primaria del compromiso motor. Asumimos por lo tanto que ese tiempo es interesante para evaluar las consecuencias de la deficiencia en el receptor CD300f en la respuesta temprana. Por último, el día 90 es el punto temporal más distal al momento de trauma, este nos brindará información sobre la repercusión de la deficiencia en el receptor CD300f en la respuesta inflamatoria post-traumática a largo plazo, incluyendo el período de la resolución de la inflamación. Este punto es particularmente interesante ya que a nivel comportamental vemos que los

animales Wt retornaron a los niveles basales, mientras que los KO están recién comenzando el segundo pico de aumento en el número de errores por metro.

ii) Análisis histológicos

Realizamos cortes seriados de animales a los 5 y 90 dpl y teñimos con la técnica de Nissl para analizar el volumen de lesión y grado de conservación del tejido nervioso respectivamente (figura 3.19). Estas dos mediciones si bien están relacionadas no son lo mismo, ya que el cálculo del volumen de lesión se basa en la cuantificación bajo el microscopio del área de tejido comprometida por desorganización de la sustancia blanca y gris o pérdida de tejido en cada corte con respecto al área total del hemisferio lesionado, mientras que el cálculo de tejido conservado se basa en la cuantificación del tejido remanente del hemisferio lesionado con respecto al área del hemisferio contralateral. Esto se debe a que con el colapso del hemisferio por la pérdida de tejido a los 3 meses es muy complejo determinar un volumen de lesión, y es por esto que suele utilizarse entre otras medidas el volumen de tejido remanente o su inverso, el volumen de pérdida de tejido con respecto a contralateral.

Establecimos el punto 0 de coordenada en el eje céfalo-caudal como el primer corte en el cual aparecen los ventrículos laterales (figura 3.19 a, flechas), y realizamos las medidas del área lesionada por corte utilizando el software FIJI. Para la cuantificación del volumen de lesión en el día 5 pl

consideramos el sitio directo del trauma y las regiones periféricas donde el tejido se viera comprometido o desorganizado (figura 3.19 b y 3.20 a,c). Esta zona peri-contusional a veces se puede extender hasta el cuerpo estriado, donde se aprecia la desorganización de las fibras y haces de sustancia blanca. Mientras que para la cuantificación de la lesión al día 90, donde el tejido nervioso colapsó y es muy difícil trazar los límites para cuantificar el porcentaje de pérdida del volumen, éste fue calculado como *tejido conservado*⁻¹ (figura 3.19 c y 3.20 c-e).

Analizando la histología de los cerebros a los 5 y 90 dpi, observamos una tendencia de los animales KO a presentar lesiones de menor tamaño, contrariamente a lo que esperábamos, (figura 3.20 a-b), y un claro corrimiento de la lesión hacia caudal (figura 3.20 a), con un pico en el corte n° 1 para WT y en 4-5 para KO. Esto quizás pueda deberse a diferencias en el tamaño de los cerebros de los animales KO y Wt, en este sentido, los cerebros de los animales KO parecen ligeramente más pequeños que los Wt como podemos apreciar en los cortes seriados de cerebro teñidos con Nissl (figura 3.19 a). Si bien evaluamos el tamaño de los cerebros de los animales Wt y KO luego del trauma, los resultados no son representados en este trabajo ya que podrían estar reflejando consecuencias post-traumáticas como el edema, lo cual podría alterar el volumen normal de los cerebros. Para evitar este artefacto se realizó la comparación del peso de cerebros de animales CD300f Wt y KO en

condiciones naïve, aunque tampoco se encontraron diferencias entre los grupos.

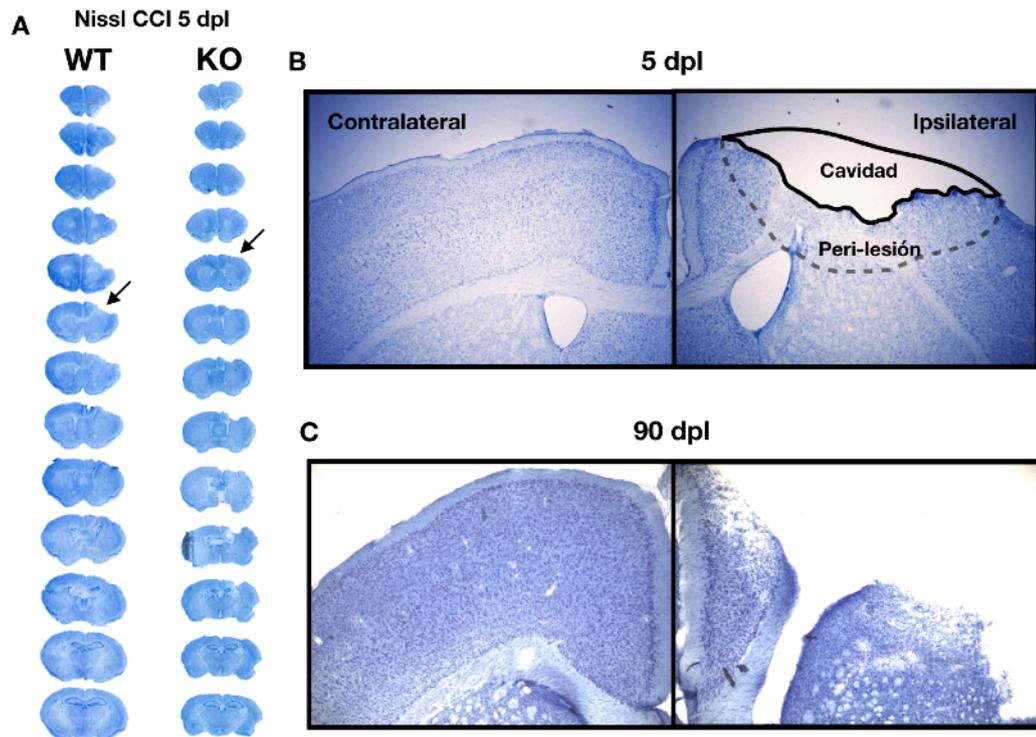


Figura 3.19_ Análisis de la lesión cortical en secciones seriadas de cerebros de animales CD300f WT y KO teñidos con la técnica de Nissl. a) Imagen representativa de la tinción de Nissl en cortes coronales seriados de cerebros Wt y KO 5 días posteriores al CCI. La flecha indica el punto “cero” del eje anteroposterior que se utilizó en las gráficas 3.19 a y b; **b)** Esquema representativo de los parámetros considerados para el cálculo del volumen de lesión en cerebros de animales Wt y KO 5 días luego de un CCI [volumen de lesión = cavidad del tejido + tejido comprometido (perilesión)]; en **c)** vemos que la cavidad cortical a los 90 dpl es mucho mayor que al día 5 pl, si bien la medida del tejido comprometido circundante se dificulta por el colapso general del tejido nervioso.

Por otra parte, a los 90 dpl podemos ver que la diferencia en el volumen de lesión entre ambos genotipos que se intuía ya desde el día 5 pl, se establece, existiendo una mayor conservación de tejido en los animales CD300f KO comparados con Wt (Figura 3.20 b, d).

Asimismo, podemos ver que el corrimiento en las coordenadas de la lesión ya no se observa, y que la curva se ensancha y achata de 5 a 90 dpl, con lo cual ya no aparece claro el límite entre el centro de la lesión y la periferia que se veía a tiempos más cercanos a la lesión.

La reducción en el volumen de lesión se contradice con los resultados obtenidos a partir los análisis comportamentales, donde vemos que los animales KO cometen un número de errores significativamente mayor que los Wt en los 2 tiempos evaluados por histología, 5 y 90 dpl (figura 3.20 e). Intentamos correlacionar el volumen de la lesión con el número de errores cometidos por metro en cada uno de los animales (figura 3.20 f), y encontramos que mientras que en WT existe una tendencia a la correlación positiva entre estos dos parámetros como es de esperar (a mayor volumen de lesión mayor número de errores por metro), en los KO no parece haber correlación alguna (r Pearson WT = 0.6, r Pearson KO = 0.07) sino que independiente del tamaño de la lesión, ellos cometen más errores por metro que los Wt .

En base a estos resultados podemos decir que existe una clara afectación en la respuesta post-traumática mediada por la deficiencia del receptor

CD300f a corto y largo plazo; si bien los animales CD300f KO luego de un trauma por CCI presentan un volumen de lesión reducido con respecto a Wt, lo cual generalmente se correlaciona con una mejoría fisiológica o cognitiva, estos animales presentan claros déficits motores.

iii) Análisis moleculares

Con el fin de analizar la influencia del receptor CD300f en la respuesta post-traumática del punto de vista molecular, analizamos el perfil de expresión de mediadores pro y anti-inflamatorios, así como de moléculas involucradas en las vías fagocíticas, en la región específica del cerebro que incluye la zona del daño primario y periferia de animales CD300f Wt y KO luego de un trauma a diferentes tiempos (figura 3.21).

Para el estudio del perfil de expresión génica a 1 dpl utilizamos las placas PrimePCR™ descritas en el análisis de los animales naïve. Nuevamente estudiamos el perfil de expresión de genes involucrados en las vías fagocíticas y de inflamación aguda en cerebros CD300f Wt y KO, y para complementar amplificamos otros genes no incluidos en estas placas mediante qPCR (figura 3.21). Los resultados obtenidos se muestran en el heatmap de la figura 3.21 b, donde podemos observar que en términos generales hay muchos genes implicados en las vías estudiadas que cambian su patrón de expresión en cerebros CD300f KO comparados con Wt, mientras otros se mantienen estables (resultados normalizados con respecto a Wt = 1, se muestra el logaritmo₂ del cambio (Log₂ fold

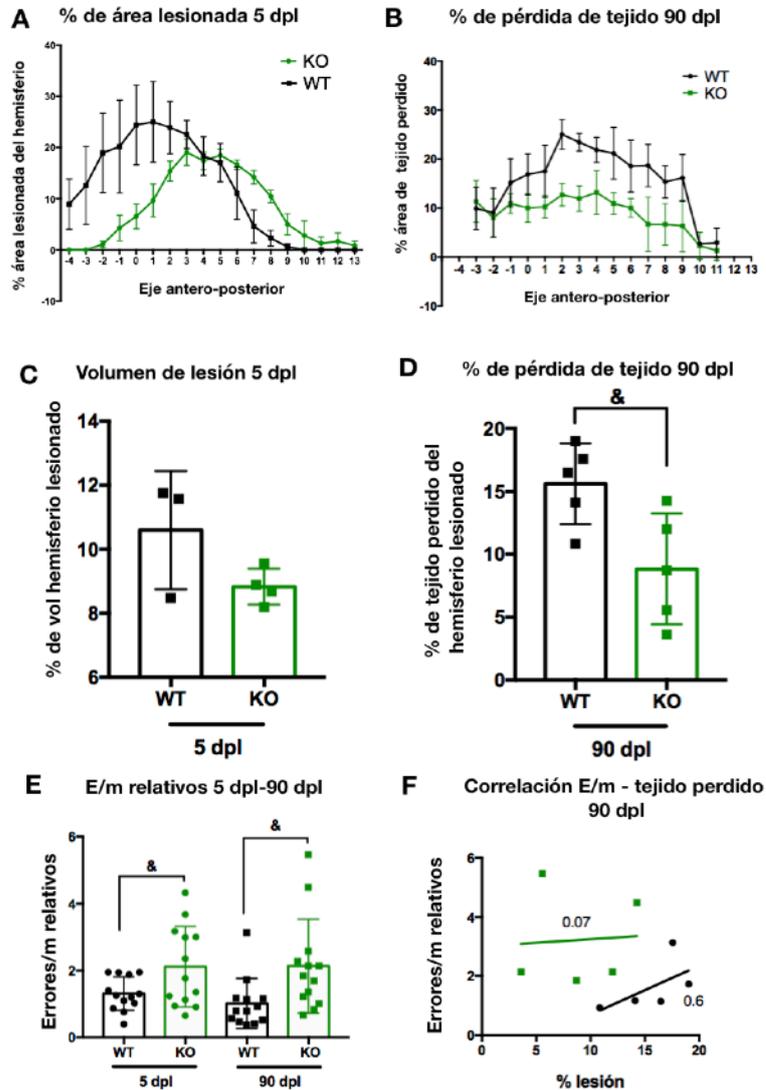


Figura 3.20_ Progresión temporal-espacial de la lesión cortical en animales CD300f WT y KO. a-b) Progresión espacial del área lesionada a los 5 (a) y 90 dpl (b) evaluados mediante histología; c-d) Volumen de lesión a los 5 y 90 dpl respectivamente calculados a partir de a y b. El gráfico en c) representa el porcentaje del hemisferio lesionado, mientras que d) muestra el porcentaje de tejido perdido con respecto al hemisferio contralateral, &p<0.05 T test de dos colas. e) Errores por metro relativos al día 0=1 analizados por el Test del Parallel Rod Floor obtenidos de los resultados de la figura 3.18 a. f) Correlación de pearson entre errores/m y volumen de lesión a los 90 dpl; en Wt la correlación posee una tendencia es más fuerte que en KO, donde no se ve correlación, el número sobre la pendiente indica el coeficiente de correlación. Ensayo realizado con animales macho de 3-6 meses, nWt y KO=13.

change); en rojo sobre expresión, en azul disminución de la expresión).

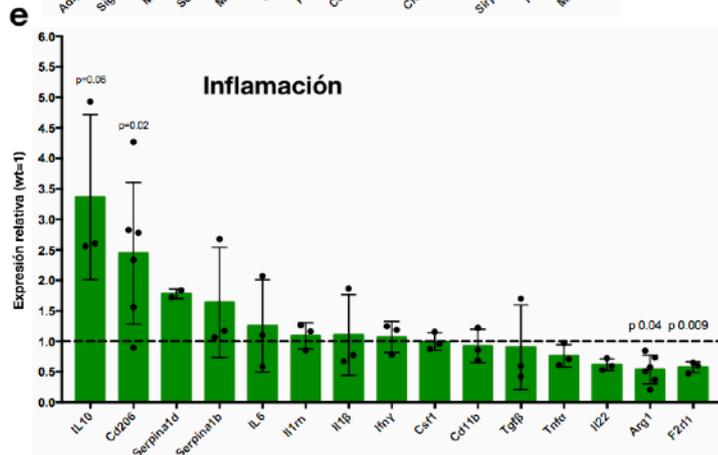
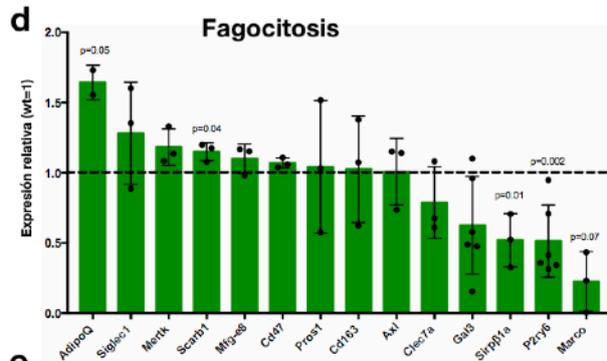
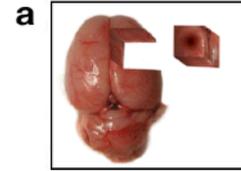
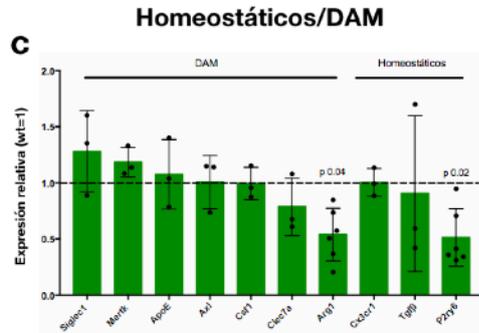
Analizando detalladamente la expresión de genes específicos realizamos 4 gráficos donde agrupamos a los marcadores homeostáticos/DAM, fagocíticos, inflamatorios y de reclutamiento (figura 3.21 c-e). Como podemos observar en el gráfico 3.21 c que muestra la expresión de genes de microglía homeostáticos/DAM, la tendencia a la disminución del gen *P2ry6* que observábamos en los cerebros de animales CD300f KO naïve se refuerza luego de un trauma severo. Observamos que la expresión de este gen se encuentra fuertemente disminuida en los animales KO ($p=0.02$) en la fase aguda de la lesión a 1dpl, lo mismo que se observa para *Arg1* ($p=0.02$). Sin embargo la expresión de los otros marcadores microgliales homeostáticos se mantiene a niveles similares a los Wt luego de un trauma, lo cual indica que en términos generales la microglía mantiene sus funciones básicas, si bien posee un fenotipo levemente alterado. Cabe recordar que el receptor P2RY6 es clave para la inducción de la respuesta fagocítica de las células microgliales. En este sentido, muchos otros genes asociados a esta respuesta se encuentran también alterados en los cerebros KO (figura 3.20 d), tales como *Marco* ($p=0.07$) y *Sirpβ1a* ($p=0.01$), los cuales se expresan a niveles por debajo de la mitad comparados con Wt, mientras que *Adipoq* se encuentra altamente sobreexpresado ($p=0.05$), al igual que el gen *Scrab1* cuya leve sobreexpresión es significativa ($p=0.04$).

Por otra parte, el gen que codifica para la opsonina Gal-3, expresada fundamentalmente en microglía (122), posee una tendencia a la disminución, al igual que lo observado en naïve. Esta opsonina es clave en el reconocimiento de células en proceso de muerte y fagocitosis por unirse al receptor de fagocitosis MertK (42, 120), pero también se ha descrito recientemente su participación en la respuesta neuroinflamatoria a través de su unión al receptor TLR-4 (122). En este sentido, los autores describieron que la deficiencia o bloqueo del Gal-3 en animales sometidos a un trauma reduce la inflamación, la activación de la microglía y la pérdida neuronal, sin embargo, no se realizaron estudios a nivel comportamental. Por su parte, *Marco* se relaciona directamente con la actividad fagocítica; se ha visto que su disminución inhibe la respuesta fagocítica de células dendríticas y microglía en cultivo (256). Observamos que en los animales KO la expresión de este gen se encuentra altamente

Figura 3.21_ Comparación del perfil de expresión génica de cerebros CD300f KO y Wt en la fase aguda 1 día post CCI. **a)** Representación esquemática del tejido utilizado en el análisis molecular; **b)** Heatmap mostrando el cambio en el perfil de expresión génica de animales KO comparados con Wt (Log2 change); en rojo = genes sobre expresados en KO, en azul = disminuidos en KO, en blanco = no hay cambios. **c)** Expresión de genes microgliales homeostáticos/DAM en animales KO vs Wt luego de un trauma; **d)** perfil de expresión de genes involucrados en el reclutamiento y activación de poblaciones de fagocitos mononucleares (neutrófilos y microglía); **e)** perfil de expresión de genes específicos de fagocitosis; **f)** perfil de expresión de genes involucrados en la inflamación aguda. Resultados normalizados con respecto a Wt = 1. p = p-value t student de dos colas. nWT y KO = 3-6.

Expresión génica en cerebros CCI

b CCI 1dpl



inhibida, lo cual pueda deberse a algún mecanismo compensatorio del sistema para intentar aumentar los niveles de fagocitosis luego de un trauma.

En cuanto a la respuesta anti inflamatoria, el gen que codifica para el receptor de manosa (*Cd206*)¹³ se encuentra altamente sobreexpresado ($p=0.02$), contrariamente a lo que veíamos en los animales naïve. Tanto el receptor CD206 como *Arg1* son característicos de la respuesta pro-regenerativa o anti-inflamatoria en el cerebro (7), sin embargo curiosamente, mientras *Cd206* aumenta su expresión, *Arg1* se encuentra disminuido en los animales KO ($p=0.04$) (figura 3.20 e).

Evaluamos también la regulación de la respuesta pro-inflamatoria dependiente de CD300f y encontramos que los niveles de expresión de los genes pro-inflamatorios clave como *Il1 β* , *Infy* y *Tnfa* no se ven afectados por la ausencia de este receptor luego de un trauma, mientras que *Il10*, relacionado con respuestas anti-inflamatoria, se encuentra muy por encima de los valores encontrados en Wt ($p=0.06$). Por otra parte, *Il6* que se encontraba sobre expresados en naïve, se iguala con Wt luego del trauma.

¹³ CD206 se relaciona con la función fagocítica tras el reconocimiento de patrones con residuos de manosa.

Por otra parte, observamos una tendencia a la sobre-expresión del receptor de neutrófilos *Cxcr1* y la quimioquina *Cxcl1* o “proteína activadora de neutrófilos” (figura 3.22), así como un alto nivel del receptor *Fpr2* ($p=0.06$) el cual es un fuerte activador/receptor quimiotáctico de estas células. Con esto podríamos intuir un aumento en los niveles de reclutamiento de neutrófilos luego de un CCI (como también sugería el estudio en meninges), si bien no vemos cambios gruesos en la expresión del gen *Mpo* que codifica para la enzima implicada en su actividad microbicida (mieloperoxidasa). Observamos también una fuerte disminución en los niveles de expresión en el gen de la quimioquina *Mip1a* (o *Ccl3*) (figura 3.22-3.24 b), la cual funciona como activadora de

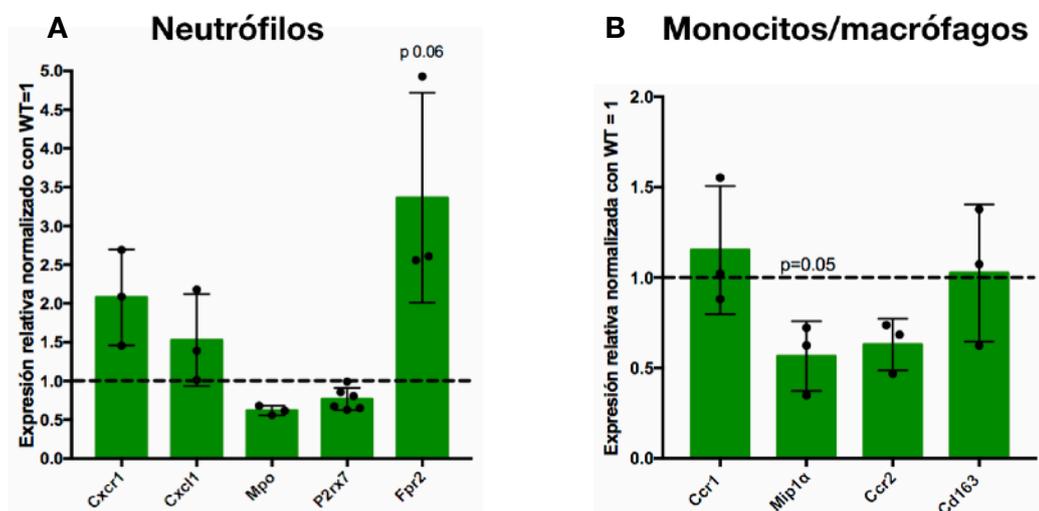


Figura 3.22_ Expresión de quimioquinas y receptores involucrados en la comunicación con leucocitos periféricos en cerebros Wt y CD300f KO luego de un trauma por CCI. Expresión de genes involucrados en el reclutamiento de a) neutrófilos y b) monocitos/macrófagos. Resultados normalizados con respecto a Wt = 1. p = p-value t student de dos colas. nWT y KO = 3-6.

macrófagos (también de neutrófilos), actuando a través del receptor CCR1 (figura 3.22 y 3.24 c), si bien los niveles del último luego del trauma se mantienen inalterados.

Realizamos análisis temporales de la expresión de distintos genes (figura 3.23, 3.24 y 3.25) y observamos variaciones en la regulación de varios de ellos, de manera dependiente de CD300f.

No encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de CD4 (figura 3.23 a) ni en condiciones naïve ni luego del trauma si bien se puede distinguir cierta tendencia al aumento luego del mismo. Por otra parte evaluamos los niveles de hemoglobina a1 y a2 en condiciones naïve o luego de un trauma para evaluar la posible existencia de hemorragias

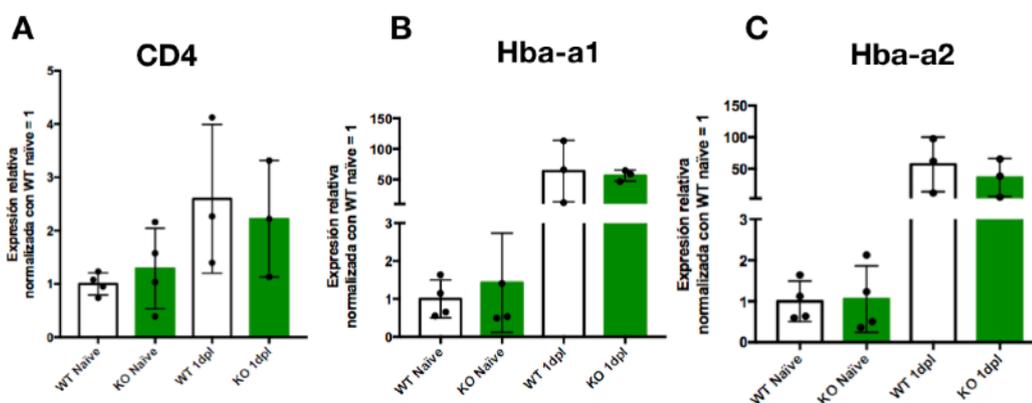


Figura 3.23_ Curso temporal de la expresión de distintos genes cerebros Wt y CD300f KO naïve y luego de un trauma por CCI. Comparación del perfil de expresión de genes en cerebros naïve vs CCI para CD300f Wt y KO: En **a)** CD4 **b)** y **c)** hemoglobina a1 y a2 respectivamente. Resultados normalizados con respecto a Wt naïve = 1. nWT y KO = 3-4.

cerebrales y tampoco vimos diferencias entre los genotipos (figura 3.23 b-c).

Por otra parte, observamos que mientras en Wt la expresión de p2ry6 aumenta luego del trauma comparado con cerebros naïve, en cerebros KO este aumento no ocurre sino que sus niveles se mantienen constantes, similares a KO naïve (figura 3.24 a). El efecto observado en CD206 es similar, aunque este gen disminuye su expresión Wt luego del trauma comparado con Wt naïve, mientras que en KO se mantiene a niveles constantes (figura 3.24 b). Por otra parte, los niveles de IL6, basalmente más elevados en KO naïve se igualan a Wt luego del trauma, donde aumentan significativamente en ambos genotipos (figura 3.24 c). Por su parte, la expresión de Arginasa 1 se mantiene más baja que en Wt en ambas condiciones, naïve y CCI; esta sufre un fuerte aumento de sus niveles luego del trauma en ambos genotipos (figura 3.24 d).

Observamos que la quimioquina Mip1 α parte de niveles similares en Wt y KO naïve y luego del trauma aumenta, aunque su expresión es más baja en los animales KO CCI que en Wt (figura 3.25 a), mientras que CCR1 (figura 3.25 b) posee una expresión basal aumentada en cerebros KO naïve comparados con Wt naïve, y luego del trauma aumenta para ambos genotipos y se iguala, al igual que ocurre con el receptor CD163 (figura 3.25 c).

Naïve vs CCI 1DPL

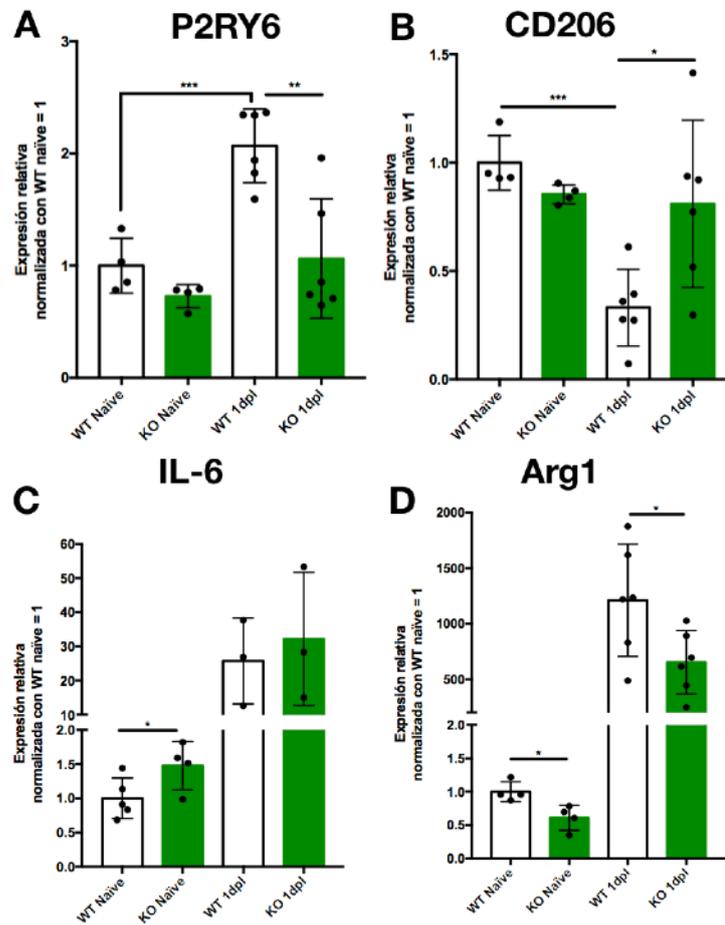


Figura 3.24_ Curso temporal de la expresión de distintos genes involucrados en la respuesta inflamatoria en cerebros Wt y CD300f KO naïve y luego de un trauma por CCI. Comparación del perfil de expresión de genes en cerebros naïve vs CCI para CD300f Wt y KO: En a) P2ry6; b) Cd206; c) IL-6; d) Arg1. Resultados normalizados con respecto a Wt naïve= 1. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 T student de dos colas. nWT y KO = 3-6.

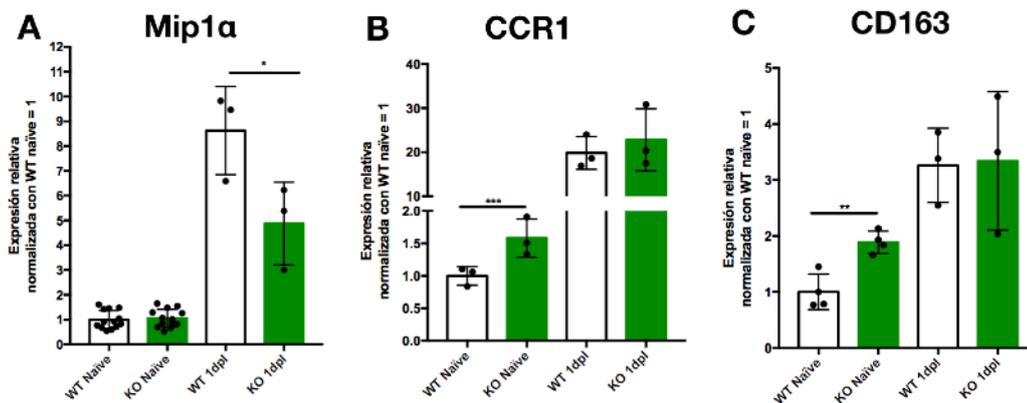


Figura 3.25_ Curso temporal de la expresión de distintos genes involucrados en el reclutamiento/activación de leucocitos en cerebros Wt y CD300f KO naïve y luego de un trauma por CCI. Comparación del perfil de expresión de genes en cerebros naïve vs CCI para CD300f Wt y KO: En a) Mip1 α ; b) CCR1; c) CD163. Resultados normalizados con respecto a Wt naïve= 1. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, t student de dos colas. nWT y KO = 3-13.

Para el análisis de la expresión génica a los 5 dpl se amplificaron algunos genes clave en la respuesta pro-inflamatoria como *Il1 β* , *Cd86*, *Cd11b* y el gen específico de microglía *Tmem119* (figura 3.26). No encontramos diferencias significativas en ninguno de los genes analizados respecto a Wt (figura 3.26 a). La figura 3.26 b-c muestra el curso temporal de la expresión de dos de estos genes, *Cd11b* e *Il1 β* , y se puede observar que los niveles de expresión no varían entre los genotipos, aunque existe una fuerte tendencia a la disminución en *Cd11b* a los 5 días luego del trauma (figura 3.26 b). Los niveles de *Il1 β* en ambos genotipos aumentan en la fase aguda (1dpl), y disminuyen hacia la semana post trauma, si bien se siguen observando niveles elevados comparados con naïve (figura 3.26 c).

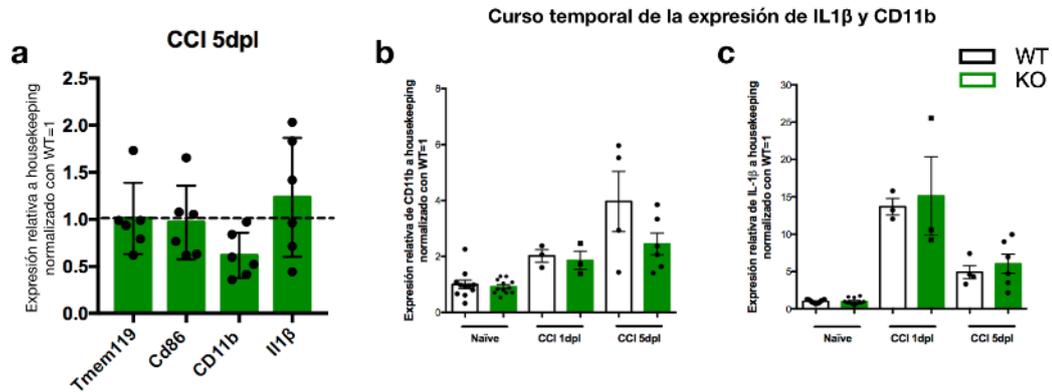


Figura 3.26_Análisis de la expresión de citocinas pro-inflamatorias a los 5 dpl. a) Expresión génica de las citocinas pro-inflamatorias Cd86, Cd11b e Il1β, clave en el desarrollo de la respuesta inflamatoria post traumática, y del gen homeostático Tmem119 5 días luego del CCI. No se ven alteraciones evidentes en su expresión si bien hay una tendencia a la disminución de la expresión de Cd11b. b-c) Curso temporal de la expresión de Cd11b (b) e Il1β (c) en animales previo a la lesión (naïve) y al 1 y 5 dpl, vemos que la tendencia a la disminución de Cd11b se observa únicamente a los 5 dpl y no durante la respuesta aguda.

Con esto podemos concluir que la deficiencia de CD300f aumenta la respuesta anti-inflamatoria, (IL-10, CD206) pero no influye en la respuesta pro-inflamatoria típica (IL-1β, INFγ, TNFa, CD86) la cual se mantiene inalterada en animales WT y KO. Por otra parte, en los animales KO se ve una clara disminución en algunos de los genes más importantes implicados en la fagocitosis (*P2ry6*, *Sirpβ1a*) y el aumento probablemente compensatorio de otros como *Scarb1* o *Adipoq*.

En resumen, CD300f disminuye la respuesta anti-inflamatoria y participa de la fagocitosis de células necróticas y productos de desecho en la fase

aguda del trauma, cuando es necesario limpiar la zona de restos celulares para permitir la reparación y regeneración del tejido, así como la correcta reconexión y plasticidad neuronal.

La alta susceptibilidad de los ratones CD300f KO a los efectos de la respuesta post-traumática resaltan la importancia de CD300f como un regulador negativo de la misma.

3.3 Experimentos en marcha

3.3.1 *CD300f en el envejecimiento*

Muchos trabajos científicos se han enfocado últimamente en mostrar el papel que poseen distintos receptores microgliales durante el envejecimiento, tales como el receptor inhibitor con dominios ITIMs SiglecE. Su ausencia produce un acortamiento del ciclo vital, un aumento en las canas en los machos, y aumento en la producción de radicales libres entre otras cosas. Esto se enmarca en la hipótesis pro-inflamatoria del envejecimiento (238), que postula que la acumulación de pequeños estímulos pro-inflamatorios subclínicos de bajo grado generan a largo plazo un ambiente pro-inflamatorio neurodegenerativo en la vejez. Por otra parte también se ha descrito la des-regulación de varios genes microgliales homeostáticos durante este proceso (28, 30), entre los que se destacan los receptores inmunomoduladores que incluyen a la familia TREM y CD300 (179), y otros genes asociados al metabolismo microglial (28, 179). Este es un campo muy fértil en donde varias neuropatologías se han ligado al mal funcionamiento de estas células en los procesos de envejecimiento. En el caso de CD300f, un estudio reciente muestra cómo este receptor se ve sobreexpresado en el cerebro con la edad (179). En este contexto, nosotros comenzamos a analizar las consecuencias de la deficiencia del receptor CD300f durante el envejecimiento de animales KO comparados con WT. Para ello, tres cohortes de animales (con un total de 43 animales WT y 45 KO) fueron mantenidas en el bioterio del Instituto

Pasteur (2) y la Facultad de Medicina (1) durante un período de dos años, durante los cuales se controlaron parámetros comportamentales, tales como ataxia y actividad locomotora espontánea, además de evaluar otros parámetros metabólicos, peso y aparición de canas. Finalmente, realizamos además estudios de sobrevivencia en animales WT y CD300f KO

En la figura 3.22 podemos observar que si bien en animales más jóvenes no existen diferencias de pesos entre ambos grupos, los animales deficientes en el receptor CD300f poseen una reducción significativa en su masa corporal a partir del mes 6, y luego se mantienen siempre por debajo de WT. En cuanto a la aparición de canas, evaluamos el pelaje al año y medio de vida y notamos que los animales CD300f KO presentan un 50% más de canas comparados con los WT, lo cual está fuertemente asociado al envejecimiento (238).

Por otra parte, los resultados obtenidos en los estudios comportamentales hasta el mes 22 no arrojaron diferencias significativas en relación a la aparición de ataxia o actividad locomotora espontánea (figura 3.23). Sin embargo, por un tema de disponibilidad de tiempo, este estudio fue continuado por otros miembros del laboratorio, los cuales culminaron los ensayos de conducta y recolección de muestras para próximamente realizar los análisis bioquímicos y moleculares particulares para la búsqueda de la conexión entre las funciones del receptor CD300f y los procesos de envejecimiento. Los datos obtenidos luego del mes 22 muestran

que a partir de los dos años, la ausencia de este receptor influye en las funciones motoras analizadas, con un aumento progresivo de la descoordinación motora o ataxia en animales KO comparados con Wt.

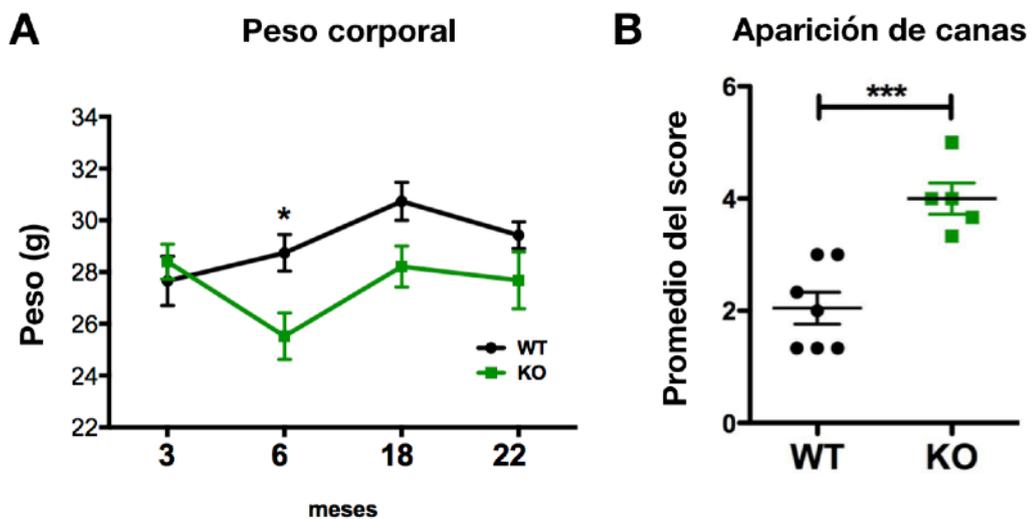


Figura 3.27_ La ausencia del inmuno-receptor CD300f agrava el fenotipo de envejecimiento. a) Peso de los animales macho a los 3, 6, 18 y 22 meses. Observamos que el peso de los animales KO es menor al de los Wt a los 6 meses de vida, y conforme pasa el tiempo este se encuentra siempre por debajo de los Wt, si bien las diferencias en los otros tiempos estudiados no resultaron significativas. **b)** Evaluación del pelaje de animales macho KO y Wt al año y medio de vida por 3 observadores independientes en un estudio a ciegas. Se puede observar un claro aumento del número de canas de los animales KO con respecto a Wt. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ t student de dos colas.

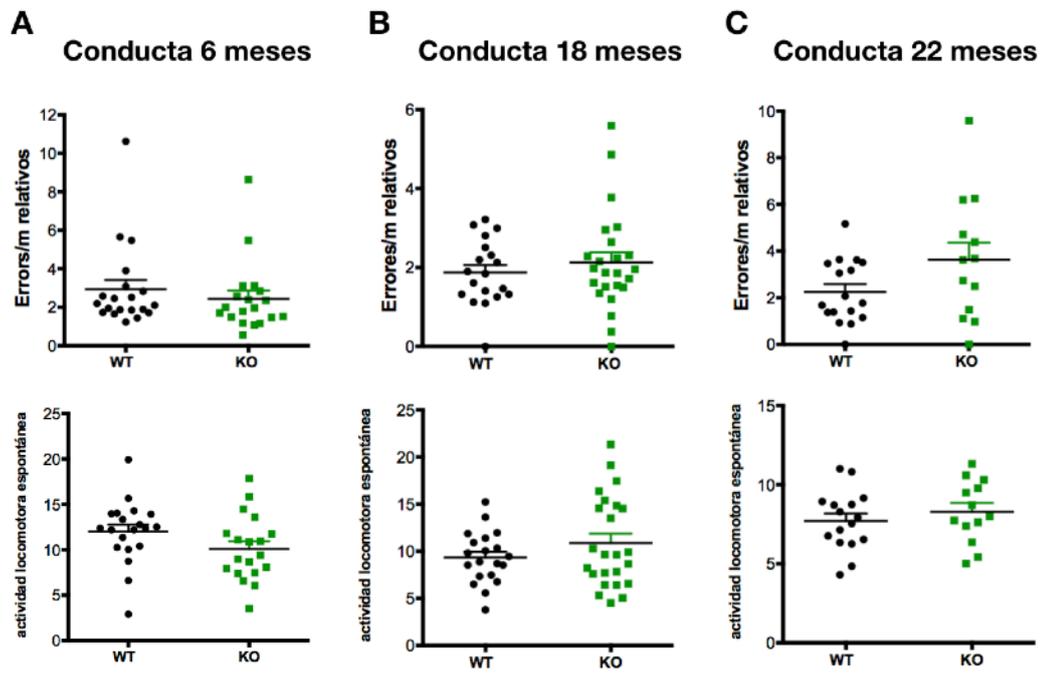


Figura 3.28_ Análisis de los parámetros comportamentales de animales CD300f Wt y KO durante el envejecimiento. Se utilizaron animales macho y hembra de 3 cohortes diferentes. Gráficos superiores medida de ataxia, gráficos inferiores: actividad locomotora espontánea medidas por el test del Parallel Rod Floor a los a) 6 meses b) 18 meses y c) 22 meses. No se observan diferencias en los parámetros evaluados hasta el mes 22.

Finalmente, los estudios de supervivencia (figura 3.24) mostraron la ausencia del inmuno-receptor CD300f reduce significativamente la expectativa de vida de los animales; existe una aceleración en la muerte de los animales CD300f KO con respecto a WT, y una reducción significativa de tasa de supervivencia de los animales deficientes en CD300f.

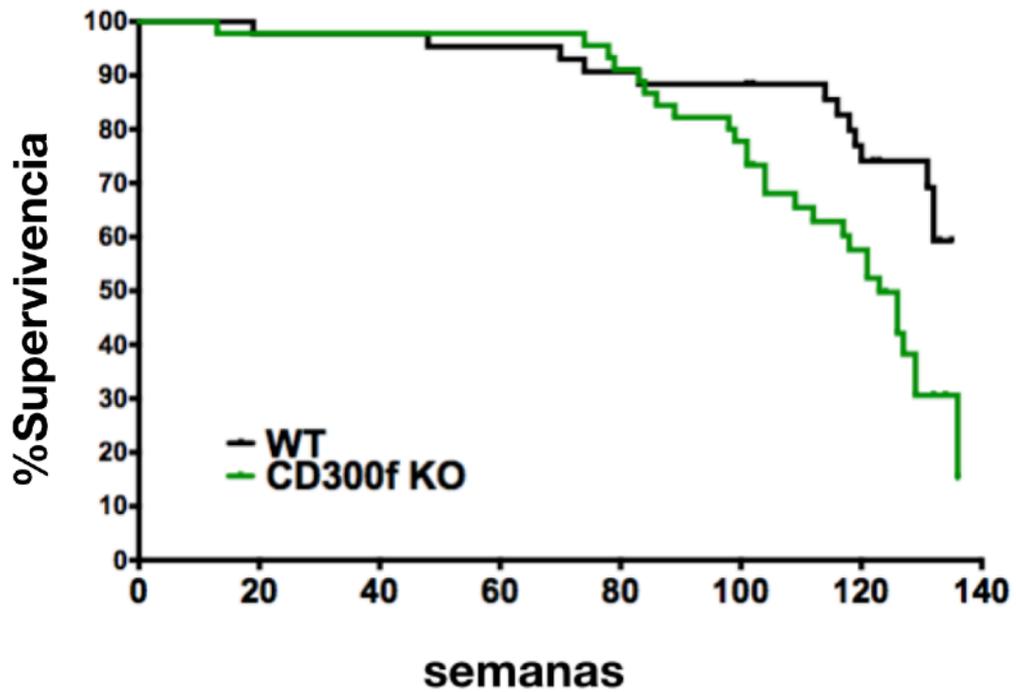


Figura 3.29_La ausencia del inmunoreceptor CD300f reduce la expectativa de vida de los ratones. Curva de supervivencia de animales Wt y CD300f KO (n Wt=43, n KO= 45) machos y hembras seguidos durante 140 semanas. Se graficó el % de supervivencia en función del tiempo (semanas). El análisis mediante el test de Mantel-Cox (Log-rank) mostró diferencias significativas en las curvas de sobrevivida ($\chi^2 = 6.29$, d.f = 1 y p = 0.01).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El hecho de que el receptor CD300f reconozca PS, un aminofosfolípido expuesto en la monocapa externa de la membrana celular de células en proceso de muerte o células activadas, ha brindado importancia a su papel en la modulación de las funciones inmunes y su participación en la respuesta inmunológica a muchas condiciones patológicas como enfermedades infecciosas, auto-inmunes, cáncer, alergias e inflamación crónica. Pese a que las evidencias sugieren la gran importancia de este receptor en la regulación de las condiciones inflamatorias, muy pocos estudios han evaluado su papel en el sistema nervioso.

En la presente tesis examinamos el rol del inmuno-receptor CD300f en la regulación de la homeostasis del sistema nervioso central, así como durante la neuroinflamación aguda y crónica luego de distintos estímulos inflamatorios como el tratamiento con LPS o TEC. Nuestro estudio fue diseñado con el objetivo de comenzar a caracterizar y definir la función del receptor CD300f en el sistema nervioso. Para ello realizamos análisis comportamentales, transcriptómicos e histológicos con el fin de comparar el fenotipo de animales CD300f Wt y KO en condiciones naïve (sin tratar) o neuroinflamatorias luego de un trauma.

4.1 Papel del receptor CD300f en condiciones fisiológicas

Uno de los descubrimientos más importantes de esta tesis es que la deficiencia del receptor CD300f en el SNC repercute en la función fagocítica de las células microgliales. De acuerdo a lo reportado en relación a las funciones de las células microgliales, esto podría tener efectos negativos durante el desarrollo del sistema nervioso vinculados con los déficits comportamentales basales observados en animales adultos naïve deficientes en CD300f. Esto colocaría a CD300f como un posible actor clave en la regulación de la respuesta microglial en condiciones homeostáticas.

Las deficiencias comportamentales basales observadas en los animales CD300f KO se manifiestan en que recorren distancias menores que los Wt en un campo abierto y poseen dificultades para habituarse a su entorno evaluado mediante el test del Parallel Rod floor, lo cual podría estar relacionado con déficits de memoria o de motivación. Para dilucidar este punto debemos poner a punto un test específico como el de reconocimiento de un objeto nuevo. Por otra parte, los animales KO mostraron claros signos de anhedonia y depresión estudiados por los test de Splash y Suspensión por la cola. Esto concuerda con la hipótesis que sitúa a la disminución de la distancia recorrida en el campo abierto como un efecto dependiente de una alteración en la motivación por explorar. Además, los resultados obtenidos a través del test del Marble Burying

muestran patrones comportamentales de estos animales ligados al síndrome obsesivo compulsivo. De esta manera se confirma que los animales CD300f KO poseen diversas alteraciones comportamentales no descritas previamente, que sin embargo no afectan su comportamiento reproductor ya que no hemos detectado diferencias en el proceso de cría de estos animales. De acuerdo con nuestros datos, se ha mostrado que alteraciones en otros receptores microgliales como el CX3CR1 (47) o Hoxb (79) también inducen cambios comportamentales. Los efectos comportamentales observados aquí podrían no deberse a cambios originados en el SNC debido a la alteración del fenotipo microglial por la ausencia de CD300f, sino a cambios sistémicos que secundariamente afecten al SNC y a la microglía. Sin embargo se ha demostrado que la cepa de ratones original CD300f ^{-/-} utilizada en este trabajo no posee alteraciones en: i) las proporciones Mendelianas y viabilidad de los embarazos; ii) parámetros óseos o peso, evaluados a las 6 semanas de edad; iii) número de células mieloides y linfoides en los nódulos linfáticos inguinales, bazo y sangre; iv) niveles de expresión de otros miembros de la familia CD300 en células dendríticas derivadas de la médula ósea, tanto a niveles basales como luego de la estimulación con LPS; y v) las respuestas mediadas por las células T efectores *in vitro* e *in vivo* (175). Otro grupo produjo una segunda cepa de animales transgénicos CD300f ^{-/-} (161). Ellos caracterizaron varios parámetros *in vitro* tales como el desarrollo de células mieloides y linfoides, número de mastocitos de tejidos periféricos, capacidad de desgranulación, producción de citoquinas

y patrón de fosforilación de tirosinas, y no encontraron diferencias significativas comparados con Wt. Un tercer grupo generó una cepa adicional de animales CD300f ^{-/-} y también caracterizó en detalle distintas poblaciones celulares sanguíneas, marcadores de activación y niveles circulantes de citoquinas, tampoco encontrando diferencias significativas entre los animales KO y Wt (166). Incluso los animales CD300f KO de 15 meses de edad no muestran sobre inflamación, enfermedades autoinmunes o cambios en las citoquinas pro ni anti-inflamatorias circulantes (166). Esto representa evidencia robusta para sugerir que los efectos comportamentales observados en este estudio son de origen central y no una manifestación de fenómenos periféricos.

El aumento significativo en el número de microglía Iba-1+ observado en la corteza motora primaria y secundaria de animales adultos deficientes en CD300f relaciona la expresión de el inmuno-receptor con la capacidad de renovación microglial, o balance entre las tasas de proliferación-apoptosis de la microglía. Dado que estudios llevados a cabo por varios grupos muestran que no hay diferencias en las poblaciones de monocitos/macrófagos y otros tipos de células mieloides periféricas en animales CD300f KO (175), y que la microglía adulta no se renueva a partir de precursores mieloides en el adulto normal (12, 243) podríamos asumir que las diferencias en el número de células Iba1+ se deben principalmente a un aumento de células microgliales en los animales KO. Además, este 15-20% de aumento en el número microglial se acompaña

con el leve aumento similar de ciertos genes microgliales homeostáticos como Cx3Cr1 (tendencia no significativa) y P2ry12 observado en los animales KO.

Este patrón probablemente se establezca durante el desarrollo embrionario-postnatal temprano, luego de que los precursores de las células microgliales migran y se asientan en el SNC, ya que no observamos diferencias en el marcaje con anti Ki67 en la corteza M1/M2 de animales adultos. De todas maneras, la utilización del inmunomarcaje con anti Ki67 posee ciertas limitaciones, ya que si bien se sabe que la tasa de auto-renovación de la microglía ocurre más rápido de lo que antes se creía (~0.6%/día) (243), este ensayo únicamente considera un momento discreto de la vida del animal, donde no necesariamente estas estén proliferando en la región analizada. Para abordar esta interrogante deberíamos analizar el número de células microgliales en animales P1-P12, momento en el que ya se estableció la densidad total de microglía que permanecerá estable hasta el adulto (16). Para ello deberíamos utilizar ensayos de proliferación microglial más finos, como por ejemplo la incorporación de BrdU en células Iba-1+ y conteos de la densidad de las células microgliales en esos tiempos postnatales.

Tampoco podemos descartar que las diferencias en el número total de microglía a nivel cortical se deban a alteraciones en los niveles de apoptosis mediados por CD300f en la microglía ya que se ha descrito la capacidad de CD300f de mediar la apoptosis de células mieloides independientemente de caspasas, estrés de retículo endoplasmático o

autofagia (257). Para estudiar esta posibilidad deberíamos realizar ensayos *in vivo* por microscopía de 2P utilizando ratones CX3CR^{1+/GFP} y analizar la tasa de desaparición de la microglía en animales CD300f KO vs Wt en períodos largos de tiempo tal como lo describen Askew y colaboradores (243). También es posible realizar ensayos de TUNEL o de γ H2AX para analizar la fragmentación del ADN en células microgliales comparando ambos genotipos.

Por otra parte, el aumento en el número de células microgliales podría estar ligado a los patrones comportamentales que se observan en los animales KO, ya que se han descrito diferencias en la densidad de células microgliales/macrófagos perivasculares en varios modelos animales y pacientes de enfermedades psiquiátricas (82, 239-242, 258, 259). En este sentido, no podemos adjudicar los efectos vistos en los animales naïve únicamente a la función microglial, ya que también observamos una desregulación en ciertos genes exclusivos de macrófagos perivasculares (PVM), tales como *Cd163* (29) o *Cd206* (7, 260), estando el primero altamente sobreexpresado en los cerebros KO en condiciones basales. Esto deja abierta la posibilidad de la existencia de un mayor número de PVM o quizás un mayor nivel de activación de los mismos, lo cual abordaremos en estudios a futuro. Uno de los métodos accesibles para aislar la función de la microglía de la de PVM es la inyección intraventricular de liposomas conteniendo Clodronato (un análogo tóxico de ATP), el cual es fagocitado específicamente por

macrófagos perivasculares induciendo su muerte (261). Por otra parte, estamos diseñando ratones inducibles para la deficiencia de CD300f en células mieloides - generados tras el cruzamiento de animales floxeados para CD300f con animales CX3CR1-Cre^{ERT} - lo cual permite eliminar este receptor exclusivamente de la población de células microgliales en un momento dado de la vida del animal, ya que la tasa de renovación de las células mieloides periféricas es mucho mayor que la de la microglía.

Analizando el perfil de expresión génica basal en cerebros Wt y KO naïve encontramos que el patrón general de expresión de la gran mayoría de los genes microgliales homeostáticos en los cerebros KO se mantiene estable comparado con Wt, con lo cual podríamos decir que las funciones básicas de estas células permanecen inalteradas entre ambos genotipos. Sin embargo, el fenotipo microglial sufre ciertas modificaciones cambiando sus niveles de expresión en algunos genes, definiendo un fenotipo microglial ligeramente diferente al homeostático, que tampoco coincide con el observado en la microglía asociada a enfermedades degenerativas o DAM (28-30). Además, analizando los datos obtenidos por el grupo de Ido Amit en el artículo donde definen a la microglía DAM por RNAseq de células únicas (*single cell RNAseq*) (29), encontramos que el ARNm de CD300f se encuentra expresado a niveles similares en la microglía naïve y PVM, mientras que disminuye a niveles por debajo de la mitad en el fenotipo DAM, sugiriendo que podría contribuir a regular los fenotipos microgliales. Si bien aún no existen estudios de RNAseq de

células únicas en patologías psiquiátricas, se han hecho varios estudios genómicos que podrían dar información sobre el fenotipo microglial en estas patologías.

Una de las vías más afectadas a raíz de la ausencia de CD300f es la fagocitosis microglial. Principalmente encontramos una fuerte tendencia a la disminución en la expresión del gen microglial homeostático que codifica para el receptor purinérgico P2RY6, el cual está ligado directamente a la capacidad fagocítica de la microglía tras el reconocimiento del UDP liberado por las células en proceso de muerte (68, 98, 100). También encontramos una importante desregulación de otros genes implicados en esta función tales como Sirpβ1a, MertK, Clec7a, Gal3, Siglec1, y Adipoq. A pesar de que estos cambios de fenotipo microglial sugieren que existe una alteración importante en la fagocitosis, es importante demostrar cuál es el efecto funcional real *in vivo*. Esto es muy complicado, aunque en el caso del SNC puede utilizarse un modelo de trauma moderado y microscopía de 2P mediante el uso de animales CX3CR1^{+/GFP} (17, 18, 68). Utilizando este sistema pudimos comprobar que la ausencia de este receptor disminuye funcionalmente la capacidad fagocítica de células microgliales CX3CR1^{+/GFP} CD300f KO. Observamos una importante alteración en la capacidad de formación del fenotipo microglial fagocítico “Jellyfish” en los animales deficientes en CD300f KO, junto con un aumento en el número de células apoptóticas/necróticas PI+ en el parénquima nervioso. De esta manera, el

fenotipo obtenido por los estudios de transcriptómica concuerda con los resultados funcionales *in vivo*.

Esto va acorde con los resultados obtenidos por otros grupos donde muestran la participación de CD300f en la fagocitosis/eferocitosis mediada por macrófagos periféricos (160) o células dendríticas (166), regulando esta función de manera positiva o negativa respectivamente tras la unión con su ligando PS. En este sentido, se conocen otros ligandos lipídicos capaces de unirse a CD300f, como la esfingomiélin (EM) y la ceramida (162) cuya significancia en la función de CD300f en el SNC son aún desconocidas. Además, otras moléculas lipoproteicas podrían mediar su unión, como la opsonina de unión a PS APOE, la cual está muy vinculada al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como AD, ALS o EM (30) tanto por su participación en el agregado y limpieza de péptidos β A (262, 263) actuando a través del receptor TREM2 (264), como mediando el podado de sinapsis por parte de astrocitos (265) y microglía de manera dependiente de la acumulación del componente del complemento C1q (41, 44). La falla en la función fagocítica microglial podría traducirse en errores en el podado sináptico, neuronofagia/neurofagia y por tanto de la conectividad de los animales deficientes en CD300f, tanto durante el desarrollo del sistema nervioso -donde es necesario deshacerse de las neuronas y sinapsis generadas en exceso- como durante la plasticidad neuronal y sináptica en el adulto, fundamental para los procesos de memoria y aprendizaje. En este sentido, la alteración de la función fagocítica en la microglía CD300f KO podría

explicar las diferencias comportamentales vistas entre los animales KO y Wt, ya que se ha visto que muchos desórdenes psiquiátricos y neurodegenerativos están ligados a errores en la conectividad y función sináptica, incluyendo el podado sináptico y fagocitosis de sinapsis redundantes durante el desarrollo y en el adulto respectivamente (51, 266). A modo de ejemplo puede citarse que se han encontrado defectos comportamentales en animales deficientes en el receptor microglial CX3CR1, donde la comunicación neurona-microglía se ve afectada y el podado sináptico se ve inhibido (47), resultando en la disminución de la transmisión sináptica y conectividad nerviosa.

La eliminación de neuronas en exceso durante el desarrollo, así como durante la inflamación y neuropatología en el adulto es fundamental para el correcto funcionamiento del SNC. En este contexto, se ha visto que la microglía no solo es capaz de fagocitar neuronas/células apoptóticas, sino de inducir la apoptosis de neuronas vulnerables o estresadas sin generar inflamación en un proceso conocido como fagoptosis (o neurofagia¹⁴) (42, 111, 267). Esto lo logra en gran medida a través de la activación del receptor P2RY6 (268); análisis *in vitro* e *in vivo* utilizando un modelo de inyección intraestriatal con LPS mostraron que el bloqueo de la unión de este receptor con su ligando UDP mediante el uso de antagonistas o inhibidores específicos resulta en un mayor número de neuronas viables

¹⁴ Neurofagia = fagocitosis primaria de neuronas vivas; neuronofagia = apoptosis secundaria de neuronas apoptóticas o restos neuronales.

sin incremento de neuronas apoptóticas/necróticas, si bien los efectos funcionales en los animales no fueron evaluados (268). La asociación entre CD300f y el receptor P2RY6, así como la sobre-expresión de CD300f en la microglía durante etapas tempranas del desarrollo (16) nos permite hipotetizar sobre la participación de este inmuno-receptor en el reconocimiento, fagocitosis y consiguiente inducción de apoptosis en neuronas vulnerables o en proceso de muerte. La falla en esta función se ha visto relacionada con casos de autismo o esquizofrenia (269). Por lo tanto la disminución de la fagocitosis durante el desarrollo también podría relacionarse con los déficits comportamentales vistos en los animales CD300f KO, y serán evaluados a futuro mediante la cuantificación del número de neuronas totales y en determinadas regiones cerebrales en ambos genotipos.

En cuanto a los niveles de expresión de mediadores pro-inflamatorios, contrariamente a nuestra hipótesis, no encontramos una desregulación exacerbada en los cerebros de animales KO en condiciones basales, sino que en su mayoría los niveles de expresión de los mediadores pro-inflamatorios típicos como *Il1 β* , *Tnfa*, o *Ifny* permanecen inalterados. Sin embargo, el gen que codifica para IL-6 se ve sobre-expresado, mientras que *Il22*, la cual posee funciones duales en el SNC, se encuentra disminuida. Por el contrario, los animales CD300f KO naïve poseen elevados niveles de expresión de citoquinas anti-inflamatorias en cerebro como *Il1rn* e *Il10*, mientras que otras como *Arg1* y *Cd206* se expresan a

niveles más bajos que Wt y los niveles de *IL4* no cambian. Además, la expresión de CD206 es inducida por la acción de la IL-4 (270), y se ha visto que CD300f sinergiza con el receptor de IL-4 potenciando sus efectos (163), con lo cual la leve disminución en su expresión podría estar ligada a la deficiencia de CD300f y sus efectos sinérgicos.

La asociación entre inflamación y depresión ha sido muy estudiada, tanto en modelos animales como en estudios clínicos (3). La depresión usualmente se presenta en pacientes víctima de inflamación sistémica como artritis reumatoidea (271) o la enfermedad coronaria arterial (272), y pacientes en tratamiento contra el cáncer (273) o hepatitis C involucrando mediadores pro-inflamatorios (274). Además, la inflamación asociada a NLRP3 ha sido fuertemente asociada a la depresión (275). En particular, la depresión ha sido postulada como una enfermedad microglial por algunos investigadores (82). Sin embargo, estudios recientes han postulado que la intrincada comunicación neuroinmune durante el desarrollo, homeostasis y enfermedades neurológicas influyen en el desarrollo de AD, esquizofrenia y desórdenes autistas en la ausencia de una notoria neuroinflamación (276). Esto concuerda con nuestros datos, que muestran un fenotipo depresivo en ausencia de una neuroinflamación importante.

En base a esto y con el fin de estudiar la participación del inmunoreceptor CD300f en la respuesta pro-inflamatoria en el SNC decidimos

forzar el sistema utilizando un modelo de neuroinflamación “limpio” que se basa en la inoculación repetitiva de LPS, evitando la entrada de células periféricas al SNC.

Encontramos que los animales deficientes en CD300f tratados con LPS durante 4 días poseen una tendencia a la disminución de la actividad locomotora espontánea comparados con los controles Wt, lo cual adjudicamos a una exacerbación del síntoma de enfermedad o *Sickness behaviour* generado por la inoculación del lipopolisacárido bacteriano (82, 247). Cabe recordar que este protocolo se utiliza como modelo de depresión (82, 247). Las citoquinas responsables de esta sintomatología depresiva a nivel sistémico y central son la IL-1 β , TNF α y en particular la IL-6 (3). Un meta análisis de estudios en pacientes con depresión evaluando los niveles de citoquinas encontró un aumento significativo de IL-6 en sangre comparados con control (277), mientras que estudios en animales IL6^{-/-} mostraron que la deficiencia en esta citoquina promueve la resistencia al desarrollo de comportamientos depresivos inducidos por estrés (278). Por otra parte, la sobre-expresión de IL-6 en el SNC mostró elevados niveles de glucocorticoides inducidos por estrés, sugiriendo una elevada sensibilidad con un potencial de vulnerabilidad para el desarrollo de características de tipo depresivas (279). Asimismo, se ha visto que niveles aumentados de IL-6 también afectan los procesos de plasticidad y maduración sináptica en el hipocampo en el adulto (280). Por lo tanto, el aumento basal de los niveles de IL6 en los cerebros CD300f KO podría estar participando de la exacerbación de la sintomatología depresiva y

otros desórdenes cognitivos observados en estos animales, tanto en condiciones naïve como luego del tratamiento con LPS. Sin embargo, cuando evaluamos la expresión de marcadores pro-inflamatorios como *Il1 β* , *Cd86* y *Cd11b* tras el tratamiento con LPS no encontramos diferencias entre ambos grupos. Esto podría estar sugiriendo i) o bien que CD300f no estaría involucrado en la regulación de la expresión de estos marcadores en el contexto inflamatorio aquí estudiado, ii) o que nuestro modelo provocó la sobre saturación de la respuesta inflamatoria, enmascarando los cambios entre ambos genotipos, ya que tanto los niveles de *Il1 β* como la reactividad microglial se encuentran muy elevados luego del tratamiento con LPS, iii) o que estemos pasando por alto los cambios entre genotipos por ocurrir a nivel regional en zonas específicas involucradas en el desarrollo de la sintomatología debido a que analizamos los ARNm de todo un hemisferio cerebral. Estas posibilidades serán estudiadas en detalle comenzando con la disección de regiones involucradas en el desarrollo de la sintomatología de enfermedad como el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, y analizando la reactividad microglial y niveles de expresión de distintas citoquinas pro-inflamatorias incluidas IL6 luego del tratamiento con dosis menores de LPS.

Por otra parte, analizando los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los cerebros de animales control inyectados con PBS durante 4 días consecutivos, encontramos una tendencia a la disminución de la expresión de *Cd86* y *Cd11b* en animales CD300f KO PBS, mientras que *Il1 β* posee una abundancia ~3 veces mayor en estos animales

comparado con Wt PBS, y ~6 veces mayor que KO naïve. Este efecto denota la vulnerabilidad de los animales CD300f KO al estrés generado durante la manipulación e inyección intraperitoneal diaria con salino, ligando nuevamente la acción del inmuno-receptor CD300f a la generación de patrones de conducta de tipo depresivos, ya que la inducción de estrés crónico moderado o severo es la base de muchos modelos animales de depresión (248, 281). La alta vulnerabilidad a la generación de estrés en los animales CD300f KO concuerda con lo esperado según la bibliografía a consecuencia de la elevada expresión de *Il6* (279) y del aumento en el número de células microgliales en los animales CD300f KO naïve (82, 239, 282). A partir de estos resultados surgió una nueva línea de investigación basada en el estudio del efecto de ausencia del receptor CD300f en la inducción de estrés crónico y depresión, y los efectos del tratamiento con drogas antidepresivas o anti-inflamatorias.

Por último, encontramos que los animales deficientes en CD300f presentan una aceleración en la tasa de muerte comparados con Wt. Esto significa que la presencia del inmuno-receptor CD300f participaría en la regulación de los procesos de envejecimiento, lo cual podría explicarse en parte por su participación en la función fagocítica de las células mieloides. Esta función resulta clave para la eliminación de células dañadas o senescentes que aumentan en la vejez, las cuales estimulan a la generación de un contexto pro-inflamatorio de no ser eliminadas

apropiadamente. De esta forma, en ausencia de CD300f se acumularían células apoptóticas durante toda la vida del animal, y se ha demostrado que esto puede llevar incluso a patologías autoinmunes como Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (160). Este experimento fue diseñado para contestar a la pregunta de si CD300f regulaba la inflamación sistémica y del SNC en un modelo de inflamación crónica de bajo grado como es el envejecimiento. Dado los resultados tan claros y significativos obtenidos, se ha dado origen a un nuevo proyecto de investigación que será el objeto de otra tesis de doctorado.

Nuestros resultados apuntan a que la microglía CD300f KO lejos de presentar un fenotipo reactivo/pro-inflamatorio, parecería presentar un fenotipo de tipo anti-inflamatorio o “hipoinflamado”/distrófico (figura 4.1). Lo aquí hallado está en oposición con lo descrito para la función periférica del receptor CD300f, donde su presencia ejerce efectos inhibitorios en la respuesta inflamatoria en modelos de LES (160), alergias (161), EAE (175), colitis (167) o de inflamación cutánea inducida por LPS (283). Esto podría sugerir que el papel del CD300f en la microglía *in vivo* no es tan relevante a nivel de regulación negativa de la neuroinflamación, y de hecho se ha observado en cultivo que este receptor puede resultar co-activador de las respuestas frente al LPS, estimulando la producción de mediadores pro-inflamatorios (158).

En resumen, nuestros resultados colocan a CD300f como un actor central en la regulación del fenotipo microglial (figura 4.1 b) y la función microglial

fagocítica (figura 4.1 a) en el cerebro en condiciones naïve, y su disfunción se relaciona con la aparición de alteraciones comportamentales de tipo depresivo y obsesivo compulsivo. Más experimentos serán necesarios para determinar la participación de CD300f en la regulación de la actividad de los PVM y lograr aislar la función de este receptor en ambas poblaciones celulares dentro del SNC.

Microglía CD300f KO en homeostasis

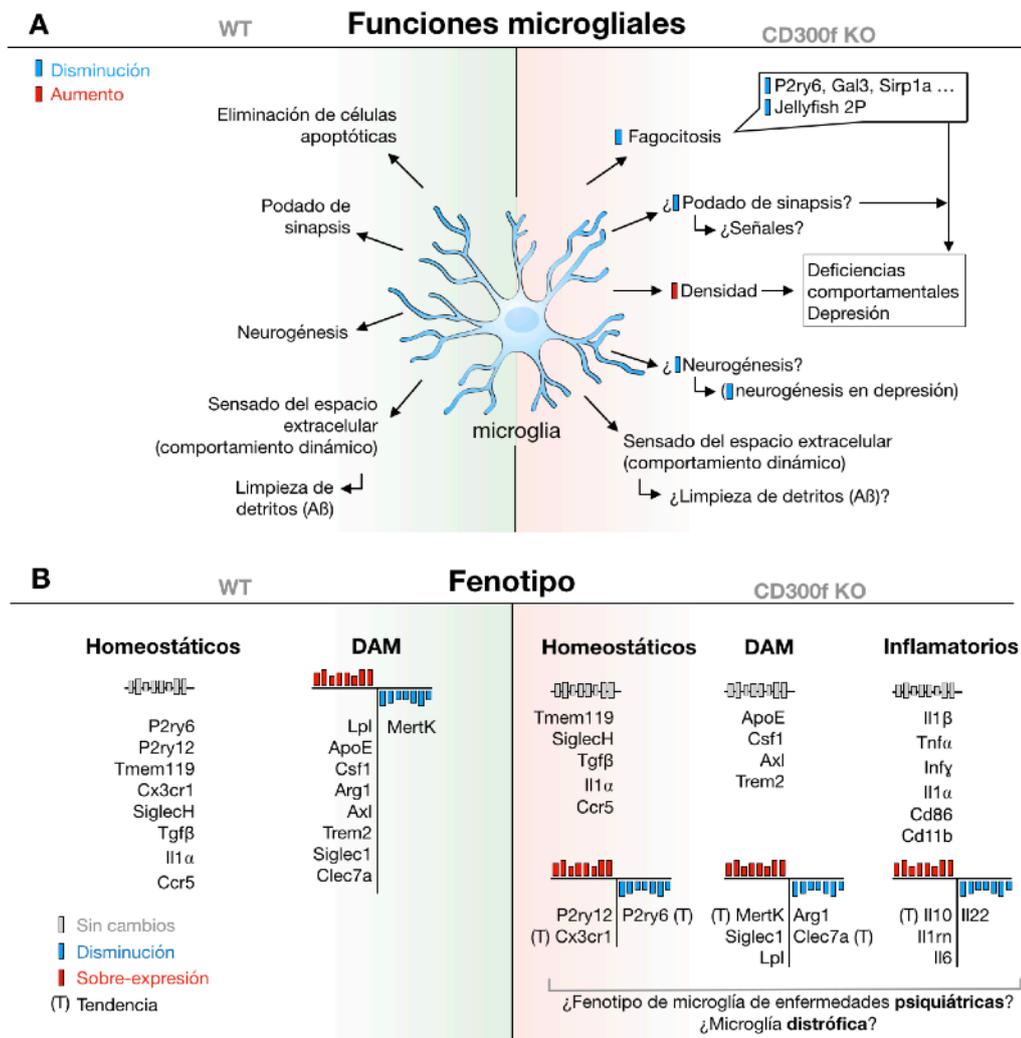


Figura 4.1_ Diagrama de la función y fenotipo alterados de la microglía CD300f KO. En **a)** se observan las distintas funciones llevadas a cabo por la microglía WT (verde) y las posibles consecuencias de su alteración tras la ausencia del receptor CD300f (rojo). En **b)** se muestra la expresión de los genes homeostáticos y asociados a patologías (DAM) en la microglía WT (verde) y la alteración de su expresión en la microglía CD300f KO (rojo). También se muestran cambios en la expresión de genes inflamatorios en cerebros CD300f KO comparados con WT. Hipotetizamos que esta variación en el fenotipo microglial CD300f KO podría derivar en patologías psiquiátricas de tipo depresivas.

4.2 Papel del receptor CD300f en un modelo de trauma severo

En la presente tesis utilizamos el modelo de CCI para evaluar el rol de CD300f en condiciones neuroinflamatorias severas, con rotura de la barrera hematoencefálica, infiltración de células mieloides que también expresan CD300f, destrucción tisular, y cambios degenerativos crónicos a largo plazo. El estudio a largo plazo de las alteraciones neurológicas de un TBI es muy complejo debido a las compensaciones que tienen lugar en los roedores [revisado en (200)]. Es por esto que en el presente trabajo contribuimos a la adaptación y puesta a punto de un sistema de evaluación comportamental y principalmente motora que pudiera evidenciar la evolución de estas funciones a largo plazo. Utilizamos el *Parallel Rod Floor* test desde 1 día hasta 90 días luego del trauma. Pudimos poner a punto las condiciones de evaluación adecuadas, obteniendo datos fiables e independientes del experimentador referentes a actividad locomotora espontánea, niveles de ansiedad (tiempos en centro-periferia del campo abierto), número de rotaciones, *freezing*, y más importante, la obtención del número de errores de posicionamiento de los miembros sobre la rejilla por metro caminado. Este último es un índice de ataxia/problemas de coordinación muy útil, en particular en este modelo que posee el haz cortico-espinal comprometido. Este desarrollo fue clave para poder evaluar las alteraciones funcionales post-trauma en los ratones, que como ya mencionamos presentan una complejidad especial en este sentido comparado por ejemplo con las ratas.

Al investigar el papel que cumple CD300f en la respuesta a la lesión traumática severa encontramos una exacerbación en la afectación motora a corto y largo plazo en animales deficientes en el inmuno-receptor. Mientras que con respecto al volumen de lesión, si bien en la fase aguda no encontramos diferencias entre ambos genotipos, a largo plazo los animales KO presentan una mayor conservación del tejido nervioso.

Analizando el efecto de la deficiencia del inmuno-receptor CD300f en la respuesta post-traumática aguda desde el punto de vista molecular encontramos una gran afectación de la actividad fagocítica de las células microgliales KO en la zona de la lesión. Observamos una fuerte inhibición en la expresión del receptor purinérgico P2RY6 comparado con Wt, si bien deberíamos confirmar estos resultados a nivel proteico mediante citometría de flujo. Además, mientras que en los animales Wt la expresión de este receptor aumenta casi al doble en la fase aguda post traumática, en los animales KO esta no cambia con respecto a naïve, permaneciendo a niveles similares a los basales. Esto denota la participación directa o indirecta de CD300f en la regulación de los niveles del receptor P2RY6, el cual estimularía la activación de su expresión en el contexto inflamatorio post-traumático, probablemente mediante sus dominios activadores. Asimismo, existe un desbalance en los niveles de expresión de otras moléculas implicadas en la función fagocítica como Sirp β , Marco, Scarb1 y Adipoq. Estos resultados son un fuerte indicador de que la actividad fagocítica de la microglía en los animales CD300f KO luego de un trauma

se ve afectada, y coloca a CD300f como un importante regulador de la respuesta inflamatoria-fagocítica en condiciones patológicas.

La fagocitosis de células muertas o en proceso de muerte resulta beneficiosa ya que media la limpieza de la zona dañada de componentes nocivos y disminuye la inflamación. Sin embargo, en modelos de isquemia focal, las neuronas de las regiones peri-infartadas se encuentran estresadas pero aún son viables y exponen PS en su membrana de manera reversible (284). Brown y colaboradores encontraron que la expresión de MERTK y MFG-E8 aumenta luego de una isquemia focal con un pico a los 3 días, y que los animales KO para estas proteínas muestran una importante reducción de la atrofia cerebral a los 28 días luego del daño comparados con Wt (110). En nuestro modelo de CCI, no hay cambios en los niveles de expresión del ARNm de MERTK, MFG-E8 u otras opsoninas como APOE o PROS1, pero sí una disminución significativa de Gal-3 u otras moléculas relacionadas con la fagocitosis como P2RY6 y SIRPβ1a. En base a esto, podemos hipotetizar que la disminución del volumen de lesión a largo plazo en los animales KO posiblemente pueda deberse a la disminución de la fagoptosis en el tejido periférico que rodea la lesión, donde las neuronas se encuentran aún vivas pero comprometidas o estresadas debido al contexto inflamatorio (42). Estas neuronas estresadas exponen PS en su membrana plasmática (267) la cual es reconocida por el receptor CD300f presente en las células microgliales, mediando su fagocitosis y consecuente apoptosis. Cabe

recordar que datos no publicados de nuestro grupo muestran una sobre-expresión de CD300f en animales Wt a los 3 y 7 días luego de un trauma focal, rodeando la zona del daño. Por otra parte, la función del receptor purinérgico P2RY6 está directamente relacionada con este proceso fagocítico-fagoptótico y su bloqueo o inhibición es capaz de rescatar la muerte o desaparición de neuronas viables pero estresadas tanto en cultivos mixtos como en modelos animales *in vivo* tras la inoculación intrastriatal con LPS (268).

Nuestra hipótesis es que este mecanismo de fagoptosis se ve inhibido o alterado ante la ausencia del receptor CD300f (figura 4.2, pg 237-38), mientras que la fagocitosis de células muertas o restos celulares o bien no se vería del todo afectada o es compensada por algún otro mecanismo, por ejemplo mediante la acción del receptor TREM2. Esto resultaría en una mayor conservación del tejido nervioso a largo plazo en animales KO, sin el efecto de una mayor inflamación debido a la acumulación de células apoptóticas en el tejido afectado (según el análisis del perfil de expresión de citoquinas pro-inflamatorias a los 5 dpi), pero con un importante efecto funcional, probablemente debido a problemas en la plasticidad asociada a las lesiones (285, 286). Una pregunta clave que queda por contestar es si las mismas señales involucradas en la fagoptosis median también la eliminación selectiva de las sinapsis, o si esto ocurre mediante otro mecanismo de señalización.

El hecho de que los animales deficientes en CD300f presenten déficits motores tan pronunciados podría estar ligado a fallas en el podado o stripping de las sinapsis comprometidas a largo plazo. Cullheim y Thams demostraron que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y sus receptores, aparte de sus funciones clásicas mediando la presentación de antígenos, juegan un rol clave en la plasticidad sináptica y regeneración nerviosa luego del daño axonal (287). Curiosamente, datos no publicados de nuestro grupo basados en estudios de “*pull down*” utilizando un anticuerpo específico contra CD300f en varias líneas celulares, mostraron que CD300f interactúa directa o indirectamente con varias proteínas vinculadas con las vías de señalización de MHC I. Además, resultados no publicados de nuestro grupo¹⁵ en colaboración con el laboratorio dirigido por Nathalia Vitreira, muestran que el agregado de CD300f-IgG (inhibidor competitivo de CD300f) a un cultivo mixto de neuronas y glia de hipocampo induce cambios en la fuerza sináptica, actuando tanto a nivel del aumento del número de contactos glutamatérgicos como a nivel de un incremento de la probabilidad de liberación del neurotransmisor. Usualmente, la acción del stripping o del podado de sinapsis es beneficiosa ya que elimina las sinapsis excitatorias glutamatérgicas que pueden afectar la viabilidad neuronal, además de ser un proceso importante para la reparación del tejido nervioso (109). El fallo en la fagocitosis de sinapsis resultaría en errores en el “cableado” o reconexión entre las neuronas viables, así como fallas en la plasticidad

¹⁵ Resultados del proyecto de doctorado de Daniela Alí, independientes de esta tesis.

sináptica y regeneración axonal luego del daño. Además, estos animales ya poseen defectos comportamentales y de fenotipo microglial a nivel basal, por lo que no podemos descartar que este efecto venga arrastrado desde el desarrollo, y que el trauma solo sea un agravante en esta condición.

Otra función que podría verse alterada es la formación de la cicatriz glial, la cual por un lado funciona para evitar que el daño al tejido se expanda, pero por otro lado impide el pasaje de axones y la reconstitución de las conexiones nerviosas (288). En este sentido, deberíamos profundizar en los estudios para confirmar estas hipótesis, comenzando por el análisis en el tamaño de la cicatriz glial en ambos grupos de animales mediante inmuno-marcajes específicos como GFAP o vimentina, así como analizar el número de neuronas remanente en animales KO y WT luego del daño traumático.

En cuanto a los marcadores inflamatorios, encontramos que en cuanto a los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias no se ven alterados en los cerebros de animales CD300f KO con respecto a Wt. Sin embargo, sí se observa un fuerte aumento de marcadores anti-inflamatorios como CD206 e IL-10 en los cerebros de animales KO. En este sentido, la expresión de IL-10 en cerebros KO alcanza niveles ~3 veces mayores que Wt, con una tendencia similar a la observada en los animales naïve. Esto concuerda con resultados de Natalia Lago de nuestro laboratorio que muestran que luego de 24 horas de un trauma de

médula espinal existe un aumento de IL-10 a nivel de proteína en el tejido nervioso. Esto permite hipotetizar que CD300f actuaría como un inhibidor de la expresión de IL-10, aunque probablemente sinergizando con otro(s) mecanismo(s). Esta citoquina ha sido la molécula supresora del sistema inmune más estudiada y juega un papel crítico en la prevención de patologías inflamatorias y autoinmunes (289, 290). Su potencial terapéutico radica en su capacidad de suprimir la síntesis de otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 o TNF (201). Sin embargo, los resultados que describen el efecto de IL-10 en el SNC luego de una lesión son contradictorios, pudiendo resultar en efectos tanto pro-regenerativos/reparativos, como tóxicos. Un ejemplo claro es el efecto de la administración de IL-10 en el modelo de EAE, cuyos resultados varían desde la disminución, hacia la falta de efecto o exacerbación de la patología (289, 291). Estudios de sobre-expresión por terapia génica realizados en animales Wt postnatales (P7) luego de un daño excitotóxico mostraron que la expresión de IL-10 resulta en un incremento del volumen de lesión de los animales 3 días luego de la lesión que retorna a los niveles basales luego de 7 días del tratamiento (292). En línea con estos resultados, la sobre-expresión de IL-10 por terapia génica en cerebros de ratones transgénicos para el precursor de la proteína amiloide (APP) mostraron la acumulación de β amiloide acompañada de la reducción de la fagocitosis de β amiloide por la microglía (293). Por otra parte, un estudio realizado en niños víctimas de TEC relacionó los altos niveles de IL-10 encontrados en el LCR con el aumento en la tasa de mortalidad

(294). Sin embargo, la administración de IL-10 en animales sujetos a TEC experimental demostraron una clara disminución en la síntesis de TNF, junto con una reducción en el patrón de activación glial y mejoras en el aspecto comportamental de los animales (295, 296). Por otra parte, la señalización a través del receptor de IL-10 en neuronas ha sido asociada con un aumento de la supervivencia celular luego de un trauma medular (297).

En base a esto podemos hipotetizar que el aumento considerable de IL-10 en los cerebros CD300f KO podría estar mediando i) o bien un incremento en los mecanismos anti-inflamatorios que promueven la reparación del tejido nervioso y supervivencia neuronal, lo cual resultaría en una mejoría en términos de conservación de tejido a largo plazo ii) o una inhibición de la inflamación necesaria para desencadenar los mecanismos fagocíticos/fagoptóticos de la microglía/macrófagos lo cual resultaría en la acumulación de células apoptóticas/necróticas y/o sinapsis fallidas/errores en la conectividad. Este aumento en IL-10 podría ser el resultado de algún mecanismo compensatorio frente a la falla en la actividad fagocítica, y/o podría estar interfiriendo en sí mismo con los mecanismos de fagocitosis de la microglía, resultando en una falla en la reconexión en animales KO. En este sentido, CD300f podría estar inhibiendo la expresión de IL-10 en los animales Wt para promover la fagocitosis necesaria para la correcta reparación del daño tanto a nivel estructural como funcional.

El balance de la inmunidad innata mediante la inhibición de la acción de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 es clave para permitir al

cerebro retornar a su estado fisiológico (290), aunque se trata de un equilibrio de una gran cantidad de moléculas por lo cual el análisis de una sola de ellas no proporciona una visión real de la situación.

Por otro lado, también encontramos un aumento en la expresión del receptor de manosa CD206 en animales KO luego de un trauma. Este receptor se encarga de la endocitosis de ligandos con residuos de manosa y ha sido históricamente ligado a la capacidad reparativa/pro-regenerativa de macrófagos periféricos (7) y perivasculares (298). Podemos observar que si bien sus niveles de expresión post-traumática en animales KO son significativamente mayores a los encontrados en cerebros Wt, éstos no varían con respecto a sus concentraciones basales naïve. Estos resultados indican que CD300f regularía de manera directa o indirecta la expresión de este receptor, ayudando al mantenimiento tónico de las concentraciones de CD206 en condiciones basales y participando de su inhibición en la respuesta aguda post-traumática.

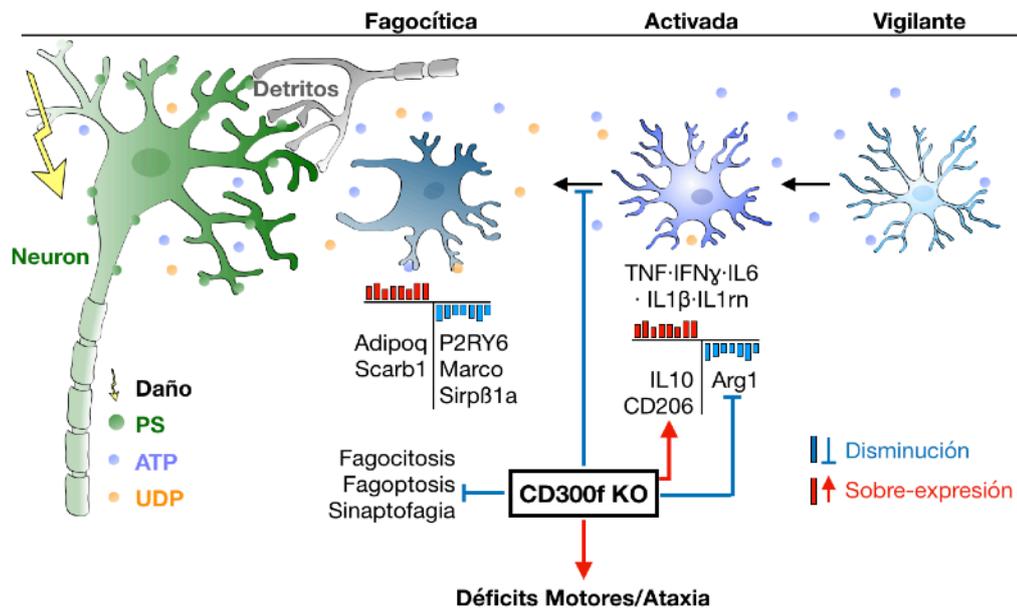
Analizando los niveles de Arg1 luego de un trauma, notamos que los niveles de expresión esta enzima aumentan significativamente luego de un trauma en ambos genotipos. Sin embargo, en cerebros de animales KO sus niveles de expresión se encuentran fuertemente disminuidos comparados con Wt, repitiendo el patrón observado en condiciones naïve. Esta enzima posee propiedades regenerativas y remodeladoras de los tejidos ya que compite con la iNOS en la utilización de L arginina, y es

capaz de convertirla en prolinas y poliaminas importantes para la deposición de matriz extracelular luego de una lesión (7). En este caso, CD300f sería un estimulador de la expresión de este gen, probablemente actuando de manera sinérgica con otros mecanismos como la IL-4 (163). El fenotipo M1/M2 descrito para clasificar a los macrófagos (299) fue tentativamente aplicado a las células microgliales en un intento de contribuir a la comprensión de sus fenotipos. Sin embargo, actualmente se considera que esta clasificación no es adecuada para la microglía (14). Por ejemplo, se asocia el fenotipo M2 a una inducción de Arg1 y CD206, sin embargo, y como se ve en el presente trabajo, mientras Arg1 disminuye sus niveles de expresión, el receptor CD206 aumenta. Esto denota un perfil microglial mixto en términos de activación, y un claro ejemplo en el cual el tan cuestionado paradigma M1/M2 no se aplica.

Con respecto a IL6, si bien esta citoquina pro-inflamatoria se encuentra aumentada en animales KO en condiciones naïve, este aumento no se mantiene luego del trauma, sino que en ambos genotipos sus niveles aumentan de manera similar. Con esto podemos inferir que CD300f inhibe la producción basal de esta citoquina en cerebros naïve, pero ante una situación inflamatoria de tal magnitud, probablemente existan mecanismos compensatorios que se encarguen del aumento de la expresión de IL-6 independiente de la deficiencia del inmuno-receptor.

Figura 4.2_ Modelo del efecto de CD300f en células microgliales luego de un trauma por CCI. Luego del daño traumático, las células afectadas liberan mediadores purinérgicos (ATP y UDP) que son detectados como señales de daño (DAMPs) por receptores específicos ubicados en la membrana plasmática de la microglía vigilante; P2RY12 y P2RY6. Estos receptores median la extensión de los procesos microgliales hacia el sitio del daño (P2RY12) y su transformación al estado fagocítico (P2RY6). A su vez, la microglía activada por los efectos del daño libera una serie de citoquinas pro y anti inflamatorias que median la evolución de la respuesta post-traumática. En el caso de la microglía CD300f KO, la expresión del receptor P2RY6, se ve disminuida (al igual que otras moléculas vinculadas con la actividad fagocítica cuya expresión varía), y por ende también su capacidad fagocítica. Esto podría significar la disminución en la eliminación de restos celulares (limpieza/fagocitosis), en la eliminación de células estresadas pero viables que exponen PS en la monocapa externa de su membrana plasmática (fagoptosis), y en el podado o refinamiento de sinapsis necesario para la correcta reconexión neuronal (sinaptofagia). Las consecuencias de este efecto podrían verse reflejadas en las dificultades motoras observadas en los animales CD300f KO. Se destacan las moléculas relevantes vinculadas en la transición de las células microgliales a distintos estados efectores y los cambios en su expresión mediados por la ausencia del receptor CD300f. En rojo sobre-expresión/activación, en azul disminución/inhibición. PS fosfatidilserina; ATP adenosina trifosfato; UDP uridina difosfato.

Microglía CD300f KO en trauma



Por último, dada la naturaleza del modelo de CCI, el daño a la BHE permite la entrada de células periféricas que normalmente no están presentes en el cerebro sano, como neutrófilos y monocitos. Estos migran hacia la zona del daño horas o días más tarde, estimulados por la presencia de quimioquinas que los guían a través de su unión con receptores específicos presentes la membrana plasmática. Todos estos tipos celulares expresan CD300f, y su función no está claramente establecida en cada uno de ellos. En el caso de los macrófagos, se describió que la falta de CD300f disminuye su capacidad fagocítica (160), lo cual generaría un efecto sumatorio con la disfunción fagocítica

microglial descrita aquí, afectando negativamente la recuperación funcional frente al CCI.

Luego de una lesión traumática al SNC, leucocitos periféricos (monocitos/macrófagos/neutrófilos y en menor medida LB y LT) son reclutados al sitio del daño con el fin de colaborar con las células inmunes residentes en las respuestas inflamatorias y participar de la limpieza de restos celulares (90). Nuestros resultados apuntan a que los animales CD300f KO poseen una afectación en las vías de reclutamiento de células periféricas, en particular de monocitos/macrófagos. Encontramos una fuerte disminución en la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos Mip1 α (CCL3) en la etapa aguda post-traumática, mientras que su receptor CCR1 se encuentra inalterado. En este sentido, luego del daño traumático y ruptura consecuente de la BHE, la infiltración de macrófagos periféricos resulta en un aumento en los niveles detectables del receptor Ccr1, aunque a niveles similares que Wt. Por el contrario, la expresión del receptor de monocitos clásicos CCR2 en los cerebros KO posee una tendencia a la disminución en comparación con Wt. Estos resultados sugieren que la presencia del receptor CD300f regularía de alguna manera la entrada de monocitos/macrófagos periféricos al sitio de la lesión, sin embargo necesitamos más experimentos para afirmar esta hipótesis.

Por otra parte, observamos una tendencia a la sobre-expresión del receptor de neutrófilos Cxcr1 y la quimioquina Cxcl1 o “proteína

activadora de neutrófilos”. En línea con estos resultados, encontramos una elevada expresión del receptor Fpr2 en el cerebro de animales KO. Este es un receptor de membrana acoplado a la proteína G que liga péptidos *N*-formil liberados desde células dañadas y promueve la quimiotaxis de las células inmunes, en particular neutrófilos (90). Por ejemplo, estudios de microscopía en tiempo real en una lesión estéril en el hígado revelaron que los péptidos formil liberados de células necróticas actúan como DAMPs ayudando a guiar a los neutrófilos al sitio del daño (300). Estos resultados sugieren que podría ocurrir un aumento en los niveles de reclutamiento de estas células luego de un CCI en animales CD300f KO, si bien no vemos cambios gruesos en la expresión del gen *Mpo* que codifica para la enzima implicada en su actividad microbicida (mieloperoxidasa). Cabe recordar que los neutrófilos expresan elevados niveles de CD300f con lo cual es razonable hipotetizar que la deficiencia de este receptor podría repercutir en la función o el reclutamiento de estos leucocitos en el SNC. En este sentido, y de acuerdo con la idea de que la ausencia de CD300f puede llevar a un aumento de la infiltración de neutrófilos en condiciones patológicas, se ha visto que el bloqueo de CD300f y su ligando aumenta el reclutamiento de neutrófilos y mejora el estado de los animales en un modelo de sepsis (169), mientras que en un modelo de colitis, su deficiencia aumenta la infiltración de neutrófilos hacia el colon y acentúa la patología (167).

Por otro lado, una de las principales rutas de acceso de leucocitos periféricos al parénquima nervioso son las meninges (90). Estudios por

microscopía de 2P mostraron que en particular los neutrófilos se localizan en un principio en las meninges dañadas donde se acumulan e interactúan con células necróticas (68, 69) para luego infiltrarse hacia la zona del daño en el parénquima del SNC. En este sentido, nuestros análisis de infiltración de neutrófilos a nivel de las meninges luego de un mTBI arrojaron resultados poco concluyentes debido al escaso número de animales, aunque se puede observar una tendencia al aumento en el reclutamiento de neutrófilos en animales CD300f KO.

Si bien los neutrófilos son generalmente considerados como una población de leucocitos pro-inflamatorios, estas células juegan un papel vital en la reparación de los tejidos dada su participación en la fagocitosis, liberación de metaloproteasas y factores de crecimiento (69). En particular, el bloqueo de la entrada de neutrófilos hacia las meninges luego de un trauma moderado resulta en un aumento de la muerte celular en esta región. Mientras que a nivel del parénquima nervioso, la inhibición del reclutamiento de neutrófilos resulta protectora luego de un trauma severo (211) resultando en la reducción del edema, volumen de lesión y activación de microglía/macrófagos. Por otra parte, en el parénquima nervioso estas células son capaces de inducir la muerte neuronal mediante la liberación de distintos mediadores pro-inflamatorios como ROS o TNF α (301). Los autores concluyen que el efecto contradictorio mediado por los neutrófilos radica en la severidad del impacto, ya que en el modelo de mTBI existe una gran conservación de las meninges y tejido nervioso, mientras que en el modelo de CCI al ser más severo destruye

las meninges y su efecto cambia (69). En este sentido, resulta fundamental estudiar la influencia del receptor CD300f en la dinámica de reclutamiento de estas células hacia el SNC luego de un trauma y su efecto en la respuesta post-traumática. Para confirmar la existencia de alteraciones en los niveles de reclutamiento/activación de leucocitos periféricos en la respuesta inflamatoria post-traumática mediadas por CD300f, realizaremos en el futuro un conteo de las poblaciones celulares en la zona de la lesión en animales Wt y KO mediante citometría de flujo o inmunohistoquímica.

Por último, no encontramos diferencias en los niveles de expresión del receptor CD4 por lo cual podríamos decir que no existen variaciones en los niveles de reclutamiento de LT helper en la fase aguda post-traumática. Tampoco observamos diferencias en los niveles de hemoglobina entre ambos genotipos, si bien esta aumenta después del trauma comparados con naïve, siendo esto previsible por la existencia de hemorragias post traumáticas y tal vez podríamos considerarlo como un índice de que no existe un aumento de las hemorragias en los animales KO.

4.3 Conclusiones

En resumen, nuestro estudio provee evidencias *in vivo* de que CD300f es un mediador crucial para la regulación del fenotipo microglial y del sistema nervioso central en general, tanto en condiciones fisiológicas como luego de una lesión traumática. Sin embargo, su ausencia en el SNC no genera una potenciación de las cascadas pro-inflamatorias como sí ocurre en la periferia luego de disparadores como alergias, Lupus o colitis.

Por otra parte, la presencia de este inmuno-receptor disminuye la respuesta anti-inflamatoria, seguramente permitiendo la fagocitosis/fagoptosis de células necróticas/apoptóticas, en proceso de muerte y productos de desecho en la fase aguda del trauma, cuando es necesario limpiar la zona de restos celulares para permitir la resolución de la inflamación y la consecuente reparación y regeneración del tejido nervioso. Por otra parte, este receptor podría ser fundamental para promover la correcta reconexión y plasticidad neuronal, proceso fundamental tanto en el desarrollo del SNC como durante la reparación-compensación del mismo ante un daño degenerativo en el adulto. La alta susceptibilidad de los animales CD300f KO a los efectos del daño traumático resaltan la importancia de CD300f como un regulador de la respuesta post-traumática.

Estudios pre-clínicos recientes han revelado que el TEC induce muchos procesos neuro-restauradores, incluyendo neurogénesis, crecimiento

axonal (sprouting), sinaptogénesis, oligodendrogénesis y angiogénesis, las cuales podrían contribuir a la recuperación funcional post traumática (302-306). Además, tratamientos que promueven estos procesos neuro-restauradores han resultado en una mejoría funcional luego del daño traumático (285, 286). Sin embargo, los ensayos clínicos en TEC se han abocado principalmente a la neuroprotección, mientras que la neuro-reparación no ha sido investigada en profundidad en modelos animales o pacientes de TEC. Al contrario de la neuroprotección, las terapias reparativas tienen como fin la remodelación del tejido nervioso, más que la reducción de la muerte celular o del volumen de lesión. Además, en los modelos de TEC las terapias neuro-reparativas pueden ser administradas en una ventana temporal mucho mayor que las neuroprotectoras (al menos 24 horas más tarde que el impacto), y mejoran la recuperación neurológica sin la alteración del volumen de lesión cortical (95, 307, 308). Por lo tanto, estas terapias pueden tener un alto impacto en la clínica y requieren de mayor investigación. En este sentido, postulamos que el efecto del receptor CD300f podría tener un valor agregado al modular la reparación del SNC luego de un trauma, y su función remodeladora será investigada en más detalle a futuro.

ABREVIACIONES

BIBLIOGRAFÍA

1. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? Trends
2P Microscopía de dos fotones
AD Enfermedad de Alzheimer
ALS Esclerosis lateral amiotrófica
CCI Impacto cortical controlado
CD300f KO Ratones deficientes en CD300f
CX3CR1 ^{+/GFP} Ratones que expresan GFP bajo el promotor de CX3CR1
DAM Microglía asociada a enfermedades degenerativas
EAE Encefalomiелitis autoinmune experimental
EM Esclerosis múltiple
GFP Proteína fluorescente verde
LCR Líquido céfalo-raquídeo
MM Macrófagos meningeales
mTBI Trauma moderado
Naïve Animales sin tratar
PI Ioduro de propidio
PS Fosfatidilserina
PVM Macrófagos perivasculares
SNC Sistema nervioso central
TEC Trauma encéfalo-craneano
Wt Genotipo salvaje
Immunol. 2007 Jan;28(1):12-8. PubMed PMID: 17129764.
2. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. Annu Rev Immunol. 2014;32:367-402. PubMed PMID: 24471431. Pubmed Central PMCID: 5001846.
3. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci. 2008 Jan;9(1):46-56. PubMed PMID: 18073775. Pubmed Central PMCID: 2919277.
4. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. Nature. 2015 Jul 16;523(7560):337-41. PubMed PMID: 26030524. Pubmed Central PMCID: 4506234.
5. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma

and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012;4(147):147ra11-ra11.

6. Río-Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos: histogénesis y evolución normal : éxodo y distribución regional de la microglia1921.
7. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014 Jun 03;11:98. PubMed PMID: 24889886. Pubmed Central PMCID: 4060849.
8. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):841-5. PubMed PMID: 20966214. Pubmed Central PMCID: 3719181.
9. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*. 2013 Mar;16(3):273-80. PubMed PMID: 23334579.
10. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017;35(1):441-68. PubMed PMID: 28226226.
11. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:119-45. PubMed PMID: 19302036.
12. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):253-62. PubMed PMID: 21068834.
13. Linnartz B, Wang Y, Neumann H. Microglial immunoreceptor tyrosine-based activation and inhibition motif signaling in neuroinflammation. *Int J Alzheimers Dis*. 2010 Jun 22;2010. PubMed PMID: 20721346. Pubmed Central PMCID: 2915791.
14. Ransohoff RM. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci*. 2016 Jul 26;19(8):987-91. PubMed PMID: 27459405.
15. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, et al. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*. 2014 Jan;17(1):131-43. PubMed PMID: 24316888. Pubmed Central PMCID: 4066672.
16. Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 22;113(12):E1738-46. PubMed PMID: 26884166. Pubmed Central PMCID: 4812770.
17. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8. PubMed PMID: 15831717.

18. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005 Jun;8(6):752-8. PubMed PMID: 15895084.
19. Penfield W. *Cytology & cellular pathology of the nervous system.* New York: P.B. Hoeber, inc.; 1932. 3 v. p.
20. Kim SU, de Vellis J. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res.* 2005 Aug 1;81(3):302-13. PubMed PMID: 15954124.
21. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013 Feb;39(1):3-18. PubMed PMID: 23252647.
22. Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, et al. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation.* 2014 Jan 21;11:12. PubMed PMID: 24447857. Pubmed Central PMCID: 3906907.
23. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* 2007 Nov;10(11):1387-94. PubMed PMID: 17965659.
24. Hanisch UK, Prinz M, Angstwurm K, Häusler KG, Kann O, Kettenmann H, et al. The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2104-15.
25. Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, et al. Interferon- γ differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci.* 2002;16(11):2113-22.
26. Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *The Journal of Immunology.* 2001;167(9):5004-10.
27. Liu Y, Hao W, Letiembre M, Walter S, Kulanga M, Neumann H, et al. Suppression of microglial inflammatory activity by myelin phagocytosis: role of p47-PHOX-mediated generation of reactive oxygen species. *J Neurosci.* 2006;26(50):12904-13.
28. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, et al. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci.* 2013 Dec;16(12):1896-905. PubMed PMID: 24162652. Pubmed Central PMCID: 3840123.
29. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017 Jun 15;169(7):1276-90 e17. PubMed PMID: 28602351.
30. Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, et al. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity.* 2017 Sep 19;47(3):566-81 e9. PubMed PMID: 28930663.

31. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:453-501. PubMed PMID: 2031577.
32. Frade JM, Barde Y-A. Microglia-Derived Nerve Growth Factor Causes Cell Death in the Developing Retina. *Neuron.*20(1):35-41.
33. Marin-Teva JL, Dusart I Fau - Colin C, Colin C Fau - Gervais A, Gervais A Fau - van Rooijen N, van Rooijen N Fau - Mallat M, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. (0896-6273 (Print)). eng.
34. Takahashi K, Rochford Cd Fau - Neumann H, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. (0022-1007 (Print)). eng.
35. Ekdahl CT, Claassen J-H, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(23):13632-7.
36. Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci.* 2013;16(5):543-51.
37. Araujo DM, Cotman CW. Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *J Neurosci.* 1992;12(5):1668-78.
38. Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res.* 2001;65(4):322-31.
39. Trang T, Beggs S, Salter MW. Brain-derived neurotrophic factor from microglia: a molecular substrate for neuropathic pain. *Neuron Glia Biol.* 2011;7(1):99-108.
40. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2006 Jan;31(1):149-60. PubMed PMID: 16297637.
41. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007 Dec 14;131(6):1164-78. PubMed PMID: 18083105.
42. Vilalta A, Brown GC. Neurophagy, the phagocytosis of live neurons and synapses by glia, contributes to brain development and disease. *The FEBS journal.* 2017 Nov 10. PubMed PMID: 29125686.
43. Schafer DP, Stevens B. Synapse elimination during development and disease: immune molecules take centre stage. *Biochem Soc Trans.* 2010 Apr;38(2):476-81. PubMed PMID: 20298206.
44. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* 2012 May 24;74(4):691-705. PubMed PMID: 22632727. Pubmed Central PMCID: 3528177.

45. Stephan AH, Barres BA, Stevens B. The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35:369-89. PubMed PMID: 22715882.
46. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science.* 2011 Sep 9;333(6048):1456-8. PubMed PMID: 21778362.
47. Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci.* 2014 Mar;17(3):400-6. PubMed PMID: 24487234.
48. Peter S. Bloomfield, Sudhakar Selvaraj, Mattia Veronese, Gaia Rizzo, Alessandra Bertoldo, David R. Owen, et al. Microglial Activity in People at Ultra High Risk of Psychosis and in Schizophrenia: An [11C]PBR28 PET Brain Imaging Study. *Am J Psychiatry.* 2016;173(1):44-52. PubMed PMID: 26472628.
49. Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, Davis A, Hammond TR, Kamitaki N, et al. Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature.* 2016 01/27/online;530:177.
50. Estes ML, McAllister AK. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Aug;16(8):469-86. PubMed PMID: 26189694. Pubmed Central PMCID: 5650494.
51. Beggs S, Salter MW. SnapShot: Microglia in Disease. *Cell.* 2016 May 19;165(5):1294- e1. PubMed PMID: 27203115.
52. Marin I, Kipnis J. Learning and memory ... and the immune system. *Learn Mem.* 2013 Sep 19;20(10):601-6. PubMed PMID: 24051097. Pubmed Central PMCID: 3768198.
53. Vezzani A, Viviani B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology.* 2015 Sep;96(Pt A):70-82. PubMed PMID: 25445483.
54. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science.* 2002;298(5594):789-91.
55. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science.* 2016;352(6286):712-6.
56. Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MRP, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain.* 2016;139(4):1265-81.
57. Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science.* 2016 Aug 19;353(6301):783-5. PubMed PMID: 27540166. Pubmed Central PMCID: 5260471.
58. Hoffmann O, Braun JS, Becker D, Halle A, Freyer D, Dagand E, et al. TLR2 mediates neuroinflammation and neuronal damage. *The Journal of Immunology.* 2007;178(10):6476-81.

59. Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, et al. Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect Immun*. 2010;78(2):865-71.
60. Diab A, Abdalla H, Li HL, Shi FD, Zhu J, Höjberg B, et al. Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1 α attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun*. 1999;67(5):2590-601.
61. Hoffmann O, Mahrhofer C, Rueter N, Freyer D, Bert B, Fink H, et al. Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. *Infect Immun*. 2007;75(9):4289-97.
62. Wilms H, Schwark T, Brandenburg LO, Sievers J, Dengler R, Deuschl G, et al. Regulation of activin A synthesis in microglial cells: pathophysiological implications for bacterial meningitis. *J Neurosci Res*. 2010;88(1):16-23.
63. Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery*. 2005;57(1):128-34.
64. Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, Yofu S, Satoh K, Miyamoto K, et al. Gp91 phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2010;7(1):41.
65. Hsieh CL, Niemi EC, Wang SH, Lee CC, Bingham D, Zhang J, et al. CCR2 deficiency impairs macrophage infiltration and improves cognitive function after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(20):1677-88.
66. Edwards P, Arango M, Balica L, Cottingham R, El-Sayed H, Farrell B, et al. CRASH trial collaborators. Final results of MRC CRASH, a randomised placebo-controlled trial of intravenous corticosteroid in adults with head injury-outcomes at 6 months. *Lancet*. 2005;365(9475):1957-9.
67. Wright DW, Yeatts SD, Silbergleit R, Palesch YY, Hertzberg VS, Frankel M, et al. Very early administration of progesterone for acute traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2457-66.
68. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature*. 2014 Jan 09;505(7482):223-8. PubMed PMID: 24317693. Pubmed Central PMCID: 3930079.
69. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol*. 2015 Mar;72(3):355-62. PubMed PMID: 25599342. Pubmed Central PMCID: 5001842.
70. Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI, Reese EA. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem Res*. 2012 May;37(5):903-10. PubMed PMID: 22311128. Pubmed Central PMCID: 3478877.
71. Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun*. 2013 Jan;27(1):22-32. PubMed PMID: 22985767. Pubmed Central PMCID: 3518576.

72. Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, et al. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*. 2015 Mar 12;160(6):1061-71. PubMed PMID: 25728668. Pubmed Central PMCID: 4477963.
73. Guerreiro R, Bilgic B, Guven G, Brás J, Rohrer J, Lohmann E, et al. A novel compound heterozygous mutation in TREM2 found in a Turkish frontotemporal dementia-like family. *Neurobiol Aging*. 2013;34(12):2890.e1-. e5.
74. Kleinberger G, Yamanishi Y, Suárez-Calvet M, Czirr E, Lohmann E, Cuyvers E, et al. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med*. 2014;6(243):243ra86-ra86.
75. Ulland TK, Song WM, Huang SC, Ulrich JD, Sergushichev A, Beatty WL, et al. TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017 Aug 10;170(4):649-63 e13. PubMed PMID: 28802038. Pubmed Central PMCID: 5573224.
76. Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H. TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS Med*. 2007 Apr;4(4):e124. PubMed PMID: 17425404. Pubmed Central PMCID: 1851623.
77. Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, et al. Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS One*. 2013;8(4):e60921.
78. Du Yan S, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, et al. RAGE and amyloid- β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*. 1996;382(6593):685.
79. Chen SK, Tvrdik P, Peden E, Cho S, Wu S, Spangrude G, et al. Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice. *Cell*. 2010 May 28;141(5):775-85. PubMed PMID: 20510925. Pubmed Central PMCID: 2894573.
80. Greer JM, Capecchi MR. Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice. *Neuron*. 2002;33(1):23-34.
81. Attwells S, Setiawan E, Wilson AA, Rusjan PM, Mizrahi R, Miler L, et al. Inflammation in the Neurocircuitry of Obsessive-Compulsive Disorder. *JAMA Psychiatry*. 2017 Aug 01;74(8):833-40. PubMed PMID: 28636705.
82. Yirmiya R, Rimmerman N, Reshef R. Depression as a microglial disease. *Trends Neurosci*. 2015 Oct;38(10):637-58. PubMed PMID: 26442697.
83. Carboni L, Becchi S, Piubelli C, Mallei A, Giambelli R, Razzoli M, et al. Early-life stress and antidepressants modulate peripheral biomarkers in a gene-environment rat model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010;34(6):1037-48.
84. Bauer J, Hohagen F, Gimmel E, Bruns F, Lis S, Krieger S, et al. Induction of cytokine synthesis and fever suppresses REM sleep and improves mood in

- patients with major depression. *Biol Psychiatry*. 1995 1995/11/01;38(9): 611-21.
85. Warner-Schmidt JL, Vanover KE, Chen EY, Marshall JJ, Greengard P. Antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are attenuated by antiinflammatory drugs in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(22):9262-7.
 86. Kreisel T, Frank M, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta M, et al. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 2014;19(6): 699-709.
 87. Peluffo H, Solari-Saquieres P, Negro-Demontel ML, Francos-Quijorna I, Navarro X, Lopez-Vales R, et al. CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype. *J Neuroinflammation*. 2015 Aug 12;12:145. PubMed PMID: 26259611. Pubmed Central PMCID: 4531482.
 88. Takahashi K, Rochford CD, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med*. 2005 Feb 21;201(4):647-57. PubMed PMID: 15728241. Pubmed Central PMCID: 2213053.
 89. Kigerl KA, de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Popovich PG, Keane RW. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol*. 2014 Aug;258:5-16. PubMed PMID: 25017883. Pubmed Central PMCID: 4974939.
 90. Russo MV, McGavern DB. Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends Immunol*. 2015 Oct;36(10):637-50. PubMed PMID: 26431941. Pubmed Central PMCID: 4592776.
 91. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):677-87. PubMed PMID: 26121197. Pubmed Central PMCID: 4519035.
 92. Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol*. 1994 1994/04/01;12(1):991-1045.
 93. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):1-5. PubMed PMID: 17032697.
 94. Ahmad A, Crupi R, Campolo M, Genovese T, Esposito E, Cuzzocrea S. Absence of TLR4 reduces neurovascular unit and secondary inflammatory process after traumatic brain injury in mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e57208. PubMed PMID: 23555560. Pubmed Central PMCID: 3610903.
 95. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Feb;14(2):128-42. PubMed PMID: 23329160. Pubmed Central PMCID: 3951995.
 96. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol*. 2011 Mar;11(3):201-12. PubMed PMID: 21331080. Pubmed Central PMCID: 4209705.

97. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med.* 2012 Dec 13;367(24):2322-33. PubMed PMID: 23234515. Pubmed Central PMCID: 3675791.
98. Koizumi S, Shigemoto-Mogami Y, Nasu-Tada K, Shinozaki Y, Ohsawa K, Tsuda M, et al. UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature.* 2007 Apr 26;446(7139):1091-5. PubMed PMID: 17410128. Pubmed Central PMCID: 3464483.
99. Ohsawa K, Irino Y, Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Inoue K, et al. P2Y12 receptor-mediated integrin-beta1 activation regulates microglial process extension induced by ATP. *Glia.* 2010 May;58(7):790-801. PubMed PMID: 20091784.
100. Koizumi S, Ohsawa K, Inoue K, Kohsaka S. Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia.* 2013 Jan;61(1):47-54. PubMed PMID: 22674620.
101. Hochreiter-Hufford A, Ravichandran KS. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):a008748.
102. Sancho D, Reis e Sousa C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:491-529. PubMed PMID: 22224766. Pubmed Central PMCID: 4480235.
103. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016 Mar;53(2):1181-94. PubMed PMID: 25598354.
104. Mukhopadhyay S, Gordon S. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology.* 2004;209(1):39-49.
105. Bowdish DM, Sakamoto K Fau - Kim M-J, Kim Mj Fau - Kroos M, Kroos M Fau - Mukhopadhyay S, Mukhopadhyay S Fau - Leifer CA, Leifer Ca Fau - Tryggvason K, et al. MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and *Mycobacterium tuberculosis*. (1553-7374 (Electronic)). eng.
106. Areschoug T, Gordon S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2009 Aug;11(8):1160-9. PubMed PMID: 19388903.
107. Hawkes CA, McLaurin J. Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of β -amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(4):1261-6.
108. Barrow AD, Trowsdale J. You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1646-53. PubMed PMID: 16783855.
109. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol.* 2014 Jun;49(3):1422-34. PubMed PMID: 24395130. Pubmed Central PMCID: 4012154.
110. Neher JJ, Emmrich JV, Fricker M, Mander PK, Théry C, Brown GC. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia.

- Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(43):E4098-E107.
111. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Apr;15(4):209-16. PubMed PMID: 24646669.
 112. Schmid CD, Sautkulis LN, Danielson PE, Cooper J, Hasel KW, Hilbush BS, et al. Heterogeneous expression of the triggering receptor expressed on myeloid cells-2 on adult murine microglia. *Journal of neurochemistry*. 2002 Dec;83(6):1309-20. PubMed PMID: 12472885. Pubmed Central PMCID: 2637869.
 113. Barclay AN, Brown MH. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jun;6(6):457-64. PubMed PMID: 16691243.
 114. Gaikwad S, Larionov S, Wang Y, Dannenberg H, Matozaki T, Monsonego A, et al. Signal regulatory protein-beta1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2009 Dec;175(6):2528-39. PubMed PMID: 19893026. Pubmed Central PMCID: 2789620.
 115. Zhang H, Li F, Yang Y, Chen J, Hu X. SIRP/CD47 signaling in neurological disorders. *Brain Res*. 2015 Oct 14;1623:74-80. PubMed PMID: 25795378. Pubmed Central PMCID: 4569528.
 116. Poliani PL, Wang Y, Fontana E, Robinette ML, Yamanishi Y, Gilfillan S, et al. TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *J Clin Invest*. 2015 May;125(5):2161-70. PubMed PMID: 25893602. Pubmed Central PMCID: 4463196.
 117. Mazaheri F, Snaidero N, Kleinberger G, Madore C, Daria A, Werner G, et al. TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Rep*. 2017 Jul;18(7):1186-98. PubMed PMID: 28483841. Pubmed Central PMCID: 5494532.
 118. Cannon JP, O'Driscoll M, Litman GW. Specific lipid recognition is a general feature of CD300 and TREM molecules. *Immunogenetics*. 2012 Jan;64(1):39-47. PubMed PMID: 21800138.
 119. Grommes C, Lee CD, Wilkinson BL, Jiang Q, Koenigsnecht-Talboo JL, Varnum B, et al. Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2008;3(2):130-40.
 120. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J Cell Physiol*. 2012 Feb;227(2):401-7. PubMed PMID: 21792939. Pubmed Central PMCID: 3225605.
 121. Nomura K, Vilalta A, Allendorf DH, Hornik TC, Brown GC. Activated Microglia Desialylate and Phagocytose Cells via Neuraminidase, Galectin-3, and Mer Tyrosine Kinase. *J Immunol*. 2017 Jun 15;198(12):4792-801. PubMed PMID: 28500071. Pubmed Central PMCID: 5458330.
 122. Yip PK, Carrillo-Jimenez A, King P, Vilalta A, Nomura K, Chau CC, et al. Galectin-3 released in response to traumatic brain injury acts as an alarmin orchestrating brain immune response and promoting neurodegeneration.

- Sci Rep. 2017 Jan 27;7:41689. PubMed PMID: 28128358. Pubmed Central PMCID: 5269662.
123. Linnartz-Gerlach B, Kopatz J, Neumann H. Siglec functions of microglia. *Glycobiology*. 2014 Sep;24(9):794-9. PubMed PMID: 24833613.
 124. Macauley MS, Crocker PR, Paulson JC. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 Oct;14(10):653-66. PubMed PMID: 25234143. Pubmed Central PMCID: 4191907.
 125. Hoek RM. Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science*. 2000;290(5497):1768-71.
 126. Aguzzi A, Barres BA, Bennett ML. Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):156-61. PubMed PMID: 23307732. Pubmed Central PMCID: 4431634.
 127. Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol*. 2002 Jun;23(6):285-90. PubMed PMID: 12072366.
 128. Valente T, Serratosa J, Perpina U, Saura J, Sola C. Alterations in CD200-CD200R1 System during EAE Already Manifest at Presymptomatic Stages. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:129. PubMed PMID: 28522962. Pubmed Central PMCID: 5415594.
 129. Gitik M, Liraz-Zaltsman S, Oldenborg PA, Reichert F, Rotshenker S. Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRPalpha (signal regulatory protein-alpha) on phagocytes. *Journal of neuroinflammation*. 2011 Mar 15;8:24. PubMed PMID: 21401967. Pubmed Central PMCID: 3068094.
 130. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, et al. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*. 2003;102(4):1186-95.
 131. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*. 2009 Nov 20;31(5):711-21. PubMed PMID: 19836265. Pubmed Central PMCID: 2787682.
 132. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 2006 06/18/online;9:917.
 133. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*. 2007 Oct;30(10):527-35. PubMed PMID: 17904651.
 134. Farber K, Pannasch U, Kettenmann H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*. 2005 May;29(1):128-38. PubMed PMID: 15866053.
 135. Kuhn SA, van Landeghem Fk Fau - Zacharias R, Zacharias R Fau - Farber K, Farber K Fau - Rappert A, Rappert A Fau - Pavlovic S, Pavlovic S Fau -

- Hoffmann A, et al. Microglia express GABA(B) receptors to modulate interleukin release. (1044-7431 (Print)). eng.
136. Taylor D, Diemel L, Cuzner M, Pocock J. Activation of group II metabotropic glutamate receptors underlies microglial reactivity and neurotoxicity following stimulation with chromogranin A, a peptide up-regulated in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2002;82(5):1179-91.
 137. Taylor DL, Diemel LT, Pocock JM. Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J Neurosci*. 2003;23(6):2150-60.
 138. Johnson EA, Dao TL, Guignet MA, Geddes CE, Koemeter-Cox AI, Kan RK. Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1alpha by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats. *Journal of neuroinflammation*. 2011 May 2;8:41. PubMed PMID: 21535896. Pubmed Central PMCID: 3104356.
 139. Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia*. 2006 Apr 1;53(5):551-6. PubMed PMID: 16374779.
 140. Clark GJ, Ju X, Tate C, Hart DN. The CD300 family of molecules are evolutionarily significant regulators of leukocyte functions. *Trends Immunol*. 2009 May;30(5):209-17. PubMed PMID: 19359216.
 141. Clark G, Cooper B, Fitzpatrick S, Green B, Hart D. The gene encoding the immunoregulatory signaling molecule CMRF-35A localized to human chromosome 17 in close proximity to other members of the CMRF-35 family. *HLA*. 2001;57(5):415-23.
 142. Aguilar H, Alvarez-Errico D, Garcia-Montero AC, Orfao A, Sayos J, Lopez-Botet M. Molecular characterization of a novel immune receptor restricted to the monocytic lineage. *J Immunol*. 2004 Dec 01;173(11):6703-11. PubMed PMID: 15557162.
 143. Alvarez-Errico D, Aguilar H, Kitzig F, Brckalo T, Sayos J, Lopez-Botet M. IREM-1 is a novel inhibitory receptor expressed by myeloid cells. *Eur J Immunol*. 2004 Dec;34(12):3690-701. PubMed PMID: 15549731.
 144. Clark GJ, Ju X, Azlan M, Tate C, Ding Y, Hart DN. The CD300 molecules regulate monocyte and dendritic cell functions. *Immunobiology*. 2009;214(9-10):730-6. PubMed PMID: 19592130.
 145. Niizuma K, Tahara-Hanaoka S, Noguchi E, Shibuya A. Identification and Characterization of CD300H, a New Member of the Human CD300 Immunoreceptor Family. (1083-351X (Electronic)). eng.
 146. Bustamante CD, Fledel-Alon A, Williamson S, Nielsen R, Hubisz MT, Glanowski S, et al. Natural selection on protein-coding genes in the human genome. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1153-7. PubMed PMID: 16237444.

147. Nielsen R, Bustamante C, Clark AG, Glanowski S, Sackton TB, Hubisz MJ, et al. A scan for positively selected genes in the genomes of humans and chimpanzees. *PLoS Biol.* 2005;3(6):e170.
148. Colonna M. TREMs in the immune system and beyond. *Nature Reviews Immunology.* 2003;3(6):445-53.
149. Alvarez-Errico D, Sayos J, Lopez-Botet M. The IREM-1 (CD300f) inhibitory receptor associates with the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol.* 2007 Jan 15;178(2):808-16. PubMed PMID: 17202342.
150. Borrego F. The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood.* 2013 Mar 14;121(11):1951-60. PubMed PMID: 23293083. Pubmed Central PMCID: 3596959.
151. Izawa K, Kitaura J, Yamanishi Y, Matsuoka T, Kaitani A, Sugiuchi M, et al. An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments lipopolysaccharide response through association with FcRgamma in mast cells. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):925-36. PubMed PMID: 19561101.
152. Martinez-Barriocanal A, Comas-Casellas E, Schwartz S, Jr., Martin M, Sayos J. CD300 heterocomplexes, a new and family-restricted mechanism for myeloid cell signaling regulation. *J Biol Chem.* 2010 Dec 31;285(53):41781-94. PubMed PMID: 20959446. Pubmed Central PMCID: 3009906.
153. Nakahashi-Oda C, Tahara-Hanaoka S, Shoji M, Okoshi Y, Nakano-Yokomizo T, Ohkohchi N, et al. Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. *J Exp Med.* 2012 Jul 30;209(8):1493-503. PubMed PMID: 22826299. Pubmed Central PMCID: 3409498.
154. Burakoff R, Chao S Fau - Perencevich M, Perencevich M Fau - Ying J, Ying J Fau - Friedman S, Friedman S Fau - Makrauer F, Makrauer F Fau - Odze R, et al. Blood-based biomarkers can differentiate ulcerative colitis from Crohn's disease and noninflammatory diarrhea. (1536-4844 (Electronic)). eng.
155. Speckman RA, Wright Daw JA, Helms C, Duan S, Cao L, Taillon-Miller P, et al. Novel immunoglobulin superfamily gene cluster, mapping to a region of human chromosome 17q25, linked to psoriasis susceptibility. *Hum Genet.* 2003 Jan;112(1):34-41. PubMed PMID: 12483297.
156. Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskvina V, Ivanov D, et al. Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010 Nov 15;5(11):e13950. PubMed PMID: 21085570. Pubmed Central PMCID: 2981526.
157. Chung DH, Humphrey MB, Nakamura MC, Ginzinger DG, Seaman WE, Daws MR. CMRF-35-Like Molecule-1, a Novel Mouse Myeloid Receptor, Can Inhibit Osteoclast Formation. *The Journal of Immunology.* 2003;171(12):6541-8.
158. Ejarque-Ortiz A, Sola C, Martinez-Barriocanal A, Schwartz S, Jr., Martin M, Peluffo H, et al. The Receptor CMRF35-Like Molecule-1 (CLM-1) Enhances

the Production of LPS-Induced Pro-Inflammatory Mediators during Microglial Activation. *PLoS One*. 2015;10(4):e0123928. PubMed PMID: 25927603. Pubmed Central PMCID: 4415817.

159. Choi SC, Simhadri VR, Tian L, Gil-Krzewska A, Krzewski K, Borrego F, et al. Cutting edge: mouse CD300f (CMRF-35-like molecule-1) recognizes outer membrane-exposed phosphatidylserine and can promote phagocytosis. *J Immunol*. 2011 Oct 01;187(7):3483-7. PubMed PMID: 21865548. Pubmed Central PMCID: 3178745.
160. Tian L, Choi SC, Murakami Y, Allen J, Morse HC, 3rd, Qi CF, et al. p85alpha recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nature communications*. 2014;5:3146. PubMed PMID: 24477292. Pubmed Central PMCID: 4151829.
161. Izawa K, Yamanishi Y, Maehara A, Takahashi M, Isobe M, Ito S, et al. The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity*. 2012 Nov 16;37(5):827-39. PubMed PMID: 23123064.
162. Izawa K, Isobe M, Matsukawa T, Ito S, Maehara A, Takahashi M, et al. Sphingomyelin and ceramide are physiological ligands for human LMIR3/CD300f, inhibiting FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 Jan;133(1):270-3 e1-7. PubMed PMID: 24035150.
163. Moshkovits I, Karo-Atar D, Itan M, Reichman H, Rozenberg P, Morgenstern-Ben-Baruch N, et al. CD300f associates with IL-4 receptor alpha and amplifies IL-4-induced immune cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 14;112(28):8708-13. PubMed PMID: 26124135. Pubmed Central PMCID: 4507247.
164. Simhadri VR, Andersen JF, Calvo E, Choi SC, Coligan JE, Borrego F. Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2799-809. PubMed PMID: 22302738. Pubmed Central PMCID: 3327458.
165. Bosurgi L, Cao YG, Cabeza-Cabrerizo M, Tucci A, Hughes LD, Kong Y, et al. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science*. 2017 Jun 9;356(6342):1072-6. PubMed PMID: 28495875. Pubmed Central PMCID: 5556699.
166. Tian L, Choi SC, Lee HN, Murakami Y, Qi CF, Sengottuvelu M, et al. Enhanced efferocytosis by dendritic cells underlies memory T-cell expansion and susceptibility to autoimmune disease in CD300f-deficient mice. *Cell death and differentiation*. 2016 Jun;23(6):1086-96. PubMed PMID: 26768664. Pubmed Central PMCID: 4987725.
167. Matsukawa T, Izawa K, Isobe M, Takahashi M, Maehara A, Yamanishi Y, et al. Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. *Gut*. 2016 May;65(5):777-87. PubMed PMID: 25673319. Pubmed Central PMCID: 4853571.
168. Lee HN, Tian L, Bouladoux N, Davis J, Quinones M, Belkaid Y, et al. Dendritic cells expressing immunoreceptor CD300f are critical for

- controlling chronic gut inflammation. *J Clin Invest*. 2017 May 01;127(5):1905-17. PubMed PMID: 28414292. Pubmed Central PMCID: 5409274.
169. Izawa K, Maehara A, Isobe M, Yasuda Y, Urai M, Hoshino Y, et al. Disrupting ceramide-CD300f interaction prevents septic peritonitis by stimulating neutrophil recruitment. *Sci Rep*. 2017 Jun 27;7(1):4298. PubMed PMID: 28655892. Pubmed Central PMCID: 5487349.
 170. Danik JS, Paré G, Chasman DI, Zee RY, Kwiatkowski DJ, Parker A, et al. Novel loci, including those related to Crohn disease, psoriasis, and inflammation, identified in a genome-wide association study of fibrinogen in 17 686 women. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2(2):134-41.
 171. Sabater-Lleal M, Huang J, Chasman D, Naitza S, Dehghan A, Johnson AD, et al. Multiethnic meta-analysis of genome-wide association studies in > 100 000 subjects identifies 23 fibrinogen-associated Loci but no strong evidence of a causal association between circulating fibrinogen and cardiovascular disease. *Circulation*. 2013;128(12):1310-24.
 172. Ban M, McCauley JL, Zuvich R, Baker A, Bergamaschi L, Cox M, et al. A non-synonymous SNP within membrane metalloendopeptidase-like 1 (MMEL1) is associated with multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2010;11(8):660-4.
 173. Martinez-Barriocanal A, Arcas-Garcia A, Magallon-Lorenz M, Ejarque-Ortiz A, Negro-Demontel ML, Comas-Casellas E, et al. Effect of Specific Mutations in Cd300 Complexes Formation; Potential Implication of Cd300f in Multiple Sclerosis. *Sci Rep*. 2017 Oct 19;7(1):13544. PubMed PMID: 29051512. Pubmed Central PMCID: 5648872.
 174. Moshkovits I, Shik D, Itan M, Karo-Atar D, Bernshtein B, Hershko AY, et al. CMRF35-like molecule 1 (CLM-1) regulates eosinophil homeostasis by suppressing cellular chemotaxis. *Mucosal Immunol*. 2014 Mar;7(2):292-303. PubMed PMID: 23820751.
 175. Xi H, Katschke KJ, Jr., Helmy KY, Wark PA, Kljavin N, Clark H, et al. Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory receptor CLM-1. *J Exp Med*. 2010 Jan 18;207(1):7-16. PubMed PMID: 20038601. Pubmed Central PMCID: 2812551.
 176. Kiiialainen A, Hovanes K, Paloneva J, Kopra O, Peltonen L. Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol Dis*. 2005;18(2):314-22.
 177. Peluffo H, Ali-Ruiz D, Ejarque-Ortiz A, Heras-Alvarez V, Comas-Casellas E, Martinez-Barriocanal A, et al. Overexpression of the immunoreceptor CD300f has a neuroprotective role in a model of acute brain injury. *Brain Pathol*. 2012 May;22(3):318-28. PubMed PMID: 21951326.
 178. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 2014;34(36):11929-47.
 179. Grabert K, Michael T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, et al. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional

- sensitivities to aging. *Nat Neurosci.* 2016 Mar;19(3):504-16. PubMed PMID: 26780511. Pubmed Central PMCID: 4768346.
180. Torres-Espin A, Hernandez J, Navarro X. Gene expression changes in the injured spinal cord following transplantation of mesenchymal stem cells or olfactory ensheathing cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e76141. PubMed PMID: 24146830. Pubmed Central PMCID: 3795752.
 181. Pan B, Liu Y, Yan JY, Wang Y, Yao X, Zhou HX, et al. Gene expression analysis at multiple time-points identifies key genes for nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2017;55(3):373-83.
 182. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol.* 2004;115(1):4-18.
 183. Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2013;4.
 184. Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, Clark RS, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2017 Mar;13(3):171-91. PubMed PMID: 28186177.
 185. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology.* 2008;7(8):728-41.
 186. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews.* 2007 Apr;54(1): 34-66. PubMed PMID: 17222914.
 187. Albert-Weissenberger C, Sirén A-L. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med.* 2010;2(1):16.
 188. Stein SC, Chen X-H, Sinson GP, Smith DH. Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2002;97(6):1373-7.
 189. Harhangi B, Kompanje E, Leebeek F, Maas AI. Coagulation disorders after traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien).* 2008;150(2):165-75.
 190. Bramlett HM, Dietrich WD. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *J Neurotrauma.* 2015;32(23):1834-48.
 191. Chiu W-T, Huang S-J, Tsai S-H, Lin J-W, Tsai M-D, Lin T-J, et al. The impact of time, legislation, and geography on the epidemiology of traumatic brain injury. *J Clin Neurosci.* 2007;14(10):930-5.
 192. Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2013 Apr;9(4): 231-6. PubMed PMID: 23443846.
 193. Barrios Camponovo G. Enfermedad traumática en Uruguay: aspectos epidemiológicos. *Rev Med Urug.* 1995;11(3):187-207.

194. Sánchez G, Valsangiácomo P, Trostchansky J, Machado F. Perfil epidemiológico de traumatizados graves en un hospital de agudos. *Revista Médica del Uruguay*. 2006;22(3):179-84.
195. Mez J, Daneshvar DH, Kiernan PT, Abdolmohammadi B, Alvarez VE, Huber BR, et al. Clinicopathological Evaluation of Chronic Traumatic Encephalopathy in Players of American Football. *JAMA*. 2017 Jul 25;318(4):360-70. PubMed PMID: 28742910.
196. Bruce ED, Konda S, Dean DD, Wang EW, Huang JH, Little DM. Neuroimaging and traumatic brain injury: State of the field and voids in translational knowledge. *Mol Cell Neurosci*. 2015 May;66(Pt B):103-13. PubMed PMID: 25827094.
197. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert opinion on emerging drugs*. 2009;14(1):67-84.
198. Menon DK, Maas AI. Traumatic brain injury in 2014. Progress, failures and new approaches for TBI research. *Nat Rev Neurol*. 2015 Feb;11(2):71-2. PubMed PMID: 25582447.
199. Frink M, Andruszkow H, Zeckey C, Krettek C, Hildebrand F. Experimental trauma models: an update. *BioMed Research International*. 2011;2011.
200. M R, Negro-Demontel ML, D B-O, E T, N L, Peluffo H. Thy1-YFP-H mice combined with parallel rod floor test evidence short and long-term traumatic brain injury progression. *Current protocols*. 2018.
201. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8(2):101-5. PubMed PMID: 00075198-200204000-00002.
202. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro-and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):22-30.
203. de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014;34(3):369-75.
204. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E, et al. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(15):8721-6.
205. Sinz EH, Kochanek PM, Dixon CE, Clark RS, Carcillo JA, Schiding JK, et al. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest*. 1999;104(5):647.
206. Viviani B, Boraso M, Marchetti N, Marinovich M. Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy? *Neurotoxicology*. 2014;43:10-20.
207. Garcia JH, Liu KF, Relton JK. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *The American Journal of Pathology*. 1995;147(5):1477-86. PubMed PMID: PMC1869513.

208. Zhang Z, Zhang ZY, Wu Y, Schluesener HJ. Lesional accumulation of CD163+ macrophages/microglia in rat traumatic brain injury. *Brain Res.* 2012 Jun 21;1461:102-10. PubMed PMID: 22583855.
209. CLARK RS, SCHIDING JK, KACZOROWSKI SL, MARION DW, KOCHANNEK PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma.* 1994;11(5):499-506.
210. Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Zink BJ, Gherzi-Egea JF, Chodobski A. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009 Sep;29(9):1503-16. PubMed PMID: 19471279. Pubmed Central PMCID: 2736364.
211. Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L, Hillered L, Clausen F. Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation.* 2012;9(1):17.
212. Semple BD, Bye N, Rancan M, Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Role of CCL2 (MCP-1) in Traumatic Brain Injury (TBI): Evidence from Severe TBI Patients and CCL2-/- Mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(4):769-82. PubMed PMID: 20029451.
213. Febinger HY, Thomasy HE, Pavlova MN, Ringgold KM, Barf PR, George AM, et al. Time-dependent effects of CX3CR1 in a mouse model of mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation.* 2015 Sep 02;12:154. PubMed PMID: 26329692. Pubmed Central PMCID: 4557842.
214. Gentleman S, Leclercq P, Moyes L, Graham D, Smith C, Griffin W, et al. Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *Forensic Sci Int.* 2004;146(2):97-104.
215. Frugier T, Morganti-Kossmann MC, O'Reilly D, McLean CA. In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *J Neurotrauma.* 2010;27(3):497-507.
216. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol.* 2011;70(3):374-83.
217. Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. *Brain.* 2013 Jan;136(Pt 1):28-42. PubMed PMID: 23365092. Pubmed Central PMCID: 3562078.
218. Smith C, Gentleman SM, Leclercq PD, Murray LS, Griffin WST, Graham DI, et al. The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013;39(6):654-66.
219. McClain CJ, Cohen D, Ott L, Dinarello CA, Young B. Ventricular fluid interleukin-1 activity in patients with head injury. *The Journal of laboratory and clinical medicine.* 1987;110(1):48-54.
220. Juengst SB, Kumar RG, Arenth PM, Wagner AK. Exploratory associations with Tumor Necrosis Factor- α , disinhibition and suicidal endorsement after traumatic brain injury. *Brain Behav Immun.* 2014 2014/10/01;41:134-43.

221. Koliatsos VE, Cernak I, Xu L, Song Y, Savonenko A, Crain BJ, et al. A mouse model of blast injury to brain: initial pathological, neuropathological, and behavioral characterization. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2011;70(5): 399-416.
222. Friess SH, Ichord RN, Ralston J, Ryall K, Helfaer MA, Smith C, et al. Repeated traumatic brain injury affects composite cognitive function in piglets. *J Neurotrauma*. 2009;26(7):1111-21.
223. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2013 Aug;246:35-43. PubMed PMID: 22285252. Pubmed Central PMCID: 3979341.
224. Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli T, Graham D, McLellan D. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. *Histopathology*. 1989;15(1):49-59.
225. Acarin L, González B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci*. 2000;12(10):3505-20.
226. Brody DL, Mac Donald C, Kessens CC, Yuede C, Parsadanian M, Spinner M, et al. Electromagnetic controlled cortical impact device for precise, graded experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2007 Apr;24(4): 657-73. PubMed PMID: 17439349. Pubmed Central PMCID: 2435168.
227. Negro-Demontel ML, Saccardo P, Giacomini C, Yanez-Munoz RJ, Ferrer-Miralles N, Vazquez E, et al. Comparative analysis of lentiviral vectors and modular protein nanovectors for traumatic brain injury gene therapy. *Molecular therapy Methods & clinical development*. 2014;1:14047. PubMed PMID: 26015985. Pubmed Central PMCID: 4362363.
228. d'Avila JC, Lam TI, Bingham D, Shi J, Won SJ, Kauppinen TM, et al. Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):31.
229. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*. 2012 Aug 22;32(34):11706-15. PubMed PMID: 22915113. Pubmed Central PMCID: 4461442.
230. Malatynska E, Steinbusch HW, Redkozubova O, Bolkunov A, Kubatiev A, Yeritsyan NB, et al. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: implications for modeling elderly depression. *Exp Gerontol*. 2012;47(8):552-64.
231. Rosa PB, Ribeiro CM, Bettio LE, Colla A, Lieberknecht V, Moretti M, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014;127:1-6.
232. Neis VB, Moretti M, Manosso LM, Lopes MW, Leal RB, Rodrigues ALS. Agmatine enhances antidepressant potency of MK-801 and conventional antidepressants in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2015;130:9-14.

233. Deacon RM. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc.* 2006;1(1):122.
234. Siegert E, Paul F, Rothe M, Weylandt KH. The effect of omega-3 fatty acids on central nervous system remyelination in fat-1 mice. *BMC Neurosci.* 2017 Jan 24;18(1):19. PubMed PMID: 28114887. Pubmed Central PMCID: 5259863.
235. Louveau A, Kipnis J. Dissection and immunostaining of mouse whole-mount meninges. 2015.
236. Painter MM, Atagi Y, Liu CC, Rademakers R, Xu H, Fryer JD, et al. TREM2 in CNS homeostasis and neurodegenerative disease. *Mol Neurodegener.* 2015 Sep 4;10:43. PubMed PMID: 26337043. Pubmed Central PMCID: 4560063.
237. Jay TR, Hirsch AM, Broihier ML, Miller CM, Neilson LE, Ransohoff RM, et al. Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2017 Jan 18;37(3):637-47. PubMed PMID: 28100745. Pubmed Central PMCID: 5242410.
238. Schwarz F, Pearce OM, Wang X, Samraj AN, Laubli H, Garcia JO, et al. Siglec receptors impact mammalian lifespan by modulating oxidative stress. *eLife.* 2015 Apr 07;4. PubMed PMID: 25846707. Pubmed Central PMCID: 4384638.
239. Steiner J, Bielau H, Brisch R, Danos P, Ullrich O, Mawrin C, et al. Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res.* 2008;42(2):151-7.
240. Garey L. When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J Anat.* 2010 Oct;217(4):324-33. PubMed PMID: 20408906. Pubmed Central PMCID: 2992411.
241. Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O. Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation.* 2013 Apr 1;10:43. PubMed PMID: 23547920. Pubmed Central PMCID: 3626880.
242. Schnieder TP, Trencavska I, Rosoklija G, Stankov A, Mann JJ, Smiley J, et al. Microglia of Prefrontal White Matter in Suicide. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014;73(9):880-90.
243. Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, et al. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell reports.* 2017 Jan 10;18(2):391-405. PubMed PMID: 28076784. Pubmed Central PMCID: 5263237.
244. Thundyil J, Pavlovski D, Sobey CG, Arumugam TV. Adiponectin receptor signalling in the brain. *Br J Pharmacol.* 2012 Jan;165(2):313-27. PubMed PMID: 21718299. Pubmed Central PMCID: 3268187.
245. Carrell RW, Lomas DA. Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases. *N Engl J Med.* 2002 Jan 3;346(1):45-53. PubMed PMID: 11778003.

246. Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *J Neuroinflammation*. 2015 Jun 06;12:114. PubMed PMID: 26048578. Pubmed Central PMCID: 4470063.
247. Sekio M, Seki K. Lipopolysaccharide-Induced Depressive-Like Behavior is Associated with $\alpha(1)$ -Adrenoceptor Dependent Downregulation of the Membrane GluR1 Subunit in the Mouse Medial Prefrontal Cortex and Ventral Tegmental Area. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015 12/19 02/12/ received 05/31/ revised 06/03/ accepted;18(1):pyu005. PubMed PMID: PMC4368860.
248. Izumi J, Washizuka M, Hayashi-Kuwabara Y, Yoshinaga K, Tanaka Y, Ikeda Y, et al. Evidence for a Depressive-like State Induced by Repeated Saline Injections in Fischer 344 Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997 1997/08/01/;57(4):883-8.
249. Coles JA, Myburgh E, Brewer JM, McMenamin PG. Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Prog Neurobiol*. 2017 Sep;156:107-48. PubMed PMID: 28552391.
250. Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, et al. Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *eLife*. 2017 Oct 3;6. PubMed PMID: 28971799. Pubmed Central PMCID: 5626482.
251. Bramlett HM, Dietrich WD. Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. 2007;161:125-41.
252. M R, Negro-Demontel ML, D B-O, E T, N L, Peluffo H. Thy1-YFP-H mice combined with parallel rod floor test evidence short and long-term traumatic brain injury progression. *Current protocols*.
253. Clausen F, Hånell A, Israelsson C, Hedin J, Ebendal T, Mir AK, et al. Neutralization of interleukin-1 β reduces cerebral edema and tissue loss and improves late cognitive outcome following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci*. 2011;34(1):110-23.
254. Yan EB, Hellewell SC, Bellander B-M, Agyapomaa DA, Morganti-Kossmann MC. Post-traumatic hypoxia exacerbates neurological deficit, neuroinflammation and cerebral metabolism in rats with diffuse traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):147.
255. Kamens HM, Phillips TJ, Holstein SE, Crabbe JC. Characterization of the parallel rod floor apparatus to test motor incoordination in mice. *Genes Brain Behav*. 2005 Jun;4(4):253-66. PubMed PMID: 15924557.
256. Granucci F, Petralia F, Urbano M, Citterio S, Di Tota F, Santambrogio L, et al. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood*. 2003 Oct 15;102(8):2940-7. PubMed PMID: 12842997.
257. Can I, Tahara-Hanaoka S, Hitomi K, Nakano T, Nakahashi-Oda C, Kurita N, et al. Caspase-Independent Cell Death by CD300LF (MAIR-V), an Inhibitory

- Immunoglobulin-Like Receptor on Myeloid Cells. *The Journal of Immunology*. 2007;180(1):207-13.
258. Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biol Psychiatry*.68(4):368-76.
259. Tetreault NA, Hakeem AY, Jiang S, Williams BA, Allman E, Wold BJ, et al. Microglia in the cerebral cortex in autism. *J Autism Dev Disord*. 2012;42(12):2569-84.
260. Faraco G, Park L, Anrather J, Iadecola C. Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Nov;95(11):1143-52. PubMed PMID: 28782084.
261. Polfliet MMJ, Goede PH, van Kesteren-Hendrikx EML, van Rooijen N, Dijkstra CD, van den Berg TK. A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system. *J Neuroimmunol*.116(2):188-95.
262. Holtzman DM, Bales KR, Tenkova T, Fagan AM, Parsadanian M, Sartorius LJ, et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(6):2892-7.
263. Dodart J-C, Marr RA, Koistinaho M, Gregersen BM, Malkani S, Verma IM, et al. Gene delivery of human apolipoprotein E alters brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(4):1211-6.
264. Atagi Y, Liu C-C, Painter MM, Chen X-F, Verbeeck C, Zheng H, et al. Apolipoprotein E is a ligand for triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). *J Biol Chem*. 2015;290(43):26043-50.
265. Chung WS, Verghese PB, Chakraborty C, Joung J, Hyman BT, Ulrich JD, et al. Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Sep 6;113(36):10186-91. PubMed PMID: 27559087. Pubmed Central PMCID: 5018780.
266. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*. 2017 Sep 8;23(9):1018-27. PubMed PMID: 28886007.
267. Neher JJ, Neniskyte U, Zhao J-W, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *The Journal of Immunology*. 2011;186(8):4973-83.
268. Neher JJ, Neniskyte U, Hornik T, Brown GC. Inhibition of UDP/P2Y6 purinergic signaling prevents phagocytosis of viable neurons by activated microglia in vitro and in vivo. *Glia*. 2014 Sep;62(9):1463-75. PubMed PMID: 24838858. Pubmed Central PMCID: 4336556.
269. Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 2013 Mar 6;33(10):4216-33. PubMed PMID: 23467340. Pubmed Central PMCID: 3711552.

270. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 1992;176(1):287.
271. Katz P, Yelin E. Prevalence and correlates of depressive symptoms among persons with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 1993;20(5):790-6.
272. Zellweger MJ, Osterwalder RH, Langewitz W, Pfisterer ME. Coronary artery disease and depression. *Eur Heart J*. 2004;25(1):3-9.
273. Capuron L, Ravaut A, Dantzer R. Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy. *J Clin Oncol*. 2000;18(10):2143-51.
274. Bonaccorso S, Marino V, Puzella A, Pasquini M, Biondi M, Artini M, et al. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon- α -based immunotherapy are related to interferon- α -induced changes in the serotonergic system. *J Clin Psychopharmacol*. 2002;22(1): 86-90.
275. Kaufmann FN, Costa AP, Ghisleni G, Diaz AP, Rodrigues ALS, Peluffo H, et al. NLRP3 inflammasome-driven pathways in depression: clinical and preclinical findings. *Brain Behav Immun*. 2017;64:367-83.
276. Estes ML, McAllister AK. Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol*. 2014 Nov;24(6): 623-30. PubMed PMID: 25345893. Pubmed Central PMCID: 4365495.
277. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biol Psychiatry*.67(5): 446-57.
278. Chourbaji S, Urani A, Inta I, Sanchis-Segura C, Brandwein C, Zink M, et al. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis*. 2006 2006/09/01;23(3):587-94.
279. Raber J, O'shea RD, Bloom FE, Campbell IL. Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function by transgenic expression of interleukin-6 in the CNS of mice. *J Neurosci*. 1997;17(24):9473-80.
280. Bellinger F, Madamba S, Campbell I, Siggins G. Reduced long-term potentiation in the dentate gyrus of transgenic mice with cerebral overexpression of interleukin-6. *Neurosci Lett*. 1995;198(2):95-8.
281. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of stress*. 2017 Feb;6:78-93. PubMed PMID: 28229111. Pubmed Central PMCID: 5314424.
282. Tynan RJ, Naicker S, Hinwood M, Nalivaiko E, Buller KM, Pow DV, et al. Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun*. 2010 Oct;24(7): 1058-68. PubMed PMID: 20153418.
283. Shiba E, Izawa K, Kaitani A, Isobe M, Maehara A, Uchida K, et al. Ceramide-CD300f Binding Inhibits Lipopolysaccharide-induced Skin

- Inflammation. *J Biol Chem*. 2017 Feb 17;292(7):2924-32. PubMed PMID: 28073916. Pubmed Central PMCID: 5314187.
284. Mari C, Karabiyikoglu M, Goris ML, Tait JF, Yenari MA, Blankenberg FG. Detection of focal hypoxic-ischemic injury and neuronal stress in a rodent model of unilateral MCA occlusion/reperfusion using radiolabeled annexin V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(5):733-9.
 285. Zhang ZG, Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *The lancet neurology*. 2009;8(5):491-500.
 286. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Neurorestorative treatments for traumatic brain injury. *Discov Med*. 2010;10(54):434.
 287. Cullheim S, Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain research reviews*. 2007 Aug; 55(1):89-96. PubMed PMID: 17509690.
 288. Villapol S, Byrnes KR, Symes AJ. Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2014;5:82. PubMed PMID: 24926283. Pubmed Central PMCID: 4044679.
 289. Kwilasz AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*. 2015 Sep;96(Pt A):55-69. PubMed PMID: 25446571. Pubmed Central PMCID: 5144739.
 290. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation*. 2016 Nov 24;13(1):297. PubMed PMID: 27881137. Pubmed Central PMCID: 5121946.
 291. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad ARA. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*. 2015;74(1):27-34.
 292. Gonzalez P, Peluffo H, Acarin L, Villaverde A, Gonzalez B, Castellano B. Interleukin-10 overexpression does not synergize with the neuroprotective action of RGD-containing vectors after postnatal brain excitotoxicity but modulates the main inflammatory cell responses. *J Neurosci Res*. 2012 Jan;90(1):143-59. PubMed PMID: 21922521.
 293. Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C, Eddy JA, Funk CC, Moore B, et al. IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron*. 2015 Feb 4;85(3):519-33. PubMed PMID: 25619653. Pubmed Central PMCID: 4320003.
 294. BELL MJ, KOCHANNEK PM, DOUGHTY LA, CARCILLO JA, ADELSON PD, CLARK RS, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma*. 1997;14(7):451-7.

295. Balasingam V, Yong VW. Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci*. 1996;16(9):2945-55.
296. Knoblach SM, Faden AI. Interleukin-10 improves outcome and alters proinflammatory cytokine expression after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 1998;153(1):143-51.
297. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2009;220(1):183-90.
298. Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D. Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia*. 2005 Feb;49(3):375-84. PubMed PMID: 15538754.
299. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000;164(12):6166-73.
300. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010;330(6002):362-6.
301. Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF- α . *J Neurochem*. 2007;102(3):900-12.
302. Lu D, Goussev A, Chen J, Pannu P, Li Y, Mahmood A, et al. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2004;21(1):21-32.
303. Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005;22(9):1011-7.
304. Richardson RM, Sun D, Bullock MR. Neurogenesis after traumatic brain injury. *Neurosurgery Clinics*. 2007;18(1):169-81.
305. Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Zhang Y, Qu C, Schallert T, et al. Delayed administration of erythropoietin reducing hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome following traumatic brain injury in rats: comparison of treatment with single and triple dose. *J Neurosurg*. 2010;113(3):598-608.
306. Zhang Y, Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Liu Z, Qu C, et al. Sprouting of corticospinal tract axons from the contralateral hemisphere into the denervated side of the spinal cord is associated with functional recovery in adult rat after traumatic brain injury and erythropoietin treatment. *Brain Res*. 2010;1353:249-57.
307. Meng Y, Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, Qu C, Chopp M. Dose-dependent neurorestorative effects of delayed treatment of traumatic brain injury with recombinant human erythropoietin in rats. *J Neurosurg*. 2011;115(3):550-60.

308. Xiong Y, Mahmood A, Meng Y, Zhang Y, Zhang ZG, Morris DC, et al. Treatment of traumatic brain injury with thymosin β 4 in rats. *J Neurosurg.* 2011;114(1):102-15.