



Programa de
Desarrollo de las
Ciencias Básicas



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

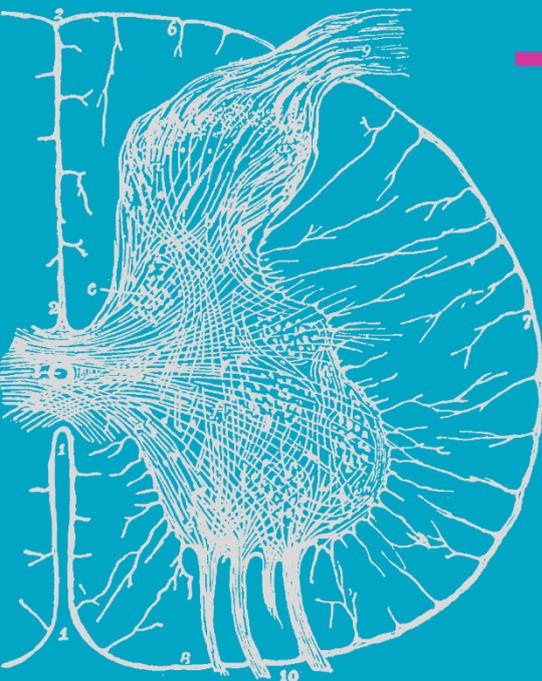


TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PEDECIBA Biología, Subárea Biología Celular y Molecular

IMPLICANCIAS DEL INMUNORECEPTOR CD300f EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA TRAS UNA LESIÓN MEDULAR POR CONTUSIÓN

Lic. Andrés Cawen

Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica
Intitut Pasteur de Montevideo



Orientadora: Dra. Natalia Lago
Co-orientador: Dr. Hugo Peluffo

Tribunal:
Dra. Cecilia Casaravilla
Dr. Raúl Russo
Dr. Ernesto Miquel

ABRIL 2023

RESUMEN

Las lesiones del Sistema Nervioso Central (SNC), y en particular las de la médula espinal (LME), constituyen un importante problema de salud pública. La limitada capacidad del SNC para regenerar axones y restituir neuronas deriva en la pérdida de funciones permanentes, con complicaciones orgánicas muy variadas.

La lesión traumática de la médula espinal se da como consecuencia de un daño físico primario agudo, con la consecuente pérdida de tejido, daño de axones y muerte de células, que termina por desencadenar una serie de eventos fisiopatológicos de daño tisular que se propaga en una segunda fase por semanas, meses, e incluso años. En esta segunda fase de lesión se continúan perdiendo estructuras y funciones mediante procesos activos de inflamación, que finalmente no se resuelven. Estos mecanismos comprenden la sobreactivación de la microglía y astrocitos residentes, así como un gran reclutamiento e infiltración de células inmunes desde la sangre al sitio de lesión, generando un microambiente proinflamatorio que termina por dañar cuerpos neuronales, axones, sinapsis y oligodendrocitos que permanecían hasta el momento sanos. La alta desmielinización que se produce en los tractos axonales de la médula espinal genera gran cantidad de restos de la mielina, compuesta por lípidos y proteínas específicas, que deben ser fagocitados, metabolizados y eliminados. Esto supone un gran desafío para las células fagocíticas como son la microglía y macrófagos, ya que la mielina se compone de membranas muy compactas difíciles de degradar y, además, es rica en colesterol. Este no puede ser degradado por las células, por lo que debe transportarse desde estos fagocitos al espacio extracelular formando parte de lipoproteínas. La inflamación se resuelve solo cuando este proceso de limpieza es culminado, permitiendo generar seguidamente un ambiente regenerativo en el que se pueda producir la remielinización.

El inmunoreceptor CD300f modula procesos inflamatorios sistémicos y participa en la fagocitosis de células apoptóticas; es expresado mayoritariamente por monocitos, microglía, neutrófilos y en menor medida por mastocitos. Se conoce que sus ligandos son de naturaleza lipídica por lo que se ha postulado que podría actuar como sensor de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), y en este sentido, desempeñaría un rol importante en los procesos de desmielinización donde se genera una sobrecarga de restos lipídicos.

En este proyecto se consideraron las implicancias de CD300f en la progresión de la patología tras la LME. En primera instancia, animales hembra carentes del receptor (CD300f KO) mostraron una peor recuperación funcional motora tras la lesión. Se analizó el tejido medular a diferentes tiempos posteriores a la misma, encontrándose en los animales CD300f KO mayor proporción de lípidos neutros acumulados en el núcleo de lesión (teñidos con Oil Red O), medidos por área ocupada en el epicentro de lesión y extensión longitudinal rostro-caudal de secciones positivas para el colorante. Este núcleo de lesión fue coincidente con la observación de una mayor área negativa para el marcador astrocitario GFAP. A pesar de la peor recuperación funcional de los animales CD300f KO, no se encontraron diferencias en el área de mielina conservada medida por Luxol Fast Blue, ni mayor cicatriz fibrótica medida por área positiva para colágeno tipo I.

Para comprender los procesos involucrados que derivan en la mayor presencia de lípidos neutros mencionada, se estudió *in vitro* los procesos de fagocitosis y acumulación de lípidos mediante el cultivo de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM) de ratones control (WT) y CD300f KO, en presencia de restos de mielina en condiciones normales y ante diferentes estímulos, como lipopolisacárido bacteriano (LPS), IL-4 e IFN γ . Se evaluó la sobrevivencia de las células a largo plazo (24, 48 y 72 horas), observándose un comportamiento diferencial entre los diferentes tratamientos, pero no así entre los genotipos. Al evaluar la acumulación de lípidos mediante la tinción con OilRedO, y al medirlo tanto por absorbancia como por inmunofluorescencia, no se evidenciaron diferencias significativas entre los genotipos en células derivadas de animales machos. En contraste, pruebas preliminares haciendo uso de BMDM de animales tanto hembra como machos, y bajando la concentración de mielina usada, permitieron evidenciar diferentes conductas. La menor concentración de mielina resultó óptima para evidenciar diferencias en el acumulado de lípido entre los genotipos CD300f y WT, y a su vez sugirieron divergencias entre los sexos. Los BMDM derivados de hembras presentaron mayor acumulado de lípidos en condiciones control y al ser co-estimuladas con LPS, en tanto que los derivados de machos tuvieron un comportamiento contrapuesto en el co-estímulo con LPS. Estas observaciones abrieron un nuevo camino en la búsqueda de diferencias sexuales que puedan explicar lo observado tras la LME.

Al evaluar la fagocitosis por medio de incubación de los BMDM con pHrodo-mielina y microesferas fluorescentes, y el posterior análisis por citometría de flujo, no se observaron diferencias a los 30 minutos en la capacidad fagocítica general o mielina-específica, excepto por los BMDM derivados de animales machos y estimulados con LPS, que mostraron un leve descenso de células fagocitando las perlas fluorescentes.

Por otra parte, se estableció una nueva colonia de ratones «knockout» condicionales para CD300f (CD300f KOc), inducibles por Tamoxifeno (TMX). Para eso se llevó a cabo el diseño y seguimiento de la estrategia de cruce, y los genotipificados de cada camada, con el fin de obtener finalmente animales $cd300floxP/loxP:cx3cr1creERT2/+$ y sus respectivos controles $cd300floxP/loxP:cx3cr1+/+$. Se realizó además la caracterización molecular y fenotípica de estos mediante el análisis de los niveles de expresión génica por qPCR de BMDM puestos a prueba *in vitro*, y muestras de tejido de animales previamente tratados con TMX; en tanto, se realizaron pruebas comportamentales (“Splash test” con sacarosa y Laberinto elevado en cruz) en busca de conductas anhedónicas y de baja ansiedad previamente descritas para ratones hembras y machos CD300f KO, respectivamente.

Con el objetivo de poder diferenciar si lo observado tras la LME se debe a los efectos de los monocitos circulantes reclutados a la lesión o la microglía residente, se realizaron LME en los ratones CD300f KOc, tratados previamente con TMX de tal forma que CD300f no estuviera presente en la microglía y los macrófagos de barrera del SNC, pero sí en los monocitos reclutados. Se evidenció una peor recuperación funcional motora en estos animales en los primeros días luego de la lesión, tiempo en que solo estaría actuando la microglía.

En conclusión, se evidenció un vínculo entre de CD300f y los procesos de fagocitosis y degradación de lípidos en lesiones desmielinizantes del SNC; siendo el CD300f microglial importante durante los procesos inflamatorios y reparatorios, especialmente al inicio de la lesión. También sugiere posibles implicancias diferenciales sexo-dependientes en estos procesos. En resumen, estos resultados proporcionan una base para futuras investigaciones sobre el papel de CD300f en la respuesta inflamatoria en la lesión medular y podrían tener implicaciones para el desarrollo de terapias dirigidas a esta proteína.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	II
INTRODUCCIÓN	1
LA MÉDULA ESPINAL	1
<i>Estructura de la médula espinal</i>	1
Estructuras externas	1
Estructuras internas.....	3
LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN HUMANOS.....	4
TIPOS DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL	5
<i>Lesiones cervicales</i>	5
<i>Lesiones torácicas</i>	6
<i>Lesiones lumbares</i>	6
GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE.....	8
<i>Sistema inmune innato</i>	8
<i>Sistema inmune adaptativo</i>	9
NEUROINMUNOLOGÍA.....	10
FISIOPATOLOGÍA DE LA LME	11
<i>Daño primario</i>	13
<i>Daño secundario</i>	13
<i>Respuesta neuroinflamatoria</i>	14
Temporalidad de los procesos celulares y moleculares.....	14
La microglía.....	18
Macrófagos.....	21
La mielina	23
Fagocitosis y procesamiento de los restos de mielina.....	25
INMUNORECEPTORES	27
<i>La familia de inmunoreceptores CD300</i>	27
CD300f	29
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
1. MODELOS ANIMALES	34
1.1. <i>Mantenimiento de animales</i>	34
1.2. <i>Ratones CD300f «knockout» (CD300f KO)</i>	34

1.3.	<i>Generación de ratones con el gen cd300f flanqueado por sitios loxP (cd300^{flloxP/loxP})</i>	35
1.4.	<i>Establecimiento de colonia de ratones cd300f KO condicionales (CD300f KOc) y su grupo control</i>	36
2.	GENOTIPIFICACIÓN	39
2.1.	<i>Extracción y cuantificación de ADN</i>	39
2.2.	<i>PCR</i>	39
2.3.	<i>Electroforesis</i>	41
3.	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y COMPORTAMENTAL DE LOS RATONES KOc AL INDUCIR LA RECOMBINACIÓN (<i>IN VIVO</i>)	41
3.1.	<i>Evaluación de la recombinación por cuantificación de la expresión de cd300f</i>	41
3.1.1.	<i>Extracción y cuantificación de ARN</i>	43
3.1.2.	<i>Retrotranscripción</i>	43
3.1.3.	<i>PCR en tiempo real (qPCR)</i>	43
3.2.	<i>Pruebas comportamentales</i>	43
3.2.1.	<i>“Splash test” con sacarosa</i>	44
3.2.2.	<i>Laberinto elevado en cruz</i>	44
4.	CULTIVOS CELULARES DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA MÉDULA ÓSEA	44
4.1.	<i>Evaluación del sistema de recombinación Cre-lox in vitro (KOc)</i>	45
4.2.	<i>Ensayos de acumulación de lípidos (WT vs KO)</i>	46
4.2.1.	<i>Extracto de mielina de cerebros en gradiente de Percoll®</i>	46
4.2.2.	<i>Cuantificación de lípidos por absorbancia</i>	47
4.2.3.	<i>Inmunofluorescencia de células en cultivo, cuantificación de lípidos por microscopía</i>	47
4.3.	<i>Ensayos de fagocitosis (WT vs KO)</i>	48
4.3.1.	<i>Conjugación mielina-pHrodo™ Green STP ester</i>	48
5.	LESIONES DE MÉDULA ESPINAL	48
5.1.	<i>Estrategia experimental y lesiones en ratones KOc</i>	49
5.2.	<i>Evaluación de la recuperación funcional motora luego de la lesión</i>	50
6.	PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	51
6.1.	<i>Obtención del tejido</i>	51
6.2.	<i>Tinciones e inmunofluorescencia de tejidos</i>	51
6.2.1.	<i>Luxol Fast Blue (LFB)</i>	51
6.2.2.	<i>Oil Red O (ORO)</i>	52
6.2.3.	<i>Inmunofluorescencia</i>	52
7.	MICROSCOPIA	53
8.	SOFTWARE	53
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
	RESULTADOS	55
1.	EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA AUSENCIA DE CD300F <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	55

1.1.	<i>Efecto sobre la recuperación funcional motora luego de una lesión medular por contusión</i>	55
1.2.	<i>Análisis del tejido medular a los 14 y 28 días post-lesión</i>	56
1.2.1.	<i>Efecto sobre la preservación de mielina</i>	56
1.2.2.	<i>Efecto sobre la acumulación de lípidos</i>	57
1.2.3.	<i>Efecto sobre la cicatrización fibrótica y astrogliosis a los 14dpl</i>	61
1.3.	<i>Efectos sobre el metabolismo de lípidos provenientes de restos de mielina en macrófagos derivados de la médula ósea</i>	63
1.4.	<i>Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos derivados de la médula ósea</i>	70
2.	ESTABLECIMIENTO DE LA COLONIA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES KOC	72
2.1.	<i>Genotipificación de camadas</i>	72
2.2.	<i>Análisis in vitro de la expresión de CD300f luego de inducir la recombinación en macrófagos derivados de la médula ósea</i>	73
2.3.	<i>Análisis de la expresión de CD300f en diferentes órganos a las cuatro semanas de inducir la recombinación (in vivo)</i>	74
2.4.	<i>Efectos comportamentales posteriores a inducir la recombinación</i>	76
3.	CONSECUENCIAS DE LA ELIMINACIÓN DE CD300F DE LA MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS DE BARRERA	77
3.1.	<i>Efecto sobre la recuperación funcional motora de ratones CD300f KOc</i>	77
3.2.	<i>Análisis de ORO en el tejido medular a los 28 días post-lesión</i>	79
	DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS	80
	CONCLUSIONES	90
	AGRADECIMIENTOS	91
	BIBLIOGRAFÍA	93

INTRODUCCIÓN

LA MÉDULA ESPINAL

Este órgano conforma en conjunto con el encéfalo el SNC, mientras que los ganglios de la raíz dorsal, los plexos y los nervios periféricos conforman el Sistema Nervioso Periférico (SNP). La médula espinal conecta entonces el encéfalo con el SNP, actuando como una vía por la cual la información viaja en ambos sentidos, teniendo un rol fundamental en el movimiento, percepciones y movimientos autonómicos. Más precisamente, la médula espinal se encarga de transmitir las señales motoras desde la corteza cerebral a los músculos o glándulas, para ejecutar acciones; retorna información sensorial desde las distintas partes del cuerpo, para que sean procesadas; y además coordina muchas respuestas de acto reflejo ante ciertos estímulos (Bican et al., 2013).

Estructura de la médula espinal

La organización de la médula espinal es muy compleja, pero puede ser separada anatómicamente en estructuras externas e internas, con características estructurales y funcionales bien definidas (**Figura 1**).

Estructuras externas

La médula espinal como tal tiene comienzo en el hueso occipital y se extiende por la parte dorsal del cuerpo a través de la columna vertebral. En humanos su ancho varía entre los 13.5 mm de grosor en la región cervical a 8.3 mm en la región torácica. Su forma es mayoritariamente ovalada y presenta en su superficie un surco central longitudinal profundo llamado fisura media anterior (Bican et al., 2013; Cho, 2015).

La columna vertebral, compuesta por segmentos separados (vértebras), da protección y sostén a la médula espinal que discurre por el interior del canal conformado por los agujeros raquídeos de las vértebras (**Figura 1B**). La columna vertebral humana se compone de 31 vértebras, 8 cervicales, 12 torácicas, 5 lumbares, 5 sacras y 1 coccígea. A través de los estrechos espacios que quedan entre ellas pasan los nervios, emergiendo de cada lado de estos segmentos dos raíces nerviosas conteniendo fibras motoras y sensoriales, que van a conectar el resto del cuerpo (Bican et al., 2013; Cho, 2015).

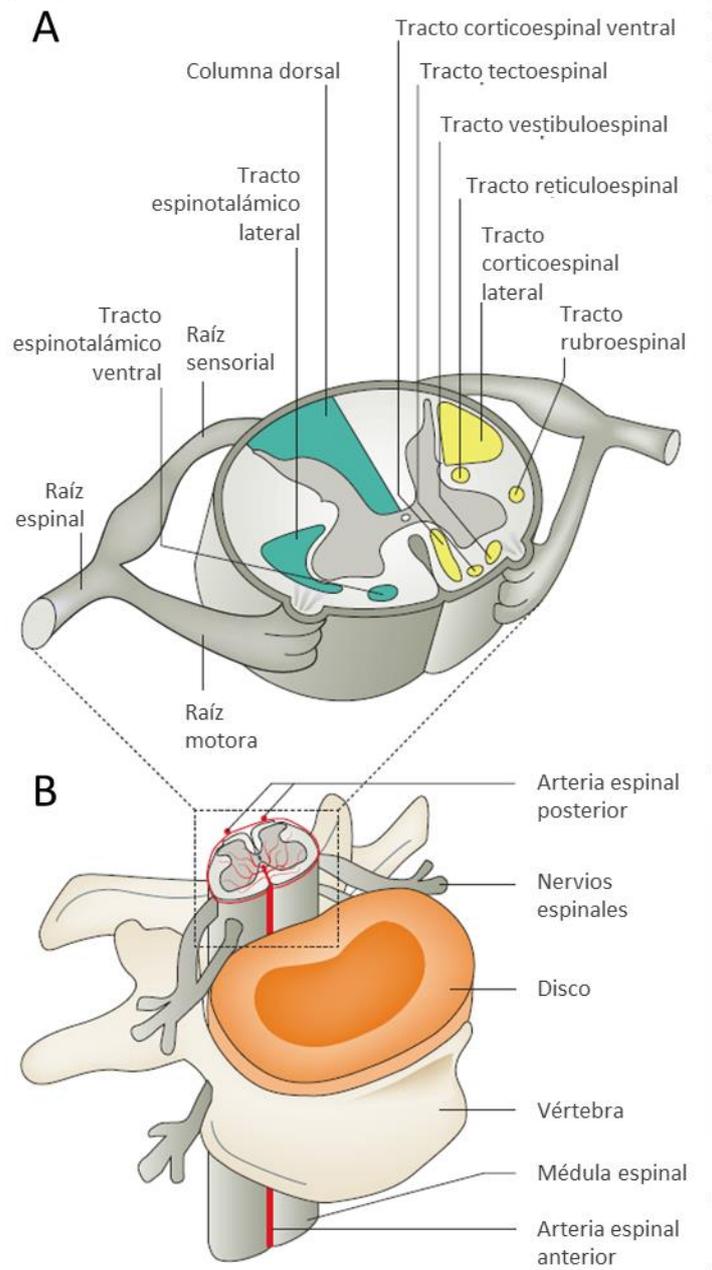


Figura 1. Estructura de la médula espinal y la columna vertebral. A, Estructuras y organización interna de la médula espinal. Se muestran los principales tractos motores descendientes en amarillo y los principales tractos sensoriales en verde. **B,** Estructuras y organización externa. Se aprecia una vértebra y la disposición de la médula y nervios respecto a esta. Imagen tomada y adaptada de Ahuja et al., 2017

Además, la médula espinal se encuentra contenida en un tubo de membranas que también cumplen función de protección. Estas membranas reciben el nombre de meninges y se componen por la piamadre, la aracnoides y la duramadre. Cada membrana se encuentra separada de la otra por el espacio subdural (aracnoides – duramadre) y el espacio subaracnoideo (piamadre – aracnoides). Sin embargo, ha sido descrita muy recientemente una cuarta capa de meninges, denominada membrana linfática subaracnoidea (SLYM, por sus singlas en inglés

subarachnoid lymphatic-like membrane), que estaría dividiendo el espacio subaracnoideo en dos (Møllgård et al., 2023). Se ha descrito a esta cuarta capa morfológica e inmunofenotípicamente similar a la membrana mesotelial, con características funcionales relacionadas al intercambio directo entre el líquido cefalorraquídeo y la sangre venosa, conteniendo al mismo tiempo gran número de células mieloides responsables de la vigilancia inmunológica del SNC (Møllgård et al., 2023). En el mismo sentido, otra reciente investigación ha publicado hallazgos novedosos respecto a la función de los macrófagos residentes cercanos al parénquima del SNC, han sido denominados como PBMs (por las siglas en inglés de *parenchymal border macrophages*) y según describen los autores, estarían directamente implicados en la dinámica del flujo de líquido cefalorraquídeo y mantenimiento de la homeostasis (Drieu et al., 2022). El líquido cefalorraquídeo, que cumple funciones de nutrición y regulación del SNC, del mantenimiento de la presión interna, eliminación y transporte de sustancias y de amortiguación, brindando soporte hidroneumático; había sido ubicado hasta ahora en el espacio subaracnoideo (Bican et al., 2013), no obstante, la nueva evidencia hace que sea necesaria una redefinición en la organización y función de las barreras inmunitarias y del transporte de fluidos en el SNC para incluir así a la SLYM (Møllgård et al., 2023). Estos últimos hallazgos dan cuenta de un interés creciente en los últimos años, por el conocimiento y comprensión de las implicancias de estas membranas y las células inmunes allí residentes en las alteraciones y afecciones del SNC, que habían sido poco consideradas hasta el momento.

Estructuras internas

Internamente, al realizar un corte transversal de la médula espinal se pueden diferenciar claramente dos estructuras, la sustancia gris rodeada por la sustancia blanca (**Figura 1A**).

La sustancia gris se localiza hacia el centro y adopta una forma característica que recuerda a la letra H o a una mariposa, aunque esta puede variar según el nivel en que nos encontremos. Se la puede dividir en partes dorsales y ventrales, los brazos proyectados dorsalmente reciben el nombre de astas dorsales, en tanto que los proyectados ventralmente reciben el nombre de astas ventrales. Las regiones intermedias que conectan estas proyecciones son llamadas sustancia gris intermedia. En el centro de esta se encuentra el canal central, que corre longitudinalmente, se encuentra lleno con líquido cefalorraquídeo y rodeado por células ependimarias (Cho, 2015). Microscópicamente, en la sustancia gris podemos encontrar los cuerpos neuronales, las dendritas, axones y las células gliales. Internamente, ha sido dividida en base a su apariencia microscópica en diez capas sucesivas, llamadas láminas de Rexed, compuesta cada una por diferentes tipos de neuronas (Cho, 2015). Las astas ventrales contienen neuronas motoras e interneuronas, mientras que las astas dorsales contienen neuronas

sensoriales secundarias e interneuronas que reciben información de los ganglios de la raíz dorsal (neuronas sensoriales primarias).

La sustancia gris divide a la sustancia blanca en la columna posterior, lateral y anterior. Se compone de los axones proyectados por las diversas neuronas, y se organiza en forma de conjuntos de fibras nerviosas que reciben el nombre de tractos. Los tractos de sustancia blanca se clasifican en ascendentes (envía información sensorial) o descendentes (envían información para el movimiento motor). Los tractos ascendentes más prominentes son el tracto espinotalámico (envía información sobre dolor, temperatura y tacto grueso), el tracto espinocerebeloso (información de los músculos y articulaciones) y la vía formada por el lemnisco medial de la columna posterior (vibración, propiocepción y tacto fino); en tanto, el tracto descendente más prominentes es el tracto corticoespinal piramidal, que pasa ininterrumpidamente desde la corteza motora hasta el asta anterior (Bican et al., 2013; Cho, 2015).

LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL EN HUMANOS

Las lesiones del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen un importante problema de salud pública, su incidencia y prevalencia varía de país a país, en tanto que este tipo de pacientes tiene mejor pronóstico de supervivencia en las regiones desarrolladas. Paradójicamente, los países con mayor incidencia de lesiones de médula espinal son aquellos de bajos ingresos o en vías de desarrollo (**Figura 2**); según las últimas estimaciones la incidencia solo de las lesiones traumáticas de médula espinal para América Latina se encuentra en casi unos 80 mil casos al año (Kumar et al., 2018; Ding et al., 2022), al tiempo que a escala global han sido estimados 0.9 millones de casos incidentes y 20.6 millones de casos prevalentes en el 2019 (Ding et al., 2022).

Este tipo de lesiones ocasionan grandes gastos en los sistemas de salud y seguridad social, tienen un fuerte impacto en la calidad y esperanza de vida del paciente, y las deficiencias en los sistemas de salud impiden la correcta rehabilitación e incluso la reinserción social del mismo. El costo directo a lo largo de la vida del paciente, asociados a los cuidados y pérdida de ingresos, varía entre los 500.000 y 2 millones de dólares a lo largo de la vida de este. Existe una distribución bimodal respecto a la edad de incidencia, habiendo un primer pico en torno a los 30 años, siendo la mayoría hombres, y un segundo pico en mayores de 65 años, con un aumento en el número de mujeres (Singh et al., 2014; Hamid et al., 2018). La principal causa de trauma de médula espinal son los accidentes de tránsito, y en menor proporción los accidentes laborales o domésticos, deportes o actividades recreativas (Singh et al., 2014).

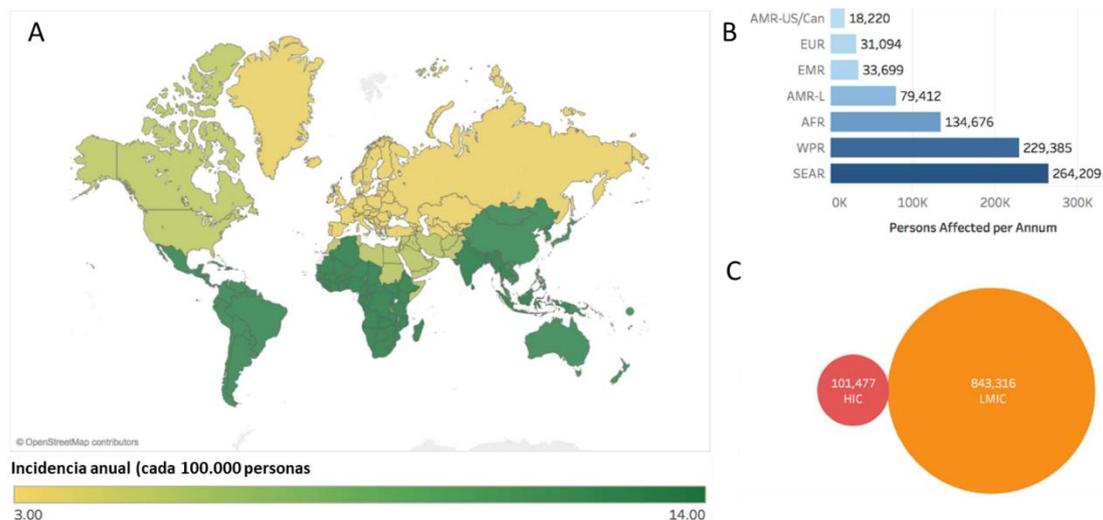


Figura 2. Incidencia de lesiones traumáticas a la médula espinal según las regiones determinadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). América latina se encuentra entre las regiones con mayor incidencia anual. **A,** Mapa de la incidencia anual de lesiones traumáticas a la médula espinal por país. **B,** Personas afectadas anualmente por lesiones traumáticas a la médula espinal en cada región según la OMS. **C,** Número de personas que tienen lesiones traumáticas de médula espinal cada año de acuerdo a los niveles de ingreso del país. Las lesiones de médula espinal ocurren en mayor proporción en países de bajos y medianos ingresos (LMIC) que en los países de altos ingresos (HIC). Abreviaciones de las regiones: AFR: Región Africana AMR-US/Can: Región de América de Estados Unidos y Canadá; AMR-L: Región de América Latina; EMR: Región Mediterránea del Este; EUR: Región Europea; SEAR: Región del Sudeste Asiático; WPR: Región del Este del Pacífico. Figura tomada y adaptada de Kumar et al., 2018

TIPOS DE LESIÓN DE MÉDULA ESPINAL

La lesión de la médula espinal (LME) puede ocasionar afecciones y complicaciones muy variadas, dependiendo de la altura en que se da y la severidad de esta; explicándose el patrón de pérdidas senso-motoras observado en los pacientes con el síndrome de LME, por la afectación de tractos específicos de la médula sin afectar a otros (Ahuja et al., 2017). A grandes rasgos, una lesión a nivel cervical puede causar tetraplejía (parálisis total o parcial de los miembros superiores e inferiores y el torso), o si ocurre a nivel torácico o lumbar puede causar paraplejía (parálisis total o parcial de los miembros inferiores). La forma más generalizada y usada para clasificar las LME se ha basado históricamente en el nivel de la médula en el que se da el daño (**Figura 3**). De acuerdo con esto, las lesiones pueden ser clasificadas en los siguientes tipos:

Lesiones cervicales

Es el tipo más común de lesión medular severa y deriva en tetraplejía. Los pacientes que presentan lesiones cervicales altas (C1-C4) tienen dificultad para respirar por sus propios medios, realizar la digestión, controlar la vejiga e incluso se puede ver afectada el habla. En tanto, los pacientes con lesiones cervicales bajas (C4-C5) si bien pueden respirar y hablar por sus propios medios, tienen limitado control de sus extremidades superiores. Ambos tipos de paciente

requieren en mayor o menor medida asistencia de por vida para las actividades cotidianas, aunque los últimos pueden muchas veces moverse de un lugar a otro de forma independiente si cuentan con una silla de ruedas eléctrica (Nas et al., 2015).

Lesiones torácicas

Este tipo de lesiones resulta en paraplejias, afectando el tronco y los miembros inferiores. Los pacientes con lesiones torácicas altas (T1-T5) pueden no tener el control de los músculos abdominales y el equilibrio del tronco, en tanto que aquellos con lesiones torácicas bajas (T6-T12) pueden tener control sobre el equilibrio del tronco y algo de control sobre el intestino y la vejiga (Nas et al., 2015).

Lesiones lumbares

Resultan en pérdida de alguna función de las caderas y piernas. Son pacientes con buen pronóstico que pueden moverse por sus propios medios en distancias cortas, valiéndose de algún dispositivo que le ayude en la marcha (Nas et al., 2015).

Hacia comienzos del milenio, la Sociedad Americana de Lesión Espinal desarrolló la escala ASIA (por sus siglas en inglés *American Spinal Injury Association*) que tiene en cuenta la preservación de funciones tanto motoras como sensoriales para la clasificación de los pacientes (Thuret et al., 2006; Burns et al., 2012). Adicionalmente, esta escala tiene también en cuenta la severidad de la lesión y sus consecuencias. Catalogando a las lesiones como: de tipo completa, donde existe una desconexión total de las fibras, por lo que se da una pérdida total de la función sensorial y motora; lesiones de tipo incompleta, donde se preserva un porcentaje de fibras que permiten la permanencia de funciones sensoriales y/o motoras (Burns et al., 2012; Ahuja et al., 2017).

En este sentido, en las últimas décadas se realizaron avances significativos para el diagnóstico y clasificación de estos pacientes, lográndose desarrollar un Estándar Internacional para la Clasificación Neurológica de la Lesión de Médula Espinal (ISNCSCI, por las siglas en inglés de *International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury*) al que se le realizan revisiones para la incorporación de nuevos avances (Burns et al., 2012; ASIA-ISCOS, 2019; ASIA-ISCOS ISNCSCI worksheet, 2019).

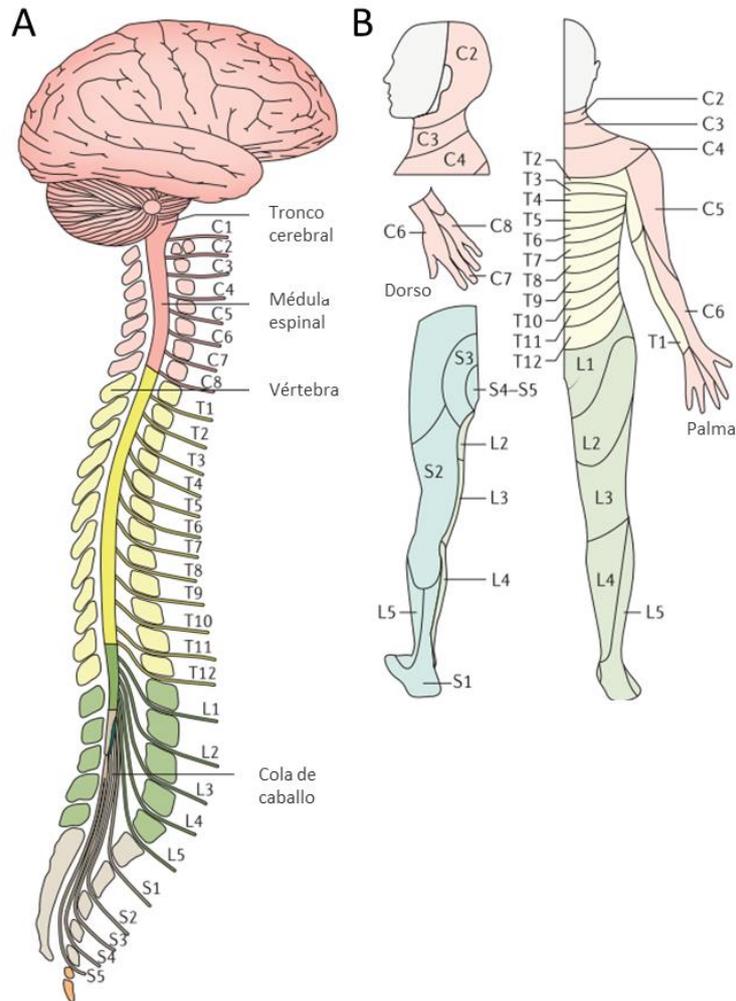


Figura 3. Inervación de la médula espinal hacia las distintas zonas del cuerpo. A, Disposición y salida de los nervios desde la médula espinal. Se distinguen nervios afectados en lesiones cervicales (rosado), torácicos (amarillo) y lumbares (verde) **B,** Se muestra la posible área corporal afectada tras los diferentes tipos de lesión y daño de nervios. Imagen tomada y adaptada de Ahuja et al., 2017

Entre las heterogeneidad de comorbilidades que puede ocasionar la LME se encuentran la disfunción de la vejiga y/o intestinos, problemas respiratorios y gastrointestinales, hiperreflexia autonómica, disfunción sexual, lesión hepatocelular, infecciones del tracto urinario, dolor neuropático y afecciones psicológicas (Campanella et al., 2002; Saghazadeh and Rezaei, 2017; Guest et al., 2022). En el pasado, la principal causa de muerte asociada a los pacientes con LME estaba mayormente dada por insuficiencia renal; sin embargo, la mejora del tratamiento urológico ha cambiado esto y en la actualidad, la embolia pulmonar, la neumonía y la septicemia la sustituyen como causa de muerte (Hamid et al., 2018). Aunque la supervivencia de los pacientes con LME ha mejorado en las últimas décadas, aún continúa teniendo índices altos de mortalidad. Se estima que entre un 4 y 17% de los pacientes mueren durante la internación hospitalaria; y luego de salir del centro de salud, 3.8% de los pacientes mueren en el primer año y 1.6% en el segundo año (Ahuja et al., 2017).

Si bien algunos pacientes logran mostrar una recuperación espontánea luego de la lesión, la mayoría presenta afecciones de manera permanente. La limitada capacidad del SNC de mamíferos adultos para regenerar axones dañados y restituir neuronas perdidas es lo que deriva en la pérdida permanente de funciones motoras, sensoriales y autonómicas por debajo del nivel de la lesión (David et al., 2012).

GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune lleva a cabo la vigilancia inmunológica en todo el organismo y ejecuta respuestas organizadas ante diferentes patógenos, insultos en la homeostasis corporal y para la cicatrización de heridas tras lesiones. Estas respuestas se efectúan por medio de células y mecanismos de manera coordinada; dividiéndose en dos ramas con características y funciones diferenciadas, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo.

Sistema inmune innato

La inmunidad innata se caracteriza por ser una respuesta rápida, de manera no específica y con capacidad limitada de reconocer antígenos. Actúa cuando se han atravesado las primeras barreras de defensas físicas y químicas del organismo como la piel, mucosas, saliva, ácidos estomacales, etc. Se compone de una variedad de moléculas y tipos celulares, entre las que se encuentran macrófagos, células dendríticas, granulocitos (basófilos, eosinófilos, mastocitos y neutrófilos) y células NK (Murphy et al., 2008). Estas células cuentan con una amplia gama de receptores de reconocimiento de patrones (PPRs) con los que censan el ambiente en búsqueda de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que puedan comprometer la homeostasis corporal. Entre estos receptores se encuentran los NLRs (*NOD-Like receptors*), TLR (*Toll-Like Receptors*) y aquellos que son expresados principalmente en la membrana celular y le confieren un inmuno-fenotipo característico. Ante la activación de alguno de estos se da respuesta activando cascadas de señalización intracelulares con diferentes efectos, pudiendo liberar citoquinas y quimioquinas, a través de las cuales se amplifica la respuesta reclutando otras células inmunes, promoviendo señalizaciones intercelulares en el sitio donde se localizan y/o a través del sistema circulatorio de manera distal. Dependiendo del insulto a la homeostasis ocurrido, se activarán diferentes células en una respuesta a este. Las células inmunes innatas más importantes son, como fue mencionado antes, los leucocitos polimorfonucleares, los monocitos, células dendríticas y células NK. Entre estos, los neutrófilos son los principales intervinientes en la respuesta, engullendo los cuerpos extraños para su posterior degradación por enzimas líticas. Los monocitos son reclutados rápidamente hacia el sitio de infección o daño y se diferencian a

macrófagos o células dendríticas, fagocitando patógenos o restos celulares para su eliminación. Asimismo, estas células pueden actuar como presentadoras de antígenos (APCs, por *antigen-presenting cells*) al procesar grandes moléculas y hacerlas reconocibles, en pequeños fragmentos o antígenos, por parte del sistema inmune adaptativo (Murphy et al., 2008).

Otro elemento importante de la inmunidad innata es el sistema de complemento, compuesto por una familia de proteínas con roles diversos, como ser la señalización proinflamatoria, marcaje de células o estructuras para que sean fagocitadas (opsonización) o la activación de la vía lítica, que puede por medio de diversas proteínas conformar complejos de ataque a membrana, para causar daño directo (Murphy et al., 2008).

En suma, estos elementos confieren al sistema inmune innato de un amplio y rápido repertorio de estrategias defensivas moleculares y celulares ante patógenos y daños tisulares, además de participar directamente en el remodelado del tejido y cicatrización luego de las lesiones (Murphy et al., 2008).

Sistema inmune adaptativo

Frecuentemente la respuesta inmune innata no es suficiente y termina por desatar la activación del sistema inmune adaptativo, que orchestra una respuesta especializada y a medida para cada patógeno o injuria. Se diferencian dos tipos de respuesta: celular y humoral, implicando la activación y expansión de dos tipos celulares, los linfocitos T y los linfocitos B, respectivamente. La inmunidad adaptativa confiere al organismo de cierto mecanismo de “memoria” al mantenerse una fracción de los linfocitos activados como células de memoria. (Murphy et al., 2008).

Los linfocitos T reciben su nombre debido a que maduran en el Timo desde los timocitos. Se caracterizan por expresar una serie de receptores específicos (TCR, por *T cell receptors*) que reconocen antígenos cuando son presentados como péptidos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos T median diversas funciones dependiendo del subtipo. Los CD8+ y CD4+ reconocen antígenos peptídicos que se muestran en el MHC y pueden tener funciones citotóxicas, colaboradoras o reguladoras. Por otro lado, los linfocitos B maduran en los tejidos hematopoyéticos. En respuesta al reconocimiento del antígeno por parte de un único receptor de las células B (BCR) y la colaboración de los linfocitos T, inician la proliferación y diferenciación hacia células B plasmáticas que secretan inmunoglobulinas: glicoproteínas que reconocen antígenos específicos y son la forma secretadas del BCR. Estos actuarán cubriendo la superficie del patógeno y pueden neutralizarlo, al evitar su unión a otras células; opsonizarlo, al crear una señal para la destrucción de este por parte de otras células inmunes como los

neutrófilos, que lo fagocitarán; o activar el sistema de complemento, que dará inicio a una cascada de señalización que terminará por lisarlo (Murphy et al., 2008).

NEUROINMUNOLOGÍA

Las particularidades del SNC han llevado a que sea considerado durante mucho tiempo como un sistema inmuno-privilegiado al tener características diferentes al resto del cuerpo. En cierta medida, esto es así debido a que se encuentra compartimentalizado por la barrera hematoencefálica (BHE), que separa el parénquima nervioso del sistema vascular, permitiendo el pasaje selectivo de sustancias y células desde la sangre al SNC y viceversa. En condiciones normales, la única célula de tipo inmune que reside dentro del tejido nervioso es la microglía, representando un tipo inusual de fagocito mononuclear, con características singulares que serán descritas en profundidad más adelante. En procesos neuroinflamatorios, se da la activación de las células inmunes residentes y se altera la permeabilidad de la BHE, lo que termina por permitir la infiltración hacia el parénquima de células periféricas como monocitos, neutrófilos y linfocitos (Hellenbrand et al., 2021).

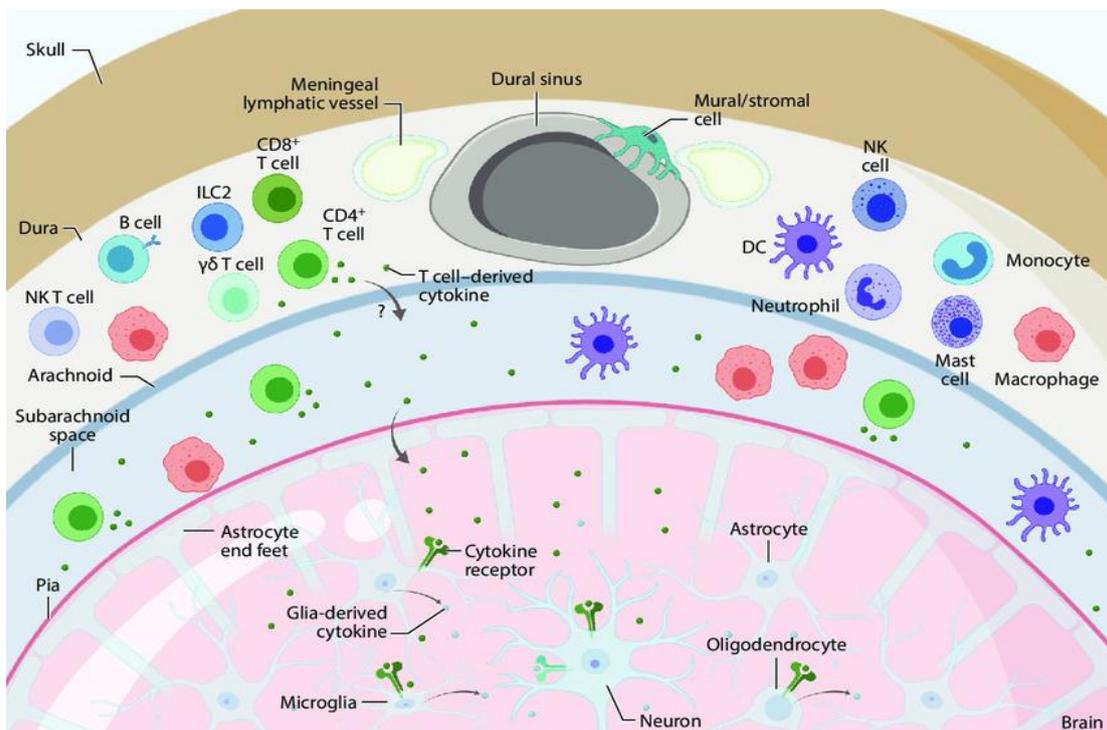


Figura 4. La inmunidad meníngea y su composición celular. Las meninges en estado estacionario albergan una amplia diversidad de células inmunitarias, cuya mayor heterogeneidad se encuentra en la duramadre. Aunque la duramadre no está directamente en contacto con el parénquima cerebral, las citoquinas derivadas de las células T durales pueden modular la actividad neuronal; sin embargo, sigue sin estar claro cómo pueden penetrar las citoquinas en la aracnoides para acceder al líquido cefalorraquídeo (LCR). Una vez en el LCR, es probable que las citoquinas accedan al parénquima cerebral a través de vías paravasculares y puedan activar neuronas por medio de la señalización directa de receptores de citoquinas o a través de otras vías indirectas. En las vías indirectas, las citoquinas son reconocidas por células de la glía (astrocitos, microglía, células precursoras de oligodendrocitos y oligodendrocitos), que a su vez liberan citoquinas capaces de modular la función de las neuronas. Abreviaturas: LCR, líquido cefalorraquídeo; DC, célula dendrítica; ILC2, célula linfoide innata de tipo 2; NK, natural killer. Imagen tomada y adaptada de Alves De Lima et al., 2020.

Sin embargo, en los últimos años la consideración de inmuno-privilegio del SNC ha sido cuestionada. El avance en las investigaciones ha demostrado que, si bien existe el aislamiento antes mencionado, circundante al parénquima nervioso se da la presencia de varias células inmunes que residen en las meninges (Herz et al., 2017; Alves De Lima et al., 2020), incluso en las leptomeninges (Dempsey, 2022) (**Figura 4**) y más recientemente en la novel descrita SLYM (Møllgård et al., 2023), que constituyen en conjunto un nicho para la vigilancia inmunológica del SNC. Asimismo, se ha evidenciado que citoquinas u otras moléculas provenientes de la periferia son capaces de atravesar la BHE y modular la actividad neuronal y/o glial; un claro ejemplo ha sido el denominado «sickness behavior» (comportamiento de enfermedad), que se da como consecuencia de la respuesta del SNC a las citoquinas liberadas periféricamente por las células inmunitarias y los macrófagos residentes en los tejidos al detectar PAMPs (Dantzer, 2009). Si bien estas interacciones neuroinmunes no han sido comprendidas aún en profundidad, en los últimos años han ido tomando relevancia al evidenciarse su impacto en el mantenimiento de la homeostasis, así como en la progresión y recuperación en afecciones neurodegenerativas y tras lesiones del SNC (Alves De Lima et al., 2020).

FISIOPATOLOGÍA DE LA LME

Como consecuencia de un daño físico primario agudo se da la lesión traumática de la médula espinal que puede dañar directamente los cuerpos y procesos celulares del tejido, provocando la muerte de células como neuronas y astrocitos, entre otros. Subsiguientemente se desencadenan una serie de eventos fisiopatológicos de daño tisular que se propagan en una segunda fase por semanas y meses, en la que se da un reclutamiento de células hacia el sitio de la lesión, con entrada facilitada por la ruptura de la barrera hemato-medular (BHM); y se continúan perdiendo estructuras y funciones mediante procesos activos. Estos mecanismos derivan en la destrucción de tractos axonales adicionales, así como la muerte de nuevas células y la consecuente desmielinización. Son numerosos los estudios que atribuyen a la respuesta inflamatoria como principal contribuyente al daño tisular secundario y la neuropatología crónica, dirigiendo las investigaciones a tratar de esclarecer los procesos subyacentes a la misma y como modularla para limitar los daños (David et al., 2012).

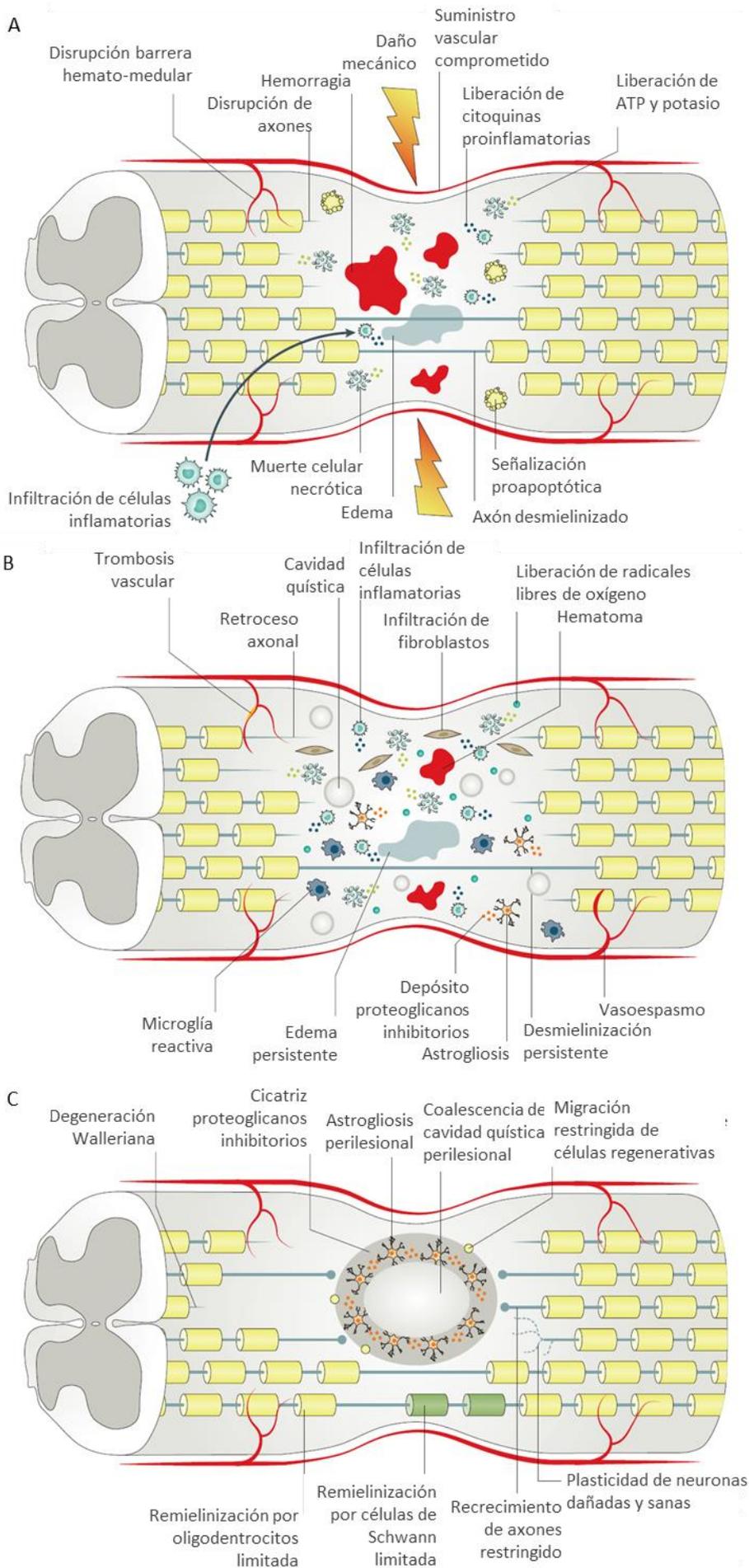


Figura 5. Fases de la lesión de médula espinal por contusión. **A,** fase aguda. Se muestran los procesos involucrados en el daño primario, como liberación de ATP, potasio y citoquinas proinflamatorias, generación de edema y hemorragias, infiltración de células inmunes desde la circulación, ruptura de axones y muerte de células por apoptosis y necrosis. **B,** Fase subaguda, se mantienen los procesos mencionados con la consecuente infiltración de más células, entre ellas neutrófilos, macrófagos y fibroblastos. Se da la astrogliosis y desmielinización de más axones. Persisten los edemas y hemorragias. **C,** Fase crónica, Formación de un núcleo de lesión definido que impide la remielinización, las células adoptan localizaciones específicas en torno a este. Imagen tomada y adaptada de Ahuja et al., 2017

Daño primario

El estado inicial inmediato al trauma se caracteriza por la rotura del tejido medular, que puede o no ir acompañada de fractura o dislocación de las vértebras. Esta primera fase se caracteriza por la destrucción del parénquima neural, disrupción de los axones, hemorragia y disrupción de la BHM (**Figura 5A**). Siendo el grado de destrucción inicial y la compresión medular los determinantes de la gravedad de la lesión. Esta serie de cambios mecánicos, bioquímicos y fisiológicos en el tejido activa una cascada de procesos que va a determinar, como ya fue indicado, el daño tisular secundario (Anjum et al., 2020).

En esta primera fase aguda del daño se da una manifestación clínica sugerente de una pérdida funcional completa producto del llamado *shock medular*, que se caracteriza por ser un estado clínico temporario, sin embargo, a nivel tisular y dependiendo de la gravedad de la lesión, pueden permanecer segmentos conectados por algunos axones que no han sido dañados, denotando un estado de lesión parcial (Ahuja et al., 2017; Couillard-Despres et al., 2017).

Daño secundario

El daño primario termina por inducir un daño secundario que se propaga rostral y caudalmente desde el epicentro de lesión mediante la generación de un ambiente excitotóxico, por concentraciones crecientes de especies reactivas de oxígeno, potasio y glutamato, acumulación de calcio, señales proapoptóticas, daño isquémico producto de la disrupción de la microvasculatura y peroxidación de ácidos grasos, entre otros; lo que termina por producir la destrucción adicional de tractos axonales que hasta ahora habían permanecido intactos, muerte y atrofia de nuevos cuerpos neuronales y oligodendrocitos, con la consecuente desmielinización de más axones (**Figura 5B-C**). Conjuntamente, la permeabilidad alterada de la BHM y la producción de hemorragia e isquemia expone a la médula a la entrada facilitada de células inmunes, citoquinas y péptidos vasoactivos, lo que termina favoreciendo cada vez más la generación de un microambiente proinflamatorio en el que se da liberación de citoquinas como la interleucina IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Anjum et al., 2020). La producción de este conjunto de patrones inflamatorios y estrés oxidativo por parte de las células inflamatorias es lo que determinará la extensión final del daño en el tejido, así como la muerte o supervivencia de neuronas cercanas o distales conectadas con el área de lesión, convirtiéndolos en promisorios blancos terapéuticos para la neuroprotección y regeneración (Alexander and Popovich, 2009).

Esta fase secundaria de daño se puede dividir en una fase aguda (0-48 hs), subaguda (primeras dos semanas) y crónica (semanas - años). En la fase aguda, se da inicio al daño secundario

descrito más arriba, caracterizado mayoritariamente por la inflamación y necrosis del tejido. Si esta fase aguda persiste, dará comienzo a la fase subaguda que se distingue por la muerte neuronal por apoptosis, desmielinización y remodelado de axones, degeneración Walleriana (Conforti et al., 2014) y formación de la cicatriz glial, conformada por astrocitos reactivos. Esta fase subaguda termina por conducir a la fase de lesión crónica de la LME (**Figura 5C**), en la que se da la formación de una cavidad quística (no observada en ratones)(Kigerl et al., 2006), retroceso de los axones y maduración de la cicatriz glial, acompañada de la formación de una cicatriz fibrótica, siendo esta última especialmente observada en ratones (Anjum et al., 2020; Guest et al., 2022).

Respuesta neuroinflamatoria

Si bien existen numerosos estudios sobre el proceso inflamatorio que se da en humanos tras la LME, los modelos animales más usados y estudiados para comprender esta patología han sido ratas y ratones. Ciertas investigaciones han mostrado la existencia de ligeras diferencias entre los sistemas inmunes adaptativos de estos organismos, denotando pequeñas variaciones en cómo se desarrollan los diferentes procesos que ocurren tras la lesión (Hellenbrand et al., 2021). En el presente trabajo se han usado ratones como modelo de estudio, por lo que, se expondrán los principales eventos descritos en la bibliografía respecto a la neuroinflamación tras la LME en estos organismos.

La neuroinflamación tras la LME consiste en interacciones multicelulares. Células como la microglía, astrocitos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T participan en reacciones inflamatorias, desempeñando cada una funciones e interacciones particulares. Esta respuesta inflamatoria ocurre por etapas, donde en primera instancia se da la migración de la microglía residente y astrocitos hacia el sitio de lesión, y el reclutamiento de neutrófilos desde la sangre; y una segunda etapa, en la que se da la migración desde la sangre de monocitos, que se diferenciarán a macrófagos (MDM, macrófagos derivados de monocitos) y linfocitos B y T (**Figura 6**).

Temporalidad de los procesos celulares y moleculares

Al producirse el insulto sobre el tejido nervioso la microglía y los macrófagos de barrera en las meninges son las primeras células que responden al detectar patrones de daño y migran rápidamente hacia el sitio de lesión.

A los 30 minutos post trauma, la microglía y astrocitos ya comienzan a expresar IL-1 β y TNF- α . Hacia la hora TNF- α continúa siendo expresado por la microglía y astrocitos, pero también por oligodendrocitos y neuronas. Entre las 4-6 horas se da un aumento significativo en los

niveles de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-6, lo que conduce a un mayor reclutamiento y proliferación de microglía y astrocitos hacia el sitio de lesión, así como de células inmunes periféricas (Hellenbrand et al., 2021). A las 4 horas se ha observado un aumento, aunque bajo, en la expresión de IL-10 (citoquina antiinflamatoria que reduce las citoquinas proinflamatorias, estimula la reparación y regeneración del tejido y la diferenciación de oligodendrocitos), que es acompañada por un aumento posterior de las citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-13 entre los días 3 y 7 (Sánchez-Ventura et al., 2019; Hellenbrand et al., 2021). Posiblemente estos niveles bajos en la expresión de citoquinas antiinflamatorias sean debido a la adopción de diferentes fenotipos funcionales por parte de la microglía/macrófagos de acuerdo al microambiente que los rodea, pero que no resulta por ser suficiente para frenar la cascada de procesos proinflamatorios.

Entre las 4-6 horas luego de la LME comienza la llegada de los neutrófilos, que constituyen el grupo de células más importante en ingresar desde la circulación al sitio de lesión, dándose el pico máximo de ingreso hacia las 24 horas, que decae rápidamente en los próximos 7 días (**Figura 6**); aunque ha sido descrito para ratones un segundo pico a los 14 días con una persistencia de estos a niveles menores por al menos 6 semanas luego de la lesión (Kigerl et al., 2006). Si bien algunos estudios muestran que producen efectos benéficos al promover la reparación del tejido y controlar la respuesta inflamatoria, por ejemplo, liberando productos que pueden actuar como factores de crecimiento y favorecer la regeneración axonal; el número excesivo de neutrófilos que llegan al sitio termina por ser perjudicial y producir mayor daño. La liberación de mediadores tóxicos como proteasas y radicales libres para esterilizar y limpiar la zona dañada tiene implicancias en el daño secundario al actuar también sobre células sanas, al mismo tiempo que liberan mediadores proinflamatorios que terminan por producir un mayor reclutamiento de MDM (David et al., 2018). La vida media de los neutrófilos una vez dentro del tejido es de aproximadamente 7 horas, tras las cuales sufren muerte celular por apoptosis y son

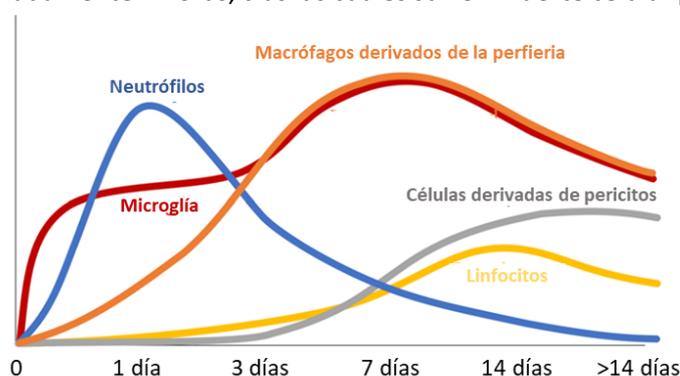


Figura 6. Se muestra la variación temporal de las poblaciones celulares que llegan al sitio de lesión. La microglía es la primera célula en responder y migrar, y se hacen indistinguibles de los macrófagos infiltrantes, alcanzando en conjunto el pico máximo al día 7 post-lesión. Los neutrófilos alcanzan su máximo en torno a las 24 horas y disminuyen gradualmente hacia el día 7-10, aunque para ratones se ha descrito un pico máximo más tardío. Los linfocitos alcanzan su máximo en niveles más bajos y tardíos. Imagen tomada y modificada de Hellenbrand et al., 2021

fagocitados por los macrófagos, en un proceso conocido como eferocitosis (Elliott et al., 2017), teniendo este proceso la capacidad de producir cambios en el estado de los MDM, llevándolos hacia un estado más antiinflamatorio (David et al., 2018).

En las primeras horas de la lesión se da aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, causando efectos oxidativos como la nitración de proteínas. Del mismo modo, ocurre también la peroxidación lipídica, proceso por el cual los radicales libres de oxígeno se unen a los ácidos grasos insaturados de las membranas, formando 4-hidroxinonal (4-HNE) y perturbando la fluidez de estas, los procesos metabólicos y el transporte de iones; pudiendo afectar directamente la integridad estructural y funcional de las neuronas por unión a sus proteínas (Nigam and Schewe, 2000). Reportes en la literatura indican que a las 3 horas ya hay un aumento significativo en la formación de 4-HNE, con un pico de concentración a las 24 horas, que se mantiene por al menos dos semanas (Xiong et al., 2007).

Hacia las 12 horas post-lesión se produce un incremento significativo de varias quimioquinas como MCP-1 (quimioatrayente de monocitos), MIP-1 α (proteína 1-alfa inflamatoria de macrófagos), RANTES (reclutadora de linfocitos T, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos y células dendríticas), GRO (atrayente y activador de neutrófilos) y CXCL1 (atrayente de neutrófilos). Por lo que, en consecuencia, al cabo de las primeras horas tras la LME son los leucocitos polimorfonucleares las principales células infiltrantes que, tras su sobre-activación, continúan causando daño en el tejido y reclutando MDM por la liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS), enzimas y quimioquinas. Los niveles de IL-1 β , TNF- α e IL-6 se mantienen elevados durante las 24 horas post-lesión por parte de la microglía/macrófagos y astrocitos, producto del alto reclutamiento y proliferación (Hellenbrand et al., 2021).

La primera semana luego de la lesión está caracterizada por un aumento significativo de las quimioquinas reclutadoras de monocitos, linfocitos T y células dendríticas. Se da, como fue mencionado, un comportamiento multifásico tiempo-dependiente en la respuesta celular, marcada por una primera fase de entrada temprana de los neutrófilos con un pico al día 1, seguida de un pico de microglía/macrófagos hacia el día 7 post-lesión, y un pico de linfocitos hacia el día 9 (Hellenbrand et al., 2021).

También durante esta primera semana se da una retracción de los axones hacia el segundo día post-lesión producto del traumatismo inicial, con una segunda fase marcada por el ingreso de los monocitos que se diferenciarán a macrófagos (Horn et al., 2008; Evans et al., 2014; Gensel and Zhang, 2015). Consecuentemente a la muerte de oligodendrocitos que se da en los primeros días post lesión, producto de los procesos de injuria primarios y secundarios mencionados,

sumado a la desmielinización posterior por retracción axónica y degeneración Walleriana (Conforti et al., 2014); se produce en la zona una sobrecarga de restos de mielina que deben ser eliminados, modulando la respuesta inflamatoria y suponiendo un gran reto para las células fagocíticas que se encargan de procesarlos (Clarner et al., 2012; Hammel et al., 2022). Se hará énfasis en en los detalles e implicancias de este proceso más adelante.

A los 5 días de la lesión, los MDM y la microglía activada son las células inflamatorias predominantes, y ya comienzan a adoptar una localización característica. Los macrófagos fagocíticos se limitan principalmente a la zona de necroptosis (en el centro de la lesión) y la microglía a los márgenes, proliferando y formando una densa interfaz protectora entre los MDM infiltrados (Wang et al., 2015a; Bellver-Landete et al., 2019) y los astrocitos reactivos en la periferia. Este proceso irá haciendo cada vez más estrecho el contacto intercelular, madurando hacia los 14 días post-lesión, hasta formar un núcleo de lesión definido y rodeado por una cicatriz glial de astrocitos reactivos (**Figura 7**); que permanece por meses. Una particularidad que se ha observado sobre todo en ratones es la infiltración de fibroblastos que se asocian con los MDM,

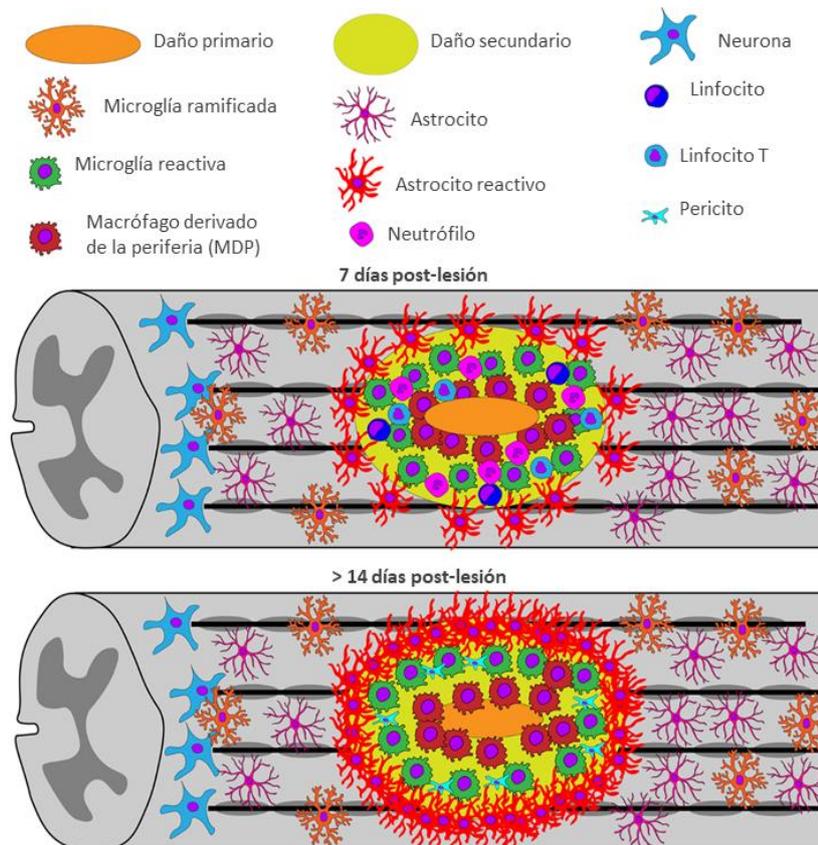


Figura 7. Diagrama de la activación/infiltración celular y formación del núcleo de lesión posterior a una LME por contusión. La microglía se activa, retrae sus procesos citoplasmáticos y se vuelve indistinguible de los PDM infiltrantes. Los astrocitos también se vuelven reactivos, retraen sus procesos citoplasmáticos y migran a la lesión. Aunque al principio los astrocitos ayudan a reparar el tejido, con el tiempo se convierten en astrocitos cicatrizantes y empiezan a cerrar la inflamación subsiguiente. La cicatriz glial final está compartimentada con células inmunitarias infiltrantes en el centro, microglía que interactúa con pericitos alrededor de los bordes y astrocitos que encapsulan todo el tejido que contiene la inflamación. Imagen tomada y modificada de Hellebrand et al., 2021.

formando una especie de matriz fibrótica de tejido en el núcleo de lesión distinguida por la presencia de colágeno tipo I y fibronectina, que se conoce como cicatriz fibrótica. Estas observaciones son sugerentes de que son estas células, ligado a una mayor infiltración de linfocitos MDM, son las responsables que no se formen cavidades quísticas en esta especie de animales (Kigerl et al., 2006; Ayazi et al., 2022), que igualmente impiden el crecimiento axonal.

La microglía

La microglía es la célula inmune residente del SNC. Comparte características con los macrófagos, pero a diferencia de los presentes en la médula luego una lesión, no provienen de la médula ósea, sino que migran tempranamente durante el desarrollo embrionario hacia el SNC desde sus progenitores eritromieloides en el saco vitelino, manteniendo su autorrenovación en el tejido nervioso durante la vida del organismo, aislada de la circulación sanguínea a menos que ocurra por alguna razón una disrupción de la BHE (Ginhoux et al., 2013).

Contrariamente a lo que se pensaba en un principio, son células muy dinámicas que se encuentran sondeando permanentemente el microambiente que las rodea (Nimmerjahn, 2012). Este censado lo hacen mediante un gran número de proyecciones de su citoplasma que extienden y retraen, que se destacan ante su soma, presentando alta expresión de un conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs) (Block et al., 2007); siendo esta morfología ramificada (**Figura 9**) característica de condiciones homeostáticas (Graeber et al., 2010).

La microglía lleva a cabo diversas funciones para asegurar el mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso, reciben constantemente multiplicidad de señales a fin de detectar cambios en el pH, citoquinas, quimioquinas, ATP, aminoácidos y variedad de compuestos que se presenten en su entorno (Nimmerjahn, 2012). En condiciones de salud participan en el crecimiento, mantenimiento y reciclado de la mielina (Hagemeyer et al., 2017; Berdowski et al., 2021; McNamara et al., 2023), se encargan de remover desechos celulares y cuerpos apoptóticos sin suscitar procesos proinflamatorios (Ransohoff and Perry, 2009) y, además, participan en el refinamiento de los circuitos neuronales podando, eliminando y colaborando en la maduración de las sinapsis (Parkhurst et al., 2013) y su recambio tanto durante el desarrollo como en el sistema nervioso adulto.

No obstante, ante la detección de un insulto que resulte nocivo, como lo es el daño del tejido provocado por un trauma y la consecuente liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), la microglía es capaz de responder rápidamente reorientando y extendiendo sus procesos hacia el sitio de lesión. Se ha descrito que la primera respuesta de estas células resulta ser protectora (Popovich et al., 2002), pero cambian rápidamente hacia un estado reactivo

proinflamatorio, con aumento en la expresión de receptores en su superficie, así como de la fagocitosis, liberando a su vez citoquinas y quimioquinas que terminan por desencadenar una cascada de acontecimientos que conducen al reclutamiento de células inmunitarias periféricas hacia el sitio de lesión (Kigerl et al., 2006). Igualmente, se ha mostrado que tienen un rol fundamental en la limpieza de la zona dañada y reciclado de los desechos generados. En este sentido, si bien se describen fallas en el correcto desarrollo de los procesos, es ampliamente aludida su participación en el procesamiento de los restos de mielina generados en distintas patologías, en pro de favorecer la posterior remielinización (Gómez-López et al., 2021; Kalafatakis and Karagogeos, 2021; Hammel et al., 2022; Quan et al., 2022). En relación con esto, recientemente se ha mostrado como su depleción fue capaz de exacerbar la desmielinización y perjudicar la remielinización en un modelo de infección viral (Sariol et al., 2020).

La microglía reactiva acaba por retraer sus proyecciones citoplasmáticas y adopta una morfología ameboide similar a la los MDM que infiltran, lo que la hace a estas poblaciones celulares difícilmente distinguibles entre sí, ya que además expresan los mismos marcadores como Iba1, CD11b, CD45, CSF1R y F4/80b (David et al., 2018). En tanto, en condiciones normales, Iba-1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule-1*) se utiliza como marcador para identificar a las células microgliales en el SNC debido a que es el único tipo celular que expresa esta proteína de superficie en condiciones de homeostasis, diferenciándose por su morfología ramificada característica de los macrófagos perivasculares (**Figura 9**).

Por el momento, si bien existen algunos trabajos que han mostrado poblaciones celulares diferenciadas por citometría de flujo, basados en la expresión diferencial de las proteínas de superficie (Campanella et al., 2002; Zhou et al., 2017; Amo-Aparicio et al., 2018); no existen marcadores celulares específicos que permitan distinguir entre microglía y MDM en condiciones de infiltración, por lo que se refiere a ellas en conjunto como “microglía/macrófagos”.

Los estados de activación fenotípicos que es capaz de adoptar la microglía han sido foco de un amplio debate durante los últimos años. Hacia comienzos de la década pasada, teniendo en cuenta las similitudes que estas células presentan con los macrófagos, los investigadores comenzaron a utilizar la misma nomenclatura usada en estos, M1-M2, para referirse a los estados proinflamatorio-antiinflamatorio. La cual no deja de ser una simplificación adoptada tras la realización de ensayos *in vitro*, con lo cual no tiene en cuenta la complejidad de influencias a la que están expuestas las células *in vivo*. Con el paso de los años y el avance de las ciencias ómicas se hicieron evidentes falencias en el uso de este enfoque reduccionista, ya que no contemplaba el amplio espectro de fenotipos que comenzaban a observarse, surgiendo así cuestionamientos hacia el empleo de esta nomenclatura para hacer referencia a los estados de

la microglía (Ransohoff, 2016). Recientemente se la ha declarado finalmente en desuso y se planteó conjuntamente la necesidad de una mejor definición y estudio de la dinámica del estado microglial, que contemple la integración multidimensional de sus estados coexistentes (Paolicelli et al., 2022). En tanto, el empleo de esta nomenclatura para referirse a los fenotipos de macrófagos no ha sido ajena a los mismos cuestionamientos (Murray et al., 2014; Ginhoux et al., 2016), pero a pesar de ello aún hoy es ampliamente utilizada con ciertos matices para referirse a los estados de éstos.

Hoy se sabe que la heterogeneidad microglial existente es dependiente del contexto en que se encuentran, resultando los términos usados para definirlos en su conjunto poco informativos si no se precisa el contexto y la función tomada por la célula. La microglía puede adoptar diferentes perfiles moleculares y morfológicos espacio temporales, que además dependen de la edad y sexo del organismo, señales locales del SNC y provenientes de la periferia, conjuntamente al estado fisiopatológico del SNC y del organismo en general. En este sentido, se ha planteado que probablemente los estados microgliales que en ciertos contextos resultan beneficiosos pueden resultar perjudiciales en otros (Paolicelli et al., 2022).

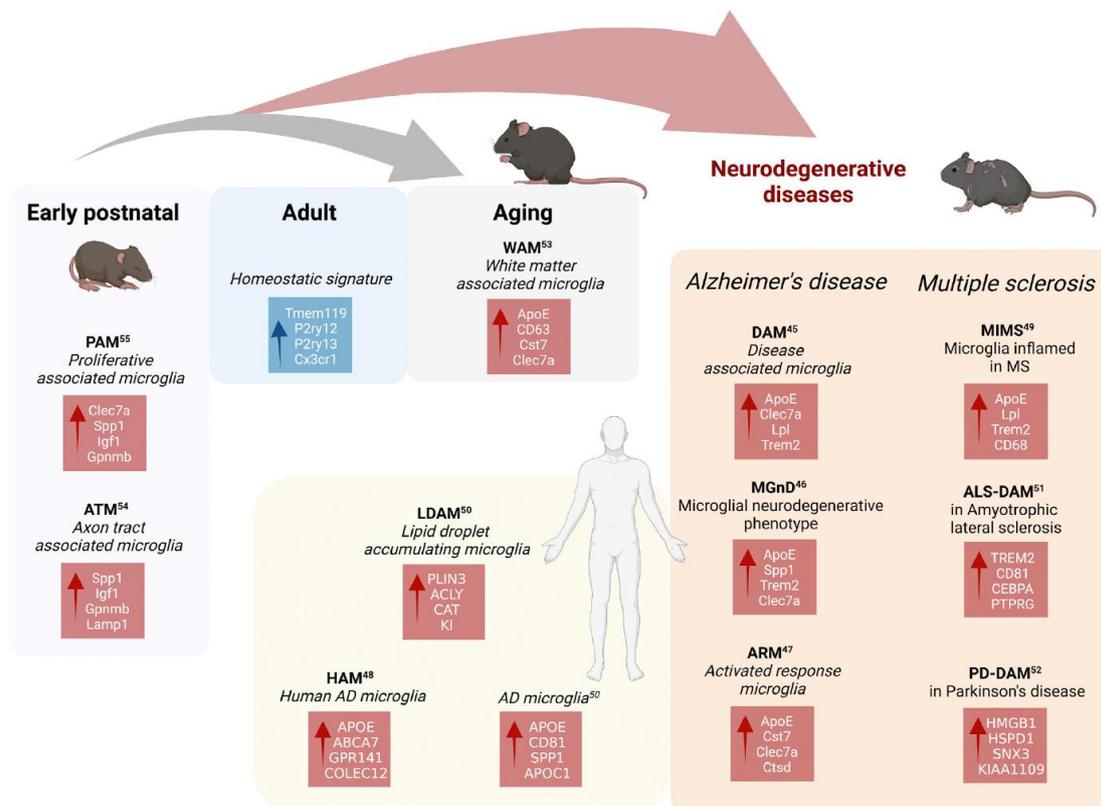


Figura 8. Firmas transcripcionales de diferentes microglías. El avance de la transcriptómica ha permitido identificar muchas firmas transcripcionales para la microglía, tanto en ratones como humanos, durante el desarrollo y envejecimiento pero que no se limitan exclusivamente a los estadios o patologías asociadas. Imagen tomada de Paolicelli et al., 2022.

Al respecto, varios estadios transcripcionales, revelados por firmas de expresión génica, han sido asociadas a patologías y fases específicas del organismo al revelarse en estrecha relación a ellos (**Figura 8**). Pero en sí, estas firmas de expresión génica no son más que vías biológicas específicas activas, y las trascendencias funcionales de estos estados microgliales, como la relación entre ellos, aún siguen sin estar claras.

En resumen, la microglía ha demostrado ser una célula inmune con singularidades definidas por ubicarse desde muy temprano en el desarrollo en el SNC, que presenta una gran diversidad fenotípica tanto en su morfología como perfil molecular.

Macrófagos

Los macrófagos forman parte de un grupo heterogéneo de células del sistema fagocítico mononuclear, constituido por los monocitos circulantes y macrófagos tisulares residentes. Los monocitos circulan por la sangre, teniendo origen en los progenitores mieloides de la médula ósea, y son capaces de ingresar a los tejidos donde se diferencian a macrófagos (Murphy et al., 2008). Poseen una gran plasticidad fenotípica funcional y tienen gran influencia en la reparación de tejidos luego de injurias. Los macrófagos son capaces de adoptar diferentes estados de activación (definidos como M1, M2a, M2b, M2c) en respuesta a estímulos provenientes del microambiente en que se encuentren (Stout and Suttles, 2004). Esta funcionalidad adaptativa los ha convertido en actores principales durante todo el proceso reparatorio de los tejidos, promoviendo la inflamación, removiendo desechos, estimulando otras células y liberando señales antiinflamatorias. Sin embargo, se ha visto que en ocasiones suele darse una sobreactivación de éstos, conduciendo a una inflamación persistente que deriva en fallas en la cicatrización (Nathan and Ding, 2010).

En la LME, como ya fue mencionado, ingresan al parénquima por entrada facilitada tras el daño del tejido y disrupción o cambios en la permeabilidad de la BHM, siendo reclutados hacia el sitio por medio de quimioquinas. En este sentido, se ha descrito su ingreso desde las meninges (Mazzitelli et al., 2022), desde la circulación sanguínea, adoptando propiedades proinflamatorias, y a través de los plexos coroideos y el canal central (**Figura 9**), con propiedades pro-regenerativas (Shechter et al., 2009, 2013). El inicio de la entrada al sitio de lesión de los MDM se da a partir de las primeras horas tras el daño, con un aumento significativo a partir del tercer día, y presentando un pico máximo al séptimo día (Hellenbrand et al., 2021).

Se sabe que tras la LME los macrófagos se activan adoptando un patrón distinto al que se da en otros tejidos, con fallas en la fase resolutive. Al respecto, se ha observado como coexisten una mezcla de fenotipos en las primeras fases tras la lesión, al tiempo que subsiguientemente los fenotipos activados alternativos M2, con características antiinflamatorias y regenerativas, decrecen; mientras que los tipo M1, proinflamatorios, permanecen elevados (Gensel and Zhang, 2015).

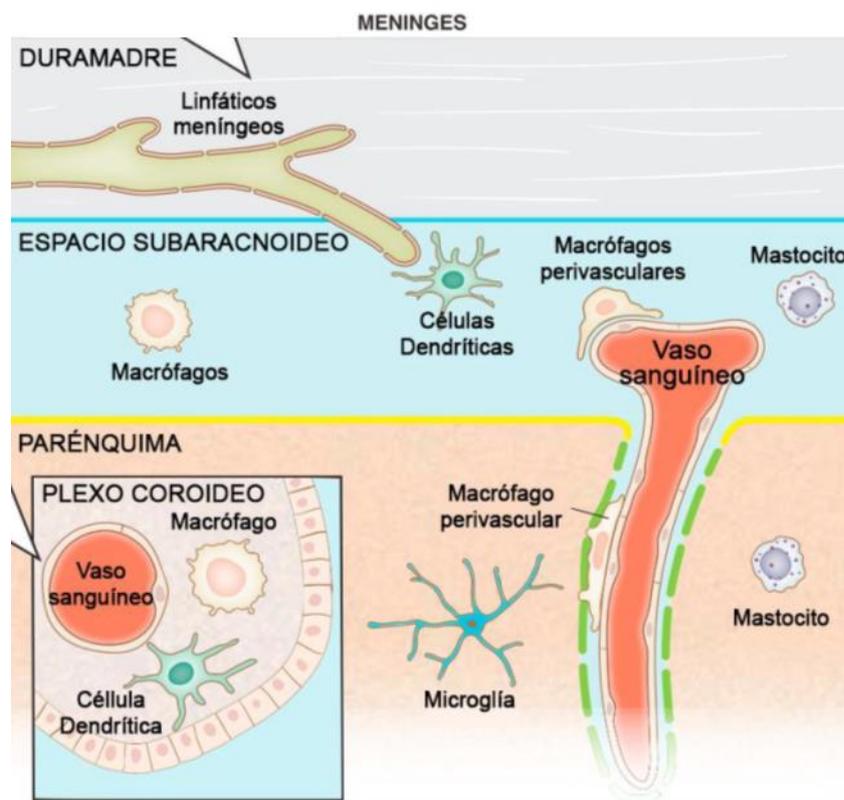


Figura 9. Representación de la ubicación y morfologías diferenciales adoptadas por distintas células en torno al parénquima nervioso, en condiciones de homeostasis. Imagen tomada y modificada de Herz et al., 2017

Una particularidad ya aludida de la LME es la generación de restos de mielina en altas concentraciones. En este marco, se ha demostrado que estos restos tienen la capacidad de modular la activación de los macrófagos, haciendo que pierdan el fenotipo M2, posiblemente por una saturación de la metabolización lipídica y exportación del colesterol (Wang et al., 2015a). Esto determina la formación de macrófagos tipo «foamy» (traducidas al español como células espumosas), llamadas así por el aspecto vacuolado típico que adoptan por presentar un gran acumulado lipídico en su interior; además tienen una capacidad fagocítica reducida y, en consecuencia, acaban por perpetuar una respuesta inflamatoria crónica, aumentando la neurotoxicidad e impidiendo la correcta cicatrización y remielinización (Wang et al., 2015a; Van Broeckhoven et al., 2021). Se ahondará sobre las implicancias de estos procesos en los siguientes apartados.

La mielina

La mielina es una extensión de la membrana plasmática de los oligodendrocitos en el SNC y de las células de Schwann en el periférico, que se dispone en forma de capas compactas alrededor de los axones. Cumple funciones electrofisiológicas, haciendo que los impulsos eléctricos sean transmitidos con mayor rapidez y eficiencia. Se compone de un 70% de lípidos y 30% de proteínas (**Tabla 1**). Cerca del 44 % de los lípidos presentes en la mielina del SNC son fosfolípidos y 29 % glucolípidos, mientras que alrededor del 28 % es colesterol. Este último cumple funciones en la fluidez y permeabilidad de la membrana, esencial para el crecimiento de la mielina. Interesantemente, se estima que cerca del 25 % de todo el colesterol corporal se encuentra en el SNC. El 44 % de los fosfolípidos se compone mayoritariamente de plasmalógenos, y en concentraciones decrecientes por fosfatidilcolinas, esfingomielina, fosfatidilserinas y fosfatidilinositol. Los plasmalógenos cumplen funciones en la compactación y estabilidad de la mielina, regulando su estructura, protegiéndola del daño oxidativo y reforzando los enlaces inter-lipídicos. En tanto, las principales funciones de la esfingomielina son el desarrollo y mantenimiento estructural, así como participar en las vías de transducción de señales. Por otra parte, los glucolípidos se constituyen principalmente de galactosilceramidas, y en menor medida de su forma sulfatada, la sulfatida. Estas moléculas participan en el desarrollo y mantenimiento de la integridad estructural de la mielina, así como su interacción con los axones y en sus propiedades electrofisiológicas. (Hammel et al., 2022)

Respecto a las proteínas que componen la mielina, se han identificado cerca de 393 diferentes, compuestas principalmente por proteínas proteolípicas (PLP), proteína básica de la mielina (MBP), glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG); y en menor medida por el inhibidor de crecimiento de neuritas (Nogo), la glucoproteína oligodendrocito-mielina (Omgp) y la glucoproteína asociada a la mielina (MAG). En su conjunto cumplen funciones en la formación de la vaina y compactación de la mielina, y maduración de los oligodendrocitos; siendo especialmente señaladas las propiedades antigénicas de algunas para inducir respuestas autoinmunes tras insultos en el tejido, por la presentación de antígenos por parte de las APC, e inhibición del crecimiento o regeneración axonal. (Hammel et al., 2022)

Tabla 1. Resumen de los componentes principales de la mielina. Se detalla el porcentaje que representa cada uno en el total y su asociación a patologías.

LÍPIDOS	70 % *	
Colesterol	27.7%	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación de expresión de citoquinas proinflamatorias e inducción de apoptosis • Oxidación → Enfermedades neurodegenerativas, derrames isquémicos, traumas del SNC, remielinización en el envejecimiento
Fosfolípidos	43.5 %	
Plasmalógenos	18.4 %	<ul style="list-style-type: none"> • Deficientes en enfermedades neurodegenerativas, trastornos del desarrollo, lesiones del SNC y envejecimiento
Fosfatidilcolinas	10.5 %	
Fosfatidilserinas	6.3 %	
Fosfatidilinositol	1.0 %	
Esfingomielina ##	7.3 %	<ul style="list-style-type: none"> • Su alteración y acumulación se asocia a enfermedades neurodegenerativas • Acumulación y mediadores secundarios de daño en contextos de traumatismos del SNC
Glucolípidos	29.4 %	
Galacosilceramida ##	24.4 %	<ul style="list-style-type: none"> • Mediadores secundarios de daño en contextos de traumatismos del SNC
Sulfatida ##	8.0 %	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición del crecimiento axonal y mediador proinflamatorio de la glía
PROTEÍNAS	30 % *	
Proteínas proteolípicas (PLP)	38 %	<ul style="list-style-type: none"> • Reportadas como antígenos neuronales y estimulantes de las células presentadoras de antígenos (APC) que inducen respuesta autoinmune en trastornos como isquemia, esclerosis múltiple y traumatismos de cerebro y médula espinal
Proteína básica de la mielina (MBP)	30 %	
Fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (CNP)	5 %	
Glucoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG)	1 %	
Inhibidor de crecimiento de neuritas (Nogo); Glucoproteína de oligodendrocito-mielina (Omgp); Glucoproteína asociada a la mielina (MAG); y otras	28 %	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibición del crecimiento axonal tras lesiones del SNC, isquemia o enfermedades desmielinizantes

* porcentaje del peso seco de la mielina, los otros porcentajes son la abundancia respecto al total.

Conforman los esfingolípidos, su metabolismo involucra varias reacciones reversibles de síntesis y descomposición generando metabolitos con propiedades pro-supervivencia o pro-apotóticas (Jones and Ren, 2016).

Fagocitosis y procesamiento de los restos de mielina

Como fue ya indicado, el daño de axones y la desmielinización que se da tras la LME, más allá del perjuicio directo en la función de conducción de las señales eléctricas, termina por generar gran cantidad de restos mielínicos en la zona. Son múltiples las investigaciones que tratan de arrojar luz sobre los mecanismos y consecuencias que implica la generación de los restos de mielina, logrando evidenciar que se generan en diversas condiciones patológicas y que, además, pueden contribuir directamente a la patología en sí o a la progresión de otras. Algunos de estos procesos involucran interacción y captación de los restos de mielina entre los tipos celulares presentes, teniendo consecuencias diversas como el reclutamiento de células inmunes, generación de inflamación crónica, incapacidad de remielinización y detrimento del crecimiento neuronal (McKerracher et al., 1994; Kotter et al., 2006; Clarner et al., 2012; Bogie et al., 2014; Safaiyan et al., 2016; Zhou et al., 2019). En la **Tabla 1** se resumen los principales componentes identificados de la mielina y las asociaciones de los mismos a alteraciones patológicas; puntualizadas en las revisiones realizadas por Jones and Ren, 2016 y Hammel et al., 2022.

Los restos de mielina generados durante la LME pueden ser fagocitados por las células residentes en un principio, y las no residentes al cabo de la infiltración hacia el sitio de lesión. Para la fagocitosis se han definido células con capacidad fagocítica muy eficientes, llamadas “fagocitos profesionales”, y otras con menor eficiencia consideradas “semi-profesionales”; se ha visto que cada una de estas células utilizan mecanismos específicos de captación y procesamiento de los restos de mielina. La microglía y los macrófagos son considerados del tipo profesionales, contienen varios receptores que median directamente el proceso de fagocitosis de los restos, entre los que se encuentran CD36, receptores TAM (Tyro3, Axl, y Mer), receptores Fc y TREM-2. Se ha sugerido que la principal vía que utilizan estas células para fagocitar y procesar los restos de mielina es por la vía endosoma-lisosoma; y que posiblemente la microglía sea capaz también de procesarlos por autofagia (Safaiyan et al., 2016; Wu et al., 2021). Por otra parte, se ha descrito la existencia de fagocitosis de restos de mielina por células no profesionales, con características y consecuencias muy peculiares. Tal es el caso puntualizado para las células endoteliales, capaces de fagocitar restos de mielina mediante receptores Fc, presentar luego antígenos en el MHC-II y por consiguiente reclutar linfocitos T CD4+; al tiempo que son capaces de promover la inflamación y la formación de cicatriz fibrótica (Lopes Pinheiro et al., 2016; Zhou et al., 2019). En tanto, los astrocitos reactivos también tienen capacidad de fagocitar los restos de mielina, aunque no es su función primaria. En este caso el mecanismo está mediado por la interacción de dos proteínas específicas expresadas por estos, realizando el procesamiento por la vía endosomal (Wang et al., 2020).

La fagocitosis llevada a cabo por microglía y macrófagos es la que ha despertado mayor interés por ser la principal y, además, por la asociación directa de estas células cargadas con restos de mielina en la generación de cambios funcionales en la patogénesis de la lesión. Se ha mencionado ya, cómo los macrófagos con restos de mielina en su interior pierden capacidad fagocítica y cambian su fenotipo, haciéndose más proinflamatorios y cronificando la inflamación. Recientemente se ha descrito a la alta liberación del ácido araquidónico (AA) desde las membranas de restos de mielina por parte de los macrófagos como posible metabolito implicado en esta sobreactivación (Kopper et al., 2021). En el mismo sentido, se ha mostrado que tras la LME, los restos de mielina con alto contenido lipídico son captados y procesados por los MDM principalmente, en lugar de por la microglía endógena (Wang et al., 2015a). Aunque igualmente se ha hecho referencia a la importancia de la microglía como la principal célula fagocítica en los primeros días tras la lesión, con implicancias directas en la fagocitosis de los restos de mielina al entrar en contacto con los axones dañados (Greenhalgh and David, 2014). Al respecto, son varias las investigaciones que han señalado como esta capacidad fagocítica de la microglía es inhibida por la interacción con los MDM que infiltran y entran en contacto con los axones dañados (Kroner and Rosas Almanza, 2019). Se ha mostrado como los MDM asumen la mayor parte de la actividad fagocítica hacia el día 14, pero también como curiosamente este material fagocitado persiste por un largo tiempo en estos, mientras que en la microglía su detección es transitoria. A su vez, se observó mayor proporción de muerte tras la fagocitosis de mielina en los MDM en comparación con la microglía, sugiriéndose en suma que ésta última presentan mejor eficacia para el procesamiento de los restos de mielina (Greenhalgh and David, 2014; Kroner and Rosas Almanza, 2019). En resumen, todos estos datos dejan planteada la necesidad de mayores estudios en relación a estos procesos a fin de ser esclarecidos.

Una característica que hace al procesamiento de los restos de la mielina una vez fagocitados es su particular conformación. Su disposición en forma de membranas muy compactas hace que sean difíciles de degradar y, además, el alto contenido de colesterol presente representa un desafío adicional para las células ya que no puede ser degradado, por lo que deben exportarlo desde el interior al espacio extracelular mediante transportadores específicos que asocian lipoproteínas. Se ha observado que fallas en este procesamiento terminan por generar la acumulación de gotas lipídicas en la microglía, representando un estado disfuncional proinflamatorio (Marschallinger et al., 2020) con baja capacidad fagocítica y formación de cristales de colesterol en el interior celular, afectando el sistema lisosomal, con la consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno que colaboran a la generación del microambiente

proinflamatorio y una pobre remielinización (Cantuti-Castelvetri et al., 2018; Nugent et al., 2020).

INMUNORECEPTORES

Los inmunoreceptores son un grupo de receptores transmembrana que se localizan en la superficie de células inmunes, desempeñan roles en el reconocimiento de otras células, estructuras o moléculas, además de participar en la migración celular. Comparten cascadas de señalización tras la unión de sus ligandos respectivos, que conducen a diferentes respuestas celulares de activación o inhibición. Como ejemplos destacables, y de la importancia creciente que vienen cobrando este tipo de receptores, se encuentran entre varios: PD-1/PD-L1 en cáncer e inmunoterapia (Han et al., 2020), y TREM2 con mutaciones asociadas tanto con la enfermedad de Alzheimer de aparición tardía como con la variante conductual de la demencia frontotemporal (DFT)(Carmona et al., 2018).

La familia de inmunoreceptores CD300

Los receptores CD300 son una familia de proteínas transmembrana, con un dominio extracelular tipo inmunoglobulina V (IgV). En humano esta familia se encuentra codificada en una región del cromosoma 17, y se compone por 8 miembros (**Figura 10**), CD300a/IRP60, CD300b/IREM3, CD300c/CMRF35, CD300d, CD300e/IREM2, CD300f/IREM1, CD300g y CD300h (Borrego, 2013; Niizuma et al., 2015). Se caracterizan por tener dos puentes disulfuro en su dominio IgV, con homología estructural a los receptores TREM, lo que define una superfamilia de inmunoglobulinas de superficie fuertemente conservadas y con un ancestro común (Clark et al., 2009). Si bien se ha descrito la expresión de CD300a en linfocitos y de CD300g en células endoteliales, son expresados principalmente en la superficie de las células de la línea mieloide (Borrego, 2013).

Dentro de la familia de CD300, se ha caracterizado a CD300b, c, d y e como activadores, por tener residuos transmembrana que interaccionan con proteínas adaptadoras con dominios activadores tipo ITAM (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) como DAP-12/DAP10 o FcγR. En cambio, CD300a y CD300f presentan una larga cola citoplasmática con variedad de motivos ITIM (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) que reclutan fosfatasas y median señales inhibitorias (Borrego, 2013). En el caso particular de CD300f se ha descrito una función dual, por poseer también motivos ITAM que interactúan con PI3K, Grb2 y la cadena gamma FcγR, activando cascadas de señalización intracelulares. Por su lado, no se han descrito dominios de señalización intracelular para CD300g (Borrego, 2013).

Se ha visto además que los receptores CD300 son capaces de formar complejos entre sí en la superficie celular por medio de interacciones entre los dominios extracelulares IgV, constituyendo homo y hetero-complejos (Martínez-Barriocanal et al., 2010). Esta combinación representa mecanismos de las células mieloides para regular las respuestas inmunes de forma diferencial. Se ha descrito que algunas citoquinas pro-inflamatorias pueden alterar la expresión de los receptores de este familia, así como a la inversa, pudiendo éstos actuar alterando la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la migración celular (Clark et al., 2009). Estos hallazgos evidencian la fuerte correlación entre los receptores CD300 y la regulación de la respuesta inflamatoria, sumando complejidad a la señalización intracelular que median individualmente, haciendo que la familia en su conjunto haya tomado una relevancia creciente.

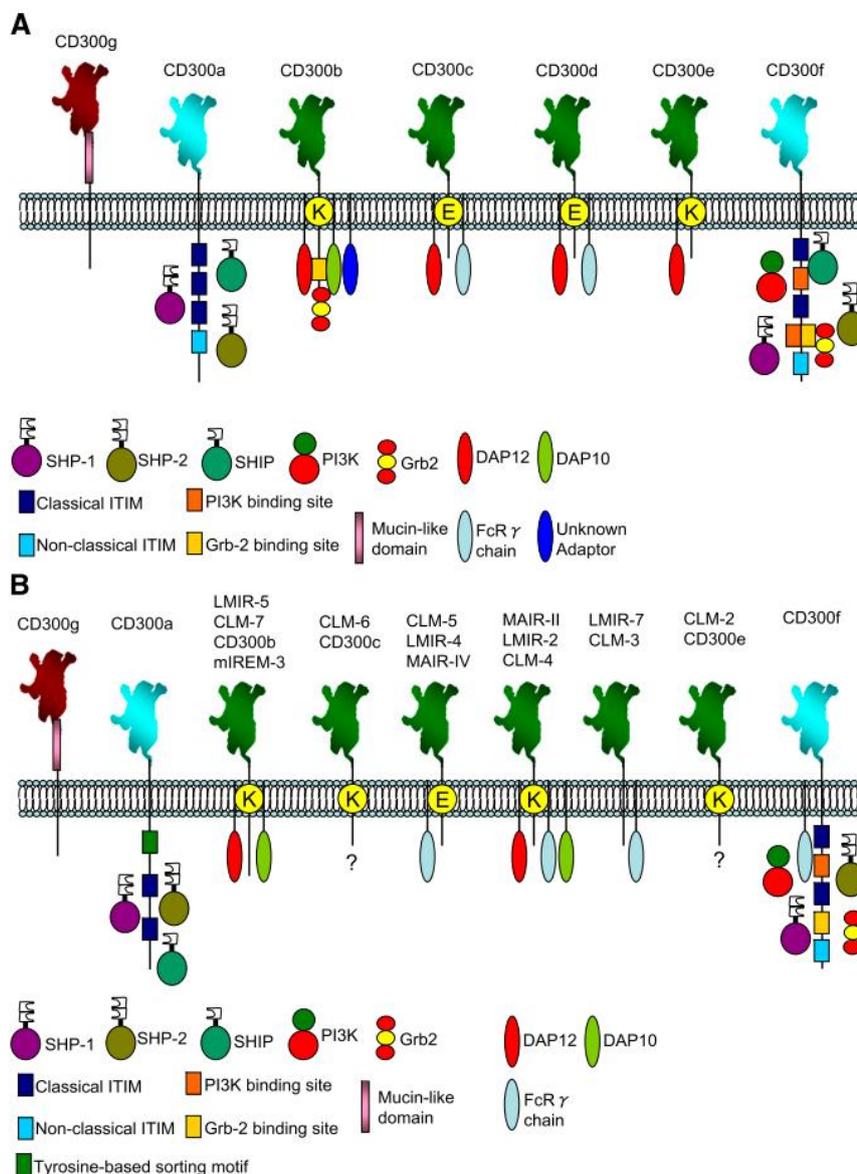


Figura 10. Representación esquemática de los receptores CD300 en humano (A) y ratón (B). El dominio extracelular de los receptores que contienen ITIM está coloreado en turquesa, y el de los no-ITIM en color verde. El dominio extracelular de CD300g está coloreado en marrón. Se indican los motivos de señalización de cada receptor, y se muestra la interacción con fosfatasas, las moléculas adaptadoras y quinasas. Tomado de Borrego, 2013.

CD300f

En humanos el inmunoreceptor CD300f tiene cinco residuos de tirosina en su cola citoplasmática que constituyen motivos para la asociación con fosfatasa (SHP-1, SHP-2, SHIP) o quinasas (**Figura 11**): dos ITIMs clásicos, un ITIM no clásico, dos motivos capaces de unir la subunidad reguladora de la PI3K, y otro capaz de unir a la proteína 2 de unión a factores de crecimiento (Grb2). Por otra parte, el ortólogo murino de CD300f, conocido como CLM-1, es capaz de asociarse con FcγR mediando respuestas activadoras (**Figura 10B**).

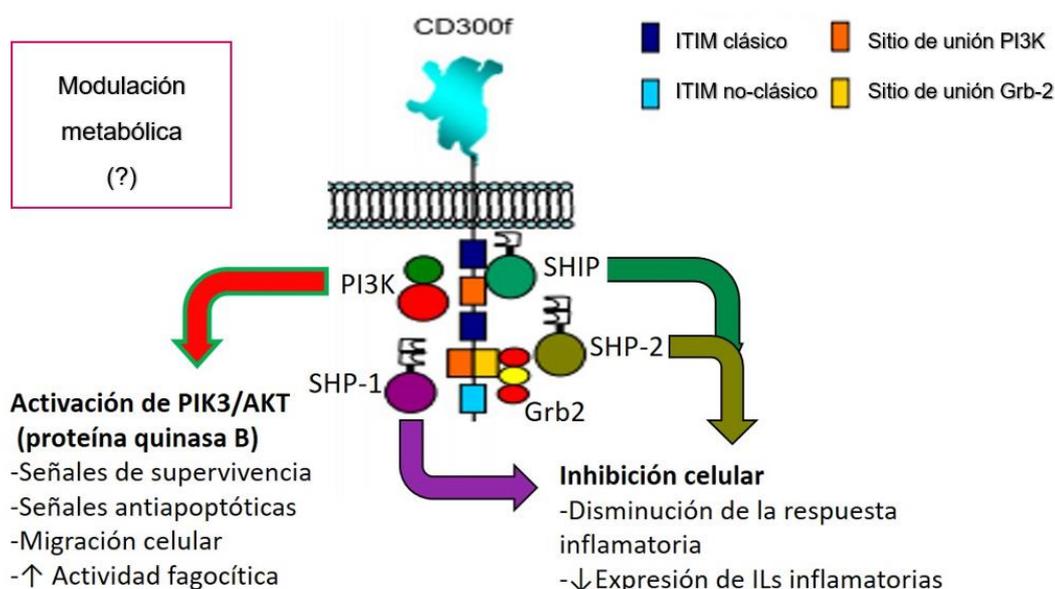


Figura 11. CD300f humano (IREM-1); esquematización de la función dual en los mecanismos de señalización intracelular una vez activo por sus ligandos. Tomado y modificado de Borrego, 2013

Se ha visto que es expresado mayoritariamente por monocitos y microglía, y en menor medida por neutrófilos, eosinófilos y mastocitos (Izawa et al., 2007; Moshkovits et al., 2014; Zhang et al., 2014; Tian et al., 2016). Diversas investigaciones han mostrado como CD300f modula las respuestas inflamatorias, y particularmente desempeña un papel antiinflamatorio al regular la señalización mediada por TLR en la activación de los macrófagos (Lee et al., 2011). Asimismo, se lo ha vinculado a procesos de modulación metabólica ante estímulos activadores en la microglía, aunque no se conoce la vía de señalización implicada (Lago et al., 2020). Se observó que ratones deficientes para CD300f (CD300f KO) tenían exacerbación de respuestas alérgicas, y en un modelo para esclerosis múltiple indujo un aumento de óxido nítrico y producción de citoquinas inflamatorias, exacerbando la enfermedad (Xi et al., 2010; Izawa et al., 2012). Se ha puntualizado que CD300f ayudaría a mantener la homeostasis regulando de forma positiva la eferocitosis en macrófagos, y de forma negativa en las células dendríticas, evitando así el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Tian et al., 2016).

Respecto a los posibles ligandos para CD300f se describió que serían fosfolípidos de membrana, mayoritariamente fosfatidilserina (PS) y en menor grado esfingomiélin (EM), teniendo implicancias en la reacción inflamatoria que determina una correcta limpieza del tejido así como en la resolución de la inflamación (Xi et al., 2010; Tian et al., 2014). Se ha puntualizado también que es capaz de ligar ceramida y lipoproteínas de baja y de alta densidad (LDL y HDL respectivamente) (Izawa et al., 2012). En este sentido, se ha descrito que si bien tanto el CD300f humano como el de ratón comparten ligandos lipídicos y funciones similares, presentan especificidades de ligando diferenciales que dependen de cambios aminoacídicos simples en el dominio IgV (Izawa et al., 2020).

Por otro lado, se describió que el receptor murino puede asociarse con el receptor de IL-4 (IL-4R α), operando como co-receptor, y amplificar las respuestas inducidas por IL-4/IL-13 tanto *in vivo* como *in vitro* (Moshkovits et al., 2015). Estos mismos autores han mostrado asimismo que macrófagos de diversos tejidos, incluyendo poblaciones del colon, peritoneo y tejido adiposo, muestran muy bajos niveles de expresión de CD300f, mientras que en poblaciones de macrófagos alveolares o esplénicos está altamente expresado. Asimismo, demostraron que la expresión de CD300f en macrófagos está regulada por la acción de la citoquina IL-4 (Moshkovits et al., 2015); y en este sentido, se ha mostrado por parte de otro grupo que la función reparadora y remodeladora de los macrófagos depende de la presencia de IL-4 o IL-13 en conjunto con células apoptóticas (Bosurgi et al., 2017), ligando por lo tanto la capacidad de CD300f en la sinergia con IL-4 previamente citada a la acción de CD300f en estos procesos.

Datos anteriores de nuestro laboratorio han demostrado un efecto neuroprotector luego de un daño cerebral agudo (excitotóxico) en rata al sobreexpresar CD300f (Peluffo et al., 2012). En este sentido, datos todavía no publicados por nuestro laboratorio mostraron que su sobreexpresión en un modelo de trauma cerebral resultó ser neuroprotectora al evaluar el volumen de lesión a los 3 días. Asimismo, ensayos preliminares de lesiones medulares en ratones hembras evidenciaron una peor recuperación funcional motora luego de la lesión en aquellas que carecían de CD300f; en tanto, al tratarlas luego de la lesión con IL-4 de forma intramedular no experimentaban una mejoría en la recuperación funcional como si se observó en el genotipo salvaje (WT)

En tanto, el bloqueo de la interacción entre el receptor y sus ligandos, utilizando una proteína de fusión soluble (CD300f-IgG2a), redujo el grado de regeneración axonal al ser inyectada en el nervio ciático luego de una lesión (Peluffo et al., 2015).

Por otro lado, se ha mostrado que ratones hembras «naïve» deficientes para CD300f presentan comportamientos compatibles con desórdenes depresivos y anhedonia, que se profundizan

ante un estímulo inflamatorio periférico por LPS (Lago et al., 2020); en tanto que, la ausencia de CD300f en machos actúa como ansiolítico, presentando reducidos comportamientos relacionados con la ansiedad (Kaufmann et al., 2020), denotándose de esta manera un impacto diferencial de CD300f en función del sexo. Asimismo, se ha propuesto que el CD300f de la microglía podría estar participando en los procesos de poda sináptica y regulación de la neuroplasticidad, con consecuencias directas en el fenotipo depresivo mencionado. Se ha mostrado conjuntamente que la microglía CD300f KO de hembras presenta una reprogramación metabólica alterada y una menor endocitosis de LDL (Lago et al., 2020); al mismo tiempo que datos de RNA-seq de microglía purificada de ratones hembras inyectadas con LPS evidencian una reducción de enzimas partícipes de la β -oxidación lipídica, de transportadores de membrana de lípidos, y de transportadores de intermediarios de lípidos entre el citosol y la mitocondria, quitando de este modo sustratos a la β -oxidación (Lago et al., 2020). Finalmente, datos del laboratorio próximos a su publicación han evidenciado una vinculación directa entre la ausencia de CD300f en ratones y el desarrollo de procesos inflamatorios sistémicos, alteraciones metabólicas, envejecimiento prematuro y menor esperanza de vida.

HIPÓTESIS

Dado que los ligandos conocidos de CD300f son principalmente de naturaleza lipídica y se lo ha vinculado al mantenimiento y reprogramación del estado metabólico de la microglía y macrófagos, postulamos que podría actuar como sensor de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), y en este sentido, especulamos que desempeñaría un rol importante en afecciones desmielinizantes del sistema nervioso, donde se genera una sobrecarga de restos lipídicos, colaborando en la detección y en el procesamiento de estos.

OBJETIVO GENERAL

Comprender los mecanismos por los cuales el inmunoreceptor CD300f contribuye a la recuperación funcional luego de una lesión medular por contusión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Elucidar los mecanismos subyacentes a la peor recuperación funcional motora de ratones que carecen de CD300f luego de la lesión medular por contusión.
2. Establecer y caracterizar una colonia de ratones «knockout» condicionales para CD300f en microglía y macrófagos.
3. Precisar si los efectos observados son debidos al receptor presente en la microglía o los monocitos reclutados al sitio de lesión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos realizados en este trabajo de tesis fueron llevados a cabo en el Institut Pasteur de Montevideo (IPMon, Uruguay) y en el Departamento de Fisiología, Biología Celular e Inmunología de la Facultad de Medicina, de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, España), en el marco de una pasantía de investigación desarrollada en el año 2022. Esta pasantía fue financiada por una beca otorgada para tal fin por el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA, Uruguay).

1. MODELOS ANIMALES

1.1. Mantenimiento de animales

Todos los procedimientos experimentales que implicaron el uso de animales fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon) y el Comité de Experimentación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), siguiendo los estándares internacionales.

Se utilizaron ratones hembras y machos (*Mus musculus*, cepa control o de fondo genético C57BL/6), adultos, de entre 4 y 18 semanas de edad, con masa de entre 15 y 35 g. En Uruguay, fueron mantenidos en el bioterio convencional (libre de patógenos) de la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (UBAL) del IPMon, en cajas de a 4-6 ratones en un ambiente controlado en condiciones estándar de temperatura (21 ± 1 °C), 40-60% de humedad relativa, con agua y comida *ad libitum* y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. En España, los animales se alojaron bajo las mismas condiciones en el bioterio del Instituto de Neurociencias de la UAB.

Los procedimientos para generar nuevas colonias de ratones, así como la reproducción de éstos, se llevaron a cabo dentro del bioterio libre de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés Specific-pathogen-free) del IPMon, en las mismas condiciones ambientales y de alimentación detalladas anteriormente.

1.2. Ratones CD300f «knockout» (CD300f KO)

Los ratones homocigotos CD300f-knockout- (KO, $cd300f^{-/-}$ de Genentech (Xi et al., 2010)), fueron adquiridos por el laboratorio hace varios años y son el modelo de estudio de rutina. Estos animales fueron retrocruzados a homocigosis dos veces con la colonia C57BL/6J WT (The Jackson Lab) del IPMon, para asegurar que los animales WT representen controles adecuados.

1.3. Generación de ratones con el gen *cd300f* flanqueado por sitios loxP (*cd300f^{loxP/loxP}*)

Como ya fue mencionado, al ortólogo murino para *cd300f* se lo conoce como *clm1*, y solo a efectos de simplificar la nomenclatura y comprensión se lo nombrará como *cd300f*, salvo puntualizaciones en relación a la organización propia del gen murino y las modificaciones realizadas sobre este.

Los procedimientos para generar los animales con el gen flanqueado fueron realizados en colaboración con la UBAL en las instalaciones del bioterio SPF del IPMon. Se efectuaron microinyecciones citoplasmáticas en cigotos de animales B6D2F2 utilizando una mezcla CRISPR de 100 ng/μL de proteína Cas9 (Synthego, Menlo Park, CA, USA), 40 ng/μL de ARN de guía única (sgRNA) (Synthego, Menlo Park, CA, USA), y 40 ng/μL de ADN monocatenario (ssDNA) (817 bases del fragmento ssDNA Megamer™, IDT, Coralville, IA, USA) diluidos en tampón de microinyección estándar. Los embriones viables fueron cultivados durante toda la noche (ON) en microgotas de medio M16 (Sigma, St Louis, MO, USA) cubiertas con aceite mineral, mantenidos en atmósfera 5% CO₂ a 37° C. Al día siguiente, se transfirieron los embriones en el estadio de dos células al oviducto de hembras B6D2F1 pseudo-preñadas 0.5 días post coito (20 embriones/hembra) según el protocolo descrito en (1). Para la cirugía, las hembras receptoras fueron anestesiadas previamente con una mezcla de ketamina (100 mg/kg, Pharmaservice, Ripoll Vet, Montevideo, Uruguay), xilacina (10 mg/kg, Seton 2%; Calier, Montevideo, Uruguay). Se les administró ácido tolfenámico subcutáneo (1 mg/kg, Tolfedine, Vetoquinol, Madrid, España) a fin de producir analgesia y efectos antiinflamatorios (2). La preñez fue determinada por inspección visual por un cuidador experimentado dos semanas después de la transferencia de embriones, el tamaño de la camada se registró al séptimo día del nacimiento.

Las crías fueron marcadas y se les realizó biopsia de cola a los 21 días de edad, se determinó el genotipo y los animales mutantes fueron mantenidos como fundadores. En la primera ronda de microinyecciones se logró la inserción únicamente del sitio loxP 5'. Los animales F1 *clm1* 5'-loxP fueron usados para producir embriones por fecundación in vitro usando el protocolo CARD® (3). Tres horas luego de la fecundación se realizó la microinyección citoplasmática de los cigotos con el siguiente mix de CRISPR: 100 ng/μL de ARNm Cas9 (Invitrogen, Waltham, MA, EE.UU.), 25 ng/μL de ARNsg (Synthego, Menlo Park, CA, EE.UU.) y 50 ng/μL de ssODN (162 bases Ultramer® DNA Oligo, IDT, Coralville, IA, EE.UU.) diluido en tampón de microinyección, con el fin de insertar el sitio loxP 3' faltante. Los embriones viables de dos células se transfirieron a hembras pseudo-preñadas como se ha detallado anteriormente. Para generar la línea mutante final se utilizaron las hembras fundadoras con sitios loxP insertados 5' y 3' al exón 1 del gen *clm1*,

identificados a partir de aquí como **Cd300^{loxP}** (**Figura 12**). Estos ratones fueron secuenciados con el fin de asegurar la correcta inserción de los sitios en los locus esperados, y descartar además la generación de mutaciones no deseadas.

- (1) Meikle MN, Schlapp G, Menchaca A, Crispo M. Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. *Cryobiology* 2018;84:77–81. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.005>.
- (2) Schlapp G, Goyeneche L, Fernández G, Menchaca A, Crispo M. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J Assist Reprod Genet* 2015;32:271–5. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0378-x>.
- (3) Nakagata N. *Reproductive Engineering Techniques in Mice*. Technical manual. Kumamoto University, Japan; pp 6-13.

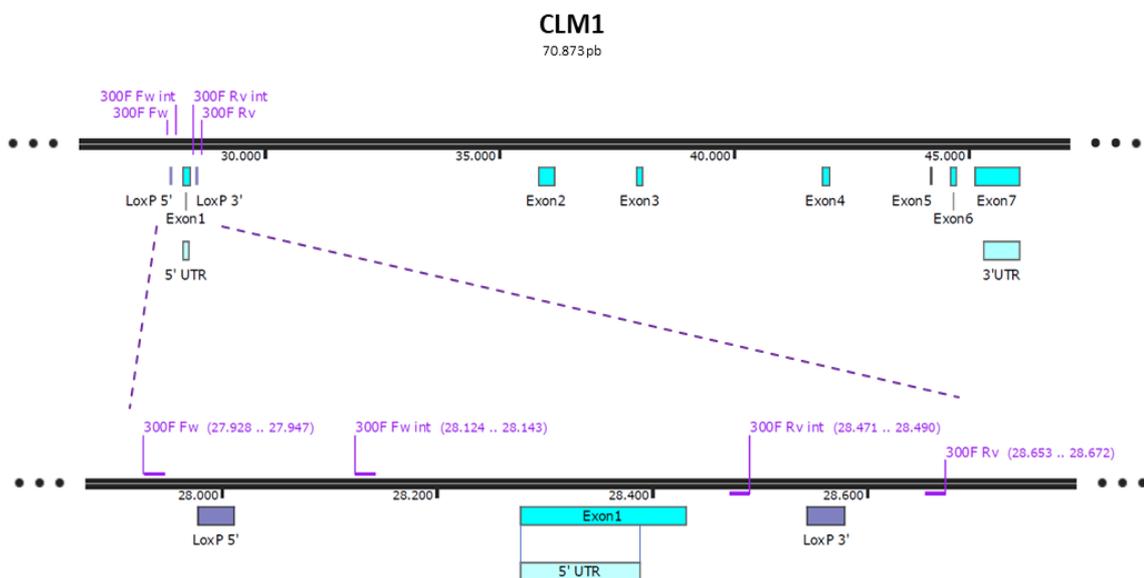


Figura 12. Diagrama del gen *clm1* con localización de los sitios loxP insertados y sitios de unión de los cebadores usados para las PCR. Superior: Se ve la localización en el genoma de los 7 exones y de la secuencia 5' y 3' UTR, internas al exón 1 y 7 respectivamente. **Inferior:** Detalle de la inserción de los sitios loxP 5' y 3' flanqueando al exón 1 y secuencias reguladoras previas. En color lila se especifican los sitios de unión de los cebadores utilizados para la genotipificación. Imagen creada con el software Snap Gene.

1.4. Establecimiento de colonia de ratones *cd300f* KO condicionales (CD300f KOc) y su grupo control

Para el establecimiento de la colonia de ratones KO condicionales se utilizaron los animales generados con el gen *cd300f* flanqueado (**Cd300^{loxP}**), que permitan la recombinación y eliminación de la secuencia intermedia a los sitios loxP insertados, y ratones Cx3cr1^{tm2.1(cre/ERT2)}Litt/WganJ (Parkhurst et al., 2013), adquiridos a The Jackson Laboratory (JAX stock #021160), que expresan tras el promotor del receptor de fractalquina una recombinasa modificada con el receptor de estrógenos humano (CreERT2), permitiendo inducir la

recombinación únicamente en presencia de Tamoxifeno (TMX) en aquellas células que expresen constitutivamente este gen (**Figura 13**), ya que el TMX se une al receptor de estrógeno y solo así se da la traslocación al núcleo de la CreERT2.

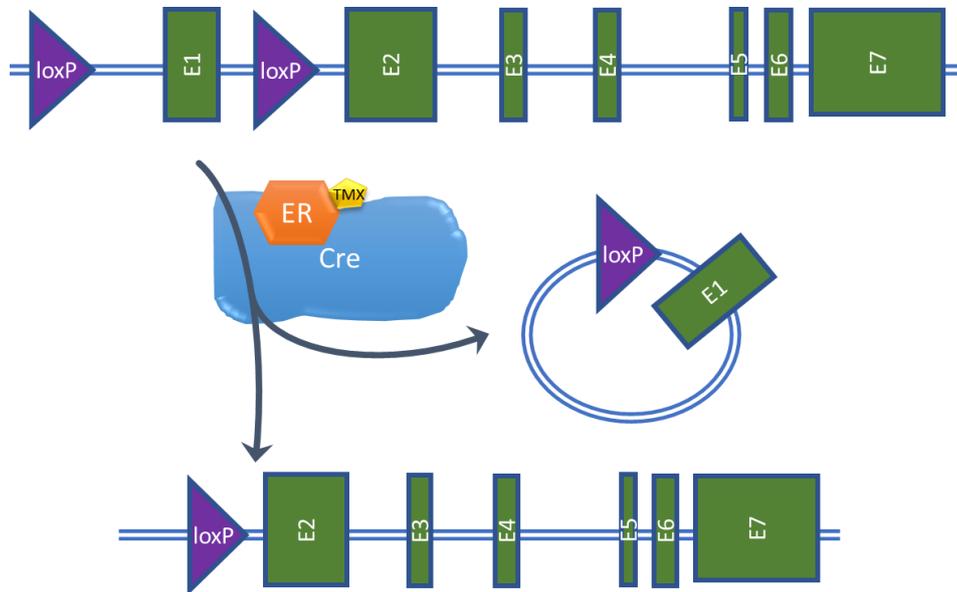


Figura 13. Esquemización del sistema de recombinaison Cre-lox de los ratones KOc. La recombinasa CreERT2 presenta expresión constitutiva por estar inserto tras el promotor del gen del receptor de fractalquina; se mantiene en el citoplasma en estado basal y solo en presencia de tamoxifeno (TMX) es traslocada al núcleo. CreERT2 reconoce los sitios loxP insertados en el ADN y elimina la secuencia intermedia a estos, en consecuencia, tras la recombinación se pierde el exón 1 y las secuencias reguladoras previas del gen *clm1* (ortólogo murino de *cd300f*).

Se diseñó una estrategia de cruce (**Figura 14**) con el objetivo de lograr el establecimiento final de la línea doble mutante; debido a que en algunos cruces la probabilidad de obtener los genotipos deseados era muy baja fue un proceso extendido en el tiempo; al finalizar el mismo resultaron genotificados un total de casi 300 ratones. En resumen, se cruzaron animales **Cd300^{loxP/loxP}** con los **Cx3cr1^{tm2.1(cre/ERT2)^{Litt}}**, con el propósito de alcanzar finalmente los siguientes genotipos: homocigotas para el gen *cd300f* flanqueado y heterocigotas para la recombinasa (**Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{CreERT2/+}**); homocigotas para el gen *cd300f* flanqueado y homocigotas para la recombinasa (**Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{CreERT2/CreERT2}**); homocigotas para el gen *cd300f* flanqueado y sin expresión de la recombinasa (**Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{+/+}**). Si bien estos últimos parecerían similares genotípicamente a los **Cd300^{loxP/loxP}** del inicio, no lo son genéticamente ya que contienen en suma el mismo fondo genético de las retrocruzas con los **Cx3cr1^{tm2.1(cre/ERT2)^{Litt}}**, asegurando así que representen un grupo control adecuado.

Los animales finalmente usados en los experimentos fueron los **Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{+/+}** (como grupo control, tratados con TMX) y los KOc **Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{CreERT2/+}** (con y sin tratamiento

con TMX, representando los sin TMX otro grupo control). El mantenimiento de heterocigosis para la recombinasa obedece a que el receptor de fractalquina es necesario para la supervivencia de las poblaciones celulares que lo expresan (microglía, monocitos y sus procedentes).

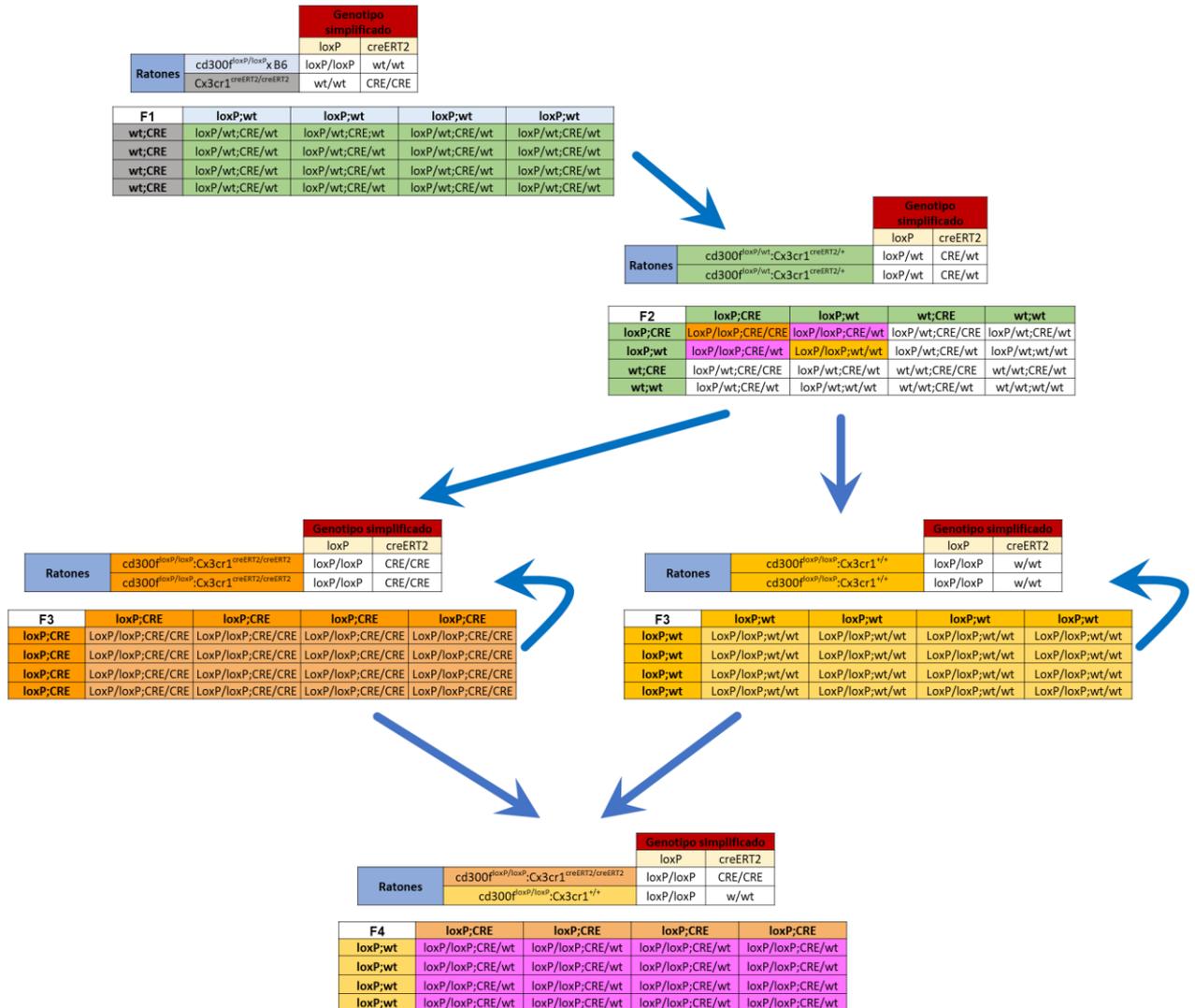


Figura 14. Esquematización de la estrategia de cruces llevada a cabo para el establecimiento de la colonia de ratones KOc. Se especifica para cada caso el genotipo de los padres y debajo, el cuadro de Punnett de los posibles genotipos de la descendencia que surgen de ese cruce. El código de colores corresponde a un genotipo particular a modo de simplificar el reconocimiento. Las flechas guían el uso de los ratones para el siguiente cruce con el fin de obtener nuevos genotipos o el mismo (autorrenovación de las colonias cd300^{loxP/loxP};Cx3cr1^{+/+} y cd300^{loxP/loxP};Cx3cr1^{creERT2/creERT2}).

2. GENOTIPIFICACIÓN

2.1. Extracción y cuantificación de ADN

A las 3 semanas de edad los ratones de cada camada fueron identificados mediante marcas en las orejas y se le realizó una biopsia de cola de 5 mm, que fue almacenada a -20 °C hasta su procesamiento.

Para la extracción del ADN se digirió la biopsia en 500 µL de solución de lisis (1 M Tris-HCl pH 8.0 1 M; 10 mM EDTA pH 7.5; 100 mM NaCl; 0.5% SDS; Proteinasa K 500 µg/mL) a 55 °C en termobloque durante 16 horas. Posteriormente se realizó la purificación con 300 µL de NaCl 5 M 10 minutos en hielo, se centrifugó 10 minutos a 9.000 g, y se traspasaron 600 µL del sobrenadante a un tubo nuevo para realizar la precipitación del ADN con Etanol (95 – 70 %) a -20° C. Se dejó secar el pellet en termobloque a 55 °C para eliminar completamente los restos de etanol del tubo y luego se hidrató el ADN por 30 minutos con 50 uL de agua milliQ. La concentración del ADN obtenido se midió en un espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX.

2.2. PCR

Por cada animal fue necesaria llevar a cabo dos reacciones de PCR que permitieran genotipificar la presencia de los alelos loxP por un lado, y de la recombinasa CreERT2 por otro. La amplificación del ADN se realizó usando termocicladores Labnet TC9610 y Applied BioSystems 2700, los cebadores utilizados se especifican en la **Tabla 2**. Se detallan los componentes usados para cada mezcla de PCR en la **Tabla 3** y las condiciones de ciclado para cada amplificación en la **Tabla 4**.

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizados para genotipificación

Tipo de cebador	Secuencia 5' → 3'
Pr 300F-Fw	TTT GAC ACC CCT TCA GCT CC
Pr 300F-Rv	CCA GGG CTC TCC TGT CTT TC
Pr 300F-FwInt	GGA GCC CCT GTT CTC TTT CC
Pr 300F-RvInt	GGT GGA CAG ATG ACC CCT TG
Pr Cm (cx3cr1)	AAG ACT CAC GTG GAC CTG CT
Pr Rv (cx3cr1 ^{creER})	CGG TTA TTC AAC TTG CAC CA
Pr Rv (cx3cr1 ⁺)	AGG ATG TTG ACT TCC GAG TTG

Tabla 3. Mezcla de PCR para el genotipificado de $cx3cr1^{creER}/cx3cr1^+$ y presencia de sitios loxP

Componente	$cx3cr1^{creER}/cx3cr1^+$	Sitios loxP
	Volumen (μ L)	Volumen (μ L)
Sol. Tampón 10X	2.0	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	0.75	0.75
dNTP (2.5 mM)	0.2	0.2
Taq (5 U/ μ L)	0.2	0.2
Pr 300F-Fw (100 μ M)	0.1	-
Pr 300F-Rv (100 μ M)	0.1	-
Pr Cm ($cx3cr1$) (100 μ M)	0.1	-
Pr Rv ($cx3cr1^{creER}$)	-	0.1
Pr Rv ($cx3cr1^+$)	-	0.1
H ₂ O milliQ	CN	CN
ADN	5*	5*

*con ~75 ng de ADN totales; CN = cantidad necesaria para volumen final de 20 μ L; Pr Fw, Pr Rv y Pr Cm = cebadores

Tabla 4. Condiciones de ciclado para la PCR de los sitios loxP y $cx3cr1^{creER}/cx3cr1^+$, esta última es de tipo «touchdown» (ciclado recomendado por The Jackson Lab).

$cx3cr1^{creER}/cx3cr1^+$			Sitios loxP		
Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	2'		94°C	2'	
94 °C	20''	10	94 °C	15''	32
65° C (-0.5 °C/ciclo)	15''		58 °C	15''	
68 °C	10''		72 °C	30''	
94 °C	15''		72 °C	10'	
60 °C	15''	28	10 °C	5'	
72 °C	30''				
72 °C	10'				
10 °C	5'				

2.3. Electroforesis

Se realizaron electroforesis en gel de agarosa 1% con 30 minutos de corrida a 100 V para evaluar los productos de PCR para el gen *cx3cr1* y en gel de agarosa 2% con 50 minutos de corrida a 100 V para los productos de PCR del gen *cd300f* flanqueado por sitios loxP. Se esperan bandas de 300 pb en el alelo mutante con el constructo para creERT2 (*cx3cr1^{creERT2}*) y de 695 pb en el alelo tipo salvaje *cx3cr1⁺*; mientras que para la inserción de los sitios loxP flanqueando a *cd300f* se esperan bandas de 744 pb para el alelo con la inserción de los sitios loxP (*cd300f^{loxP}*), y de 704 pb si no tiene las inserciones.

3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y COMPORTAMENTAL DE LOS RATONES KOc AL INDUCIR LA RECOMBINACIÓN (*in vivo*)

Para la administración del TMX (Sigma-Aldrich #T5648-5G) se probaron varias vías: subcutánea, por sonda gástrica e intraperitoneal (IP). Finalmente se decidió utilizar la vía IP al tener mejores resultados en comparación a la otras por varias razones: no inducir alteraciones en el comportamiento como sucedió con la manipulación para el sondaje orogástrico; o en el caso de la vía subcutánea, que fue descartada por generar inconvenientes posteriores a la hora de llevar a cabo las cirugías y lesiones de la médula espinal al permanecer rastros de aceite debajo del cuero del animal.

Los ratones fueron administrados a las 4 semanas de edad con TMX (100 mg/kg) o vehículo (aceite de maíz, Sigma-Aldrich #C8267) durante 4 días consecutivos, de forma IP.

3.1. Evaluación de la recombinación por cuantificación de la expresión de *cd300f*

Para evaluar los niveles de expresión de *cd300f* en los diferentes tejidos tras inducir la recombinación se usaron ratones **Cd300f^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{+/+}** y KOc **Cd300f^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{creERT2/+}**.

Posteriormente al tratamiento con TMX se dejó transcurrir un periodo de 4 semanas y al cabo de este tiempo fueron eutanasiados para colectar los órganos a analizar (cerebro, pulmón, hígado y bazo).

Siguiendo la estrategia de tiempos antes mencionada se logra que, en aquellos animales que recibieron TMX y expresan la recombinasa CreERT2, la recombinación y consecuente eliminación de CD300f se dé tanto en microglía como en poblaciones de macrófagos, pero al cabo de las 4 semanas los monocitos circulantes han recuperado la expresión del receptor mientras que la microglía y macrófagos de barrera permanecen carentes de este. Esto se da ya

que los monocitos tienen una alta tasa de renovación desde sus progenitores mieloides (Yona et al., 2013) y, en cambio, la microglía presenta autorrenovación y a tasas mucho menores (Ajami et al., 2007).

En tanto, se ha descrito que las poblaciones de células dendríticas CD4⁺ del bazo, así como los macrófagos residentes de tejido (células de Kupffer en el hígado), pierden a las células con el reordenamiento genético dado por la recombinación, por lo que recuperan la expresión del gen al cabo de este tiempo; o directamente no se produce la recombinación por presentar baja expresión de CX3CR1, y por consiguiente no expresan la recombinasa (Goldmann et al., 2013).

Los animales fueron perfundidos con PBS a 4 °C para evitar la contaminación por la sangre periférica. Para ello, en ratones profundamente anestesiados se realizan dos cortes laterales en el tórax para exponer el corazón, se introduce una aguja en el ventrículo izquierdo, y realizando un pequeño corte en la aurícula derecha, se logra formar un circuito abierto que permite la entrada y circulación del PBS por todo el cuerpo, mediante un bombeo mecánico. Posteriormente se disecaron los diferentes órganos de interés y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, luego fueron conservados a -80 °C hasta su procesamiento para la cuantificación de ARNm y proteína.

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la expresión de CD300f únicamente mediante el análisis de los niveles de ARNm por qPCR. El análisis de los niveles de proteína se pretendió realizarlo por Western Blot, pero no fue posible poner a punto la técnica para detectar de manera fiable a CD300f.

En el proceso de puesta a punto se probaron extracciones de proteína total de tejido de animales WT y diferentes anticuerpos comerciales anti-CD300f, no logrando en ninguno de los ensayos detectar la banda de proteínas correspondiente al inmunoreceptor. Los diferentes anticuerpos comerciales se han caracterizado por presentar poca eficiencia para detectar esta proteína en las diferentes técnicas inmunológicas. Adicionalmente a los ensayos antedichos, se realizaron Dot Blots para evaluar los anticuerpos secundarios anti-IgG usados para detectar los anticuerpos primarios en el Western Blot. Los resultados fueron positivos para la detección de estos en la membrana (datos no mostrados). Estos datos nos permitieron descartar un problema del anticuerpo secundario usado, y fueron sugerentes de que posiblemente el problema esté dado en la detección particular de CD300f en la membrana por el anticuerpo primario o se esté dando previamente, en el proceso de extracción proteica total desde el tejido; en este sentido, cabe aludir que CD300f puede tener dominios fosforilados que dificulten este proceso. Por otra parte, el contacto con un grupo de investigación con el que colaboramos en España nos permitió conocer que pruebas realizadas por ellos, donde utilizaron soluciones comerciales en todo el

proceso de extracción proteica y de Western Blot, les permitieron detectar a CD300f de manera confiable haciendo uso de uno de los anticuerpos probados por nosotros. Teniendo en cuenta esto, se decidió enviar las muestras de tejido aislada de nuestros animales tras la recombinación para llevar a cabo el análisis de proteína en este laboratorio próximamente, y poder así contar con datos de expresión proteica que validen las observaciones de expresión de ARNm detallados en este trabajo.

3.1.1. Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción del ARNm se procedió a la homogenización del tejido utilizando el homogenizador manual ULTRA-TURRAX® T10 y el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher #15596026). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante para la posterior separación de las fases de proteínas-ADN-ARN. Una vez obtenida la fase acuosa transparente conteniendo el ARN se utilizó el Kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH #R2072) para su purificación por columnas, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

3.1.2. Retrotranscripción

Para la retrotranscripción a ADNc se utilizó la enzima M-MLV RT (Thermo Fisher #28025013). Se retrotranscribieron entre 0.3 y 3 µg de ARNm por reacción, previamente tratado con DNAsa (libre de RNAsa) y cuantificado por espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX o NanoDrop™.

3.1.3. PCR en tiempo real (qPCR)

Para evaluar los niveles de expresión de CD300f en los diferentes tejidos se realizó la amplificación en tiempo real de *cd300f* a partir del ADNc en el equipo QuantStudio 3 real-time PCR (Applied Biosystems), utilizando TaqMan® Universal Master Mix II (Thermo Fisher #4440040) y la sonda TaqMan para *clm1* (Thermo Fisher #4331182 Mm00467508_m1), siguiendo las condiciones de ciclado especificadas por el fabricante. Los resultados de los niveles de expresión génica fueron relativizados con respecto al gen «housekeeping» *gapdh* (Thermo Fisher #4331182 Mm99999915_g1) y con respecto al promedio del grupo control para cada tejido, con valor igual a uno.

3.2. Pruebas comportamentales

Las pruebas comportamentales realizadas obedecen a la búsqueda de comportamientos previos descritos para animales CD300f KO (Kaufmann et al., 2020; Lago et al., 2020). Las pruebas fueron realizadas entre las 3-4 semanas luego del tratamiento con TMX.

3.2.1. "Splash test" con sacarosa

Esta prueba consiste en rociar sobre el torso del ratón una solución de sacarosa al 10%, que por ser pegajosa ensucia al animal y lleva a que este de inicio al comportamiento de acicalado. Además, por ser una solución dulce generará en el ratón una sensación placentera de refuerzo. El comportamiento de los animales fue registrado individualmente durante 5 minutos luego de aplicada la solución, midiendo el tiempo total invertido en el acicalado (**Figura 15A**), lo cual es indicativo del estado motivacional del cuidado personal y el estado anhedónico (al estímulo de refuerzo).

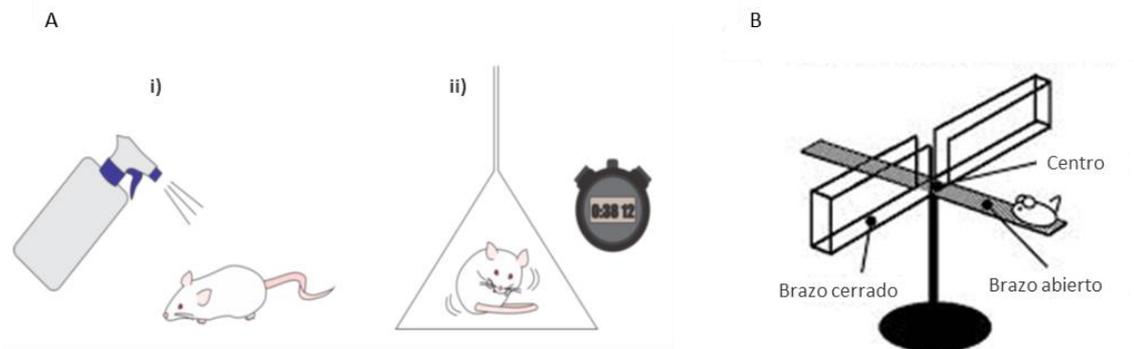


Figura 15. Pruebas comportamentales. A, Splash Test con sacarosa – i) los animales son rociados con una solución de sacarosa y ii) son colocados debajo de un embudo de vidrio, donde se registra el tiempo que invierten en acicalarse durante 5 minutos. B, Laberinto elevado en cruz. El animal es colocado en el centro de este al inicio de la prueba y se mide el tiempo que explora los brazos abiertos y cerrados durante 10 minutos.

3.2.2. Laberinto elevado en cruz

En esta prueba se coloca al ratón en el centro de un laberinto elevado en forma de cruz, que cuenta con 2 brazos cerrados por paredes y 2 brazos abiertos (**Figura 15B**). Se utiliza para evaluar el comportamiento análogo a la ansiedad, ya que detona el conflicto entre el miedo innato que tienen los roedores por las áreas abiertas contra el deseo de explorar nuevos entornos. Los animales son evaluados en cuanto al tiempo que invierte explorando los brazos abiertos y cerrados durante 10 minutos.

4. CULTIVOS CELULARES DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA MÉDULA ÓSEA

Para el cultivo de macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM) se realizó la eutanasia de los animales y posteriormente disecaron las patas traseras de cada ratón, manteniéndolas en frío sobre hielo hasta su procesamiento. Seguidamente se disecaron los huesos hasta obtener por separado las dos tibias y los dos fémures sin músculos, y se los mantuvo en PBS frío.

Se trasladaron todos los huesos hacia la cabina de flujo laminar y se los esterilizó realizando lavados sucesivos con Etanol 70 %, PBS estéril, Etanol 70% y PBS estéril. Inmediatamente se realizó el «flush» de la médula ósea mediante una jeringa, utilizando 5 mL de HBSS (Thermo Fisher #14025092) o DMEM/GlutaMAX™ (Thermo Fisher #10569010) por cada animal, que fueron colectados en un tubo falcon de 50 mL. Se disgregaron por pipeteo mecánico con pipeta P1000 y se centrifugó la suspensión a 600 G durante 5 minutos. Luego se descartó el sobrenadante, se agregó 2 mL de medio completo (DMEM/F-12 Dulbecco's (Thermo Fisher #11320033) + 10 % FBS + 1 % Penicilina/Estreptomicina (Thermo Fisher # 15140122)) y se resuspendió el pellet por pipeteo con pipeta P1000. Se ajustó el volumen a 20 mL con más medio completo y se agregó el factor estimulante de colonia de macrófagos (M-CSF) R&D Systems (#416-ML) 10 ng/mL (en los cultivos realizados en Barcelona) o Biolegend (#576406) 20 ng/mL (en los cultivos realizados en Uruguay). Esta suspensión fue dividida en dos placas de Petri de 10 cm (10 mL en cada una) y se llevó a estufa de cultivo con ambiente húmedo a 37 °C y 5% de CO₂. El sembrado de células se mantuvo hasta su diferenciación durante 7 días, realizando cambios de medio cada 3-4 días.

Para el levantado de las células desde las placas se siguieron distintos procedimientos ya que la adherencia de los macrófagos al plástico varía dependiendo de las características y tratamientos de este, haciendo que sea bastante difícil de despegarlos. En general, se trató a las células con 5mL por placa de Petri con una solución 1:1 de Tripsina-EDTA 0.25% (Thermo Fisher #25200056) y HBSS o 1.5 mL de solución pura de Tripsina-EDTA 0.25%, durante 5 – 15 minutos en estufa.

4.1. Evaluación del sistema de recombinación Cre-lox *in vitro* (KOc)

Para verificar el correcto funcionamiento del sistema de recombinación de los animales KOc se llevaron a cabo cultivos de BMDM de animales **Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{+/+}** y **Cd300^{loxP/loxP}:Cx3cr1^{CreER/+}** (KOc). Se siguió el protocolo antes descrito y, además, durante la diferenciación y hasta el día diez posterior a la siembra se incubaron con una concentración 2 nM de (Z)-4-Hidroxitamoxifeno (4-OH TMX; Sigma Aldrich #H7904), siendo este el metabolito activo del TMX, permeable a las células.

Al día diez se realizó la colecta del ARN de las células lavando y rastrillando la placa con 1 mL de reactivo TRIzol® (Thermo Fisher #15596026) y se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento. Posteriormente se procedió a la retrotranscripción y amplificación por qPCR del ADNc para evaluar los niveles de expresión de *cd300f*, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente.

4.2. Ensayos de acumulación de lípidos (WT vs KO)

Para los ensayos de acumulación de lípidos provenientes de la mielina, se cultivaron BMDM de animales WT y KO.

Luego de levantar las células por tripsinización en el día 6-7 post-siembra inicial, se plaquearon 100.000 células por cada pocillo en 300 μ L de DMEM/F12, por triplicado, en placas de 48 pocillos. Se dejaron recuperar y adherirse a la placa por 24 horas con una concentración 10-20 ng/mL de M-CSF y luego se incubaron por 24, 48 o 72 horas con una concentración de 25 o 100 μ g/mL de extractos de mielina, bajando el M-CSF durante este lapso a una concentración pro-supervivencia (5 ng/mL). En este sentido, se ha reportado en la literatura que el M-CSF a concentraciones más elevadas es capaz de recuperar la capacidad fagocítica de BMDM KO para el inmunoreceptor TREM2, que comparte características con CD300f, compensando la diferencia observada respecto a los WT a bajas concentraciones de M-CSF (Nugent et al., 2020).

En los cultivos llevados a cabo en la UAB se evaluó además las diferentes respuestas de los macrófagos al ser co-estimulados con IL-4 (20 ng/mL), LPS (100 ng/mL) o LPS (100 ng/mL) + IFN γ (20 ng/mL). En Uruguay, en tanto, solo se evaluó la co-estimulación con LPS (100 ng/mL).

Luego de transcurrido el tiempo de incubación definido para cada una de las placas, se aspiró el medio, se hizo un lavado con PBS, y se fijaron las células con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 minutos en frío y se mantuvieron con 300 μ L de PBS a 4 °C hasta su procesamiento.

4.2.1. Extracto de mielina de cerebros en gradiente de Percoll®

Para la extracción de mielina de cerebros de ratones WT se utilizó como guía el protocolo descrito usado en Gómez-López et al., 2021. Brevemente, se procedió a perfundir el ratón con PBS frío, se extrajo el cerebro y se separó los hemisferios en dos tubos eppendorf. Se procedió a cortarlo con tijeras en trozos pequeños para la digestión enzimática en 2 mL de solución de digestión (200 μ L de Colagenasa 1:10 (Sigma-Aldrich #C9407) + 200 μ L de DNAsa 1:10 (Sigma-Aldrich #D4527) + 1600 μ L de PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺) durante 30 minutos a 37 °C, agitando vigorosamente en un vortex cada 10 minutos, al cabo de este tiempo se pasó las muestras por malla de 70 μ m para terminar con la disgregación total del tejido. Se ajustó el volumen a 9 mL con solución de disociación (PBS + 2 % FBS + EDTA 7 mM) y se centrifugó a 300 g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 5,26 mL de PBS y se agregó 1,4 mL de Percoll® (Sigma Aldrich P1644) 1,22 g/mL. Para la separación por gradiente se procedió a colocar, en un tubo falcon de 15 mL, 2 mL de Percoll 1,088 g/mL y se agregó sobre este con cuidado el volumen de muestra + percoll preparado antes, procurando no mezclar las fases; sobre estas se agregó cuidadosamente 2 mL de PBS para proteger la mielina que queda en la parte superior. Se

centrifugó a 600 g por 20 minutos, sin freno para evitar el mezclado de las fases. Al finalizar el centrifugado se distinguió una fase superior blanca opaca correspondiente a los restos de mielina purificados, seguidamente se absorbió únicamente esta capa con cuidado, pasándola a tubos eppendorf nuevos, y se midió la concentración de proteínas por el método de BCA a fin de comprobar la concentración final obtenida. Se almacenó el aislado de mielina a -80 °C hasta su uso, por un máximo de seis meses.

4.2.2. Cuantificación de lípidos por absorbancia

Para evaluar la cantidad total del contenido de lípidos que presentaban las células tras los diferentes tratamientos, se hizo uso de la tinción específica para lípidos neutros con Oil Red O (ORO; Sigma Aldrich #O0625-25G). Para esto, se aspiró el PBS, se hizo un lavado con alcohol isopropílico al 60% con H₂O y se incubaron con 500 µL de solución de ORO disuelto al 60% con H₂O (desde un stock 2,5 g ORO/400 mL 100% alcohol isopropílico) durante 10-30 minutos (evitando la formación de precipitados) a temperatura ambiente. Inmediatamente después se aspiró la solución de ORO procurando levantar todos los precipitados que se hayan podido formar y se realizó un aclarado con alcohol isopropílico al 60% en agitación suave por un minuto, a fin de quitar el colorante que no haya estado unido específicamente a los lípidos.

Para la medición se levantó la totalidad del colorante unido a los lípidos neutros intracelulares incubando las células ya teñidas con 200 µL/pocillo de alcohol isopropílico al 100 % durante 10 minutos en agitación suave, luego se traspasaron los 200 µL a una placa de ELISA y se midió la absorbancia de la solución a 490 nm en un espectrofotómetro. La medida de absorbancia fue normalizada por el número de células de cada pocillo, contadas mediante tinción con DAPI 1:1000 y microscopio de epifluorescencia.

4.2.3. Inmunofluorescencia de células en cultivo, cuantificación de lípidos por microscopía

Las células fueron plaqueadas sobre cubiertas de vidrio colocadas en el fondo de los pocillos de placas de 48, al final del experimento se siguió el protocolo de fijación y almacenamiento ya descrito anteriormente. Para comenzar el inmunomarcaje se levantaron los vidrios y se pasaron a una nueva placa, se lavó con PBS y PBS + Glicina 0.1 M para eliminar autofluorescencia por grupos aldehído. Seguidamente se permeabilizaron con PBS-Tween 0.1% 2 veces y PBS Tritón 0.1% 3 veces. Se bloquearon las interacciones inespecíficas con solución de bloqueo (PBS-Tritón 0.1% - FBS 5 %) por 30 minutos a TA. Posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios durante la noche a 4° C. Al día siguiente se dejó atemperar la placa, se lavó 5 veces con PBS-Tritón 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente por

2 horas en agitación y oscuridad a TA. Posteriormente se lavó 3 veces con PBS-Tritón 0.3% y se realizó un lavado con alcohol isopropílico al 60% para proceder con la tinción de ORO como se describió anteriormente. Los anticuerpos usados se detallan en la tabla de anticuerpos (**Tabla 7**).

4.3. Ensayos de fagocitosis (WT vs KO)

Se adaptó el protocolo descrito en Gómez-López et al., 2021. Básicamente, luego del conteo de BMDM obtenidos al cabo de los 7 días de diferenciación ya detallado, se plaquearon 100 mil BMDM en placas de ELISA y se las dejó por 24 horas en estufa en medio completo con M-CSF 5 ng/mL. El día de la evaluación se las estimuló con mielina-pHrodo (pHrodo™ Green STP ester, Thermo Fisher P35369) o microesferas fluorescentes (FluoSpheres™ Carboxylate-Modified Microspheres, Thermo Fisher F8812) y adicionalmente, se valoró la co-estimulación con LPS 100 ng/mL. La fagocitosis de los distintos compuestos se evaluó durante 30 minutos, 2 y 4 horas. Al cabo de este tiempo se realizó un lavado con PBS y se levantaron las células por tripsinización agregando 50 µL Tripsina-EDTA 0.25% por cada pocillo, se las llevó a estufa por 15 minutos y se detuvo la reacción por agregado de 250 µL/pocillo de PBS + 10% FBS; manteniéndolas luego a 4° C. Se agregó el marcador DAPI 1:1000, para discriminar células vivas, y se analizaron por citómetro de flujo usando el equipo Attune® NxT.

4.3.1. Conjugación mielina-pHrodo™ Green STP ester

Se partió desde el pHrodo disuelto en DMSO siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la conjugación se mezcló 9,19 µL de extracto de mielina (30 mg/mL) con 25 µL de pHrodo-DMSO en un eppendorf. Se resuspendió en 215,81 µL de PBS (pH 8.0) y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente en agitación y oscuridad. Seguidamente se centrifugó 4000 g por 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 950 µL de PBS (pH 7.4). Se obtiene de esta manera una concentración final de 0.3 µg/mL de mielina purificada marcada con pHrodo-verde. La mielina conjugada fue almacenada hasta su uso a -80 °C, manteniendo su eficacia por al menos seis meses.

5. LESIONES DE MÉDULA ESPINAL

Para la realización de las lesiones de médula espinal por contusión los ratones fueron anestesiados con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por administración intraperitoneal. Se expuso la médula realizando una laminectomía a la altura de la 11^{va} vértebra, para ello se realiza una pequeña incisión en la piel y músculo y se quitan pequeños fragmentos superiores de la vértebra para exponer únicamente el segmento de interés. Una vez realizada la

laminectomía el animal es inmovilizado y fijado en uno de los dispositivos para realizar la lesión de la médula espinal por contusión. Las lesiones realizadas en la UAB se hicieron utilizando el Infinite Horizon Impactor, aplicando una fuerza de 50 y 60 kdyn, mientras que las que se llevaron a cabo en el IPMon fueron realizadas adecuando y poniendo a punto el PinPoint Precision Cortical Impactor 3000 (PCI3000), para este tipo de lesiones (Tip diámetro 2 mm; prof. 1,2 mm; vel. 1,5 m/s; tiempo de permanencia 0 ms), de tal forma que las mismas resultasen semejantes, reproducibles y equivalentes entre los equipos, al comparar la recuperación de los animales por la escala de BMS. Aunque ambos dispositivos consisten en un pistón controlado por computadora, la diferencia viene dada por los parámetros que cada uno permite configurar, así como en la forma de fijación del animal para llevar a cabo la contusión. Luego de la LME los animales fueron tratados, a fin de producir analgesia, con Tramadol (5 mg/kg) en el IPMon y con Buprenorfina (0.1 mg/kg) en la UAB, durante 3 días

5.1. Estrategia experimental y lesiones en ratones KOc

Para estas lesiones se usaron 3 grupos de animales independientes por cada una, de tal forma de contar con grupos control para la inyección de TMX y la no eliminación del gen (**Tabla 5**). Los animales fueron administrados de forma IP con TMX o vehículo como ya fue puntualizado. En resumen, luego de los 4 días con una inyección diaria se dejó transcurrir un periodo de 4 semanas para realizar la LME (**Figura 16**), logrando de tal manera que en aquellos animales que recibieron TMX y expresan la recombinasa, los monocitos circulantes hayan recuperado la expresión del receptor, mientras que la microglía y macrófagos de barrera permanezcan carentes de este (Goldmann et al., 2013). Las lesiones de estos animales fueron realizadas en el IPMon, utilizando el PCI3000 con las condiciones detalladas anteriormente.

Tabla 5. Grupos experimentales para LME de animales KOc y sus controles

Genotipo	Cd300 ^{floxP/loxP} :Cx3cr1 ^{+/+}	Cd300 ^{floxP/loxP} :Cx3cr1 ^{CreER/+}
TMX	+	+

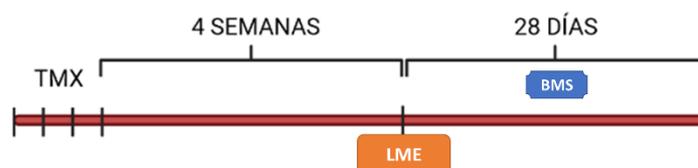


Figura 16. Estrategia experimental de inducción de recombinación y LME. Los animales fueron inyectados con Tamoxifeno (TMX 100 mg/kg) durante 4 días consecutivos para inducir la recombinación, a las 4 semanas se realizó la lesión de médula espinal (LME), permaneciendo CD300f KO a partir de este tiempo solo la microglía y macrófagos de barrera. Se evaluó la recuperación funcional locomotora hasta los 28 dpl (días 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28) mediante la Basso Mouse Scale (BMS)

5.2. Evaluación de la recuperación funcional motora luego de la lesión

Para evaluar la recuperación de la actividad locomotora se dispuso a los animales en un campo abierto a los 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 días post-lesión (dpi) y se los puntuó usando la escala de 9 puntos Basso Mouse Scale (BMS; (Basso et al., 2006)) desarrollada específicamente para valorar la recuperación funcional de los ratones tras una lesión de médula espinal por contusión a nivel torácico (

Tabla 6). En la misma se evalúan los movimientos y coordinación de los miembros inferiores al caminar por un arena de forma libre, durante 10 minutos. Estas evaluaciones fueron realizadas en ciego respecto al genotipo. En el proceso se dio la participación de varios investigadores independientes, consensuando la valoración de lo observado para que exista unificación de criterios.

Tabla 6. Puntuaciones del 0 al 9 en la escala «Basso Mouse Scale» para ratones con LME. Se detallan las acciones locomotoras a observar para la asignación del puntaje. Tabla adaptada de Basso et al., 2006.

Puntaje	Acción
0	Sin movimiento de tobillo
1	Movimiento de tobillo leve
2	Movimiento extensivo del tobillo
3	<ul style="list-style-type: none"> • Apoyo plantar de la pata con o sin soporte del peso • Pasos dorsales ocasionales o frecuentes sin apoyo de la planta de la pata
4	Pasos plantares ocasionales
5	<ul style="list-style-type: none"> • Pasos plantares frecuentes o consistentes sin coordinación • Pasos plantares frecuentes o consistentes con poca coordinación y la pata rotada al contacto inicial y al levantar
6	<ul style="list-style-type: none"> • Pasos plantares frecuentes o consistentes con poca coordinación y la pata paralela al contacto inicial • Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata rotada al contacto inicial y al levantar
7	<ul style="list-style-type: none"> • Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y rotada al levantar • Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, pero con inestabilidad severa del tronco
8	<ul style="list-style-type: none"> • Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, con leve inestabilidad del tronco leve • Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, estabilidad del tronco normal, pero con la cola abajo o alternando abajo y arriba
9	<ul style="list-style-type: none"> • Pasos plantares frecuentes o consistentes mayormente coordinados con la pata paralela al contacto inicial y al levantar, estabilidad del tronco normal y la cola siempre arriba

6. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

6.1. Obtención del tejido

Para obtener los tejidos de médula espinal a los 14 y 28 días post-lesión (dpi) los animales fueron anestesiados de forma profunda con ketamina (180 mg/kg) y xilacina (20 mg/kg) y se realizó la perfusión intracardiaca con aproximadamente 50 mL de PFA al 4 % en solución tampón fosfato 0.1 M. Luego de la perfusión, se disecaron en lupa 6 mm de médula espinal centrados en el sitio de lesión y se realizó la post-fijación del tejido con PFA al 4% en solución tampón fosfato 0.1 M durante 3 horas. Inmediatamente se lavó con solución tampón fosfato salino (PBS) y se crioprotegieron en solución de sacarosa (Sigma-Aldrich) al 30 % en PBS a 4 °C por al menos 48 horas. Posteriormente, las muestras de tejido medular fueron montadas en bloques de tal manera que queden embebidas con el compuesto soluble en agua de glicoles y resinas (Tissue-Tek; Sakura) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Fueron almacenadas a -80 °C hasta el día de su procesamiento, donde se cortaron en un criostato Leica CM1850 UV, colectando las secciones del tejido en portaobjetos de vidrio previamente gelatinizados. Se realizaron 4 series de portaobjetos, en los cuales se colocaron secciones transversales de 14 µm de grosor de distribución rostro-caudal, representando las secciones adyacentes en el mismo portaobjetos una separación de 140 µm de la médula espinal. Los portaobjetos con las médulas adheridas se dejaron secar para favorecer la adherencia y fueron conservados a -20 °C hasta su uso.

6.2. Tinciones e inmunofluorescencia de tejidos

Al retirar las secciones de tejido del freezer, previo a realizar los marcajes, fueron dejadas sobre plancha a 37 °C por al menos 20 minutos para evaporar todo el líquido y permitir que se adhieran bien al vidrio.

6.2.1. Luxol Fast Blue (LFB)

Para el análisis de preservación de mielina se realizó la tinción con Luxol Fast Blue (LFB; Sigma S3382-25G), las secciones fueron deshidratadas en soluciones crecientes de etanol y luego se colocaron en una solución de LFB en 95% de etanol y 0.05% de ácido acético durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente se lavó las secciones en agua destilada y se las colocó en una solución de carbonato de litio (Li_2CO_3) al 0.05% en agua destilada durante 50 segundos, seguido de un breve lavado con etanol al 70% y un lavado con agua destilada. A continuación, se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol y finalmente con xilol para ser montadas con

el medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich). Después de dejarlas secar por 24 horas se observó y tomó fotos de las secciones utilizando luz transmitida.

6.2.2. Oil Red O (ORO)

Para el análisis de lípidos neutros en el sitio de lesión se siguió el protocolo descrito en Mehlem et al., 2013. En el caso de tejido al que se hizo co-marcaje con anticuerpos, la tinción con ORO se realizó al finalizar el protocolo de inmunofluorescencia. Brevemente, los cortes se sacaron del freezer, se dejaron 30-45 minutos sobre plancha a 37 °C para evaporar todo el líquido y permitir una buena adherencia de las secciones al vidrio, luego se tiñeron con solución de ORO en alcohol isopropílico al 60% durante 10 minutos. Si las secciones venían de estar en PBS al final de la inmunofluorescencia, previo a la tinción con ORO se hizo un enjuague con alcohol isopropílico al 60 %. Posterior a la tinción, los portaobjetos se dejaron lavando en vaso Coplin bajo chorro de agua corriendo durante 30 minutos, cuidando de que no sea directamente sobre los cortes para no despegarlos (en oscuridad si se había hecho una inmunofluorescencia previa sobre el tejido). Se montaron con medio de montaje de base acuosa, glicerol 10% o Fluoromount con DAPI (Thermo Fisher #00-4959-52). Se observó y digitalizó los preparados haciendo uso de un microscopio Olympus con luz transmitida o epifluorescencia, según el caso, ya que el ORO presenta autofluorescencia en rojo.

6.2.3. Inmunofluorescencia

Se efectuaron inmuno-marcajes en cortes transversales de la médula espinal lesionada, siguiendo el protocolo detallado en Peluffo et al., 2015. Brevemente, los cortes preservados a - 20°C se retiraron del freezer y se dejaron a temperatura ambiente (TA) 30 minutos sobre termobloque durante 20 minutos, luego se los lavó con PBS, se permeabilizaron con PBS-Tritón 1% y se bloquearon las interacciones inespecíficas con solución de bloqueo (PBS-Tritón 1% - FBS 10%). Posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios durante la noche a temperatura ambiente (TA) o a 4° C, seguido por el secundario correspondiente, ambos disueltos en solución de bloqueo. Se detallan los anticuerpos y diluciones utilizadas en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencias de tejido y células.

Anticuerpo	Fluoróforo	Fabricante	Nº de catálogo	Dilución
anti-Iba 1	-	Rafer	19-19741	1:500 / 1:800
anti-GFAP	-	Invitrogen	13-0300	1:500
anti-Colágeno 1	-	Southern Biotech	2150-1908	1:60
anti-IgG de conejo	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-21206	1:200
anti-IgG de rata	Alexa Fluor 594	Invitrogen	A-21208	1:200

7. MICROSCOPIA

Para las fotografías de microscopía óptica se utilizaron los microscopios OLYMPUS CX41 con cámara Nikon, y el Olympus BX51 con cámara DP73. Este último también se utilizó para fotografías de epifluorescencia. Además, se hizo uso de un microscopio Nikon Eclipse Ni-U LED para fotografías de epifluorescencia de médulas lesionadas y BMDM.

8. SOFTWARE

Las imágenes de microscopía óptica y epifluorescencia se procesaron utilizando el software FIJI (1) con la herramienta ROI, medidas de área y «cell counter». Se utilizó el software ANY-Maze (2) para la evaluación del comportamiento de los animales en las distintas pruebas llevadas a cabo. Los resultados de citometría de flujo se analizaron haciendo uso de FlowJo™ Software (3). – Se graficaron y analizaron los distintos resultados obtenidos haciendo uso del software GraphPad Prism (4).

1. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682 (2012). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
2. ANY-maze (RRID:SCR_014289) Stoeling Co, USA; www.any-maze.com
3. FlowJo™ Software for Windows. Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company; 2021.
4. GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se hizo uso de las herramientas integradas en el software GraphPad Prism. Para los gráficos de recuperación funcional motora de los animales (BMS), mielina conservada y número de neuronas, se utilizaron las pruebas ANOVA de medidas repetidas de 1 y 2 vías, y la corrección de Bonferroni. Se utilizó la prueba de t-Student de dos

colas para la comparación de dos grupos en los experimentos de medidas de expresión génica, número de células, acumulado lipídico, fagocitosis y área teñida en tejido para los diferentes marcadores. Si las varianzas resultaban no comparables se utilizó la prueba no paramétrica de Welch. Para la cuantificación de diferentes variables que pudieran depender del operador se realizaron cuantificaciones en ciego.

RESULTADOS

1. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA AUSENCIA DE CD300f *in vivo* E *in vitro*

Como fue mencionado previamente, pruebas llevadas a cabo por el laboratorio, mediante un experimento preliminar al comienzo de este trabajo, eran sugerentes de que la ausencia de CD300f impactaba de forma negativa en la recuperación funcional motora de los ratones luego de una lesión de médula espinal. A su vez, otros ensayos mostraban que ratones CD300f KO con lesión de médula espinal y tratados con IL-4 intramedularmente no experimentaban la mejora inducida por esta citoquina en la recuperación funcional motora, que sí se observa en ratones WT.

1.1. Efecto sobre la recuperación funcional motora luego de una lesión medular por contusión

En el presente trabajo, con el objetivo de verificar los datos previamente observados, se realizaron lesiones de médula espinal por contusión en ratones WT y CD300f KO. Se probaron dos condiciones de lesión haciendo uso del equipo Horizon Impactor, específico para tal fin, fijando la fuerza de impacto en 50 o 60 kdyn. Cuando se fijó el equipo en 60 Kdyn, ambos grupos experimentales (WT n=3; CD300f KO n=6) presentaron el mismo patrón de recuperación funcional tras la lesión medular al ser evaluados mediante la escala de BMS durante 28 días, no existiendo diferencias entre ellos (**Figura 17A**), y apareciendo el primer indicio de recuperación para ambos grupos a los 10 dpl. En cambio, al efectuar lesiones más leves, con una fuerza de impacto de 50 Kdyn, se evidenció que los animales CD300f KO presentaban una peor recuperación motora respecto al grupo WT, apareciendo el primer indicio de recuperación para estos últimos a los 3 dpl mientras que para los CD300f KO fue a los 5 dpl. La **Figura 17B** resume lo observado durante los 28 dpl para dos cohortes independientes de animales lesionados en diferentes días con las mismas condiciones, siendo 2 grupos WT (n=11) y 2 grupos CD300f KO (n=14). Ambas cohortes mostraron un patrón similar en la recuperación funcional motora luego de la lesión. El análisis estadístico arrojó que la recuperación funcional mostrada por los grupos CD300f KO y WT resultaba significativamente diferente (ANOVA de dos vías, $p < 0.0002$) en el periodo comprendido entre los 3 y 28 dpl. Adicionalmente, animales lesionados a 50 kdyn y sacrificados a los 14 dpl para la disección del tejido a este tiempo (WT n=5 y CD300f KO n=6), mostraron un patrón similar de reducción de la recuperación funcional para el grupo CD300f KO al ser evaluados durante ese periodo (**Figura 17C**). En este sentido, las observaciones realizadas

sugieren que CD300f participa de alguna manera en los procesos celulares de la respuesta inflamatoria y promueve una mejor recuperación funcional luego de la lesión de médula espinal, aunque depende en gran medida de la severidad, y se hace imperceptible con el incremento de esta.

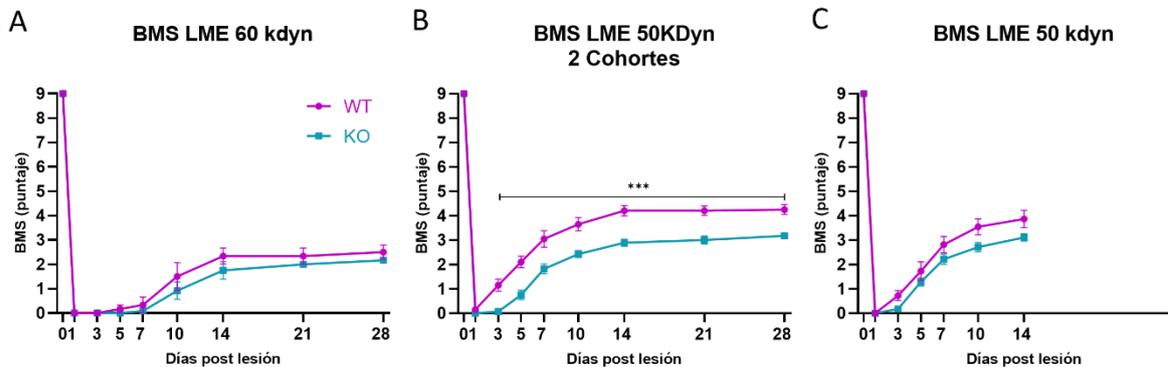


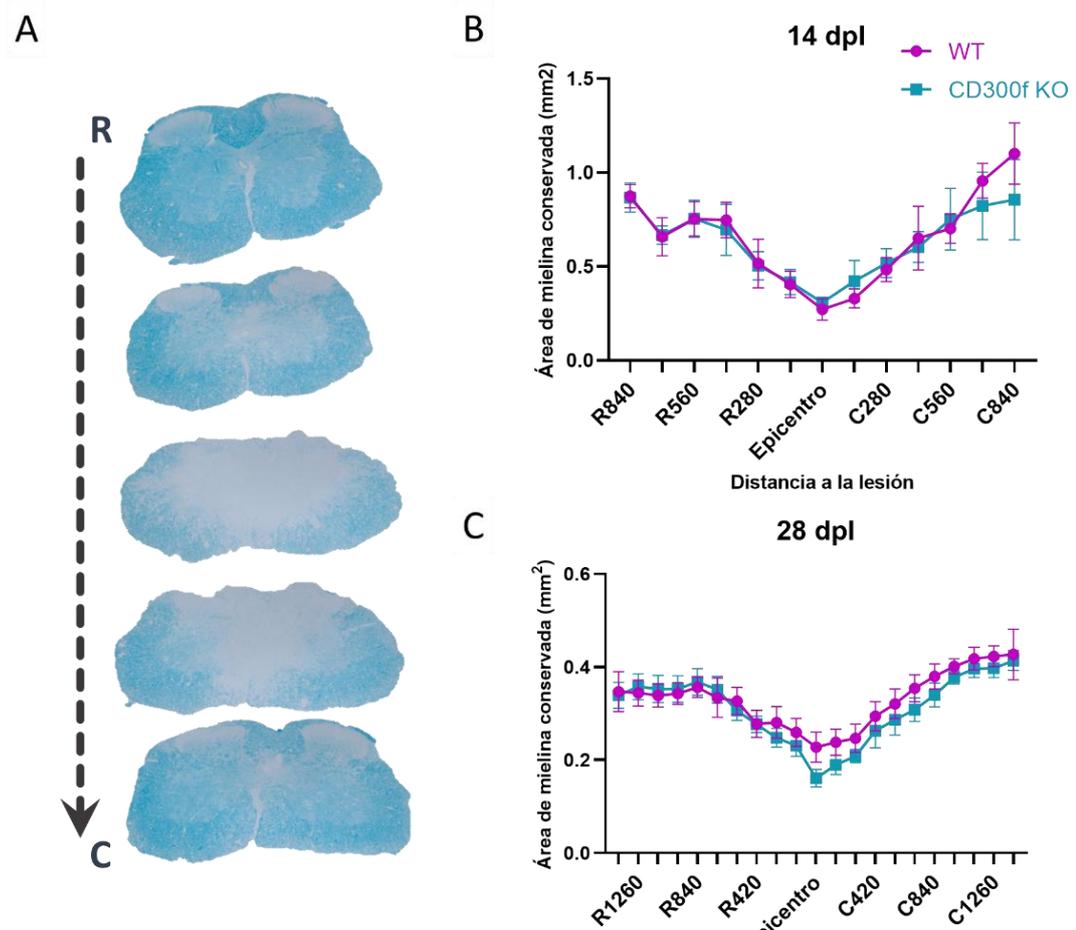
Figura 17. Evolución de la recuperación funcional motora valorada por la escala BMS hasta el día 28 post-lesión de médula espinal (LME) de ratones WT y CD300f KO. A) No se observaron diferencias entre los grupos (WT n=3; CD300f KO n=6) al realizar la lesión aplicando 60 kdyn de fuerza. Se observó que ambos grupos lograron un puntaje máximo que oscila entre 2 y 2,5 puntos en la escala. **B)** Cuando se realizaron lesiones con 50 kdyn de fuerza los ratones CD300f KO (n=14) exhibieron una peor recuperación funcional en comparación con el grupo control WT (n=11), teniendo un punto de diferencia en la escala. Se muestra el gráfico con la suma de evaluaciones para 2 cohortes independientes de animales lesionados. **C)** Otra cohorte de ratones (WT n=5; CD300f KO n=6) lesionados a 50 kdyn y seguidos hasta los 14 dpl mostraron un patrón de comportamiento similar al de los anteriores, aunque con una diferencia menor, bajo las mismas condiciones de lesión. Media \pm SEM. ***p<0.0002 ANOVA de dos vías.

1.2. Análisis del tejido medular a los 14 y 28 días post-lesión

1.2.1. Efecto sobre la preservación de mielina

Con el objetivo de dilucidar la causa de esta diferencia en el comportamiento motor, se evaluó el área de mielina conservada mediante la tinción con Luxol Fast Blue, colorante que tiene afinidad por las lipoproteínas de la mielina, por lo que se logra diferenciar claramente la sustancia gris de la sustancia blanca. Las secciones de médula evaluadas representan el total de la lesión, centradas en el epicentro de esta, siendo la distancia entre cada una de ellas de 140 μ m. Se generaron fotografías de microscopía óptica de las secciones teñidas y fueron procesadas de forma automática mediante el software Fiji. Para ello previamente se fijaron los valores de umbral para discriminar área positiva de mielina teñida de la negativa no teñida, y luego del procesamiento automático se hizo una verificación para cerciorar que la selección haya sido coherente en cada fotografía. Se valoró la desmielinización rostral y caudal al epicentro de la lesión, que se evidencia por tener la mayor pérdida de mielina/tinción para LuxolFast Blue (**Figura 18A**). Al analizar el tejido a los 14 dpl se pudo observar como la desmielinización va disminuyendo conforme nos alejamos del epicentro de lesión, tanto rostral como caudalmente en ambos genotipos, no evidenciándose diferencias en el área de mielina preservada entre

ambos (**Figura 18B**). En tanto, tejido disecado a los 28 dpl fue analizado en colaboración con un compañero del laboratorio, y tampoco arrojó diferencias entre los grupos en el área de mielina conservada a este tiempo, aunque se aprecia una leve tendencia a tener mayor preservación caudal y cercana al epicentro en el grupo WT (**Figura 18C**). En primera instancia, estos datos sugieren que la peor recuperación funcional observada en los animales CD300f KO luego de la lesión medular no estaría relacionada con una mayor pérdida de mielina por parte de estos.



1.2.2. Efecto sobre la acumulación de lípidos

En la lesión de médula espinal se generan gran cantidad de restos de mielina que son fagocitados por las células fagocíticas, como la microglía residente y los macrófagos que infiltran, y CD300f podría estar involucrado en estos procesos al censar DAMPs y modular la reprogramación

metabólica. Con el objetivo de investigar la fagocitosis y degradación de restos de mielina, se evaluó la acumulación de lípidos neutros en la lesión mediante la tinción específica para estos con el colorante Oil Red O (ORO). Se ha descrito ampliamente que estos lípidos se almacenan en las gotas lipídicas de las células luego de ser fagocitados y metabolizados, principalmente en forma ésteres de colesterol. Las gotas lipídicas son estructuras especializadas e inducibles, que funcionan como organelos citoplasmáticos participando en varios procesos como la señalización

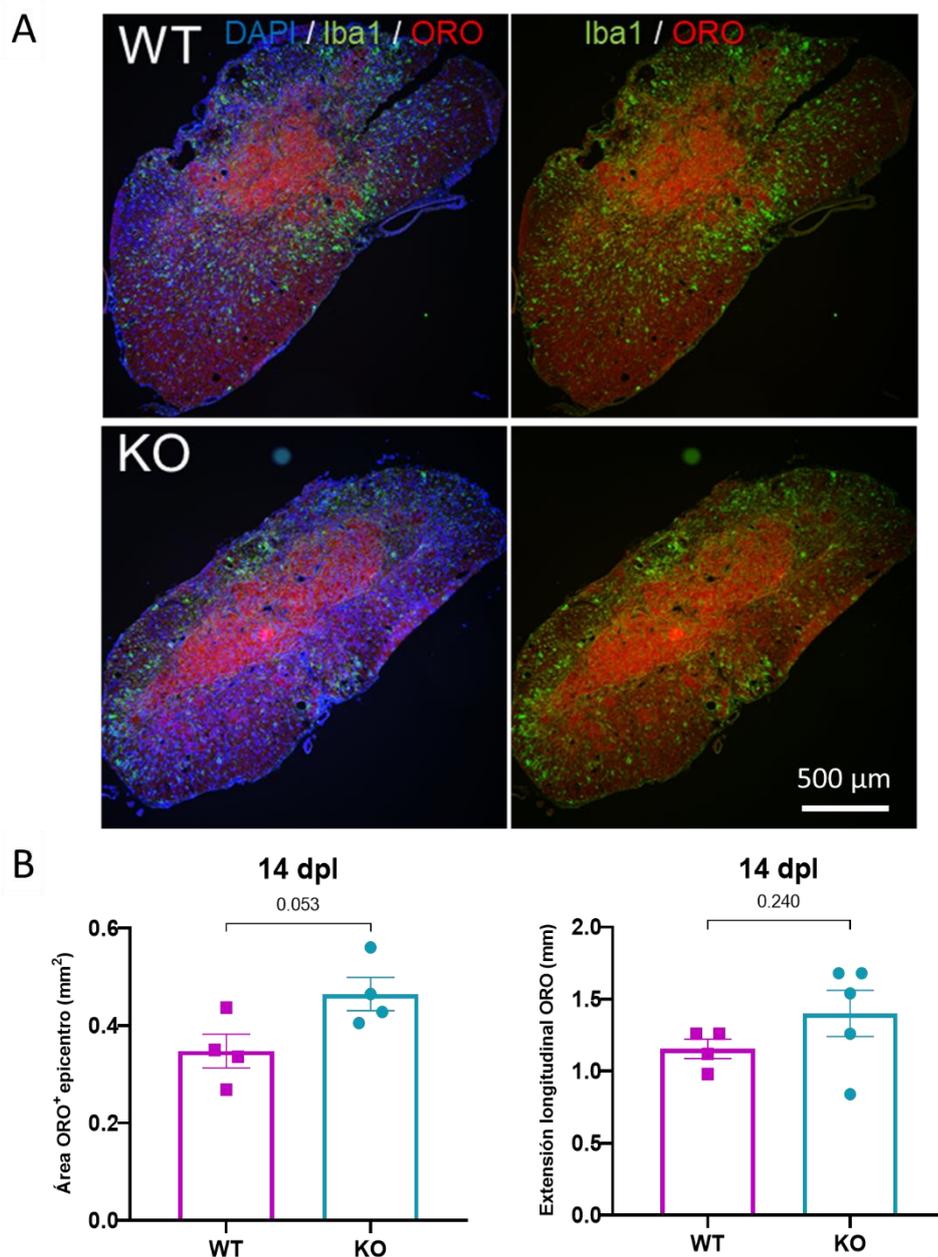


Figura 19. Evaluación de acumulación de lípidos neutros mediante la tinción de Oil Red O (ORO) a los 14 días post-lesión. **A)** Inmunofluorescencias representativas del epicentro de lesión de animales WT y CD300f KO. Secciones de tejido con marcaje para microglía/macrófagos por Iba1 (verde), lípidos neutros por tinción con ORO (rojo) y marcación nuclear con DAPI (azul). **B)** Representación gráfica de las medidas de área positiva teñida (ORO+) en el epicentro de lesión y extensión longitudinal rostro-caudal del ORO+. Si bien no se observan diferencias significativas entre los genotipos para ninguno de los parámetros medidos, existe una leve tendencia ascendente para ambos en los animales CD300f KO. Media \pm SEM; prueba t-Student.

celular, el tráfico de membrana, la síntesis de mediadores inflamatorios y, la activación y regulación del metabolismo lipídico (Olzmann and Carvalho, 2019).

Al analizar el área teñida positiva para ORO a los 14 dpl, no se observaron diferencias que resultaran significativas entre los genotipos al comparar el área en el epicentro de la lesión (**Figura 19A y B**; WT 0.35 ± 0.03 , KO 0.46 ± 0.03 ; $p=0.05$), ni la extensión longitudinal rostro-caudal de secciones conteniendo tinción para ORO (**Figura 19B**; WT 1.15 ± 0.07 , KO 1.40 ± 0.2 ; $p=0.24$). Sin embargo, a pesar de no ser estadísticamente significativa, se puede apreciar una tendencia al alza para ambos parámetros medidos en los animales CD300f KO, sugiriendo una mayor presencia de lípidos que comienzan a acumularse en las células. En tanto, se observó la formación de grandes cavidades quísticas de lesión necrótica en un animal CD300f KO, determinando esta pérdida de tejido una medida menor de área ORO+ para este ratón, por lo que fue descartado para esta cuantificación en el epicentro de la lesión.

Al observar una magnificación de las estructuras ORO+ se puede ver como éstas se encuentran de forma interna a las células Iba1+, correspondientes a poblaciones de microglía/macrófagos (**Figura 20**).

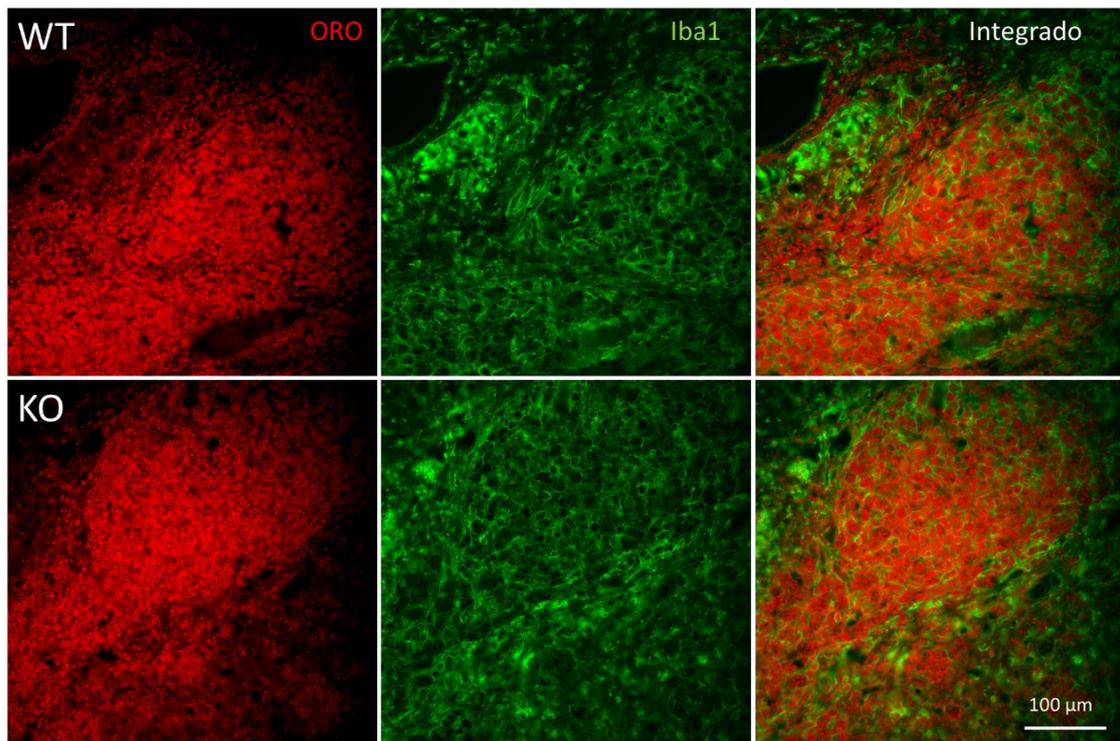


Figura 20. Inmunofluorescencias representativas del área de lesión a los 14 días. Marcaje para microglía/macrófagos por Iba1 (verde), lípidos neutros por tinción con ORO (rojo). Se aprecia el contenido lipídico ORO+ interior a las células Iba1+.

Con el objetivo de evaluar los lípidos acumulados a los 28 días post-lesión, se realizó la tinción de ORO para las secciones de tejido obtenidas a este tiempo (**Figura 21**). Se observa en la **Figura 21** mayor área positiva para el colorante en el epicentro de la lesión en los animales CD300f KO al igual que mayor extensión longitudinal rostro-caudal de este (área 0.19 ± 0.02 ; extensión 0.88 ± 0.01) respecto al grupo control de animales WT (área 0.12 ± 0.02 , extensión 0.56 ± 0.06), resultando ambas diferencias estadísticamente significativas (prueba t-Student de dos colas $p=0.03$ para área y $p=0.01$ para la extensión longitudinal)

Asimismo, al comparar los valores medidos para estos parámetros a los 28 dpl respecto a los medidos a los 14 dpl se puede apreciar que si bien ambos grupos muestran una reducción de los valores, el grupo de animales CD300f KO presenta una menor bajada de estos. Al comparar las medias y asumiendo como 100% las correspondientes observadas a los 14 dpl para cada genotipo, los porcentajes de reducción tanto del área ORO+ en el epicentro de lesión (59.67 % de los KO contra 65.39 % de los WT) como del largo longitudinal rostro-caudal (37.14 % de los KO contra 64.52 % de los WT) revelan la permanencia de mayor cantidad de lípidos a lo largo de la lesión a los 28 dpl en los animales CD300f KO (**Figura 22**).

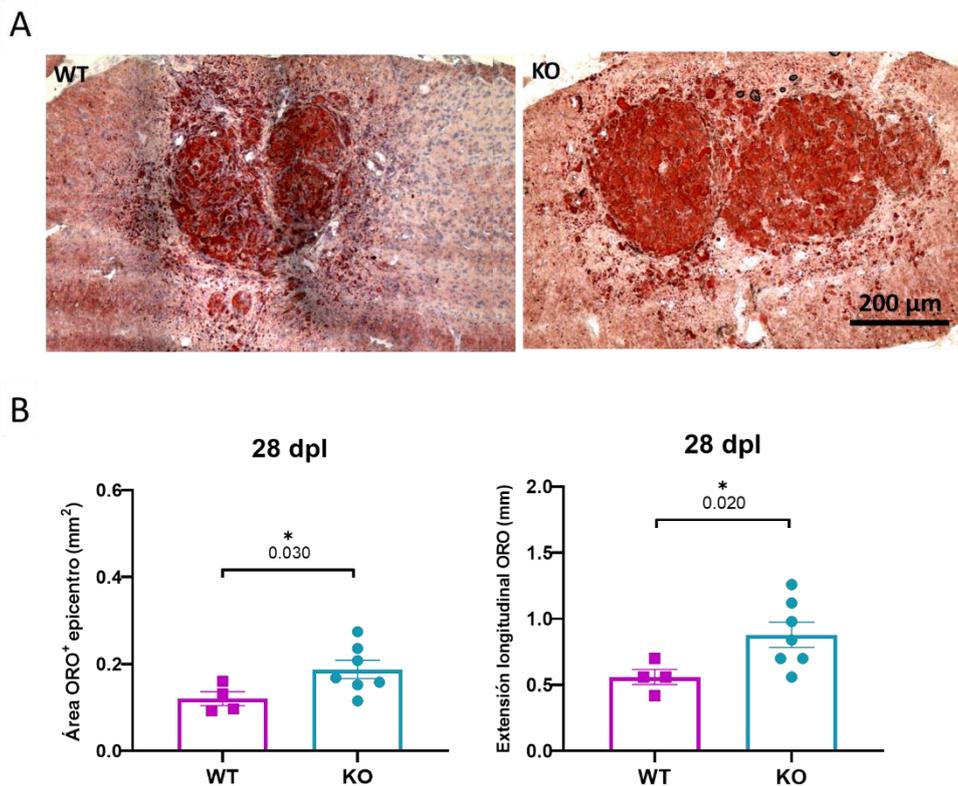


Figura 21. Evaluación de acumulación de lípidos neutros mediante la tinción de Oil Red O (ORO) a los 28 días post-lesión. A) Microscopías de luz transmitida representativas de secciones de tejido conteniendo el epicentro de lesión de animales WT y CD300f KO, co-teñidas con Hematoxilina. **B)** Representación gráfica de las medidas de área positiva teñida (ORO+) en el epicentro de lesión y extensión longitudinal rostro-caudal del ORO+. Se observa tanto mayor área positiva para ORO en el epicentro de lesión como mayor extensión longitudinal en los animales CD300f KO, siendo ambas significativas respecto al grupo WT. Valores de $p < 0.05$ t-Student de dos colas. Media \pm SEM.

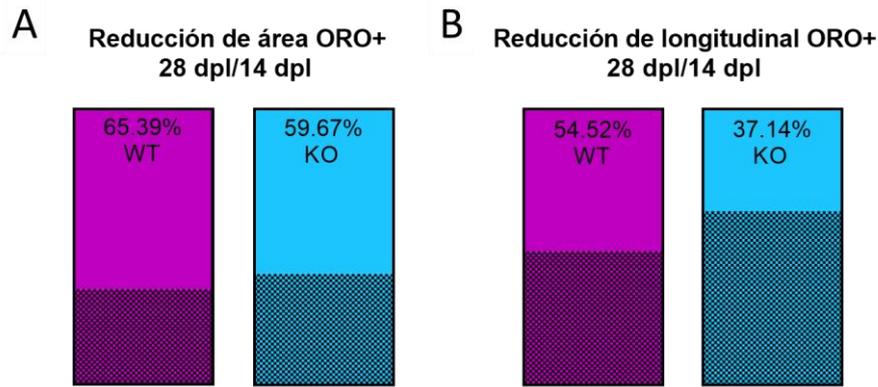


Figura 22. Representación gráfica de la reducción de Oil Red O (ORO+) en el epicentro de lesión (A) y extensión longitudinal rostro-caudal (B) al comparar los valores de las medias a los 14 y 28 dpl, asumiendo como 100% los valores de estas a los 14 dpl para cada grupo. Se observa como los animales CD300f KO (turquesa) exhiben menores porcentajes de reducción para ambos parámetros en comparación a los animales WT (violeta) en los que se reduce entre un 55 y 65 %.

Teniendo en cuenta esto, se puede suponer que las células sin CD300f tendrían problemas para la correcta metabolización de lípidos y su eliminación del tejido, ya que no logran una disminución similar a la de los WT en el periodo transcurrido entre los 14 y 28dpl. Alternativamente, y teniendo en cuenta que los datos evaluados a los 14 dpl son ligeramente superiores en los animales CD300f KO en comparación con los WT, aunque no estadísticamente significativos, se podría sugerir que las células fagocíticas carentes del inmunoreceptor están acumulando mayor cantidad de lípidos en su interior y como consecuencia de esto se dé una pobre metabolización de los mismos, dando como resultado la formación de células espumosas que permanecen por mayor tiempo en el sitio de la lesión. Es sabido que este tipo de células, ya sean macrófagos o microglía, pierden a su vez capacidad fagocítica (Wang et al., 2015a; Marschallinger et al., 2020), por lo que puede que también se esté dando un aumento en el número de células presentes en el área para compensar este desbalance.

Cabe mencionar que, aún hoy es discutido en la literatura el dilema planteado previamente sobre qué sucede primero, si es la inflamación la que conduce a la formación de gotas lipídicas en las células o si es la acumulación de gotas lipídicas la que induce fenotipos inflamatorios (Marschallinger et al., 2020).

1.2.3. Efecto sobre la cicatrización fibrótica y astrogliosis a los 14dpl

Se ha descrito que mayoritariamente los fenotipos M2 antiinflamatorios de los macrófagos serían quienes promueven la formación de la cicatriz fibrótica por parte de los fibroblastos (Anjum et al., 2020). Para verificar si la infiltración de macrófagos podría ocurrir asociada a cambios en la formación de este tejido conectivo fibroso, que se ha descrito madura hacia los 14 días post-lesión, y que podría a su vez inhibir la regeneración de axones (Dorrier et al., 2021;

Ayazi et al., 2022), se llevó a cabo la detección de colágeno tipo I por inmunofluorescencia en las secciones de tejido correspondientes a 14 dpl (**Figura 23A**). No se observaron diferencias entre los genotipos en el área positiva para este marcador en el epicentro de lesión, así como tampoco en la intensidad de fluorescencia media (**Figura 23B**). Por lo que pudimos deducir que no está ocurriendo un cambio en la formación de la cicatriz fibrótica, al menos en este tiempo post-lesión evaluado.

Por otro lado, para evaluar la formación de la cicatriz astrogliar por parte de los astrocitos reactivos, se realizó la detección por inmunofluorescencia del marcador astrocitario GFAP en las mismas secciones. Se observó, como era esperado, que en ambos genotipos existe una correlación entre el área negativa para GFAP y el núcleo de lesión positivo para ORO (**Figura 19**), pero no así la presencia de una cicatriz definida de astrocitos reactivos que delimitara a este

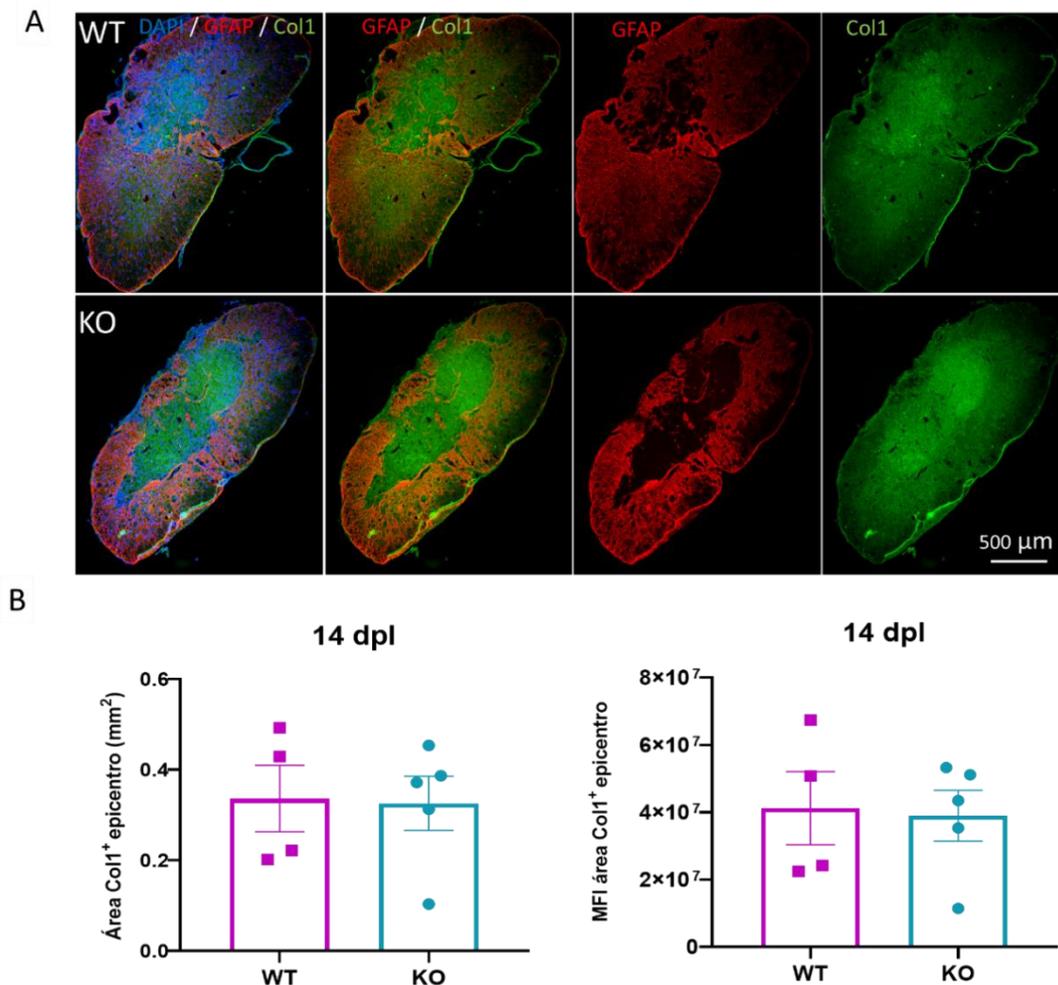


Figura 23. Evaluación de la formación de cicatriz fibrótica y astrogliar a los 14 dpl. A) Inmunofluorescencias representativas del epicentro de lesión de animales WT y CD300f KO. Secciones de tejido con marcaje para astrocitos por GFAP (rojo), cicatriz fibrótica por colágeno tipo I (verde) y marcaje nuclear por DAPI. No se evidencia formación de cicatriz astro gliar (GFAP) rodeando a la lesión en ninguno de los grupos. **B)** Representación gráfica del área positiva marcada para Col1 en el epicentro de lesión e intensidad de fluorescencia media (MFI) para esta. No se observan diferencias entre los genotipos para ninguno de los parámetros. Media \pm SEM; prueba t Student.

núcleo (**Figura 23A**). Esta cicatriz en cambio, sí fue observada delimitando a las cavidades quísticas de tejido necrótico formadas en uno de los animales CD300f KO (no mostrado).

1.3. Efectos sobre el metabolismo de lípidos provenientes de restos de mielina en macrófagos derivados de la médula ósea

Con el fin de poder evaluar el metabolismo lipídico de los restos de mielina, se realizaron cultivos de BMDM provenientes de animales macho WT y CD300f KO, y se los expuso a extractos de mielina durante diferentes periodos de tiempo: 24 horas, 48 horas y 72 horas con mielina, y 24 horas con mielina + 24 horas sin mielina. A su vez fueron co-estimulados con LPS, LPS/IFN γ o IL-4, a fin de inducir respectivamente fenotipos más proinflamatorios o antiinflamatorios que activan diferentes vías metabólicas (Mills and O'Neill, 2016), y poder evaluar así posibles patrones diferenciales en el procesamiento de los lípidos provenientes del extracto de mielina. Cabe recordar que fue descrita además la asociación de CD300f con IL-4R α , pudiendo amplificar la respuesta inducida por la IL-4 en macrófagos (Moshkovits et al., 2015).

Al analizar el impacto de los diferentes tratamientos y estímulos realizados, así como la menor concentración de M-CSF usada en estos, sobre la sobrevida de BMDM de animales macho, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos a ningún tiempo evaluado (**Figura 24**). No obstante, sí se observaron diferentes patrones de sobrevida ante los diferentes estímulos para cada tiempo. Se evidenció que los grupos control, tratados únicamente con PBS sin mielina, experimentaban una reducción en el número de células conforme pasaron los días, alcanzando un número mínimo en el conteo realizado a las 72 horas (**Figura 24D**). En contraste, al cultivar las células con PBS y mielina, se inducía mayor sobrevida respecto al grupo control PBS en todos los tiempos (**Figura 24A, B, C y D**). Los demás tratamientos realizados mostraron un comportamiento similar entre sí en los diferentes tiempos evaluados, presentado leves variaciones no significativas. Los grupos estimulados con LPS/IFN γ exhibieron una tendencia a poseer un número menor de células a las 72 horas (**Figura 24D**), aunque tampoco son diferencias significativas.

Estos datos evidenciaron la capacidad del extracto de mielina para inducir mejor sobrevida en las células, siendo indicativo de que posiblemente el mismo contenga moléculas tróficas que contribuyan a este proceso. Asimismo, se pudo apreciar que al estimular las células con LPS/IFN γ hay un leve descenso en la sobrevida celular a largo plazo, pero que ninguno de los tratamientos realizados afectaba estos parámetros de forma diferencial en los genotipos WT y CD300f KO evaluados.

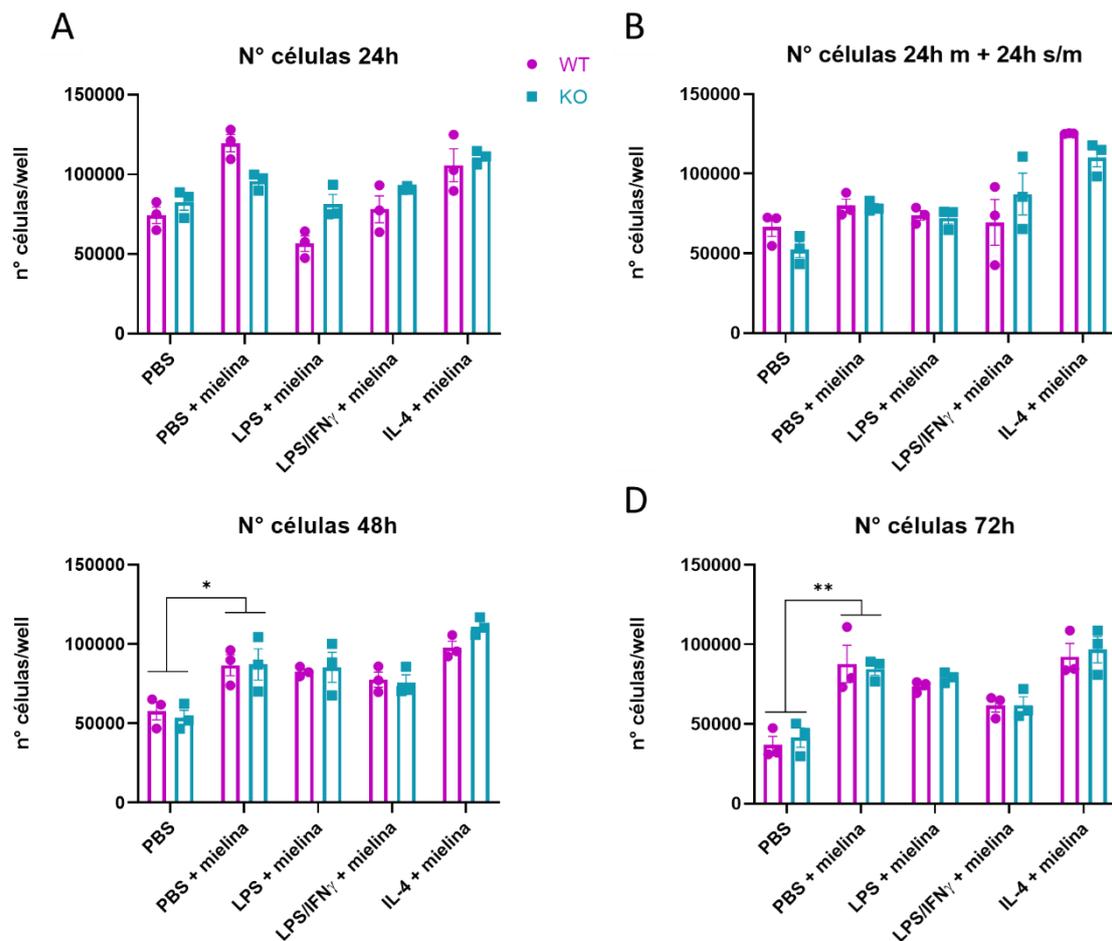


Figura 24. Evaluación de la sobrevida de los BMDM ante los diferentes estímulos y tratamientos. Fueron cultivados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de mielina, excepto el grupo control (PBS), partiendo de un sembrado inicial de aprox. 100.000 células. Recuento de núcleos teñidos con DAPI. No se observan diferencias significativas entre los genotipos a ningún tiempo evaluado **A)** 24 horas con mielina, media de pocillos triplicados de un experimento; **B)** 24 horas con mielina + 24 horas sin mielina, media de pocillos triplicados de un experimento; **C)** 48 horas con mielina, media de pocillos triplicados de dos experimentos; y **D)** 72 horas con mielina, media de pocillos triplicados de dos experimentos. Aunque sí se evidencian disímiles patrones de comportamiento en la sobrevida ante los diferentes estímulos con LPS y citoquinas para cada tiempo evaluado. Se aprecia como el grupo control tratado únicamente con PBS, sin mielina, muestra una reducción del número de células conforme pasan los días, alcanzando un número mínimo a las 72 horas. En cambio, el tratamiento con PBS + mielina induce mayor sobrevida en las células. Los demás tratamientos muestran un comportamiento similar entre sí, con leves variaciones no significantes, excepto por el grupo estimulado con LPS/IFN γ que muestra un mínimo de células a las 72 horas. Media \pm SEM. ANOVA de dos vías * $p < 0.05$; ** $p < 0.002$.

Para valorar la capacidad de procesamiento y acumulado final de lípidos en los BMDM bajo las diferentes condiciones de estímulos, al final de cada tiempo se tiñeron los cultivos con ORO y se realizó la medida del contenido interior de colorante por dos técnicas: inmunofluorescencia y absorbancia. Para la medida por inmunofluorescencia, las células fueron marcadas con el marcador de tipo celular Iba1, ORO y el marcador nuclear DAPI (**Figura 25**). Se tomaron cuatro fotografías por cada pocillo, en las mismas zonas (objetivo 40X del microscopio) y se procesaron luego en FIJI. El valor de área y la densidad integrada para ORO fue normalizado respecto al número de células contabilizado por DAPI en cada fotografía. Un punto por destacar es la variabilidad introducida en esta técnica según la zona del cultivo fotografiada. Al analizar

las cuantificaciones realizadas no se evidenciaron diferencias entre los genotipos WT y CD300f KO para ninguna de las condiciones evaluadas (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Se observó un aumento para los parámetros medidos entre las 48 y 72 horas en los tratamientos de mielina (PBS + mielina), LPS y LPS/IFN γ ; en tanto que el estímulo con IL-4 mostró valores relativamente bajos y similares en ambos tiempos observados (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El estímulo con LPS exhibió un mayor, aunque leve y variable, acumulado de lípidos a las 72 horas respecto al estímulo con LPS/IFN γ (**Figura 26B y D**), observándose una relación inversa a las 48 horas (**Figura 26A y C**). Esta observación es sugerente de que el IFN γ esté actuando posiblemente como un estímulo que disminuya la fagocitosis y/o favorezca la degradación de lípidos por parte de los macrófagos, aunque no afecta de forma diferencial a los grupos WT y CD300f KO. Resultó relevante que, a las 48 horas, la estimulación con LPS/IFN γ induce una significativa mayor acumulación de lípidos respecto a la estimulación solo con LPS en los BMDM WT (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. 6A y B**), mientras que no se observa esta diferencia en los CD300f KO, que parecen exhibir niveles equivalentes de acumulado en la estimulación solo con LPS y en la estimulación conjunta con IFN γ .

Más allá de no haber encontrado diferencias entre los genotipos, fue posible distinguir las diferentes morfologías celulares inducidas por cada tratamiento. Se puede observar en la **Figura 25** como el IFN γ induce fenotipos ameboides que ocupan menos superficie, donde las gotas lipídicas ocupan casi todo el citoplasma; con el LPS se mantienen las prolongaciones citoplasmáticas características de los macrófagos, adquiriendo las gotas lipídicas una ubicación más central mientras las prolongaciones de citoplasma quedan libres de estas; en tanto, la IL-4 (sobre todo hacia las 72 horas) induce un fenotipo de “célula lineal”, en las que las gotas lipídicas se encuentran distribuidas a diferentes distancias del núcleo, que tiene una locación central. En el caso del tratamiento solo con mielina no se observa una morfología característica particular sino que se aprecia una mezcla de estas, sobre todo a las 72 horas.

Para la medida de absorbancia, los BMDM fueron teñidas con ORO y se solubilizó el total del colorante unido a los lípidos para poder realizar la lectura en espectrofotómetro. Las observaciones realizadas fueron similares a las obtenidas por inmunofluorescencia, no evidenciándose diferencias entre los genotipos para ninguna de las condiciones evaluadas (**Figura 27**). También se observó un aumento en los niveles de lípidos entre las 48 y 72 horas en los tratamientos de mielina (PBS+mielina), LPS y LPS/IFN γ ; mientras que el estímulo con IL-4 mantuvo valores relativamente bajos y similares en ambos tiempos observados. En contraste a la IF, el estímulo con LPS/IFN γ mostró mayor acumulado de lípidos a las 72h (**Figura 27B**)

respecto al resto, y fueron muy similares a las 48 horas (**Figura 27A**). Cabe destacar que en la puesta a punto de la técnica se hizo evidente la imposibilidad de usar el grupo de células control PBS como medida confiable de absorbancia, resultando en datos variables y arbitrarios producto posiblemente de solubilizar ORO adherido al plástico del fondo del pocillo, que se encontraba

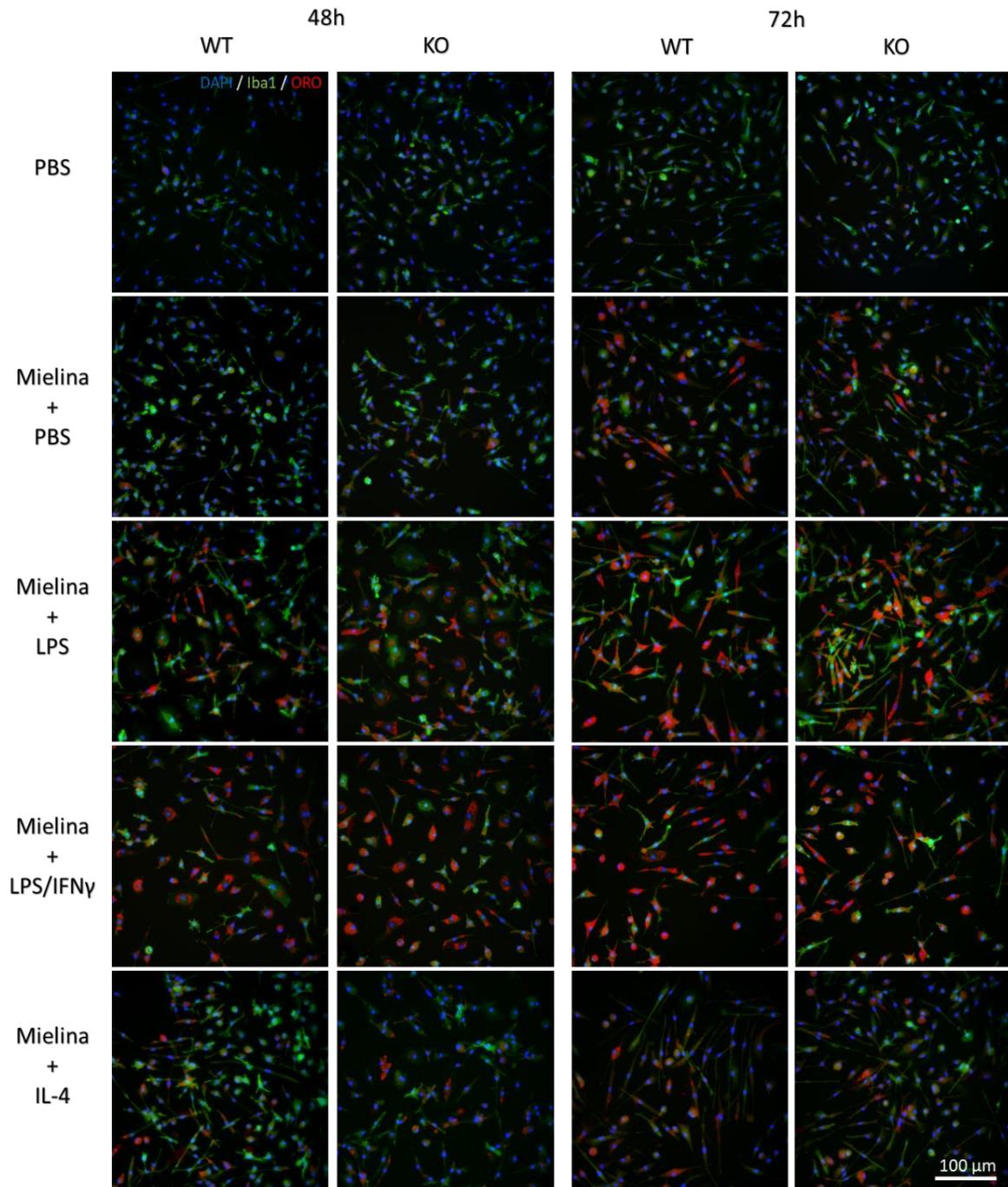


Figura 25. Inmunofluorescencias representativas de los BMDM (δ) con contenido lipídico interior, observados en los diferentes tiempos y tratamientos al ser expuestos a restos de mielina. Se aprecia el marcaje celular por Iba1 (verde), lípidos en las gotas lipídicas del interior celular por ORO (rojo) y marcaje nuclear por DAPI (azul). Se puede ver como el contenido de lípidos neutros en el interior celular es prácticamente inexistente en el tratamiento control con PBS, mientras que el tratamiento con mielina, y co-estimulación con LPS y LPS/IFN γ inducen la acumulación de estos, que se hace aún más evidente hacia las 72 horas. El tratamiento de co-estimulación con IL-4 muestra un patrón similar al grupo tratado solo con mielina (PBS+mielina). Se distinguen las diferentes morfologías y tamaños celulares adoptados ante cada tratamiento.

mayoritariamente libre por la baja densidad de células observada en esta condición. El colorante ORO tiene la particularidad de presentar alta adherencia a la mayoría de las superficies con las que entra en contacto, siendo particularmente alta en el caso del plástico. El conjunto de datos observados para ambas técnicas de medida nos permitió deducir que ambas resultaron equivalentes al evidenciar los niveles de lípidos acumulados por las células en su interior, presentando cada una sus particularidades y variabilidades. De todos modos, al examinar la globalidad de resultados parece ser más precisa y sensible la medida de lípidos realizada por inmunofluorescencia, aunque por otro lado resulta más compleja y costosa.

El conjunto de datos observados para el acumulado lipídico en el interior de los BMDM derivados de animales macho, sin diferencias entre WT y CD300f KO, nos hizo plantear la interrogante de si estos procesos podrían depender del sexo. Cabe recordar que las lesiones de médula espinal fueron realizadas en animales hembras, por presentar estas un mejor post-operatorio respecto a los machos; y que por ende del análisis del tejido medular de hembras surgió la evidencia de la mayor proporción de lípidos en el tejido de los animales CD300f KO. Asimismo, las alteraciones del estado metabólico descritas en la bibliografía para la microglía de animales CD300f KO tratados con LPS corresponde a ratones hembras (Lago et al., 2020).

Otra posibilidad planteada para poder explicar lo observado fue que, bajo las condiciones experimentales diseñadas para los cultivos de BMDM, el sistema metabólico celular podría encontrarse de alguna manera saturado, enmascarando las posibles diferencias que puedan existir. En este sentido cabe recordar que se vio como ante lesiones más fuertes, con 60 kdyn de fuerza, los patrones de evaluación de la recuperación funcional motora de ambos genotipos resultaban similares, enmascarando la diferencia que se observa al realizar lesiones más leves.

Teniendo en cuenta todo esto, se planteó la necesidad de realizar pruebas para evaluar el acumulado de lípidos en el interior de los BMDM, pero con nuevas condiciones experimentales (bajando la concentración de mielina) e incluyendo células derivadas de animales tanto machos como hembras. Se realizaron nuevos cultivos de BMDM y se evaluaron dos concentraciones diferentes de mielina a la que se los expuso, 100 µg/ml (usada hasta ahora) y 25 µg/ml. Se definieron como condiciones de tratamiento a evaluar únicamente el co-estímulo con LPS y el grupo control, en un periodo de 48 horas. Se logró evidenciar un comportamiento diferencial sexo-dependiente en el acumulado de lípidos de las células, resultando las mayores diferencias en aquellas que provenían de animales hembra. Los BMDM hembras reflejaron diferencias significativas entre los genotipos en el co-estímulo con LPS a ambas concentraciones de mielina (**Figura 28A y B**), siendo mayor el acumulado de lípidos en los CD300f KO; no obstante solo resultó una diferencia significativa en el grupo control (PBS) al usar la concentración menor de

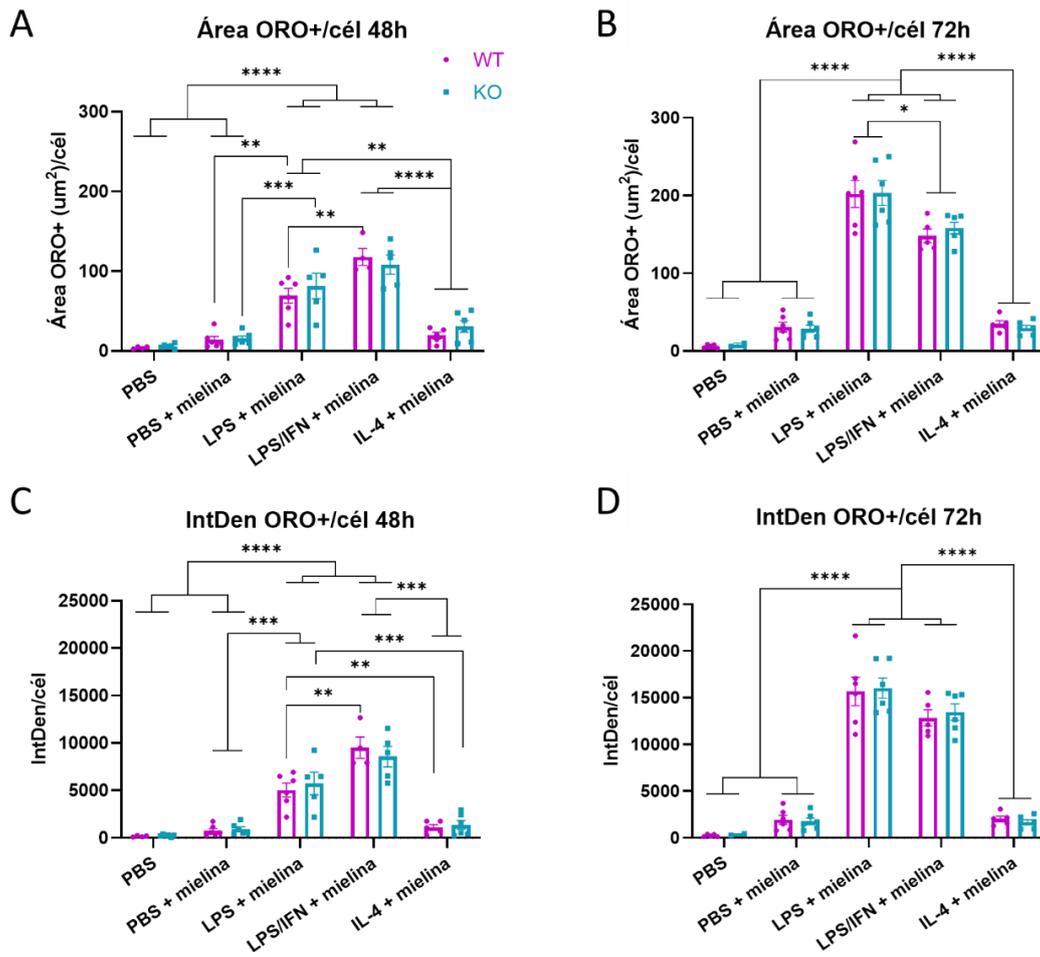


Figura 26. Cuantificación de lípidos neutros en los BMDM (♂) con diferentes tratamientos y tiempos por inmunofluorescencia, medida de área ORO+ e intensidad media de fluorescencia (MFI) normalizadas por número de célula. No se observan diferencias entre los genotipos WT y CD300f KO para ninguna de las condiciones evaluadas. **A** y **C**) Área ORO+ y MFI a las 48 horas de tratamiento, **B** y **D**) Área ORO+ y MFI a las 72 horas de tratamiento. Se evidencia un aumento para ambos parámetros entre las 48 y 72 horas en los tratamientos de mielina (PBS+mielina), LPS y LPS/IFN γ . El estímulo con IL-4 muestra valores relativamente bajos y similares en ambos tiempos observados. El estímulo con LPS exhibe un leve aumento acumulado de lípidos a las 72 horas respecto al estímulo con LPS/IFN γ , siendo esta relación inversa a las 48 horas. ANOVA de dos vías * $p < 0.05$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ Media \pm SEM de pocillos triplicados de dos experimentos.

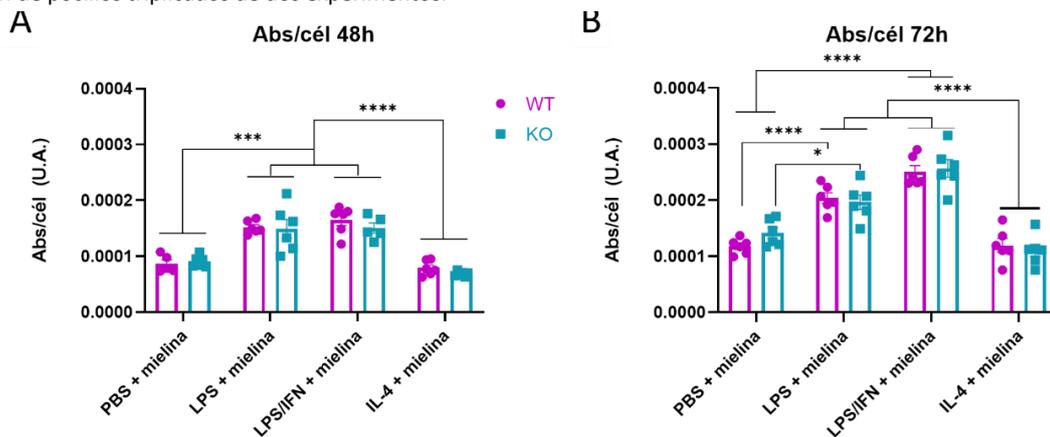


Figura 27. Cuantificación de lípidos neutros en los BMDM con diferentes tratamientos y tiempos por medida absorbancia del ORO normalizada por número de células. Media de pocillos triplicados de dos experimentos. Para la medida de absorbancia se solubilizó el colorante total unido a los lípidos en el interior celular. No se evidencian diferencias entre los genotipos para ninguno de los tratamientos realizados. Se observa un aumento en los niveles de absorbancia entre las 48 y 72 horas en los tratamientos de mielina (PBS+mielina), LPS y LPS/IFN γ . El estímulo con IL-4 mantiene valores relativamente bajos y similares en ambos tiempos observados. El estímulo con LPS/IFN γ muestra mayor acumulado de lípidos a las 72h respecto al resto. Anova de dos vías * $p < 0.05$; ** $p < 0.002$; **** $p < 0.0001$. Media \pm SEM de pocillos triplicados de dos experimentos.

mielina (**Figura 28B**). En el caso de los macrófagos derivados de animales macho, solo fueron evidentes diferencias entre los genotipos al usar la menor concentración de mielina y co-estimulación con LPS (**Figura 28B**), mostrando sorprendentemente un comportamiento contrapuesto al de las hembras, presentando menores niveles de lípidos los BMDM CD300f KO. Al comparar el comportamiento inducido por el LPS en el acumulado de lípidos, y teniendo en cuenta la menor concentración de mielina usada, ya que exhibe mejores diferencias (**Figura 28B**), se puede observar como esta molécula es capaz de provocar diferentes efectos en los macrófagos según el genotipo y sexo del que provengan. En el caso de células WT hembras, el LPS no induce cambios en los niveles de lípidos, pero sí en las células WT machos, dónde se ve una tendencia al alza. Mientras que para el caso tanto de las células CD300f KO hembras como CD300f KO machos, provoca una bajada en los niveles de lípidos acumulados en comparación a los grupos control PBS. Estos datos en conjunto sugieren la existencia de diferencias sexo dependientes en el metabolismo de lípidos provenientes de la mielina que, además, se hacen evidentes cuando las condiciones de tratamiento (que emularían la gravedad de la lesión) dejan margen para la correcta actuación de los diferentes procesos metabólicos que realizan las células, sin llegar a la saturación de los sistemas; denotando la posible participación de CD300f en la sutil regulación de estos procesos celulares previo a la afectación de la célula por el acumulado de lípidos.

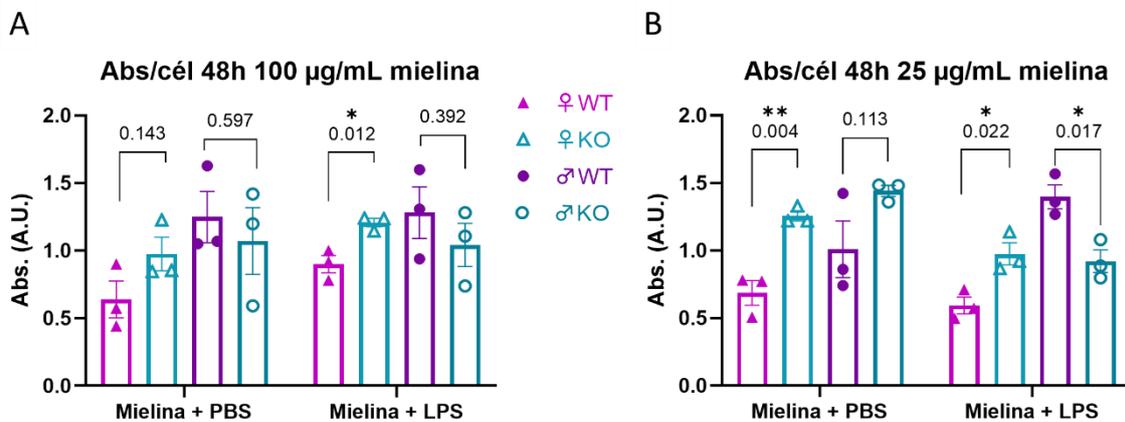


Figura 28. Evaluación de lípidos neutros acumulados por BMDM derivados de ratones machos y hembras, al ser expuestos durante 48 horas a dos concentraciones diferentes de mielina. Se muestra la medida de absorbancia de ORO normalizada al número de células presentes en cada condición. **A)** Medida de absorbancia al ser expuestos a 100 µg/mL de mielina por 48 horas. **B)** Medida de absorbancia al ser expuestos a 25 µg/mL de mielina por 48 horas. Se evidencia un comportamiento diferencial entre las células procedentes de los diferentes sexos, siendo las diferencias más notorias en aquellas que proceden de animales hembra. Asimismo, la menor concentración de mielina revela mayores diferencias significativas en el comportamiento de ambos tipos celulares (♂ y ♀), en ambas condiciones evaluadas (control con PBS y estímulo con LPS). Media ± SEM de pocillos triplicados de un experimento. ANOVA de dos vías.

1.4. Evaluación de la capacidad fagocítica de macrófagos derivados de la médula ósea

Para evaluar si las células CD300f KO podían presentar alteraciones en su capacidad fagocítica, se realizaron cultivos de BMDM derivados de animales macho y hembra. Estos fueron expuestos a microesferas fluorescentes y mielina conjugada a pHrodo, este último emite fluorescencia únicamente ante el cambio de pH que se da en los lisosomas, por lo que posibilita evaluar esta actividad celular para la molécula conjugada de forma precisa. Se decidió evaluar inicialmente la incubación de los BMDM con las microesferas o la mielina conjugada durante 30 minutos, siendo las condiciones adicionales el co-estímulo con LPS o PBS (control). Al término de los 30 minutos de incubación se analizaron por citometría de flujo. Al comparar los resultados obtenidos se puede apreciar en primera instancia como los BMDM WT en condiciones control (PBS) presentan porcentajes mucho mayores de células fagocitando microesferas (~80%) en comparación a la fagocitosis de mielina (~20-30%). En tanto, al evaluar los diferentes tratamientos no se evidenciaron diferencias significativas entre los genotipos para ninguna de las condiciones en los BMDM hembras (**Figura 29A y B**); en cambio, al valorar los porcentajes obtenidos para células derivadas de animales macho se evidenció una tendencia en los BMDM CD300f KO a presentar menor cantidad de células positivas para pHrodo-mielina en condiciones basales (PBS) (**Figura 29C**), y conjuntamente menor porcentaje de células conteniendo microesferas fluorescentes al ser co-estimuladas con LPS (**Figura 29D**), resultando solo este último en una diferencia estadísticamente significativamente. Estos resultados sugieren nuevamente una función diferencial dependiente del sexo en estos procesos. Indicando que los macrófagos de animales hembra no tendrían alterada ni su capacidad fagocítica general, ni mielina-específica en el corto plazo; pero que en cambio, macrófagos de animales macho sí podrían tener menor capacidad de responder para fagocitar mielina en condiciones basales, y presentar a su vez menor capacidad fagocítica general al responder a estímulos proinflamatorios como el LPS.

En suma, estos datos serían sugerentes de que la mayor acumulación lipídica observada en hembras, tanto en el tejido medular lesionado como BMDM de hembras, esté dada por problemas metabólicos y no por alteraciones de la fagocitosis; mientras que en el caso de los machos, la menor fagocitosis observada ante el estímulo con LPS podría ser sugerente de que los menores niveles de lípidos acumulados evidenciados a las 48 horas en los BMDM sea consecuencia de ésta. De todas formas, es necesario continuar los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* para dilucidar la función de CD300f en la fagocitosis y metabolismo lipídico, incluyendo las variables sexo-dependientes que han sido observadas. En este sentido además, se ha

reportado que el LPS es capaz de inducir mayor fagocitosis en macrófagos (Wu et al., 2009) al estimularlos por períodos menores de tiempo a los que fueron realizados en esta tesis, pero evaluando la fagocitosis en periodos de incubación más largos. En las pruebas realizadas para esta tesis no se observó este aumento de fagocitosis descrito para los BMDM WT. Por lo que conjuntamente a lo planteado anteriormente, es necesario repetir estos ensayos teniendo en cuenta estas variables adicionales de tiempos, usando tiempos de estimulación con LPS menores y evaluar la fagocitosis en tiempos más largos de incubación, como 1-2 horas.

Asimismo, se hace necesario aportar a la comprensión de los mecanismos que subyacen a la acumulación de lípidos en la respuesta inflamatoria luego de la lesión de médula espinal, pudiendo discriminar los efectos diferenciales que pueda tener CD300f en la función de la microglía y macrófagos que infiltran a la lesión. En este sentido, el uso de animales KO, que permitan la eliminación del inmunoreceptor de un tipo celular específico, es una potente herramienta que puede aportar a la comprensión de esto.

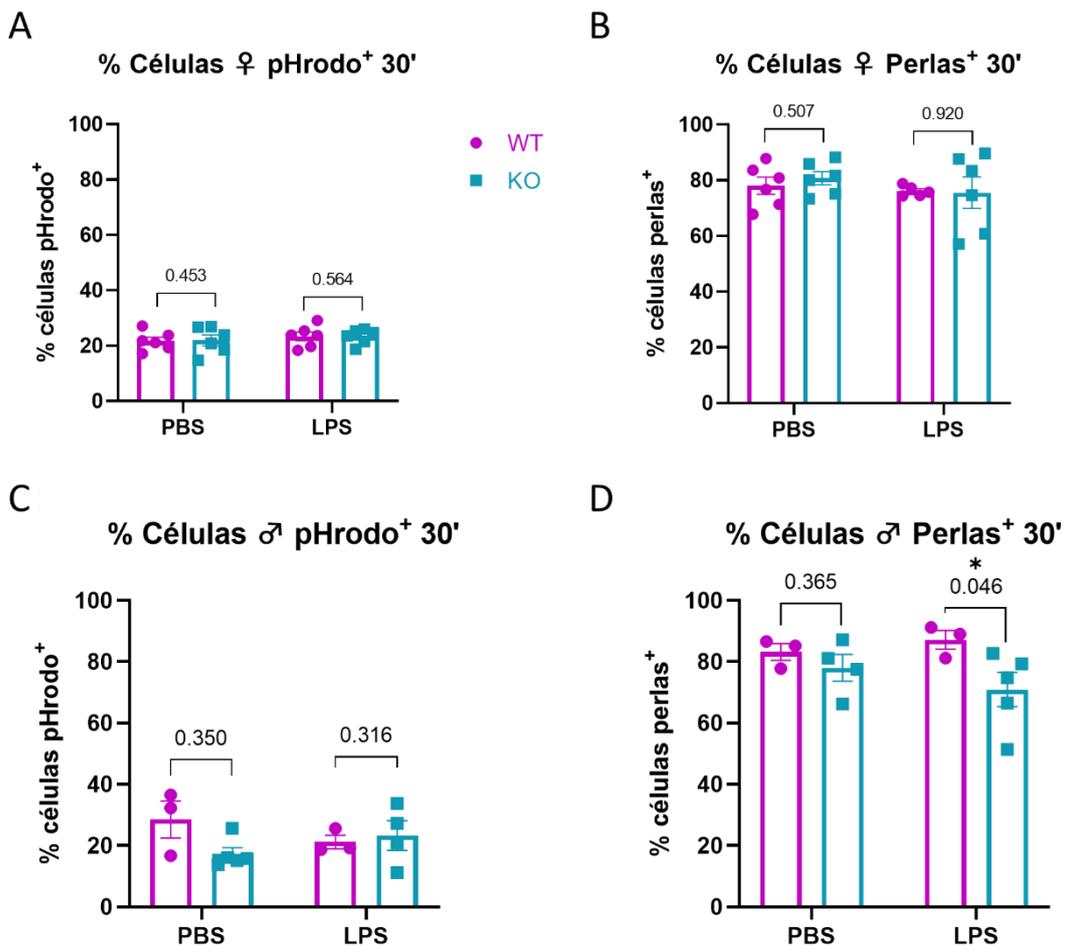


Figura 29. Valoración por citometría de flujo de la capacidad fagocítica de BMDM derivado de animales machos y hembras. Se observa la cuantificación del porcentaje de células con contenido de phrodo-mielina (A y C) y microesferas fluorescentes (beads, B y D) en su interior, discriminadas por sexo. No se observan diferencias entre los genotipos, excepto para las células provenientes de machos y co-estimuladas con LPS. Prueba t-Student *p=0.046. Media ± SEM de pocillos triplicados de dos experimentos.

2. ESTABLECIMIENTO DE LA COLONIA Y CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES KOc

2.1. Genotipificación de camadas

Para el establecimiento de la colonia de ratones CD300f KOc durante los dos primeros años de trabajo se realizaron los genotipificados de las crías nacidas en cada camada tras los cruces establecidos para lograr los genotipos deseados. Fueron genotipificados aproximadamente 300 animales, para eso se analizó, mediante electroforesis en geles de agarosa, los amplicones de ADN producto de cada PCR, a fin de verificar la inserción de los sitios loxP flanqueando al gen *clm1* (*cd300f^{loxP}*) y la presencia de los alelos con la inserción de la recombinasa creERT2 tras el promotor de *cx3cr1* (*cx3cr1^{creERT2}*).

En cada gel de agarosa se dispusieron las muestras de tal manera que cada carril corresponde a un animal particular. Se prepararon geles para la corrida de los productos de PCR de los sitios loxP y creER por separado, implicando cada uno diferentes tiempos de corrida. Para el análisis de inserción de sitios loxP se empleó mayor tiempo de corrida para lograr separar las bandas

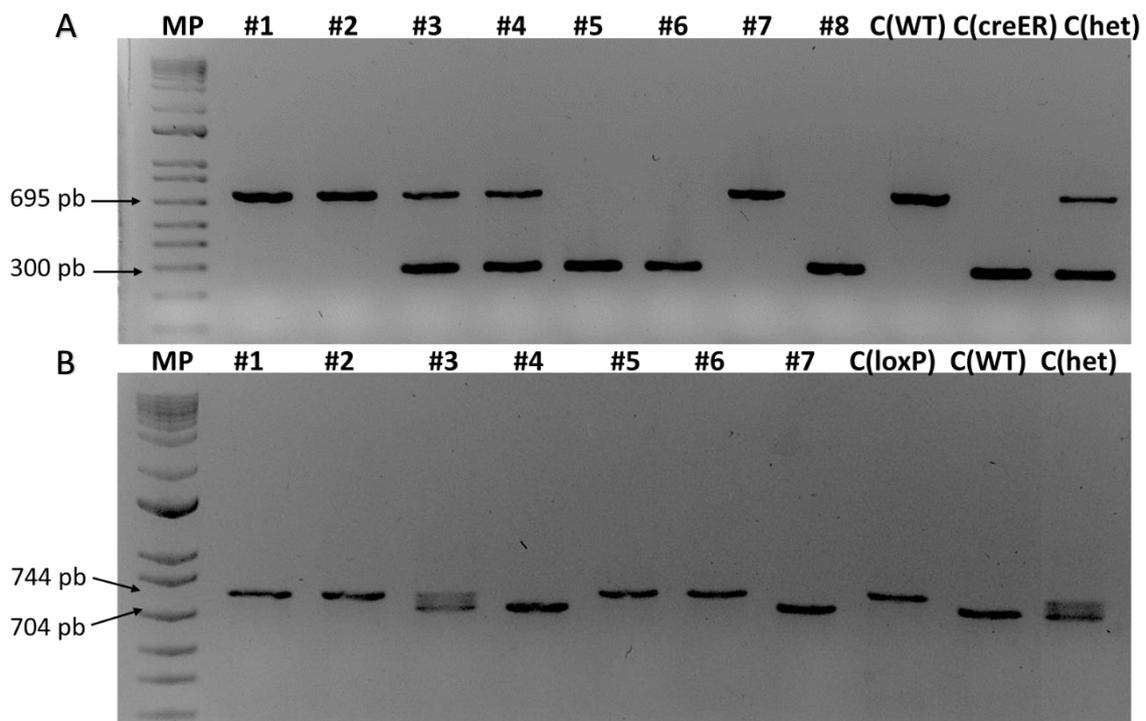


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa para la genotipificación. A) Productos de PCR para *creER* separados tras 30 minutos de corrida electroforética. Se observan bandas de 695 pb para alelos WT y bandas de 300 pb para los mutantes con inserción de *creER*. Homocigotos para la recombinasa *creER* (*cx3cr1^{creERT2/creERT2}*): #5, #6 y #8; heterocigotos (*cx3cr1^{creERT2/+}*): #3, #4; y homocigotos salvajes (*cx3cr1^{w^t/w^t}*): #1, #2 y #7. **B)** Productos de PCR para sitios loxP separados tras 50 minutos de corrida. Se observan bandas de 704 pb para alelos WT y de 744 pb para alelos con inserción de sitios loxP. Homocigotos para sitios loxP (*CD300f^{loxP/loxP}*): #1, #2, #5 y #6; heterocigoto (*CD300f^{loxP/w^t}*): #3 y homocigotos sin inserción (*cd300f^{w^t/w^t}*): #4 y #7. Controles positivos: animales homocigotos loxP o *creER* «C(loxP)» y «C(*creER*)»; homocigotos WT «C(WT)» y heterocigotas para cada gen «C(het)». MP: Marcador de peso molecular.

que presentan apenas 40 pb de diferencia entre los alelos con y sin inserción. En la **Figura 30** se observan a modo de ejemplo dos geles de electroforesis representativos para la genotipificación de algunos animales. Se aprecian bandas de tamaño 704 pb ante la presencia de alelos WT y de 744 pb si se trata de alelos con inserción de los sitios loxP (**Figura 30B**). En el caso de la recombinasa las bandas observadas corresponden a un tamaño de 695 pb para el alelo WT y bandas de 300 pb para los alelos mutantes con el constructo para la expresión de la creERT2 (**Figura 30A**).

Se fueron seleccionando los genotipos según la etapa del esquema de cruces planteado. En el gel de la **Figura 30A** se visualizan 3 animales homocigotos para la recombinasa creER ($cx3cr1^{creERT2/creERT2}$): #5, #6 y #8; 2 heterocigotos ($cx3cr1^{creERT2/+}$): #3, #4; y 3 homocigotos salvajes ($cx3cr1^{wt/wt}$): #1, #2 y #7. En tanto, en la **Figura 30B** se visualizan 4 animales homocigotos para sitios loxP ($CD300f^{loxP/loxP}$): #1, #2, #5 y #6; 1 heterocigoto ($CD300f^{loxP/wt}$): #3; y 2 homocigotos sin inserción ($cd300f^{wt/wt}$): #4 y #7.

2.2. Análisis *in vitro* de la expresión de CD300f luego de inducir la recombinación en macrófagos derivados de la médula ósea

Para evaluar el correcto funcionamiento del sistema de recombinación “Cre-loxP”, se realizaron pruebas *in vitro* mediante el cultivo de BMDM derivados de animales con el gen flanqueado y expresión de la recombinasa creERT2 ($cd300f^{loxP/loxP}:cx3cr1^{creER/+}$) y sin expresión de esta ($cd300f^{loxP/loxP}:cx3cr1^{+/+}$), además de BMDM derivados de animales con genotipo WT y CD300f KO como controles. Tras el tratamiento con el metabolito activo del TMX (4-OH TMX) para inducir la recombinación, se pudo evidenciar que los macrófagos con el gen *cd300f* flanqueado y con expresión de la recombinasa creER presentaron una reducción significativa en los niveles de expresión del gen *cd300f*, con valores muy cercanos a 0 y equivalentes al genotipo KO. En tanto, los BMDM con el gen flanqueado pero sin expresión de la creER, no exhibieron una reducción en los niveles de expresión para el gen, siendo comparables a los niveles del genotipo WT (**Figura 31**). En base a estos datos, se pudo corroborar un correcto funcionamiento del sistema de recombinación intracelular inducible con TMX, logrando eliminar casi por completo la expresión del gen *cd300f*.

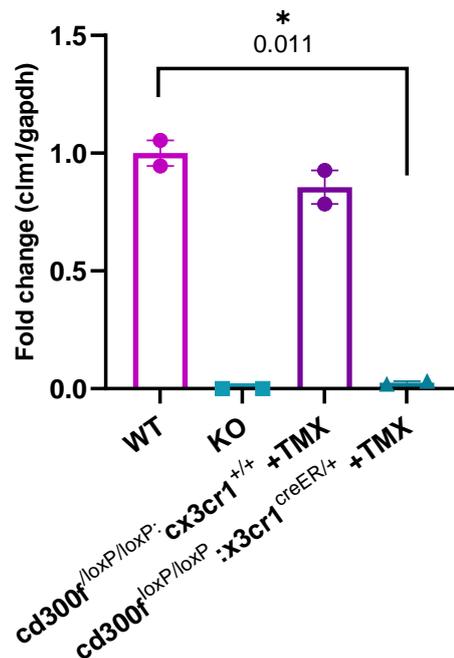


Figura 31. Evaluación de los niveles de expresión génica para *clm1* (*cd300f*) *in vitro* tras inducir la recombinación en BMDM provenientes de animales con dicho gen flanqueado. Se observó los niveles de cambio en la expresión génica respecto a BMDM de genotipo WT, asumiendo estos como valor igual a 1. Los BMDM provenientes de animales con el gen *cd300f* flanqueado por sitios loxP fueron tratados con 4-OH Tamoxifeno (TMX) para inducir la recombinación. Aquellos que presentan expresión de la recombinasa creER (*cd300f^{loxP/loxP}:cx3cr1^{creER/+}*) mostraron una reducción significativa, siendo casi igual a 0 y similar al genotipo KO. En tanto, los BMDM con el gen flanqueado pero sin expresión de la recombinasa (*cd300f^{loxP/loxP}:cx3cr1^{+/+}*) mantuvieron altos niveles de expresión de *clm1*, siendo similares al genotipo WT. Prueba t-Student *p=0.011. Media ± SEM. Media de pocillos duplicados de un experimento.

2.3. Análisis de la expresión de CD300f en diferentes órganos a las cuatro semanas de inducir la recombinación (*in vivo*)

Una vez corroborado el correcto funcionamiento del sistema de recombinación *in vitro*, se realizaron pruebas *in vivo*, administrando TMX a los diferentes animales según la estrategia experimental detallada, a los efectos de inducir la recombinación en las células blanco *cx3cr1*⁺. Al cabo de 4 semanas de la inducción se analizó los niveles de expresión génica para el gen *cd300f* en los diferentes órganos que se conoce presentan diferentes poblaciones celulares con mayor expresión de estos genes, como son los macrófagos tisulares del pulmón, bazo e hígado y, la microglía y macrófagos de barrera en el cerebro (The Myeloid Landscape 2, n.d.). Se pudo ver, tal como se esperaba, una reducción significativa en el nivel de expresión génica para *cd300f* en los animales CD300f KOc (*cd300f^{loxP/loxP}:cx3cr1^{creER/+}*) en el cerebro (**Figura 32A**), pero no así en el resto de los órganos evaluados, a excepción del pulmón y bazo que exhiben una leve reducción respecto al genotipo sin expresión de la recombinasa, aunque no resultaron

diferencias estadísticamente significativas (**Figura 32 B y C**). Asimismo, cabe notar la variabilidad en los niveles de expresión de CD300f en los animales que no presentan expresión de la recombinasa ($cd300f^{loxP/loxP};cx3cr1^{+/+}$).

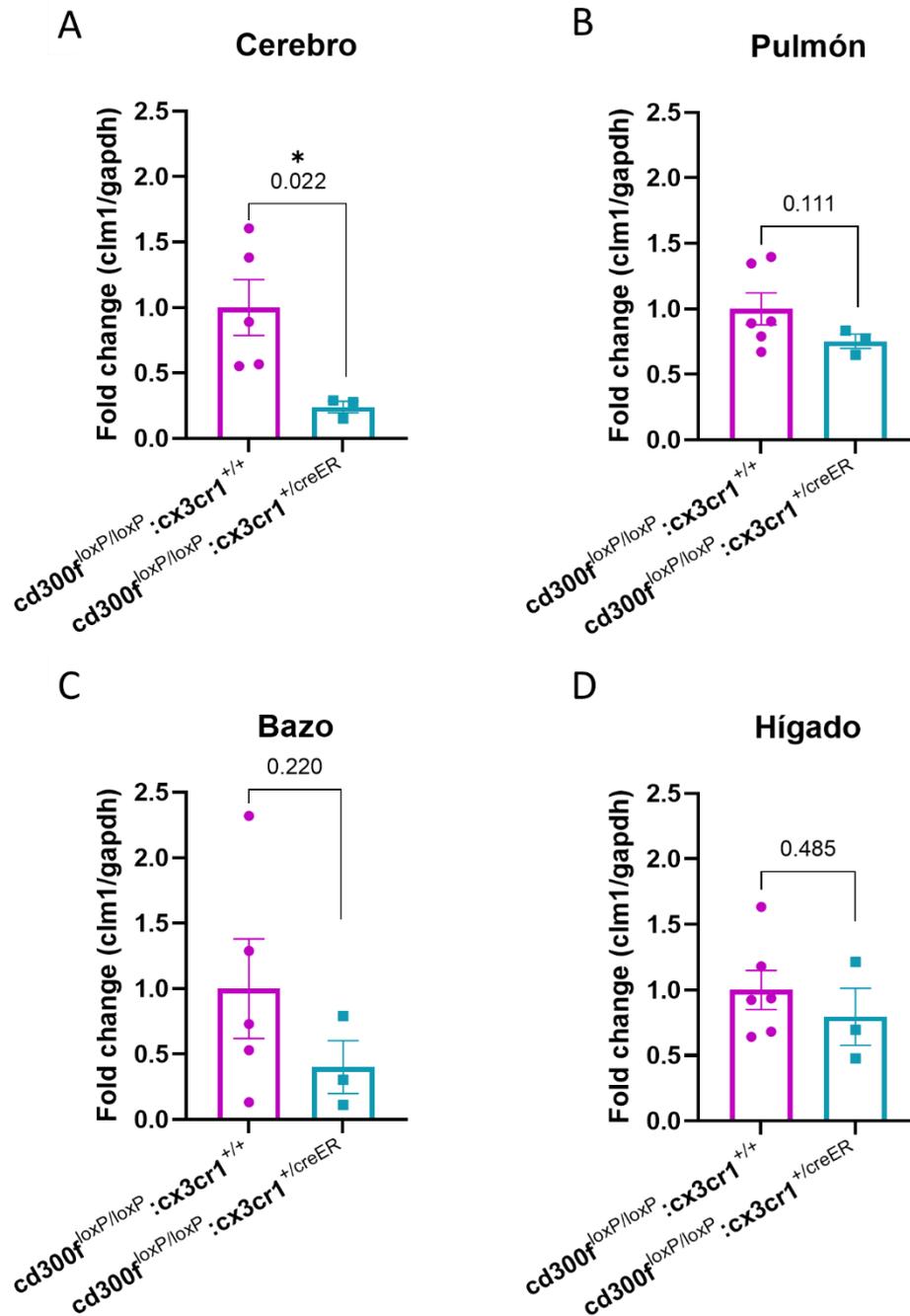


Figura 32. Efecto sobre el nivel de expresión génica para clm1 (cd300f) en los diferentes órganos tras inducir la recombinación por TMX. Se evaluaron diferentes órganos con poblaciones celulares $cx3cr1^+$ y expresión de $cd300f$ **A) Cerebro, B) Pulmón, C) Bazo, D) Hígado.** Se evidencia una bajada significativa en la expresión de $cd300f$ en el cerebro, pero no así en los otros órganos. Prueba t-Student de dos colas * $p=0.022$. Media \pm SEM, animales de un experimento.

Estos datos permitieron confirmar el correcto funcionamiento de los animales CD300f KOc como estrategia experimental para inducir la pérdida específica del gen cd300f en las poblaciones celulares cx3cr1⁺, que se recupera al cabo de 4 semanas en aquellas con altas tasas de renovación desde progenitores mieloides, pero que se mantiene en las que presentan tasas menores y/o tienen autorrenovación desde la población establecida (Goldmann et al., 2013). Esto último se da en el caso de la microglía, ya que son células que tienen bajas tasas de recambio en condiciones de homeostasis y presentan a su vez autorrenovación dentro del parénquima nervioso (Hammond et al., 2021). A la par, sucede lo mismo con los macrófagos de barrera (perivasculares) presentes en el SNC, ya que tienen la particularidad de renovarse desde progenitores de la misma población (Goldmann et al., 2016). En el caso del bazo, según la bibliografía las células dendríticas CD4⁺ y macrófagos residentes pierden el reordenamiento génico tras la recombinación (Goldmann et al., 2013). La aparente reducción de la expresión génica observada en estos órganos puede que se deba a la afectación de algunas poblaciones celulares que no se han renovado completamente aún a este tiempo, o bien presenten autorrenovación local.

2.4. Efectos comportamentales posteriores a inducir la recombinación

Como parte de la caracterización de estos animales se efectuaron pruebas comportamentales a fin de indagar la aparición de posibles patrones de comportamiento ya observados y descritos para los ratones CD300f KO. Se realizó el “Splash test” con Sacarosa (SST) en busca de comportamiento anhedónico descrito en hembras CD300f KO (Lago et al., 2020), y la prueba del Laberinto Elevado en Cruz en busca de la reducción de conducta ansiosa descrita en machos CD300f KO (Kaufmann et al., 2020).

Sorprendentemente, a las 4 semanas de haber inducido la pérdida de CD300f de la microglía y macrófagos de barrera ya se observó la aparición de una conducta anhedónica en las hembras (**Figura 33A**), implicando una reducción en la capacidad de experimentar placer evidenciada por el menor tiempo dedicado al «grooming». En tanto, al evaluar la conducta ansiosa en machos no se evidenciaron cambios a este tiempo luego de inducir la recombinación (**Figura 33B**).

La prueba de SST fue repetida en colaboración con otra compañera del grupo en nuevas cohortes de animales KOc a los que se les indujo la recombinación, pudiéndose corroborar lo observado antes. Estos resultados no son mostrados en este trabajo ya que forman parte de otro proyecto de investigación, pero mediante estos se validó el cambio comportamental de las hembras KOc observado de forma preliminar.

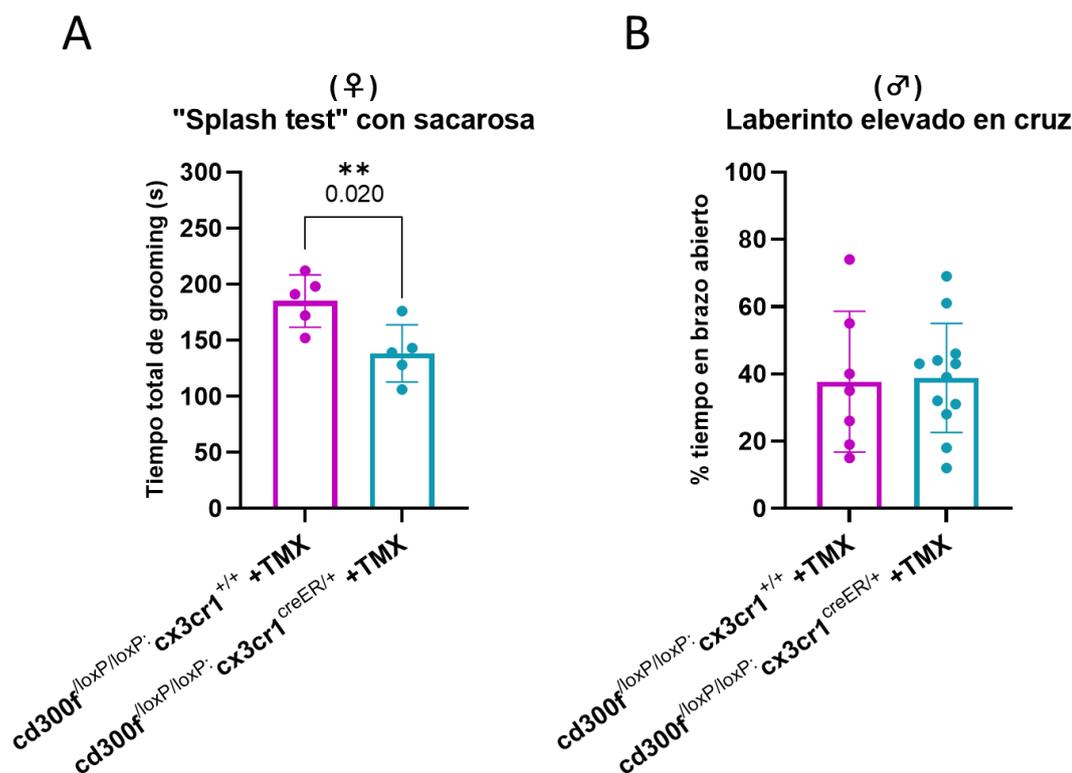


Figura 33. Pruebas comportamentales a las 4 semanas de inducir la recombinación. Permanecen carentes de CD300f la microglía y los macrófagos de barrera. **A)** "Splash test" con sacarosa en ratones hembras, se muestra el tiempo total dedicado al grooming, que es indicativo del estado hedónico. Se observa un comportamiento diferencial entre los grupos, que evidencia menor tiempo dedicado al grooming en aquellos ratones que se indujo la recombinación. **B)** Prueba del Laberinto elevado en cruz realizado en ratones machos, se muestra el % de tiempo en los brazos abiertos (calculado usando el tiempo total en brazos abiertos + el tiempo total en brazos cerrados como 100%), siendo este un indicativo del comportamiento de tipo ansioso. No se observan diferencias entre los grupos. Prueba t-Student de dos colas * $p=0.0167$. Media \pm SEM, animales de un experimento.

3. CONSECUENCIAS DE LA ELIMINACIÓN DE CD300f DE LA MICROGLÍA Y MACRÓFAGOS DE BARRERA

3.1. Efecto sobre la recuperación funcional motora de ratones CD300f KOc

Para valorar si los efectos observados hasta ahora en ratones CD300f KO se deben a la microglía y/o macrófagos que carecen del receptor, se llevaron a cabo lesiones de médula espinal en ratones CD300f KOc haciendo uso del equipo PCI3000, con las condiciones detalladas en el apartado de materiales y métodos. Las lesiones se realizaron a las 4 semanas de haber inducido la recombinación, por lo que se espera que a este tiempo los animales CD300f KOc permanezcan carentes del receptor únicamente en la microglía y macrófagos de barrera, mientras que los macrófagos infiltrantes desde la circulación ya habrán recuperado la expresión de CD300f.

Cabe destacar que poner a punto las lesiones con este equipo fue un proceso que requirió de muchas pruebas antes de lograr lesiones fiables y reproducibles, y que resultaran además similares a las realizadas con el equipo Infinite Horizon ya detalladas. En este sentido, las lesiones logradas con el equipo PCI3000 resultaron siempre un poco más severas en comparación al otro equipo, no logrando puntajes de recuperación en la escala BMS superiores a los 3 puntos. Se puede apreciar en la **Figura 34** como la recuperación funcional del grupo control ($cd300f^{loxP/loxP};Cx3cr1^{+/+}$) alcanza puntajes menores en todo el periodo de evaluación al compararlos con el grupo control WT lesionado con el equipo Horizon (**Figura 17**).

De todas formas, al evaluar el patrón de recuperación funcional por BMS de los animales $cd300f^{loxP/loxP}$ lesionados con el PCI3000, se pudo ver como el grupo CD300f KOc presentaba una peor recuperación funcional motora respecto al control, que resultó en una diferencia estadísticamente significativa en el día 7 post-lesión. Teniendo en cuenta esto y la totalidad del periodo evaluado, lo observado fue sugerente de la existencia de un comportamiento diferencial en la primer semana tras la lesión en los animales CD300f KOc, que carecen de CD300f únicamente en la microglía y macrófagos de barrera, que les impide de alguna manera lograr un proceso de recuperación similar al grupo control.

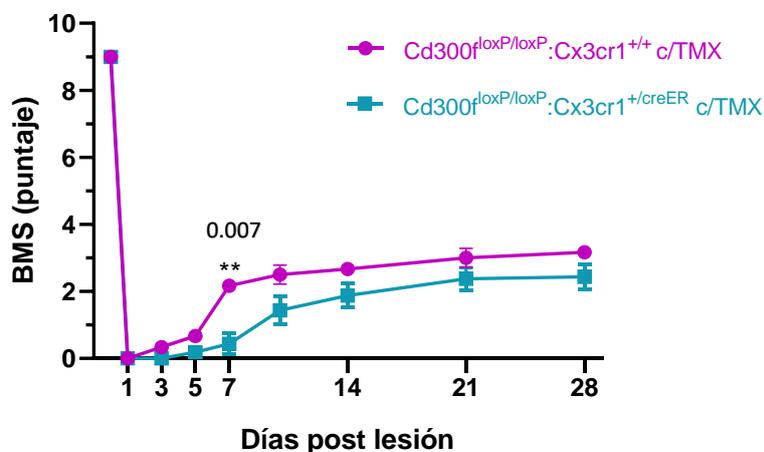


Figura 34. Valoración de la recuperación funcional motora tras la LME de ratones loxP tratados con TMX. Se realizó la LME a las 4 semanas del tratamiento con TMX. Se observa el patrón de comportamiento durante los 28 dpl de animales en los que el TMX no induce recombinación en violeta (n=3) y de animales en los que la inducción genera la pérdida del gen $cd300f$ en la microglía y macrófagos de barrera (KOc) en turquesa (n=8). Se evidencia una peor recuperación funcional en estos últimos, que resulta significativa en el día 7. ANOVA de dos vías efecto de genotipo $p=0.102$; 7dpl $*p=0.007$. Media \pm SEM, animales de un experimento.

3.2. Análisis de ORO en el tejido medular a los 28 días post-lesión

Con el objetivo de dilucidar si el CD300f expresado en la microglía y macrófagos de barrera contribuía a la acumulación de lípidos luego de la lesión, se analizó el nivel de lípidos acumulados en el sitio de lesión mediante la tinción por ORO a los 28 días post-lesión. No se observó diferencias entre los grupos para ninguno de los parámetros medidos, área ORO+ en el epicentro de la lesión (**Figura 35A**), ni largo longitudinal rostro-caudal del ORO (**Figura 35B**). Resulta interesante que al comparar los valores medidos para los animales WT a los 28dpl (**Figura 21**) con los valores medidos para el grupo control $cd300f^{loxP/loxP}cx3cr1^{creER/+}$ (**Figura 35**), se evidencia que la cantidad de lípidos presentes en la lesión de estos últimos tanto en área como extensión es casi el triple al medido en los WT. En conjunto, esto podría estar sugiriendo que las lesiones generadas con el equipo PCI300 resultan más severas que las generadas con el Horizon, saturando de alguna manera el sistema y enmascarando posibles procesos diferenciales que se puedan dar para este tiempo post-lesión.

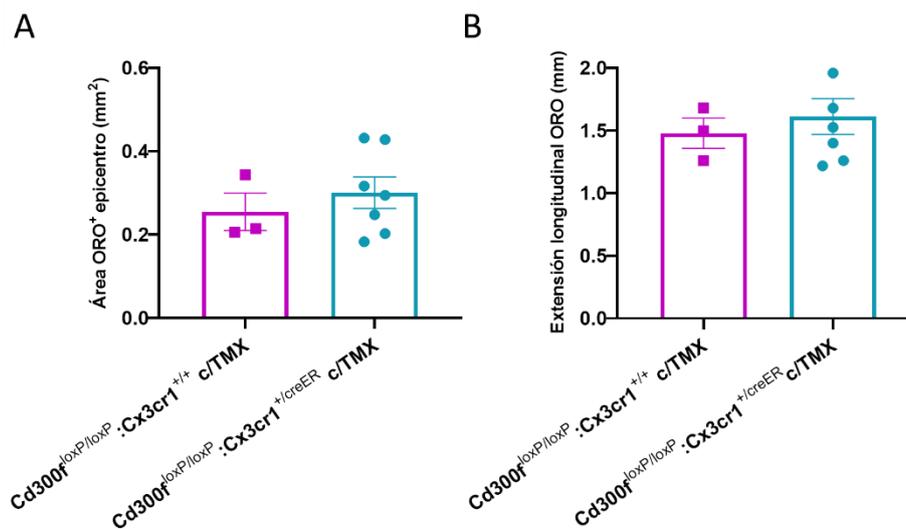


Figura 35. Medida de lípidos presentes en el sitio de lesión a los 28 días. Cuantificación de área ORO+ (A) y extensión longitudinal rostro-caudal de ORO (B). No se observan diferencias entre los genotipos para ninguno de los parámetros medidos. Media \pm SEM.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se hace evidente la apertura de nuevas líneas de razonamiento en la búsqueda de los mecanismos celulares y moleculares en los que CD300f encuentra implicado. En este sentido, es necesario continuar con ensayos que permitan dilucidar el papel que juega el CD300f expresado en la microglía y macrófagos, y para ello, sería crucial poder llevar a cabo lesiones de médula espinal en los animales KOc haciendo uso del equipo Horizon. Esto permitirá obtener resultados más claros, precisos y comparables sobre las consecuencias diferenciales que puede tener el CD300f expresado por estas células durante el proceso inflamatorio y resolutivo tras la lesión.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

Con el objetivo de elucidar el papel de CD300f en la lesión medular, se llevaron a cabo LME en ratones hembras CD300f KO. Adicionalmente, con el fin de poder discriminar los posibles efectos diferenciales causados por el CD300f expresado en la microglía y en macrófagos reclutados de la periferia, se generó una colonia de ratones «knockout» condicionales (KOc) y se llevaron a cabo LME en animales en los que CD300f estaba ausente solo en la microglía y macrófagos perivascuales. Por otra parte, se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de fagocitosis y procesamiento lipídico en macrófagos derivados de la médula ósea de ratones CD300f KO.

Los resultados obtenidos sugieren la participación de CD300f KO en el metabolismo de lípidos tras la lesión medular por contusión, así como en la recuperación funcional. Esta conclusión se basa en que: i) la ausencia global de CD300f se asocia a una peor recuperación funcional motora luego de la lesión de médula espinal en ratones hembra CD300f KO; ii) se encontró una mayor acumulación de lípidos en el sitio de lesión en estos mismos animales; iii) *in vitro*, macrófagos derivados de la médula ósea de hembras CD300f KO mostraron mayor acumulación lipídica en el interior celular, en tanto que no tuvieron alteraciones de la capacidad fagocítica. En cambio, macrófagos derivados de la médula ósea de ratones machos CD300f KO mostraron un comportamiento opuesto, acumulando menor cantidad de lípidos, al mismo tiempo que mostraron menor capacidad fagocítica.

Finalmente, los ratones hembras KOc tuvieron una peor recuperación funcional motora, sobre todo en los primeros días tras la lesión, aunque no se encontró diferencias en el acumulado de lípidos.

La peor recuperación funcional motora luego de la contusión medular observada en los ratones hembras CD300f KO no se asoció a una menor proporción de mielina conservada ni a una mayor muerte de neuronas en el asta ventral (datos no mostrados en la presente tesis) a los 28 días post-lesión. Esto sugiere que la afectación en la recuperación funcional no estaría dada por una alteración diferencial de estos parámetros; aunque para establecer esta conclusión de manera más sólida habría que hacer estudios ultraestructurales para por ejemplo confirmar que hay una preservación de mielina compacta similar entre ambos grupos. Al evaluar los lípidos neutros presentes en el núcleo de la lesión, se hizo evidente una mayor proporción de estos en los animales CD300f KO, observándose al mismo tiempo una menor reducción de estos lípidos entre los 14 y 28 dpl, respecto al grupo WT. Este aumento en los niveles de acumulación de lípidos neutros en el tejido no se debió a mayor desmielinización, y por tanto sugiere que existen

problemas para el procesado de los lípidos ingeridos, más que un aumento de la ingestión de lípidos. Estas observaciones se acompañaban además de un núcleo de lesión de mayores proporciones en los animales CD300f KO, que podría deberse a un mayor número de células espumosas incapaces de procesar los lípidos. De acuerdo con este razonamiento, los cultivos de BMDM de animales hembra no mostraron diferencias importantes en la capacidad de fagocitosis de lípidos. Una particularidad descrita para estas células espumosas con alto contenido de lípidos es que generan una respuesta inflamatoria maladaptativa, con baja capacidad fagocítica y un perfil marcadamente proinflamatorio disfuncional (Marschallinger et al., 2020; Van Broeckhoven et al., 2021). A su vez, esta acumulación de lípidos en forma de ésteres de colesterol en las gotas lipídicas conduce a la formación de cristales de colesterol en el interior celular, afectando el sistema lisosomal y liberando así especies reactivas de oxígeno que colaboran en la perpetuación del ambiente proinflamatorio, y que impide a su vez la regeneración axonal (Wang et al., 2015a; Cantuti-Castelvetri et al., 2018; Marschallinger et al., 2020). Teniendo en cuenta todas estas particularidades, se podría sugerir que la perpetuación de este ambiente proinflamatorio de mayores proporciones en los ratones hembra CD300f KO determina una mayor afectación de la recuperación funcional motora observada tras la lesión. De todos modos, es necesario continuar los estudios en este sentido y evaluar por ejemplo mediante microscopía electrónica si existen diferencias entre los grupos respecto a la formación de los cristales de colesterol en asociación a los lisosomas, así como en la cantidad de axones presentes, para poder confirmar que la afectación observada pueda asociarse a estas puntualizaciones.

Como se ha comentado, la gran cantidad de restos de mielina generados deben ser fagocitados y metabolizados para lograr una posterior regeneración del tejido y, en consecuencia, la adecuada recuperación funcional motora. Las principales células encargadas de la fagocitosis de estos restos son la microglía y los monocitos que infiltran el parénquima medular, y que provienen de la circulación y se diferencian a macrófagos (MDM) (Hellenbrand et al., 2021; Hammel et al., 2022). El patrón temporal y la función de estos dos tipos celulares es diferencial. Mientras que la microglía, por ser la célula inmune residente es la encargada de la fagocitosis durante los primeros días luego del daño medular, los macrófagos toman este rol de forma predominante hacia la segunda semana. Se ha descrito al mismo tiempo, que son los MDM infiltrantes los que inhiben a la microglía en estos procesos fagocíticos, a pesar de que paradójicamente la microglía presenta un mejor desempeño en el procesamiento de lípidos provenientes de la mielina en comparación a los macrófagos (Greenhalgh and David, 2014; Kroner and Rosas Almanza, 2019). La generación de animales floxeados para CD300f nos

permitió producir animales KOc, en los cuales sólo la microglía y los macrófagos de barrera tuvieran esta deficiencia en el ratón adulto, y de esta forma estudiar las diferencias entre microglía y macrófagos infiltrantes. Los resultados obtenidos tras realizar lesiones de médula espinal en los ratones KOc, revelaron una afectación diferencial sobre todo en los primeros días tras la lesión. Aquellos animales con microglía y macrófagos de barrera carentes de CD300f mostraron una peor recuperación funcional, siendo los puntajes de BMS de éstos significativamente menores en el día 7 post-lesión, y a pesar de mostrar una mejoría tras este periodo inicial no alcanzaron puntajes similares al grupo control. Estos datos podrían indicar que tanto alteraciones en el fenotipo microglial como en la respuesta inflamatoria temprana luego de la lesión medular son importantes determinantes de la recuperación funcional motora, y que CD300f juega un papel significativo en estas células. Cabe recordar que la entrada de los MDM comienza a los 3 dpl y tiene su pico máximo hacia los 7 dpl (Hellenbrand et al., 2021), por lo que posiblemente la mejora luego de este tiempo esté dada por los macrófagos infiltrantes que sí expresan CD300f, pero que no resulta suficiente para compensar la falta original de CD300f en la microglía. En este sentido se ha descrito que el principal proceso biológico de los macrófagos infiltrantes a los 7 dpl son las vías de catabolismo lipídico, actuando como mediadores de este proceso la activación de las vías canónicas de los receptores nucleares, como LXR (Zhu et al., 2017). Es posible entonces, que ante una pobre reactividad microglial por la ausencia de CD300f, el reclutamiento de macrófagos hacia el sitio de lesión esté siendo insuficiente y/o a tiempos desfasados de los que sucede en animales WT, y por consiguiente termine afectando el correcto desarrollo de la respuesta inflamatoria. En estudios futuros se deberá evaluar si existen alteraciones en el reclutamiento de macrófagos en ausencia de CD300f.

No obstante, al analizar los lípidos neutros acumulados en el núcleo de lesión de los animales a los 28 dpl no se evidenciaron diferencias en los valores entre los genotipos KOc y sus controles, aunque posiblemente esto esté dado como consecuencia de la severidad de la lesión generada con el equipo usado para realizar las lesiones de estos animales. En este punto, necesitamos repetir estos experimentos generando una lesión medular menos severa con el fin de evaluar esta hipótesis. En conjunto, los resultados obtenidos con los animales condicionales para CD300f, sugieren que el CD300f microglial desempeñaría un rol clave en la regulación temprana de su fenotipo y que llevaría a cabo procesos que preparen de alguna manera el ambiente tisular para la infiltración de los macrófagos de la periferia, y lograr de esta manera una cascada de procesos moleculares y celulares que resulte en una mejor recuperación funcional.

Se ha reportado que la microglía CD300f KO de ratones hembras tratados con LPS presenta bajos niveles de expresión de genes involucrados en la glucólisis, β -oxidación de ácidos grasos en la

mitocondria y el ciclo de Krebs, entre otros, además de mostrar niveles basales de actividad mitocondrial y glicólisis reducidos, presentando conjuntamente poca capacidad de reprogramación metabólica (Lago et al., 2020). La mermada capacidad de reprogramación metabólica de la microglía deficiente para CD300f frente a un estímulo inflamatorio podría explicar su falta de capacidad para coordinar diversos procesos dependientes de energía que se gatillan en células de la inmunidad innata luego de una lesión. En este mismo estudio se evidenció que CD300f puede actuar como un receptor de lipoproteínas, presentando la microglía CD300f KO bajos niveles de endocitosis de LDL, pero no así de fagocitosis de microesferas, referida como fagocitosis independiente de receptores. En este estudio se concluyó que la reprogramación metabólica necesaria para la adaptación de la microglía al nuevo contexto estaría comprometida en los ratones CD300f KO, alterando en consecuencia también los procesos de autofagia (Lago et al., 2020). De acuerdo con esta hipótesis, otros estudios han descrito que la principal vía usada para la fagocitosis y degradación de lípidos por la microglía y macrófagos es la vía endosoma-lisosoma, pero que la microglía puede adicionalmente procesarlos por autofagia (Safaiyan et al., 2016; Wu et al., 2021). Respecto a esto, un estudio reciente ha mostrado que la fagocitosis de la microglía asociada a una vía de autofagia no canónica es esencial para la correcta limpieza y degradación de los restos de mielina en un modelo de Esclerosis Múltiple (Berglund et al., 2020). Igualmente, se ha descrito que el metabolismo de los lípidos implica la activación de vías metabólicas específicas como la β -oxidación lipídica en la mitocondria, además de requerir energía suficiente para llevar a cabo los procesos. En este sentido, se ha mostrado que los receptores que median la activación de los macrófagos están relacionados con vías metabólicas, siendo la reprogramación metabólica una parte esencial en el proceso de activación de estos (O'Neill and Pearce, 2016). Asimismo se describió que la adopción de un metabolismo glucolítico es una condición necesaria para la activación de los macrófagos en respuesta al LPS y otros activadores (Liu et al., 2019), y en este marco, la microglía CD300f KO no son capaces de inducir el metabolismo glucolítico frente a la exposición a LPS (Lago et al., 2020).

En suma, teniendo en cuenta las apreciaciones mencionadas y los datos observados en esta tesis, podemos deducir que el CD300f de la microglía es importante para una correcta respuesta inflamatoria, sobre todo en los primeros días luego de la lesión, de tal forma de lograr inducir una correcta activación celular que permita entre otras cosas llevar a cabo el procesamiento inicial de los restos de la mielina. Adicionalmente, CD300f podría estar actuando como receptor de DAMPs, que determina la activación de diferentes cascadas de señalización en la microglía y, como consecuencia, se genere la respuesta inflamatoria temprana para la activación de células

inflamatorias, con la consecuente liberación de citoquinas y quimioquinas necesarias para la generación del ambiente proinflamatorio, la inducción de la fagocitosis y el procesamiento de las células apoptóticas y restos de mielina, así como el reclutamiento de células de la periferia. En relación a esto, datos no publicados de nuestra colaboradora, la Dra. Luciana Negro, muestran mediante observación por microscopía de dos fotones que la microglía CD300f KO presenta una reducida capacidad de respuesta ante un daño producido por un láser en el parénquima cerebral, así como una reducida capacidad de fagocitosis y procesamiento de células apoptóticas.

Otros datos de nuestro laboratorio, próximos a publicarse, evidenciaron que los macrófagos deficientes de CD300f también presentan alterada su capacidad de respuesta metabólica, mostrando niveles basales de actividad mitocondrial y glucólisis reducidos, por lo que posiblemente no sean capaces de activar correctamente las vías específicas para el metabolismo lipídico, siendo concordante con la mayor presencia de lípidos observados en los animales CD300f KO en los diferentes tiempos post lesión medular.

Teniendo en cuenta las puntualizaciones mencionadas respecto al metabolismo, para evaluar posibles implicancias de CD300f en la fagocitosis y metabolismo de lípidos provenientes de la mielina, se llevaron a cabo análisis *in vitro* de estos procesos mediante el cultivo de BMDM incubados con extractos de mielina y ante diferentes estímulos. Con el fin de inducir fenotipos polarizados más proinflamatorios o antiinflamatorios, que pudieran aportar información relacionada a los diferentes cambios del metabolismo mitocondrial que ocurren en cada uno, las células se estimularon con LPS, IFN γ o IL-4. Se sabe que en una polarización fenotípica proinflamatoria de los macrófagos, inducida por LPS e IFN γ , estas células aumentan la glucólisis y la síntesis de ácidos grasos, disminuyen la respiración mitocondrial y se interrumpe el ciclo de Krebs, acumulando intermediarios de este que actúan como señales alterando la función inmunitaria (Mills and O'Neill, 2016). Adicionalmente, se ha reportado que CD300f desempeña un rol antiinflamatorio en la activación de los macrófagos al regular la señalización de los TLR, como el caso de la activación por LPS mediada por TLR4 (Lee et al., 2011). En tanto, cuando son polarizados mediante IL-4 adquieren un fenotipo antiinflamatorio, se inducen altos niveles de fosforilación oxidativa y oxidación de ácidos grasos, fundamentales para la función antiinflamatoria (Mills and O'Neill, 2016). Así mismo, y como hemos comentado, se ha descrito que el CD300f es necesario para el efecto completo inducido por la IL4 en macrófagos (Moshkovits et al., 2015). En base a esto, se esperó evidenciar diferencias en la capacidad de respuesta de los BMDM CD300f KO al extracto de mielina, y por ende en el acumulado final de lípidos a los diferentes tiempos. Sin embargo, los datos obtenidos no arrojaron diferencias entre

los BMDM CD300f KO y los WT en el acumulado final de lípidos a las 48 ni a las 72 horas, tanto en la condición control como en ninguno de los estímulos de polarización realizados. Aunque una observación que resultó interesante a las 48 horas fue que ante el estímulo con LPS se indujo una acumulación de lípidos en los BMDM KO semejantes a la estimulación conjunta de LPS/IFN γ , mientras que los WT mostraron diferencias significativas al respecto. A pesar de no observar diferencias entre los genotipos al estimularlos con LPS/IFN γ , la puntualización desarrollada podría sugerir que la activación por la señalización LPS/TLR4 de los BMDM esté menos regulada al estar ausente CD300f, y por eso no se vean diferencias en el acumulado de los BMDM KO entre estos estímulos. Estos ensayos fueron llevados a cabo en macrófagos derivados de ratones machos, con una concentración de mielina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ante la posibilidad de que los procesos evaluados tengan vinculación con el sexo, y que además, las posibles diferencias entre el acumulado lipídico estén quedando enmascaradas por una saturación del sistema metabólico celular, se encontró que algunos autores utilizaban concentraciones menores del extracto de mielina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para las incubaciones (Nugent et al., 2020). Para poder evaluar estas suposiciones se llevaron a cabo pruebas en nuevos cultivos de BMDM, ahora derivados de animales tanto machos como hembras, y se los incubó con dos concentraciones de mielina diferentes: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (usada hasta ese momento) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En estos cultivos solo se evaluó la condición basal con mielina y el co-estímulo con LPS. Se pudo evidenciar mejores contrastes entre los grupos experimentales al usar la menor concentración de mielina, y al mismo tiempo se reveló un comportamiento diferencial sexo-dependiente de los BMDM CD300f KO tanto en la acumulación de lípidos como en la respuesta al estímulo con LPS. Los CD300f KO de animales hembras mostraron mayor acumulación de lípidos provenientes de la mielina con y sin estímulo de LPS, mientras que los derivados de animales machos mostraron un comportamiento contrapuesto con el LPS, teniendo menores niveles de acumulación. Si bien no dejan de ser resultados preliminares, haciéndose necesaria la repetición del ensayo para corroborar lo observado, los datos obtenidos primariamente permitieron evidenciar una implicancia dependiente del sexo en las alteraciones del metabolismo lipídico ligadas a CD300f, siendo concordante con reportes precedentes de la literatura que muestran diferencias dependientes del sexo (Kaufmann et al., 2020; Lago et al., 2020). Al mismo tiempo, el hecho de que las diferencias hayan sido mejor evidenciadas con la menor concentración de mielina refuerza la idea planteada previamente sobre la sutil regulación de los procesos en los que participa CD300f previo a la afectación de la célula por la sobrecarga de lípidos. Además, es necesario realizar nuevamente los ensayos con los diferentes estímulos pro y antiinflamatorios usando esta menor

concentración de mielina, para poder evaluar posibles diferencias en el procesamiento lipídico al inducir la activación de diferentes vías metabólicas.

En base a los problemas metabólicos mencionados ante la ausencia de CD300f, se planteó la posibilidad de que frente a una limitada concentración de M-CSF los BMDM tengan menores niveles de viabilidad celular al cabo de varios días. En este sentido, se ha reportado que TREM2, inmunoreceptor que comparte muchas características con CD300f, contribuye a la supervivencia de la microglía al hacer sinergia con la señalización del CSF-1R, mostrando la microglía TREM2 KO menor viabilidad celular a bajas concentraciones de CSF-1 (Wang et al., 2015b). En el modelo murino 5XFAD de la enfermedad de Alzheimer, se postuló que debido a la incapacidad de la microglía deficiente de TREM2 para sobrevivir a la limitación de CSF-1, esta no es capaz de sostener la microglia reactiva en asociación con las placas de A β , sufriendo mayor apoptosis en lugar de activarse y expandirse (Wang et al., 2015b). Sin embargo, en los datos obtenidos en esta tesis para la supervivencia de los macrófagos cultivados con limitación de M-CSF por 72 horas, se observó un comportamiento similar entre las células WT y CD300f KO, disminuyendo ambas significativamente el número total de células. En tanto, en las mismas condiciones, el extracto de mielina fue capaz de inducir mayor supervivencia de los BMDM a pesar de la limitación de M-CSF, por lo que postulamos que el extracto posiblemente contenga diferentes moléculas que favorezcan la viabilidad celular. Sería conveniente evaluar estos procesos *in vivo* a fin de verificar si existen diferencias en la supervivencia de la microglía y macrófagos deficientes de CD300f al estar en estado reactivo en el contexto de daño tisular, identificando por ejemplo el impacto en la apoptosis para cada una.

Por otra parte, al analizar la fagocitosis no se vieron alteraciones en este proceso en los BMDM derivados de animales hembras, mostrando niveles similares de células fagocitando tanto mielina como microesferas. En contraste, sí se observó un menor porcentaje de células fagocitando microesferas en los macrófagos derivados de machos CD300f KO estimulados con LPS. Estos datos sugieren que las células derivadas de animales hembra no presentarían alteraciones de la fagocitosis, pero en cambio, los machos podrían tener menor capacidad fagocítica general. Esto sugiere que posiblemente la mayor acumulación de lípidos observada en hembras ocurra debido a las alteraciones en el metabolismo mencionadas antes y no por una sobrecarga lipídica por aumento de la fagocitosis. Resta evaluar si la lesión medular en machos carentes de CD300f también genera una peor recuperación funcional y una mayor acumulación de lípidos en el parénquima medular, como ocurre en hembras CD300f KO, o si por el contrario no presenta diferencias.

En cuanto a los posibles mecanismos involucrados en los efectos de CD300f en la respuesta inflamatoria y el metabolismo lipídico, CD300f podría regular la absorción y metabolismo de lípidos a través de la modulación de la expresión de transportadores de lípidos y/o receptores de señalización lipídica. De hecho, CD300f funciona como receptor de lipoproteínas, y conjuntamente se observó una disminución de los niveles de receptores de membrana para ApoB y ácidos grasos de cadena larga en microglía CD300f KO en condiciones inflamatorias (Lago et al., 2020). Asimismo, se ha demostrado que CD300f inhibe la señalización por varios TLRs (Lee et al., 2011), por lo que podría modular la señalización por TLR en los lisosomas/endosomas tardíos que se activan ante la acumulación de colesterol (Sun et al., 2009; Yvan-Charvet et al., 2010). Además, se ha propuesto que los restos de mielina estarían involucrados en la inducción del cambio de fenotipo y disminución de la fagocitosis de macrófagos (Wang et al., 2015a), por lo que, ante la ausencia de CD300f estas células podrían ver comprometida aún más su capacidad para eliminar células apoptóticas y detritos celulares, así como regular la respuesta inflamatoria. En este contexto, resulta indispensable conocer el reclutamiento de células de la circulación que se da tras la lesión. Se espera evaluar próximamente si el patrón de reclutamiento de células mieloides periféricas hacia el parénquima medular luego de la lesión se ve alterado ante la ausencia de CD300f, así como la producción de quimioquinas que median este reclutamiento. Una mayor o menor infiltración de macrófagos y de neutrófilos que se da en las primeras horas luego de la lesión puede inducir cambios en los niveles de fagocitosis, digestión de lípidos, cambios en los fenotipos celulares, entre otros, que desemboquen en una mejor o peor recuperación funcional. Para ello, se realizarán análisis por citometría de flujo del tejido medular a los diferentes tiempos post-lesión. Del mismo modo, resulta relevante realizar estudios de transcriptómica de la microglía y macrófagos luego de la lesión, a fin de elucidar posibles fallas en la conversión a estados reactivos tras la desmielinización; en este sentido, la ausencia de TREM2 ha mostrado que previene la conversión a un fenotipo DAM (por sus siglas en inglés, *Disease Associated Microglia*) de la microglía ante un estímulo de desmielinización (Damisah et al., 2020). En este mismo estudio se mostró que la microglía carente de TREM2 es capaz de fagocitar correctamente los restos de mielina, pero que tiende a acumular mayor cantidad de gotas lipídicas en su interior al no poder metabolizar o mediar el eflujo de los lípidos de forma correcta (Damisah et al., 2020).

En relación con esto, es necesario continuar con los estudios *in vitro* a fin de diseccionar el mecanismo molecular por el que se estaría dando el mayor acumulado de lípidos en el interior de las células. Se ha planteado realizar a futuro ensayos con inhibidores de enzimas formadoras de ésteres de colesterol, como ACAT1; y por otro lado, estimular el flujo de colesterol hacia el

exterior celular por agonistas de transportadores específico, como ABCA1; o evaluar la activación de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de lípidos por medio de agonistas del receptor nuclear LXR (Moore and Tabas, 2011). Asimismo, resulta relevante conocer si el patrón de lípidos almacenado ante la ausencia de CD300f es diferente a la que se da en los WT, teniendo en cuenta que algunos ácidos grasos en particular son ligandos específicos de LXR, que controla la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la homeostasis lipídica (Schroepfer and Wilson, 2000; Spann et al., 2012). Para esto, se ha establecido una colaboración con el Dr. Homero Rubbo, de la Facultad de Medicina de la UdelaR, con el fin de realizar lipidómica mediante espectrometría de masa. Ya se cuenta con muestras de tejido generadas a los diferentes tiempos post-lesión, tanto de ratones CD300f KO y WT, como de KOc y de sus respectivos controles; y se espera generar además muestras de BMDM CD300f KO y WT incubados con mielina próximamente.

Como parte de otros ensayos *in vivo* planeados, ya se ha realizado un primer estudio con ratones hembras en el que se les administró un agonista de LXR luego de practicarles la lesión medular. De este modo se pretende evaluar si al estimular estas vías de mantenimiento de la homeostasis de lípidos se logra disminuir el acumulado observado en el núcleo de lesión en los animales CD300f KO. Asimismo, se han realizado ensayos para evaluar el acumulado de lípidos en un modelo de lesión “limpia” mediante la inyección intramedular de Lisolectina (Plemel et al., 2018). En este caso se genera desmielinización pero no se ve comprometida la integridad de la BHM, por lo que no ocurre infiltración de macrófagos de la periferia al parénquima, permitiendo evaluar únicamente la implicancia de la microglía en este proceso.

Por otra parte, se espera aportar al entendimiento sobre alteraciones de la capacidad fagocítica de las células en el contexto de la lesión en el tejido medular. Para esto se llevarán a cabo ensayos de fagocitosis *ex vivo*, en los cuales se aislarán las células del tejido medular a diferentes tiempos post-lesión y se incubarán con pHrodo-mielina para analizarlas posteriormente por citometría de flujo.

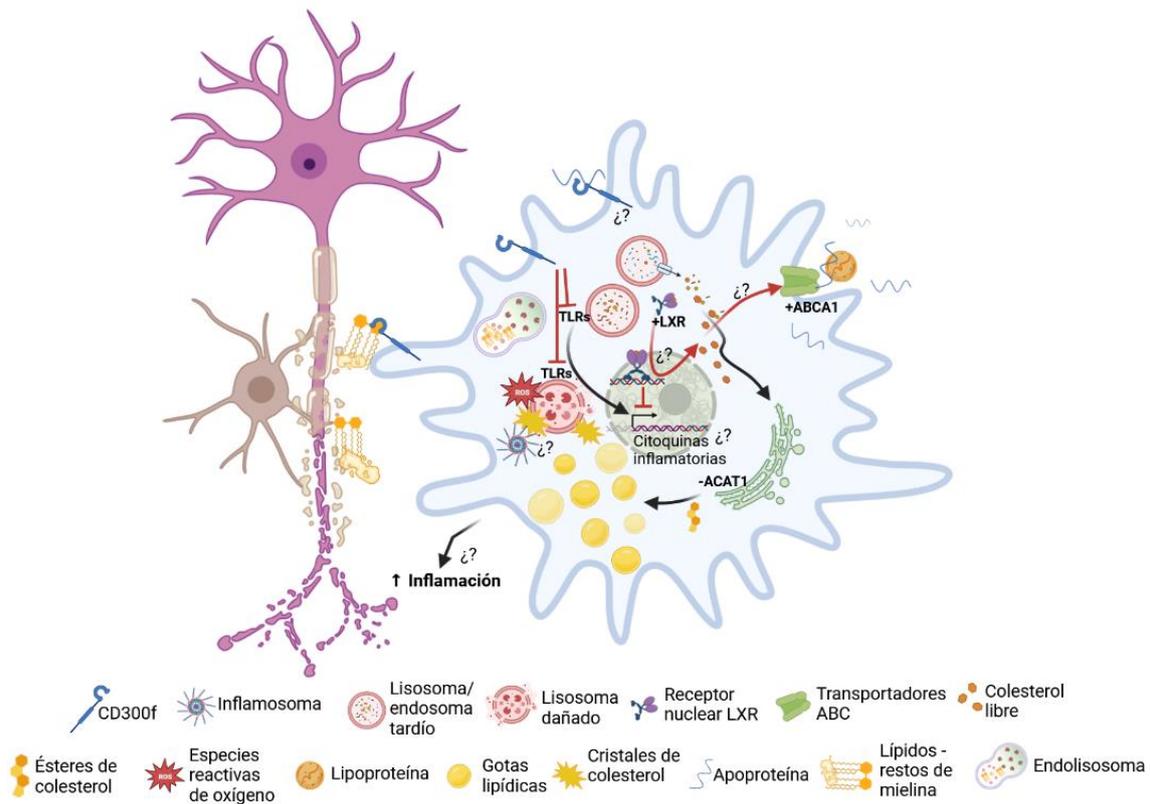


Figura 36. Propuesta de mecanismos posiblemente afectados en el metabolismo lipídico y desregulación de la respuesta inflamatoria ante la ausencia de CD300f. Tras el daño medular se da la muerte de oligodendrocitos y la generación de restos de mielina (marrón y amarillo). CD300f en la microglía/macrófagos (celestes) se une a lípidos de los restos de mielina y activa cascadas de señalización. Después de la fagocitosis de los restos de mielina, estos se procesan por la vía lisosoma-endosoma o autofagia (en la microglía) formando colesterol libre. Este colesterol libre es transportado fuera de la célula mediante los transportadores ABC o se convierte a ésteres de colesterol (EC) por la enzima ACAT1 en el retículo endoplasmático. En ausencia de CD300f, los EC se acumulan en gotas lipídicas y se oxidan, volviéndose tóxicos. Asimismo puede formar cristales que afectan el sistema lisosomal, liberando especies reactivas de oxígeno, y pueden inducir la activación del inflamosoma. En rojo se marcan las vías que posiblemente estén afectadas ante la ausencia de CD300f: i) modulación de la señalización por los TLR en lisosomas y endosomas tardíos, activados por la acumulación de colesterol libre en estos; ii) activación del receptor nuclear LXR y del eflujo de lípidos por los transportadores ABC; iii) la activación de LXR puede reprimir al factor nuclear que activa la producción de citoquinas proinflamatorias. Se postula que mediante un agonista de LXR o ABCA1, o la inhibición de ACAT1, se podría disminuir la acumulación de lípidos en el interior celular. Figura creada con BioRender.com

CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis han proporcionado datos relevantes sobre el papel del inmunoreceptor CD300f en procesos que regulan la respuesta inflamatoria y el fenotipo microglial y de macrófagos después de una lesión medular. La ausencia de CD300f en ratones hembras fue asociada con una mayor acumulación de lípidos neutros luego de una lesión medular, que posiblemente esté exacerbando la respuesta inflamatoria o alterando fenómenos de plasticidad, lo que a su vez limita la recuperación funcional motora. Asimismo, y en concordancia con lo observado *in vivo*, cultivos de macrófagos derivados de la médula ósea de hembras CD300f KO mostraron un mayor acumulado de lípidos, pero sin embargo, no presentaron alteraciones en la fagocitosis. Por el contrario, se encontró que la ausencia de CD300f en ratones machos redujo la acumulación de lípidos en cultivos de macrófagos derivados de la médula ósea al estimularlos con LPS, así como la fagocitosis general.

Se logró establecer una colonia de ratones KO condicionales para CD300f, que permitieron eliminar su expresión en poblaciones celulares específicas. La delección de CD300f en animales adultos, y solo en la microglía y los macrófagos de barrera, se asoció a una peor recuperación funcional motora en los primeros días después de la lesión medular en ratones hembras. Esta puede relacionarse con alteraciones de la respuesta inflamatoria temprana tras la lesión, importante para la activación de células y liberación de citoquinas y quimiocinas, necesarias para el correcto desarrollo de la respuesta inflamatoria y la regeneración.

Estos resultados sugieren que CD300f podría tener un papel en la regulación de la acumulación de lípidos en la lesión medular, desempeñando un rol importante en la coordinación de la respuesta de la microglía y los macrófagos; al mismo tiempo, se ha propuesto que los mecanismos moleculares que podrían explicar estos resultados incluyen la incapacidad de regular la respuesta de las células que carecen de CD300f al tener menor capacidad de reprogramación metabólica. Además, los resultados revelan que el papel desempeñado por CD300f puede ser diferente en ratones machos y hembras.

En resumen, el conjunto de resultados alcanzados propone que el receptor CD300f desempeñaría un papel importante en la regulación de la respuesta del sistema inmune innato y la respuesta inflamatoria tras una lesión medular por contusión, modulando la respuesta inflamatoria, el fenotipo celular y el metabolismo lipídico, con consecuencias directas en la recuperación funcional motora. De esta manera, proporcionan una base para futuras investigaciones sobre el papel de CD300f en la respuesta inflamatoria en la lesión medular, y podrían tener implicaciones para el desarrollo de terapias dirigidas a esta proteína.

AGRADECIMIENTOS

En el trascurso de esta tesis he crecido mucho tanto a nivel profesional como personal. Los años pasan, pero sin dudas que la diferencia está en lo que hacemos con el recurso más valioso y finito que tenemos en esta vida: el tiempo. Dedicarlo a la investigación ya sabemos todo lo que conlleva (los que estamos en esta, claro). Para los que no saben, la montaña rusa de la ciencia no hace más que sorprenderte luego de cada lenta, y muchas veces tortuosa, subida. La satisfacción de la pregunta contestada se hace esperar, y después tenés un millón más. No he escuchado a nadie exclamar “¡Eureka!” cual Arquímedes por los pasillos, pero estoy seguro de que por dentro todos lo gritamos en algún momento. Pero claro, también hay de esos otros no tan buenos, y tal vez sean la mayoría. Y por ahí vamos, dándonos ánimos entre todos para seguir intentando, tolerar esas largas jornadas maratónicas y aprender a tolerar cada fracaso para volverlo a intentar. De ensayo y error se trataba, ¿no?

Por eso, estoy convenido que la diferencia siempre la hará el entorno. “Rodéate de personas que te empujen a ser y crean en ti” o “Cualquier persona que te motive a crecer vale la pena tenerla cerca”, recitan frases por todos lados. Y en mi caso, sé que me rodea gente maravillosa con la que estoy feliz de compartir el tiempo; de todos aprendo cada día y no me queda más que agradecerles.

En primer lugar, quiero agradecer a Natalia y Hugo, quienes me dieron la libertad, el espacio y la confianza necesarios para todo desde el primer día. Agradezco su paciencia y sabiduría. Su capacidad para guiarme y fomentar el pensamiento crítico. Pero sobre todo, por ser antes que jefes personas. Por asumir el rol de líderes y crear un grupo en el que hacer ciencia se disfruta.

También quiero agradecer a mis compañeros de grupo por la ayuda y el aliento diario. Los momentos compartidos en el laboratorio, las risas, los lamentos y las charlas de la vida, de actualidad, series o películas; sin dudas que fueron esenciales para hacer más llevadero el proceso.

A Bruno, por estar siempre dispuesto a ayudar y aportar con lo que pueda. Por la mano en todas las cirugías que hicimos en el IPMon y las charlas divagando.

A Frances, por colaborar en lo que fuera necesario y asumir riesgos compartidos. Por compartir y transmitir el conocimiento. Por el interés de cada charla y los almuerzos compartidos.

A Daniela, por las chácharas de siempre y hacer más llevadera la oficina.

A Sabrina, por el aliento mutuo en los cruces del laboratorio.

A todo el personal del bioterio por el cuidado de los animales y estar siempre dispuestos a ayudar.

A Sergio, por estar pendiente y dar aviso de si algo sucedía.

A Andrea, sus charlas y palabras de ánimo en cada pasada por la puerta del Bioterio siempre son bien recibidas, y hacen la diferencia en el día a día. Gracias por cada risa compartida.

A todo el grupo de NFIS de la UAB, por hacerme sentir tan bien recibido y acogido. Me sentí como en casa.

A Joana, por estar siempre dispuesta a dar una mano o una charla de tren.

No puedo dejar de mencionar a mi familia y amigos, quienes me apoyaron en todo momento, a pesar de que muchas veces no pudieron entender completamente porque no podía verlos.

A mi madre y padre, por ser incondicionales y confiar siempre en mí.

A Daiana, por ser mi cómplice desde pequeño y empujarme para que me suelte a andar en bici.

A mis amigos todos, quienes se interesaron en lo que hacía y preguntaban con entusiasmo, su interés siempre fue valioso para mí. Por alegrar cada mal día y hacer más llevadera la rutina. Por elegirnos para compartir la vida.

A Lucy, por compartir esta pasión. Por nuestras quejas mutuas de la ciencia pero darnos siempre para adelante.

A Romi, la concu que siempre está para todas. Por soportar estos años de locura y sobre todo estos últimos meses de tener la sala invadida.

A Mati, por todo el amor y compañía. Por tolerar tanto estrés y locura, y hacer más lindos los días.

A todas las personas que de alguna u otra forma me ayudaron y acompañaron en este camino, su contribución fue fundamental en el logro de este objetivo.

¡GRACIAS!

BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, C. S., Wilson, J. R., Nori, S., Kotter, M. R. N., Druschel, C., Curt, A., et al. (2017). Traumatic spinal cord injury. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 3. doi: 10.1038/NRDP.2017.18.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F. M. V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* 10, 1538–1543. doi: 10.1038/NN2014.
- Alexander, J. K., and Popovich, P. G. (2009). *Neuroinflammation in spinal cord injury : therapeutic targets for neuroprotection and regeneration*. Elsevier doi: 10.1016/S0079-6123(09)17508-8.
- Alves De Lima, K., Rustenhoven, J., and Kipnis, J. (2020). Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102319-103410> 38, 597–620. doi: 10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-102319-103410.
- Amo-Aparicio, J., Martínez-Muriana, A., Sánchez-Fernández, A., and López-Vales, R. (2018). Neuroinflammation Quantification for Spinal Cord Injury. *Curr. Protoc. Immunol.* 123, e57. doi: 10.1002/CPIM.57.
- Anjum, A., Yazid, M. D., Daud, M. F., Idris, J., Hwei Ng, A. M., Naicker, A. S., et al. (2020). Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 7533 21, 7533. doi: 10.3390/IJMS21207533.
- ASIA-ISCOS (2019). International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury (ISNCSCI) (Revised 2019) - American Spinal Injury Association. Available at: <https://asia-spinalinjury.org/product/international-standards-for-neurological-classification-of-spinal-cord-injury-isncsci-revised-2019/> [Accessed January 17, 2023].
- ASIA-ISCOS ISNCSCI worksheet (2019). INTERNATIONAL STANDARDS FOR NEUROLOGICAL CLASSIFICATION OF SPINAL CORD INJURY Movement. Available at: <https://asia-spinalinjury.org/product/international-standards-for-neurological-classification-of-spinal-cord-injury-isncsci-revised-2019/> [Accessed January 17, 2023].
- Ayazi, M., Zivkovic, S., Hammel, G., Stefanovic, B., and Ren, Y. (2022). Fibrotic Scar in CNS Injuries: From the Cellular Origins of Fibroblasts to the Molecular Processes of Fibrotic Scar Formation. *Cells* 11. doi: 10.3390/cells11152371.
- Basso, D. M., Fisher, L. C., Anderson, A. J., Jakeman, L. B., McTigue, D. M., and Popovich, P. G. (2006). Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J. Neurotrauma* 23, 635–659. doi: 10.1089/neu.2006.23.635.
- Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallières, N., Lessard, M., Janelle, M. E., et al. (2019). Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat. Commun.* 10. doi: 10.1038/S41467-019-08446-0.
- Berdowski, W. M., Sanderson, L. E., and van Ham, T. J. (2021). The multicellular interplay of microglia in health and disease: lessons from leukodystrophy. *Dis. Model. Mech.* 14. doi: 10.1242/DMM.048925.
- Berglund, R., Guerreiro-Cacais, A. O., Adzemovic, M. Z., Zeitelhofer, M., Lund, H., Ewing, E., et al. (2020). Microglial autophagy-associated phagocytosis is essential for recovery from neuroinflammation. *Sci. Immunol.* 5. doi: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABB5077.

- Bican, O., Minagar, A., and Pruitt, A. A. (2013). The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. *Neurol. Clin.* 31, 1–18. doi: 10.1016/J.NCL.2012.09.009.
- Block, M. L., Zecca, L., and Hong, J. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity : uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 57–69. doi: 10.1038/nrn2038.
- Bogie, J. F. J., Jorissen, W., Mailleux, J., Nijland, P. G., Zelcer, N., Vanmierlo, T., et al. (2014). Myelin alters the inflammatory phenotype of macrophages by activating PPARs. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 1–13. doi: 10.1186/2051-5960-1-43/FIGURES/6.
- Borrego, F. (2013). The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system. *Blood* 121, 1951–1960. doi: 10.1182/blood-2012-09-435057.
- Bosurgi, L., Cao, Y. G., Cabeza-Cabrerizo, M., Tucci, A., Hughes, L. D., Kong, Y., et al. (2017). Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* 356, 1072–1076. doi: 10.1126/SCIENCE.AAI8132.
- Burns, S., Biering-Sørensen, F., Donovan, W., Graves, D. E., Jha, A., Johansen, M., et al. (2012). International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury, Revised 2011. *Top. Spinal Cord Inj. Rehabil.* 18, 85. doi: 10.1310/SCI1801-85.
- Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., and Beltramo, M. (2002). Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke* 33, 586–592. doi: 10.1161/HS0202.103399.
- Cantuti-Castelvetri, L., Fitzner, D., Bosch-Queralt, M., Weil, M. T., Su, M., Sen, P., et al. (2018). Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. *Science (80-.)*. 359, 684–688. doi: 10.1126/science.aan4183.
- Carmona, S., Zahs, K., Wu, E., Dakin, K., Bras, J., and Guerreiro, R. (2018). The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 17, 721–730. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30232-1/ATTACHMENT/13A3E0F6-553E-4268-B906-6A0AA9B944F9/MMC1.PDF.
- Cho, T. A. (2015). Spinal cord functional anatomy. *Continuum (Minneap. Minn).* 21, 13–35. doi: 10.1212/01.CON.0000461082.25876.4A.
- Clark, G. J., Ju, X., Azlan, M., Tate, C., Ding, Y., and Hart, D. N. J. (2009). The CD300 molecules regulate monocyte and dendritic cell functions. *Immunobiology* 214, 730–736. doi: 10.1016/j.imbio.2009.06.004.
- Clarner, T., Diederichs, F., Berger, K., Denecke, B., Gan, L., van der Valk, P., et al. (2012). Myelin debris regulates inflammatory responses in an experimental demyelination animal model and multiple sclerosis lesions. *Glia* 60, 1468–1480. doi: 10.1002/GLIA.22367.
- Conforti, L., Gilley, J., and Coleman, M. P. (2014). Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 394–409. doi: 10.1038/NRN3680.
- Couillard-Despres, S., Bieler, L., and Vogl, M. (2017). Pathophysiology of Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurol. Asp. Spinal Cord Inj.*, 503–528. doi: 10.1007/978-3-319-46293-6_19.
- Damisah, E. C., Rai, A., and Grutzendler, J. (2020). TREM2: Modulator of Lipid Metabolism in Microglia. *Neuron* 105, 759–761. doi: 10.1016/j.neuron.2020.02.008.
- Dantzer, R. (2009). Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 29, 247–264. doi: 10.1016/J.IAC.2009.02.002.
- David, S., Kroner, A., Greenhalgh, A. D., Zarruk, J. G., and López-Vales, R. (2018). Myeloid cell responses after spinal cord injury. *J. Neuroimmunol.* 321, 97–108. doi: 10.1016/J.JNEUROIM.2018.06.003.

- David, S., López-Vales, R., and Wee Yong, V. (2012). "Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury. potential therapeutic implications," in *Handbook of Clinical Neurology* (Elsevier B.V.), 485–502. doi: 10.1016/B978-0-444-52137-8.00030-9.
- Dempsey, L. A. (2022). Meningeal functional specialization. *Nat. Immunol.* 2022 238 23, 1134–1134. doi: 10.1038/s41590-022-01281-4.
- Ding, W., Hu, S., Wang, P., Kang, H., Peng, R., Dong, Y., et al. (2022). Spinal Cord Injury: The Global Incidence, Prevalence, and Disability From the Global Burden of Disease Study 2019. *Spine (Phila. Pa. 1976)*. 47, 1532–1540. doi: 10.1097/BRS.0000000000004417.
- Dorrier, C. E., Aran, D., Haenelt, E. A., Sheehy, R. N., Hoi, K. K., Pintarić, L., et al. (2021). CNS fibroblasts form a fibrotic scar in response to immune cell infiltration. *Nat. Neurosci.* 24, 234–244. doi: 10.1038/s41593-020-00770-9.
- Drieu, A., Du, S., Storck, S. E., Rustenhoven, J., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., et al. (2022). Parenchymal border macrophages regulate the flow dynamics of the cerebrospinal fluid. *Nat.* 2022 6117936 611, 585–593. doi: 10.1038/s41586-022-05397-3.
- Elliott, M. R., Koster, K. M., and Murphy, P. S. (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J. Immunol.* 198, 1387–1394. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1601520.
- Evans, T. A., Barkauskas, D. S., Myers, J. T., Hare, E. G., You, J. Q., Ransohoff, R. M., et al. (2014). High-resolution intravital imaging reveals that blood-derived macrophages but not resident microglia facilitate secondary axonal dieback in traumatic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 254, 109–120. doi: 10.1016/J.EXPNEUROL.2014.01.013.
- Gensel, J. C., and Zhang, B. (2015). Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.* 1619, 1–11. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2014.12.045.
- Ginhoux, F., Williams, M., and Naik, S. H. (2016). Dendritic cell and macrophage nomenclature and classification. *Front. Immunol.* 7, 168. doi: 10.3389/FIMMU.2016.00168/BIBTEX.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., and Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/FNCEL.2013.00045.
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., et al. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat. Immunol.* 17, 797–805. doi: 10.1038/NI.3423.
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Müller, P. F., Wolf, Y., Varol, D., Yona, S., et al. (2013). A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat. Neurosci.* 16, 1618–1626. doi: 10.1038/nn.3531.
- Gómez-López, A. R., Manich, G., Recasens, M., Almolda, B., González, B., and Castellano, B. (2021). Evaluation of Myelin Phagocytosis by Microglia/Macrophages in Nervous Tissue Using Flow Cytometry. *Curr. Protoc.* 1, 1–18. doi: 10.1002/cpz1.73.
- Graeber, M. B., Streit, W. J., and Pain, Á. N. Á. (2010). Microglia : biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 89–105. doi: 10.1007/s00401-009-0622-0.
- Greenhalgh, A. D., and David, S. (2014). Neurobiology of Disease Differences in the Phagocytic Response of Microglia and Peripheral Macrophages after Spinal Cord Injury and Its Effects on Cell Death. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4912-13.2014.
- Guest, J., Datta, N., Jimsheleishvili, G., and Gater, D. R. (2022). Pathophysiology, Classification and Comorbidities after Traumatic Spinal Cord Injury. *J. Pers. Med.* 12, 1126. doi: 10.3390/jpm12071126.

- Hagemeyer, N., Hanft, K. M., Akriditou, M. A., Unger, N., Park, E. S., Stanley, E. R., et al. (2017). Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol.* 134, 441–458. doi: 10.1007/S00401-017-1747-1.
- Hamid, R., Averbeck, M. A., Chiang, H., Garcia, A., Al Mousa, R. T., Oh, S. J., et al. (2018). Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury. *World J. Urol.* 36, 1517–1527. doi: 10.1007/S00345-018-2301-Z.
- Hammel, G., Zivkovic, S., Ayazi, M., and Ren, Y. (2022). Consequences and mechanisms of myelin debris uptake and processing by cells in the central nervous system. *Cell. Immunol.* 380. doi: 10.1016/J.CELLIMM.2022.104591.
- Hammond, B. P., Manek, R., Kerr, B. J., Macauley, M. S., and Plemel, J. R. (2021). Regulation of microglia population dynamics throughout development, health, and disease. *Glia* 69, 2771–2797. doi: 10.1002/GLIA.24047.
- Han, Y., Liu, D., and Li, L. (2020). PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 10, 727. Available at: /pmc/articles/PMC7136921/ [Accessed May 9, 2023].
- Hellenbrand, D. J., Quinn, C. M., Piper, Z. J., Morehouse, C. N., Fixel, J. A., and Hanna, A. S. (2021). Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *J. Neuroinflammation* 18, 1–16. doi: 10.1186/s12974-021-02337-2.
- Herz, J., Filiano, A. J., Smith, A., Yogev, N., and Kipnis, J. (2017). Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity* 20, 943–956. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.007.
- Horn, K. P., Busch, S. A., Hawthorne, A. L., Van Rooijen, N., and Silver, J. (2008). Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J. Neurosci.* 28, 9330–9341. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2488-08.2008.
- Izawa, K., Kaitani, A., Ando, T., Maehara, A., Nagamine, M., Yamada, H., et al. (2020). Differential Lipid Recognition by Mouse versus Human CD300f, Inhibiting Passive Cutaneous Anaphylaxis, Depends on a Single Amino Acid Substitution in its Immunoglobulin-Like Domain. *J. Invest. Dermatol.* 140, 710-713.e3. doi: 10.1016/j.jid.2019.08.439.
- Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Oki, T., Shibata, F., et al. (2007). Functional analysis of activating receptor LMIR4 as a counterpart of inhibitory receptor LMIR3. *J. Biol. Chem.* 282, 17997–18008. doi: 10.1074/JBC.M701100200.
- Izawa, K., Yamanishi, Y., Maehara, A., Takahashi, M., Isobe, M., Ito, S., et al. (2012). The Receptor LMIR3 Negatively Regulates Mast Cell Activation and Allergic Responses by Binding to Extracellular Ceramide. *Immunity* 37, 827–839. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.018.
- Jones, Z. B., and Ren, Y. (2016). Sphingolipids in spinal cord injury. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 8, 52. Available at: /pmc/articles/PMC4981650/ [Accessed January 30, 2023].
- Kalafatakis, I., and Karagogeos, D. (2021). Oligodendrocytes and Microglia: Key Players in Myelin Development, Damage and Repair. *Biomolecules* 11. doi: 10.3390/BIOM11071058.
- Kaufmann, F. N., Lago, N., Alí-Ruiz, D., Jansen, K., Souza, L. D. M., Silva, R. A., et al. (2020). Sex-dependent role of CD300f immune receptor in generalized anxiety disorder. *Brain, Behav. Immun. - Heal.* 11. doi: 10.1016/J.BBIH.2020.100191.
- Kigerl, K. A., Mcgaughy, V. M., Popovich, P. G., and Popovich, P. (2006). A Comparative Analysis of Lesion Development and Intraspinal Inflammation in Four Strains of Mice Following Spinal Contusion Injury NIH Public Access. *J Comp Neurol* 494, 578–594. doi: 10.1002/cne.20827.

- Kopper, T. J., Zhang, B., Bailey, W. M., Bethel, K. E., and Gensel, J. C. (2021). The effects of myelin on macrophage activation are phenotypic specific via cPLA2 in the context of spinal cord injury inflammation. *Sci. Reports* 2021 111 11, 1–13. doi: 10.1038/s41598-021-85863-6.
- Kotter, M. R., Li, W. W., Zhao, C., and Franklin, R. J. M. (2006). Myelin Impairs CNS Remyelination by Inhibiting Oligodendrocyte Precursor Cell Differentiation. *J. Neurosci.* 26, 328–332. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2615-05.2006.
- Kroner, A., and Rosas Almanza, J. (2019). Role of microglia in spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* 709, 134370. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134370.
- Kumar, R., Lim, J., Mekary, R. A., Rattani, A., Dewan, M. C., Sharif, S. Y., et al. (2018). Traumatic Spinal Injury: Global Epidemiology and Worldwide Volume. *World Neurosurg.* 113, e345–e363. doi: 10.1016/j.wneu.2018.02.033.
- Lago, N., Kaufmann, F. N., Negro-Demontel, M. L., Alí-Ruiz, D., Ghisleni, G., Rego, N., et al. (2020). CD300f immunoreceptor is associated with major depressive disorder and decreased microglial metabolic fitness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi: 10.1073/PNAS.1911816117.
- Lee, S.-M., Kim, E.-J., Suk, K., and Lee, W.-H. (2011). CD300F blocks both MyD88 and TRIF-mediated TLR signaling through activation of Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1. *J. Immunol.* 186, 6296–6303. doi: 10.4049/JIMMUNOL.1002184.
- Liu, M., O'Connor, R. S., Trefely, S., Graham, K., Snyder, N. W., and Beatty, G. L. (2019). Metabolic rewiring of macrophages by CpG potentiates clearance of cancer cells and overcomes tumor-expressed CD47-mediated 'don't-eat-me' signal. *Nat. Immunol.* 2019 203 20, 265–275. doi: 10.1038/s41590-018-0292-y.
- Lopes Pinheiro, M. A., Kamermans, A., Garcia-Vallejo, J. J., Van Het Hof, B., Wiert, L., O'Toole, T., et al. (2016). Internalization and presentation of myelin antigens by the brain endothelium guides antigen-specific T cell migration. *Elife* 5. doi: 10.7554/ELIFE.13149.
- Marschallinger, J., Iram, T., Zardeneta, M., Lee, S. E., Lehallier, B., Haney, M. S., et al. (2020). *Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain.* doi: 10.1038/s41593-019-0566-1.
- Martínez-Barriocanal, Á., Comas-Casellas, E., Schwartz, S., Martín, M., and Sayós, J. (2010). CD300 heterocomplexes, a new and family-restricted mechanism for myeloid cell signaling regulation. *J. Biol. Chem.* 285, 41781–41794. doi: 10.1074/JBC.M110.140889.
- Mazzitelli, J. A., Smyth, L. C. D., Cross, K. A., Dykstra, T., Sun, J., Du, S., et al. (2022). Cerebrospinal fluid regulates skull bone marrow niches via direct access through dural channels. *Nat. Neurosci.* 2022 255 25, 555–560. doi: 10.1038/s41593-022-01029-1.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D. L., Kottis, V., Dunn, R. J., and Braun, P. E. (1994). Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13, 805–811. doi: 10.1016/0896-6273(94)90247-X.
- McNamara, N. B., Munro, D. A. D., Bestard-Cuche, N., Uyeda, A., Bogie, J. F. J., Hoffmann, A., et al. (2023). Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature* 613. doi: 10.1038/S41586-022-05534-Y.
- Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U., and Falkevall, A. (2013). Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat. Protoc.* 2013 86 8, 1149–1154. doi: 10.1038/nprot.2013.055.
- Mills, E. L., and O'Neill, L. A. (2016). Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur. J. Immunol.* 46, 13–21. doi: 10.1002/EJI.201445427.
- Møllgård, K., Beinlich, F. R. M., Kusk, P., Miyakoshi, L. M., Delle, C., Plá, V., et al. (2023). A

- mesothelium divides the subarachnoid space into functional compartments. *Science* (80-.). 88, 84–88. doi: 10.1126/science.adc8810 An.
- Moore, K. J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145, 341–355. doi: 10.1016/J.CELL.2011.04.005.
- Moshkovits, I., Karo-Atar, D., Itan, M., Reichman, H., Rozenberg, P., Morgenstern-Ben-Baruch, N., et al. (2015). CD300f associates with IL-4 receptor α and amplifies IL-4-induced immune cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 8708–8713. doi: 10.1073/pnas.1507625112.
- Moshkovits, I., Shik, D., Itan, M., Karo-Atar, D., Bernshtein, B., Hershko, A. Y., et al. (2014). CMRF35-like molecule 1 (CLM-1) regulates eosinophil homeostasis by suppressing cellular chemotaxis. *Mucosal Immunol.* 7, 292–303. doi: 10.1038/MI.2013.47.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Inmunobiología de Janeway 7a. edición.*
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., et al. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41, 14–20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Nas, K., Yazmalar, L., Şah, V., Aydin, A., and Öneş, K. (2015). Rehabilitation of spinal cord injuries. *World J. Orthop.* 6, 8–16. doi: 10.5312/WJO.V6.I1.8.
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell* 140, 871–882. doi: 10.1016/J.CELL.2010.02.029.
- Nigam, S., and Schewe, T. (2000). Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 167–181. doi: 10.1016/S1388-1981(00)00119-0.
- Niizuma, K., Tahara-Hanaoka, S., Noguchi, E., and Shibuya, A. (2015). Identification and Characterization of CD300H, a New Member of the Human CD300 Immunoreceptor Family. *J. Biol. Chem.* 290, 22298–22308. doi: 10.1074/JBC.M115.643361.
- Nimmerjahn, A. et al. (2012). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* (80-.). 1314. doi: 10.1126/science.1110647.
- Nugent, A. A., Lin, K., van Lengerich, B., Lianoglou, S., Przybyla, L., Davis, S. S., et al. (2020). TREM2 Regulates Microglial Cholesterol Metabolism upon Chronic Phagocytic Challenge. *Neuron* 105, 837-854.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2019.12.007.
- O’neill, L. A. J., and Pearce, E. J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med* 213, 15–23. doi: 10.1084/jem.20151570.
- Olzmann, J. A., and Carvalho, P. (2019). Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 137–155. doi: 10.1038/s41580-018-0085-z.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M. E., Aguzzi, A., Ajami, B., et al. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110, 3458–3483. doi: 10.1016/J.NEURON.2022.10.020.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., et al. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596–1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
- Peluffo, H., Alí-ruiz, D., Ejarque-ortíz, A., Heras-alvarez, V., Comas-casellas, E., Martínez-barriocanal, A., et al. (2012). Overexpression of the Immunoreceptor CD300f Has a Neuroprotective Role in a Model of Acute Brain Injury. *Brain Pathol.* 22, 318–328. doi: 10.1111/j.1750-3639.2011.00537.x.
- Peluffo, H., Solari-saquieres, P., Negro-demontel, M. L., Francos-quijorna, I., Navarro, X., López-

- vales, R., et al. (2015). CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype. *J. Neuroinflammation* 145, 1–15. doi: 10.1186/s12974-015-0364-y.
- Plemel, J. R., Michaels, N. J., Weishaupt, N., Caprariello, A. V., Keough, M. B., Rogers, J. A., et al. (2018). Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy. *Glia* 66, 327–347. doi: 10.1002/GLIA.23245.
- Popovich, P. G., Guan, Z., McGaughy, V., Fisher, L., Hickey, W. F., and Basso, D. M. (2002). The neuropathological and behavioral consequences of intraspinal microglial/macrophage activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 623–633. doi: 10.1093/JNEN/61.7.623.
- Quan, L., Uyeda, A., and Muramatsu, R. (2022). Central nervous system regeneration: the roles of glial cells in the potential molecular mechanism underlying remyelination. *Inflamm. Regen.* 42. doi: 10.1186/S41232-022-00193-Y.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. *Nat. Neurosci.* 19, 987–991. doi: 10.1038/nn.4338.
- Ransohoff, R. M., and Perry, V. H. (2009). Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
- Safaiyan, S., Kannaiyan, N., Snaidero, N., Brioschi, S., Biber, K., Yona, S., et al. (2016). Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat. Neurosci.* 19, 995–998. doi: 10.1038/nn.4325.
- Saghazadeh, A., and Rezaei, N. (2017). The role of timing in the treatment of spinal cord injury. *Biomed. Pharmacother.* 92, 128–139. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.048.
- Sánchez-Ventura, J., Amo-Aparicio, J., Navarro, X., and Penas, C. (2019). BET protein inhibition regulates cytokine production and promotes neuroprotection after spinal cord injury. *J. Neuroinflammation* 16, 1–12. doi: 10.1186/S12974-019-1511-7/FIGURES/5.
- Sariol, A., Mackin, S., Allred, M. G., Ma, C., Zhou, Y., Zhang, Q., et al. (2020). Microglia depletion exacerbates demyelination and impairs remyelination in a neurotropic coronavirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 24464–24474. doi: 10.1073/pnas.2007814117.
- Schroepfer, G. J., and Wilson, W. K. (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554. doi: 10.1152/PHYSREV.2000.80.1.361.
- Shechter, R., London, A., Varol, C., Raposo, C., Cusimano, M., Yovel, G., et al. (2009). Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.* 6. doi: 10.1371/JOURNAL.PMED.1000113.
- Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., et al. (2013). Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* 38, 555–569. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2013.02.012.
- Singh, A., Tetreault, L., Kalsi-Ryan, S., Nouri, A., and Fehlings, M. G. (2014). Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin. Epidemiol.* 6, 309. doi: 10.2147/CLEP.S68889.
- Spann, N. J., Garmire, L. X., McDonald, J. G., Myers, D. S., Milne, S. B., Shibata, N., et al. (2012). Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* 151, 138–152. doi: 10.1016/J.CELL.2012.06.054.
- Stout, R. D., and Suttles, J. (2004). Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76, 509–513. doi: 10.1189/JLB.0504272.

- Sun, Y., Ishibashi, M., Seimon, T., Lee, M., Sharma, S. M., Fitzgerald, K. A., et al. (2009). Free cholesterol accumulation in macrophage membranes activates Toll-like receptors and p38 mitogen-activated protein kinase and induces cathepsin K. *Circ. Res.* 104, 455–465. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.182568.
- The Myeloid Landscape 2 (n.d.). Available at: <http://research-pub.gene.com/BrainMyeloidLandscape/BrainMyeloidLandscape2/#> [Accessed March 19, 2023].
- Thuret, S., Moon, L. D. F., and Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* 7, 628–643. doi: 10.1038/nrn1955.
- Tian, L., Choi, S.-C., Lee, H.-N., Murakami, Y., Qi, C.-F., Sengottuvelu, M., et al. (2016). Enhanced efferocytosis by dendritic cells underlies memory T-cell expansion and susceptibility to autoimmune disease in CD300f-deficient mice. *Cell Death Differ.*, 1–11. doi: 10.1038/cdd.2015.161.
- Tian, L., Choi, S., Murakami, Y., Allen, J., Iii, H. C. M., Qi, C., et al. (2014). p85a recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nat. Commun.* 5, 1–15. doi: 10.1038/ncomms4146.
- Van Broeckhoven, J., Sommer, D., Dooley, D., Hendrix, S., and Franssen, A. J. P. M. (2021). Macrophage phagocytosis after spinal cord injury: When friends become foes. *Brain* 144, 2933–2945. doi: 10.1093/brain/awab250.
- Wang, S., Deng, J., Fu, H., Guo, Z., Zhang, L., and Tang, P. (2020). Astrocytes directly clear myelin debris through endocytosis pathways and followed by excessive gliosis after spinal cord injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 525, 20–26. doi: 10.1016/J.BBRC.2020.02.069.
- Wang, X., Cao, K., Sun, X., Chen, Y., Duan, Z., Sun, L., et al. (2015a). Macrophages in spinal cord injury: Phenotypic and functional change from exposure to myelin debris. *Glia* 63, 635–651. doi: 10.1002/glia.22774.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., et al. (2015b). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061–1071. doi: 10.1016/J.CELL.2015.01.049.
- Wu, T. T., Chen, T. L., and Chen, R. M. (2009). Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference. *Toxicol. Lett.* 191, 195–202. doi: 10.1016/J.TOXLET.2009.08.025.
- Wu, Y. qing, Xiong, J., He, Z. li, Yuan, Y., Wang, B. ni, Xu, J. yu, et al. (2021). Metformin promotes microglial cells to facilitate myelin debris clearance and accelerate nerve repairment after spinal cord injury. *Acta Pharmacol. Sin.* 2021 436 43, 1360–1371. doi: 10.1038/s41401-021-00759-5.
- Xi, H., Jr, K. J. K., Helmy, K. Y., Wark, P. A., Kljavin, N., Clark, H., et al. (2010). Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory receptor CLM-1. *J Exp Med* 207, 7–16. doi: 10.1084/jem.20091508.
- Xiong, Y., Rabchevsky, A. G., and Hall, E. D. (2007). Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *J. Neurochem.* 100, 639–649. doi: 10.1111/J.1471-4159.2006.04312.X.
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2012.12.001.

- Yvan-Charvet, L., Wang, N., and Tall, A. R. (2010). Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 139–143. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179283.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keeffe, S., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- Zhou, T., Huang, Z., Sun, X., Zhu, X., Zhou, L., Li, M., et al. (2017). Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration. *Front. Neuroanat.* 11, 77. doi: 10.3389/FNANA.2017.00077/BIBTEX.
- Zhou, T., Zheng, Y., Sun, L., Badea, S. R., Jin, Y., Liu, Y., et al. (2019). Microvascular endothelial cells engulf myelin debris and promote macrophage recruitment and fibrosis after neural injury. *Nat. Neurosci.* 2019 223 22, 421–435. doi: 10.1038/s41593-018-0324-9.
- Zhu, Y., Lyapichev, K., Lee, D. H., Motti, D., Ferraro, N. M., Zhang, Y., et al. (2017). Macrophage transcriptional profile identifies lipid catabolic pathways that can be therapeutically targeted after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 37, 2362–2376. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2751-16.2017.

