

EL INMUNORRECEPTOR
CD200R1 EN DIFERENTES
CONTEXTOS DE
NEUROINFLAMACIÓN:
DESDE MECANISMOS
A ESTRATEGIAS
TERAPÉUTICAS



BRUNO
PANNUNZIO

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

PEDECIBA, Subárea Neurociencias

Noviembre 2023

“El inmunorreceptor CD200R1 en diferentes contextos de neuroinflamación: desde mecanismos a estrategias terapéuticas”

MSc. Bruno Pannunzio

Laboratorio de Neuroinflamación y Terapia Génica
Institut Pasteur de Montevideo

Unidad Académica de Histología y Embriología
Facultad de Medicina, UdelaR

Orientadora: Dra. Natalia Lago

Co-orientador: Dr. Rubèn López-Vales

Tribunal:

Dr. Raúl Russo

Dra. Nathalia Vitoreira

Dr. Marcelo Hill



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Unidad Académica de
Histología y Embriología



RESUMEN

La neuroinflamación o inflamación del sistema nervioso, es una respuesta fisiológica desencadenada por la presencia de estímulos dañinos, como las infecciones y daño en los tejidos. Si bien esta respuesta puede tener efectos beneficiosos y perjudiciales, generalmente se asocia a un daño irreversible del tejido nervioso que es altamente dependiente del contexto, la intensidad y la duración de la respuesta. La neuroinflamación se ha asociado con efectos perjudiciales en patologías neurodegenerativas, sin embargo, los efectos negativos de esta respuesta son más evidentes frente a un daño físico al sistema nervioso, donde la neuroinflamación es responsable de la propagación del daño y del aumento de la pérdida irreversible del tejido nervioso. Esto pone en evidencia la relevancia del estudio de los mecanismos precisos que subyacen al desarrollo de las respuestas neuroinflamatorias, con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas que nos permitan regular de manera precisa estos procesos frente a diferentes contextos de inflamación.

Los inmunorreceptores han ganado importancia como actores fundamentales en la regulación de las respuestas inflamatorias debido a su amplia variedad de efectos que ejercen sobre las células del sistema inmune. Esto genera una oportunidad para la regulación precisa de las respuestas inflamatorias a través de la modulación de la actividad de estos receptores. Uno de los receptores que ha sido involucrado en numerosas patologías del sistema nervioso que tienen un componente importante de neuroinflamación es CD200R1, el cual es activado por el ligando CD200. El receptor CD200R1 es expresado por las principales células encargadas de llevar a cabo las respuestas neuroinflamatorias, entre ellas la microglía, macrófagos, neutrófilos y linfocitos. La activación de CD200R1 por parte del ligando CD200 genera una cascada de señalización intracelular que inhibe la producción de mediadores pro-inflamatorios, por lo que se considera que tiene un efecto anti-inflamatorio. Previamente, en nuestro grupo de investigación demostramos que la modulación del receptor CD200R1 genera alteraciones en la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal y tiene un impacto en la recuperación de las funciones locomotoras.

Por lo tanto, en el presente trabajo nos planteamos profundizar en los mecanismos por los cuales la interacción CD200-CD200R1 modula las respuestas neuroinflamatorias en diferentes contextos de inflamación, por medio de la utilización de diferentes modelos experimentales, con

el fin de desarrollar estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la interacción para la regulación precisa de la neuroinflamación. Con este fin estudiamos el rol de CD200-CD200R1 en la neuroinflamación en condiciones de lesión del sistema nervioso periférico (SNP), lesión del sistema nervioso central (SNC), y de inflamación sistémica. En primer lugar, evidenciamos el rol de CD200-CD200R1 luego de una lesión de nervio ciático. Al impedir la interacción entre CD200 y CD200R1 por medio de la administración de un anticuerpo bloqueante de CD200R1, la recuperación funcional empeoró, evidenciando un rol beneficioso de la activación de CD200R1 en este modelo de lesión al SNP. Sorprendentemente, el bloqueo de CD200R1 generó un ambiente menos pro-inflamatorio a nivel local.

Utilizando un modelo transgénico de ratones CD200R1 knock-out, profundizamos en los mecanismos de la inflamación luego de una lesión de médula espinal, tanto a nivel local en el sitio de la lesión, como en los órganos periféricos que participan en el desarrollo de esta respuesta inflamatoria. A pesar de que observamos que la ausencia del receptor de manera constitutiva no tiene un efecto sobre la recuperación de las funciones locomotoras, sí tiene un efecto sobre la respuesta inflamatoria. Estas alteraciones las observamos tanto a nivel local en el sitio de lesión, como a nivel del bazo, el cual es una fuente de células inmunes que migran a la médula lesionada. Por lo tanto, de esta manera relacionamos el rol de CD200R1 en la neuroinflamación local con la respuesta que se inicia fuera del SNC. Con el fin de profundizar en estos mecanismos que relacionan la neuroinflamación con la respuesta periférica, analizamos el efecto de la ausencia de CD200R1 en los ratones knock-out en un contexto de inflamación sistémica por medio de la administración de lipopolisacárido intraperitoneal, que genera una respuesta inflamatoria a nivel de todo el organismo que es transmitida al SNC. Observamos importantes alteraciones comportamentales que se asocian a importantes cambios en SNC, así como también un marcado efecto a nivel del bazo en los ratones *CD200R1-KO* frente a este estímulo.

Finalmente, avanzamos en el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la interacción CD200-CD200R1 para la regulación de la neuroinflamación, particularmente en el contexto de una lesión traumática de médula espinal. Diseñamos y evaluamos el efecto de una nueva proteína recombinante sobre la activación del receptor CD200R1, así como también profundizamos en la ventana terapéutica óptima para actuar luego de una lesión de médula espinal y promover una mejora en la recuperación funcional.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis tutores Natalia y Rubèn, que me guiaron en este largo camino sinuoso, que me dejaron recorrerlo libremente y permitiendome salirme del sendero para explorar y poder aprender de los errores, pero siempre apoyándome cuando necesitaba volver a encontrar el camino correcto. Especialmente quiero agradecer a Nata y Hugo, que me hicieron crecer como persona y como científico, transmitiendo siempre su entusiasmo, experiencia y conocimiento para poder desenvolverme en el mundo de la ciencia de primer nivel. Todas las valiosas lecciones que aprendí las voy a llevar siempre. Además, quiero expresar mi gratitud particular a Rubén por abrirme las puertas de su laboratorio en dos ocasiones distintas. Estas experiencias fueron verdaderamente únicas y enriquecedoras, tanto en el ámbito personal como profesional.

A los miembros del tribunal Raúl, Natalia y Marcelo, que desde que empezó el proyecto me ayudaron a mejorar la calidad científica del trabajo, brindando su visión de cómo mejorar y hacer un trabajo más interesante y significativo.

A mis compañeros de lab, Andrés, Frances, Dani y Sabri, quienes siempre estuvieron dispuestos a brindar su ayuda y apoyo cuando fue necesario. En particular, quiero destacar a Andrés, con quien compartimos innumerables horas en la sala de cirugía y cuya colaboración fue fundamental para el éxito de este proyecto; sin su ayuda, habría sido imposible. A Frances también que me dio una tremenda mano poniendo a punto los cultivos de macrófagos y enseñándome el mundo de los cultivos con toda la paciencia. Dani que me ayudó con parte de los estudios comportamentales y Sabri con las inmunos de cerebro. El equipo que se armó fue el combustible que nos ayudó a todos a empujar en el mismo sentido para llegar a la orilla. Sin el aporte de todos, no hubiésemos llegado.

A toda la gente de la Universitat Autònoma de Barcelona, que me hicieron sentir en casa desde el día que llegué hasta que me fui. Compartimos momentos que siempre quedarán marcados en la memoria. Particularmente quiero agradecer a Jesús, que sus enseñanzas fueron la base sobre la que se apoyaron muchos de los experimento de esta tesis; y a Guillem, que me ayudó con los análisis de electrofisiología.

Quiero agradecer a la Comisión Acaémica de Posgrado, que me apoyó económicamente con becas desde el comienzo hasta la finalización del posgrado y me permitieron seguir este camino.

A todo el Departamento de Histología, que desde el principio me dieron para adelante, dándome fuerzas y buenos consejos cuando los necesitaba. Particularmente a Camilia Julián que realizó los cortes semifinos de nervios, siempre contagiando alegría.

A la gente de la UBAL del Institut Pasteur de Montevideo, especialmente Sergio y Andrea, que además de ser unos genios y siempre dar fuerzas para adelante, siempre dieron una mano imprescindible en el cuidado y mantenimiento de los animales.

A la Unidad de Biología Celular, particularmente Paula Céspedes que siempre me dio una mano con la citometría de flujo y fue fundamental para poner a punto esta metodología; a Karen Perelmuter que realizó los cultivos de las células BV-2, además de también dar una mano con el citómetro cuando se necesitaba.

A Cludia Ortega de la Unidad de Ingeniería de Proteínas, que llevó a cabo la producción de la proteína recombinante que fue utilizada en esta tesis.

A la gente de la UBA, que me abrió las puertas para seguir mi camino. A Marce que me enseñó a usar los microscopios y me ayudó con las adquisiciones.

Quiero darle gracias especialmente a toda mi familia y amigos, que siempre me dieron para adelante, apoyándome, dándome consejos cuando los necesitaba y cuando no también, escuchándome cuando no tenía con quien hablar, siempre guiándome hacia lo que me hace feliz. En especial mis padres y mi hermana, que me apoyaron desde el día uno cuando dije que quería empezar este camino allá por 2009-2010, siempre confiando en mí. Verlos orgullosos de mí me llena el corazón y me hace siempre empujar un poco más, porque veo los frutos instantáneamente cuando me hacen saber lo orgullosos que están. Yo estoy orgullosos de ustedes como hijo y hermano y no podría pedir una mejor familia. Nunca cambien.

A mi abuelo Peio que siempre que necesitaba algo estuvo ahí, inclusive cuando me hizo el adaptador para poder sostener la médula espinal de los ratones en el contenedor, que sin esa pieza hubiese sido imposible esta tesis.

Por último, pero más importante, quiero agradecer a Cami. Cada paso de este camino lo dimos juntos, haciendo fuerza siempre para lograr lo que nos planteamos. A pesar de la montaña rusa de emociones que fue este camino y que parecía que nunca iba a terminar, vos me hacías ver la luz al final del camino y me das la fuerza para seguir, inclusive los días que estoy Bruno, me haces ser más Luciano. El día a día hubiese sido imposible sin tu apoyo, tu cariño y tu amor. Más de una vez fuiste la voz que me ayudó a seguir adelante a pesar de querer tirar todo. Como siempre digo que somos el mejor equipo que puede haber. Entre los dos podemos lograr lo que nos proponíamos. Ahora terminamos esta etapa, pero lo más importante es lo que se viene ...

... así como las notas individuales se unen para crear una melodía, cada uno de ustedes es una nota en esta sinfonía. Esto no hubiese sido posible sin cada uno de ustedes, así que las palabras que siguen son tanto más como de ustedes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
<i>Neuroinflamación</i>	11
Inflamación en el sistema nervioso	11
Microglía	14
Heterogeneidad de microglía/macrófagos	16
Inmunorreceptores como moduladores de la neuroinflamación	22
El inmunoreceptor CD200R1 y su ligando CD200	24
<i>Modelos experimentales de neuroinflamación</i>	31
Lesiones traumáticas de nervio periférico	32
Estructura y fisiología del nervio periférico	32
Células de Schwann	33
Lesiones traumáticas de nervios periféricos en humanos	37
Eventos que ocurren luego de la lesión de nervio periférico	40
Regeneración luego de una lesión traumática de nervio periférico	46
Inmunorreceptores en la degeneración Walleriana	48
Lesión de médula espinal	52
Generalidades de las lesiones de médula espinal	52
Modelos murinos experimentales de lesión de médula espinal	54
Propagación del daño secundario luego de una contusión medular	56
Respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal	58
El bazo como interfaz neuroinmune después de una lesión de médula espinal	65
Interacción CD200-CD200R1 luego de una lesión de médula espinal	70
Inflamación sistémica por administración de lipopolisacárido (LPS)	72
Neuroinflamación frente a la estimulación con LPS	73
El bazo en una inflamación sistémica	76
HIPÓTESIS	79
OBJETIVO GENERAL	80
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	80
MATERIALES Y MÉTODOS	81
Mantenimiento de animales	81
Lesión de médula espinal y cuidados post-operatorios	82
<i>Lesión de nervio ciático</i>	83
Inyecciones dentro del nervio ciático	83
<i>Tratamiento con lipopolisacárido (LPS)</i>	84
<i>Administración de CD200-His dentro del tejido de médula espinal</i>	84

Evaluación funcional y test comportamentales	85
Basso Mouse Scale	85
Test de campo abierto.....	86
Análisis de preservación de vías motoras por potenciales evocados	87
Diseño y producción de la proteína recombinante CD200-X	88
Cultivos celulares	88
Macrófagos derivados de la médula ósea.....	88
Células de la línea BV-2	89
Citometría de flujo	90
Tejido de médula espinal	90
Citometría de flujo de células del bazo.....	90
Análisis de fagocitosis de mielina por citometría de flujo	91
Obtención de mielina y conjugación a pHrodo.....	91
Fagocitosis en tejido de médula espinal	92
Fagocitosis en cultivo celular de macrófagos derivados de la médula ósea.....	93
Procesamiento histológico	93
Nervio ciático	93
Separación (teasing) de fibras nerviosas en nervio ciático	94
Nervio tibial	95
Inervación de la piel.....	96
Médula espinal	96
Bazo	97
Cuantificación del número de microglía en cerebro	97
Análisis de limpieza de mielina en el tejido	98
Análisis de degradación de mielina en el tejido	99
Análisis de parámetros sanguíneos	99
Analizador hematológico	99
Análisis de la expresión génica	99
Extracción y purificación de ARN mensajero	99
Retrotranscripción del ARN mensajero a ADN copia.....	100
Amplificación por PCR cuantitativa	101
Secuenciación de ARN y análisis transcripcional.....	101
Procesamiento de datos y análisis estadístico	102
RESULTADOS	103
Capítulo 1 / Objetivo específico 1: Rol de CD200-CD200R1 en una lesión de nervio periférico	103
Caracterización de la expresión de CD200 y CD200R1 en el nervio ciático normal y luego de una lesión traumática.....	103

Expresión de CD200 en nervio ciático	103
Análisis de la expresión de CD200R1 en nervio ciático.....	107
Efecto del bloqueo de CD200R1 <i>in vivo</i> luego de una lesión de nervio ciático	109
Impacto sobre la respuesta inflamatoria al bloquear CD200R1 a nivel local luego de una lesión de nervio ciático.....	110
Análisis de la limpieza de mielina en el nervio ciático luego del bloqueo de CD200R1	116
Limitación en la recuperación de las funciones luego de una lesión de nervio ciático a causa del bloqueo de CD200R1 localmente.....	117
Reinervación de la piel y regeneración no se ven afectadas al bloquear CD200R1 localmente luego de la lesión de nervio ciático	119
Evaluación <i>in vivo</i> de la proteína CD200-His en la recuperación funcional luego de una lesión de nervio ciático.....	121
Recuperación funcional luego de una lesión de nervio ciático en ratones knock-out para CD200R1 ...	122
Resumen de los principales resultados del Capítulo 1/Objetivo específico 1	124
<i>Capítulo 2 / Objetivo específico 2: Papel de CD200R1 en la respuesta frente una lesión de médula espinal por contusión</i>	125
Puesta a punto del modelo de lesión de médula espinal por contusión	126
Respuesta inflamatoria local luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1.....	128
Efecto de la ausencia de CD200R1 en la dinámica temporal de las principales poblaciones celulares de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal	128
Impacto de la ausencia de CD200R1 en la fagocitosis de mielina	131
Recuperación de funciones locomotoras luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1	134
Análisis de parámetros sanguíneos luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1	136
Alteraciones en el bazo frente a una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1	138
Cambios en el peso del bazo luego de una lesión de médula espinal	138
Análisis de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en el bazo en ausencia de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal.....	140
Análisis de la inervación de fibras noradrenérgicas en el bazo en ausencia de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal.....	142
Resumen de principales resultados obtenidos con el modelo de lesión de médula espinal por contusión	144
<i>Capítulo 3 / Objetivo específico 3: CD200-CD200R1 en un contexto de inflamación sistémica por administración de LPS.....</i>	145
Efecto de la ausencia de CD200R1 sobre la neuroinflamación en el SNC luego de la administración de LPS.....	145
Análisis transcripcional del cerebro en ausencia de CD200R1 frente al estímulo de LPS	147
Alteración del bazo en ausencia de CD200R1 en un contexto de inflamación sistémica.....	150
Número de leucocitos en sangre en ausencia de CD200R1 en un contexto de inflamación sistémica .	153
Resumen de resultados obtenidos con el modelo de inflamación sistémica	155
<i>Capítulo 4: Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la activación de CD200R1</i>	156
Objetivo específico 4: Evaluación de la ventana temporal terapéutica para la activación de CD200R1 en el tejido de médula espinal lesionado	156

Objetivo específico 5: Desarrollo de nuevas proteínas recombinantes agonistas de CD200R1.....	159
Efecto in vitro de la proteína CD200-X sobre la activación de la vía de NF-κB en la línea celular BV-2.....	159
Efecto in vitro de la proteína CD200-X sobre macrófagos derivados de la médula ósea.....	162
Resumen de principales resultados del análisis de estrategias terapéuticas basadas en la activación de CD200R1	166
DISCUSIÓN	167
<i>Lesión al SNP: rol de CD200-CD200R1 luego de una lesión de nervio ciático</i>	168
Caracterización de la expresión de CD200 y CD200R1 en el nervio ciático sin lesionar y luego de una lesión traumática por aplastamiento	168
Modulación de la interacción CD200-CD200R1 <i>in vivo</i> en el nervio ciático luego de una lesión.....	173
Impacto de la ausencia de CD200R1 en la recuperación luego de una lesión de nervio ciático.....	176
<i>Lesión al SNC: rol de CD200-CD200R1 luego de una lesión de médula espinal</i>	178
Caracterización de la respuesta inflamatoria y fagocitosis luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1	178
El rol de CD200R1 en la recuperación funcional y neuroprotección luego de una lesión de médula espinal.....	183
Impacto a nivel sistémico de la ausencia de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal.....	186
<i>Inflamación sistémica: rol de CD200-CD200R1 en la neuroinflamación luego de la administración de LPS</i>	189
Alteraciones comportamentales y microgliales en ausencia de CD200R1.....	189
Análisis transcripcional del cerebro de ratones <i>CD200R1-KO</i> y <i>wt</i>	190
La respuesta del bazo y de las células de la sangre frente a LPS se ve alterada en ausencia de CD200R1	192
<i>Desarrollo de estrategias terapéuticas para la modulación de la neuroinflamación basadas en la activación de CD200R1</i>	195
Análisis de la ventana temporal terapéutica utilizando CD200-His luego de una lesión de médula espinal	195
Desarrollo de nuevas proteínas recombinantes agonistas de CD200R1	197
CONCLUSIONES GENERALES.....	202
ABREVIACIONES	205
BIBLIOGRAFÍA	206

INTRODUCCIÓN

Neuroinflamación

Inflamación en el sistema nervioso

La inflamación es una respuesta adaptativa desencadenada por la presencia de estímulos dañinos, como pueden ser las infecciones y daño en los tejidos¹. Cualquiera sea la causa de la respuesta inflamatoria, su "propósito" es eliminar o secuestrar la fuente de la alteración, permitir que el organismo se adapte a las condiciones anormales y, en última instancia, restaurar la funcionalidad y la homeostasis del tejido. Una respuesta inflamatoria generalmente es considerada beneficiosa cuando es controlada, como en el caso de una infección que es atacada, pero también puede ser dañina si esta respuesta es desmesurada y lleva a condiciones extremas como el shock séptico causando una falla a nivel sistémico². La inflamación puede ocurrir de dos formas: aguda, que dura de segundos a horas y generalmente es beneficiosa, y crónica, que consiste en una respuesta sostenida en el tiempo que puede generar un importante daño tisular³.

Al igual que en el resto del cuerpo, la inflamación en el sistema nervioso, o neuroinflamación, tiene aspectos positivos y negativos dependiendo de la intensidad y duración del proceso inflamatorio, esquematizados en la Figura 1. Un claro ejemplo beneficioso de la interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso es durante el desarrollo normal del sistema nervioso, en el cual la poda de sinapsis por las células del sistema inmune permite el remodelamiento del tejido nervioso, así como también la memoria y aprendizaje. Como se verá más adelante, el sistema nervioso central (SNC) es capaz de detectar la actividad del sistema inmune a nivel periférico, es decir por fuera del SNC. Esta activación del sistema inmune se transmite al SNC a través de varias vías neurales y humorales, propagando la señal inflamatoria hacia áreas clave del SNC, donde es interpretado por las células presentes en el tejido nervioso⁴⁻⁷. De esta manera se establece una comunicación funcional entre el sistema inmune y el sistema nervioso, fundamental para inducir un comportamiento de enfermedad característico. Estos cambios de comportamiento son necesarios para reasignar los recursos del huésped y combatir la infección^{8,9}. Si esta respuesta es impedida, se observa un aumento en la morbilidad y

mortalidad¹⁰. Por lo tanto, esta respuesta es beneficiosa para el organismo cuando se controla y resuelve adecuadamente.

Por otro lado, la neuroinflamación “patológica” es altamente destructiva y se asocia con la activación de la glía del SNC con una producción significativa de citoquinas y quimioquinas, infiltración de células inmunitarias periféricas, edema, aumento de la permeabilidad y ruptura de la barrera hematoencefálica^{11,12}. Quizás la neuroinflamación patológica más evidente es luego de un daño al sistema nervioso, ya sea por una lesión, una infección o un evento isquémico. Los tejidos fuera del SNC tienen una alta capacidad de regeneración que les permite volver a la homeostasis luego de una alteración del tejido. Por lo tanto, los procesos inflamatorios agudos intensos no representan un peligro a la integridad del tejido, sino que por lo general son beneficiosos para eliminar la fuente de alteración rápidamente y permitir la restauración de la homeostasis. Por el contrario, dado que el sistema nervioso tiene una capacidad muy limitada de regeneración luego de un daño, un proceso inflamatorio exacerbado que propague el área de daño puede ser detrimental. En el SNC, una vez que el tejido es dañado, su regeneración es muy restringida y por lo tanto resulta imposible recuperar la organización tisular original y la homeostasis¹³. Las fases agudas y crónicas de esta respuesta tienen un impacto notable en la fisiología del tejido, incluida la falla en la funcionalidad causada por la pérdida de mielina y la fragmentación axonal.

La neuroinflamación se ha asociado también negativamente con numerosas patologías neurodegenerativas, como en la enfermedad de Alzheimer^{14,15} y de Parkinson¹⁶, esclerosis múltiple^{17,18} y esclerosis lateral amiotrófica¹⁹, entre otras. A su vez, se ha planteado que el proceso de envejecimiento normal suele ir acompañado de una neuroinflamación basal, en bajos niveles, pero de manera crónica con un aumento progresivo con la edad^{20,21}. Esta neuroinflamación asociada al envejecimiento genera una alteración en la comunicación normal entre el sistema inmune y el tejido nervioso. Esto promueve una amplificación y prolongación de eventos agudos inflamatorios, generando respuestas exacerbadas frente a estímulos leves, lo que lleva al desarrollo de déficits cognitivos y conductuales que no se detectan en adultos sanos²². Además de la asociación con enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento, se ha asociado la neuroinflamación con diversas patologías psiquiátricas como la depresión^{23,24} y desórdenes del espectro autista^{25,26}. Como fue planteado previamente, si bien la neuroinflamación derivada de la comunicación entre el sistema inmune y el SNC es beneficiosa, ciertas circunstancias pueden alterar este equilibrio. Un claro ejemplo de esto es la respuesta a

estresores crónicos o traumáticos, que promueven un perfil neuroinflamatorio exacerbado. Esto es relevante porque la evidencia clínica sugiere que las personas expuestas a estrés crónico muestran una desregulación cognitiva y emocional persistente que contribuye al deterioro de la salud mental y de la calidad de vida^{27,28}.

Estas asociaciones representan ejemplos de los procesos neuroinflamatorios crónicos que contribuyen al daño tisular, progresivos y cada vez más destructivos a medida que aumenta la edad.

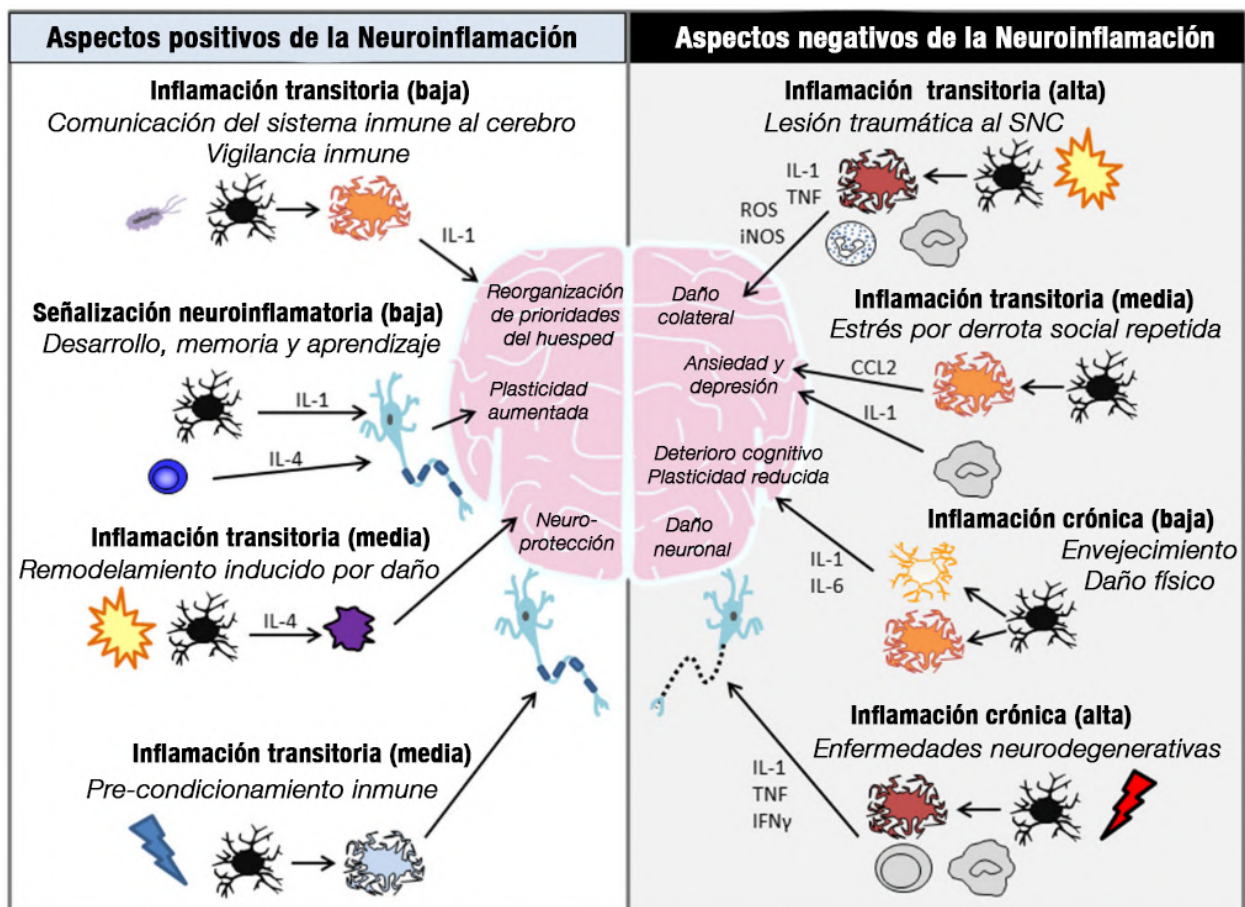


Figura 1. Aspectos positivos y negativos de la neuroinflamación. La intensidad y duración de la inflamación son los principales factores determinantes de los aspectos beneficiosos y/o destructivos para el sistema nervioso central. Del lado izquierdo se muestran ejemplos de respuestas inflamatorias breves y controladas, que generalmente se consideran beneficiosas para el organismo. Por ejemplo, las señales inmunológicas al cerebro después de una infección conducen a la posterior reorganización de las prioridades del huésped y a la inducción de comportamientos de enfermedad. Además, existe un papel importante de las citoquinas IL-1 e IL-4 en el aprendizaje y la memoria. El precondicionamiento proporciona un método para entrenar al sistema inmunológico innato hacia un fenotipo más neuroprotector. Por el contrario, en el lado derecho se muestran diversas respuestas inflamatorias perjudiciales y dañinas para

el tejido nervioso. La inflamación crónica e incontrolada se caracteriza por un aumento en la producción de citoquinas (IL-1 y TNF), especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mediadores inflamatorios. Estos componentes inflamatorios son evidentes después de un trauma en el sistema nervioso central y van acompañados de un reclutamiento de macrófagos y neutrófilos periféricos hacia el lugar de la lesión. La inflamación transitoria después del estrés repetido de derrota social también conduce al reclutamiento de monocitos y macrófagos y causa ansiedad y depresión. Además, una respuesta inflamatoria crónica durante el envejecimiento conduce a una plasticidad neuronal reducida y a trastornos cognitivos. Un mayor grado de inflamación crónica es altamente perjudicial para el sistema nervioso y es característico de enfermedades neurodegenerativas. Imagen adaptada de Di Sabato et al., 2016²².

En su conjunto, estas observaciones revelan la compleja naturaleza de los procesos inflamatorios y como los resultados positivos o negativos sobre los organismos son altamente dependientes del contexto, la intensidad y la duración. Se ha destinado un gran esfuerzo a comprender en detalle cuáles son los mecanismos que determinan los efectos de la neuroinflamación en los diferentes contextos. A pesar de que se han identificado numerosos actores como fundamentales en los procesos de neuroinflamación, destaca un tipo celular presente en el SNC como un factor común en todas las situaciones de neuroinflamación: la microglía.

Microglía

La microglía corresponde a una población del sistema inmune innato residente en el SNC, comúnmente asociada con el paralelismo de los “macrófagos del SNC” debido a sus funciones similares, a pesar de tener orígenes embrionarios diferentes. En general, la microglía constituye el 10% de la población del sistema nervioso central. La microglía se desarrolla temprano en la embriogénesis a partir de células precursoras mieloides en el saco vitelino y migra hacia el sistema nervioso central²⁹. La microglía son células de larga vida que tienen una renovación limitada, manteniendo su población en el tejido nervioso por autorrenovación, con poca contribución de células sanguíneas³⁰. Esta baja tasa de renovación las hace susceptibles a los potenciales efectos proinflamatorios de la edad, la lesión o el estrés.

La razón por la cual se ha planteado a la microglía como un actor fundamental en la base de todos los procesos neuroinflamatorios es debido a que en condiciones normales de homeostasis, donde la integridad de la barrera hematoencefálica no se ve comprometida, la microglía es el único tipo celular del sistema inmune presente en el parénquima del SNC. Así, la microglía desempeña un papel central en la iniciación y coordinación de los principales procesos

inflamatorios que ocurren en el tejido nervioso, siendo, por ende, uno de los actores clave en las consecuencias de la neuroinflamación. En muchos contextos de neuroinflamación, como en las lesiones del SNC, donde se ve comprometida la integridad de la barrera hematoencefálica, diversas células del sistema inmune invaden el tejido nervioso, como se describirá con mayor detalle posteriormente. Aunque en estas condiciones, la microglía no es la única responsable de las consecuencias de la inflamación en el tejido nervioso, sigue siendo de gran relevancia. Esto se debe a que la microglía, al ser el tipo celular inmunitario presente en el tejido en el momento de la lesión, desempeña un papel crucial en reclutar a otras células del sistema inmune.

Históricamente, se consideró que la microglía en homeostasis se encontraba en un estado de “reposo”, sin tener una función específica a la espera de un estímulo inflamatorio que convierta a la microglía a un estado “activado”, el cual se asociaba a funciones en respuesta a este estímulo³¹. Sin embargo, durante la década del 2000, varios estudios utilizando microscopía de dos fotones *in vivo*, evidenciaron que la microglía en ausencia de un estímulo inflamatorio en condiciones fisiológicas presenta una gran movilidad^{32,33} y una variedad de funciones que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis y el correcto funcionamiento del tejido nervioso. Esta población celular se encuentra constantemente inspeccionando el microambiente a su alrededor, recibiendo una variedad de señales que son integradas para detectar cambios en el pH, ATP, citoquinas y quimioquinas, aminoácidos y compuestos inorgánicos³⁴. Dentro de las principales funciones de la microglía en condiciones normales se encuentra la remoción de detritos celulares y cuerpos apoptóticos sin generar una respuesta pro-inflamatoria³⁵, la eliminación y maduración de sinapsis durante el desarrollo y en adultos, promoviendo así el refinamiento de los circuitos³⁶ y participando en los procesos de aprendizaje y memoria³⁷. Esto ha llevado a considerar el desuso del término “reposo” para referirse al estado de la microglía en condiciones fisiológicas normales, por lo que se ha sugerido el uso del término “homeostático” para referirse al fenotipo de la microglía en condiciones normales.

Frente a un estímulo inflamatorio, como pueden ser los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o a daño tisular (DAMPs), la microglía experimenta una transformación de un estado homeostático a una variedad de fenotipos que se caracterizan por un aumento en la fagocitosis y un aumento en la expresión de receptores, citoquinas, quimiocinas y otras moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria necesarias para monitorear y comunicar el estado de alerta a otras células. En casos de neuroinflamación crónica, estas células pueden permanecer activas durante períodos prolongados, liberando cantidades significativas de

citoquinas y moléculas neurotóxicas que contribuyen a la neurodegeneración a largo plazo. Esta activación de la microglía en presencia de procesos neuroinflamatorios, promueve cambios en su forma, experimentando una transición morfológica y funcional desde un estado ramificado a uno redondeado, por medio de la retracción de sus procesos celulares. Estas células se vuelven hipertróficas y ameboides, aumentando su capacidad fagocítica^{38,39}. Inclusive, luego de un estímulo inflamatorio resulta difícil distinguir entre la microglía activada y los macrófagos infiltrantes en el tejido debido a que presentan la misma morfología en estas condiciones y ambos expresan los marcadores comúnmente utilizados, como Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule-1) y CD11b⁴⁰. En condiciones normales, en ausencia de daño, el marcador Iba-1 se emplea rutinariamente para identificar células microgliales en el SNC, ya que estas células son las únicas que expresan esta proteína en la superficie en condiciones de homeostasis y pueden diferenciarse de los macrófagos perivasculares debido a su morfología ramificada⁴¹. Los macrófagos infiltrantes también expresan Iba-1 en su superficie, pero normalmente no se encuentran en el tejido nervioso parenquimatoso en ausencia de neuroinflamación. Debido a que ambos tipos celulares expresan Iba-1 y no se pueden distinguir, se les suele denominar conjuntamente como macrófagos/microglía⁴⁰.

Heterogeneidad de microglía/macrófagos

Como fue mencionado previamente, la microglía y los macrófagos presentan numerosas similitudes, tanto funcionales como morfológicas, lo que históricamente ha llevado a trasladar muchos conceptos y clasificaciones utilizadas para macrófagos a la microglía. Los macrófagos son células heterogéneas con una gran plasticidad funcional (Figura 2). Se ha planteado que los macrófagos pueden clasificarse funcionalmente en dos grandes categorías: los macrófagos M1 o M2^{42,43}. Los macrófagos M1 de activación clásica, son macrófagos efectores estimulados por el interferón y el factor de necrosis tumoral, producen una respuesta inmunitaria agresiva, produciendo citoquinas pro-inflamatorias, especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico, contribuyendo así a la inflamación y daño tisular. En contraste, los macrófagos M2 o de activación alternativa, producen factores anti-inflamatorios y tienen una capacidad reducida para generar moléculas pro-inflamatorias, contribuyendo así a la cicatrización de heridas y remodelación tisular. Los macrófagos tienen la capacidad de cambiar de un fenotipo a otro, inducido por factores presentes en el microambiente inflamatorio después de una lesión o infección⁴⁴.

Esta clasificación binaria de los macrófagos en M1 o M2 ha sido extensamente discutida en la última década, ya que se ha planteado que la plasticidad fenotípica de los macrófagos constituye un espectro de estadios funcionales⁴⁵. Por lo tanto, se ha sugerido que se deben ampliar para incluir subgrupos dentro de la clasificación binaria en M1 o M2. La definición de polarización de los macrófagos en M1 y M2 deriva de la era pre-genómica, cuando pocos marcadores estaban disponibles para establecer diferencias y similitudes en las respuestas de los macrófagos frente a diferentes estímulos. Actualmente, debido a la extensa información proveniente de análisis genómicos, transcriptómicos y proteómicos, se evidencia un panorama mucho más complejo del planteado originalmente. A pesar de que es importante tener presente que la polarización de los macrófagos es un espectro más que una categorización rígida, la clasificación en M1/M2 permite generar un marco conceptual para comprender la heterogeneidad de los macrófagos y sus funciones, por lo que se continúa utilizando actualmente.

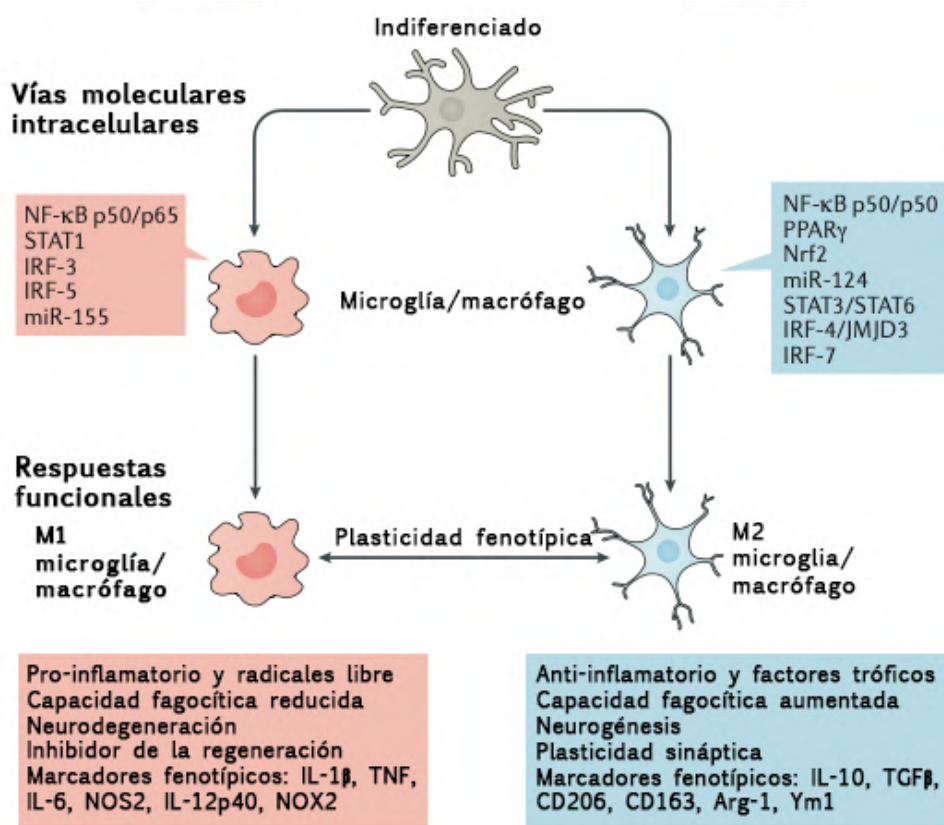


Figura 2. Visión clásica de los estados de “activación” de la microglía y macrófagos frente a un estímulo inflamatorio. El fenotipo M1 se caracteriza por la expresión de proteínas como IL-1β, TNF, IL-6, NOS2, IL-12p40 y NOX2. Las vías moleculares que regulan el fenotipo M1 incluyen el factor de transcripción y activador de la señalización 1 (STAT1), el factor regulador de interferón (IRF)-3/5, el factor nuclear-κB (NF-κB), p50/p65 y la microARN (miR)-155. Las células del tipo M1 liberan factores pro-

inflamatorios y radicales libres que promueven la neuroinflamación, el estrés oxidativo y la neurodegeneración. En respuesta a señales anti-inflamatorias y neurotróficas, la microglía y los macrófagos pueden polarizarse hacia un fenotipo M2, caracterizado por la expresión de proteínas como CD206, CD163, arginasa-1, FCγR, Ym1, IL-10 y TGFβ. Las vías moleculares que regulan las transiciones fenotípicas del tipo M2 incluyen STAT6/3, IRF-4/7, NF-κB p50/p50, Nrf2 y miR-124. La microglía y los macrófagos del tipo M2 liberan factores anti-inflamatorios y tróficos que participan en la resolución de la inflamación. Tienen una mayor actividad fagocítica y promueven la reparación mediante la modulación de la neurogénesis, la regeneración axonal, la plasticidad sináptica y la angiogénesis. La microglía y los macrófagos presentan una marcada plasticidad y pueden cambiar entre ambos fenotipos. Imagen adaptada de Simon et al., 2017⁴⁶.

De manera similar, la microglía “activada” ha sido clasificada análogamente en un fenotipo parecido al M1 de los macrófagos o de “activación clásica”, considerado pro-inflamatorio y neurotóxico, o en el fenotipo parecido al M2 o de “activación alternativa”, considerado anti-inflamatorio y neuroprotector (Figura 2). En la última década, con la llegada de tecnologías como la secuenciación de célula única, varios estudios evidenciaron que las respuestas de la microglía son más complejas que simplemente "M1" y "M2", y que muchas veces no se polarizan hacia ninguna de estas categorías, ya que a menudo expresan marcadores tanto de M1 como de M2^{45,47}. Esto ha llevado a reconsiderar la clasificación dual de los estados de la microglía, teniendo en cuenta diferentes enfoques metodológicos a la hora de determinar los fenotipos microgliales (Figura 3). Considerando que la microglía posee un complejo "detectoma" (o “*sensome*” en inglés) que consiste en una amplia gama de receptores en su superficie que les permiten detectar cambios en su entorno, se ha planteado que los estados o fenotipos microgliales son dinámicos y son el resultado de la integración de todas las señales que recibe la microglía en determinado momento. Por lo tanto, se han planteado numerosos fenotipos o estados microgliales que son fuertemente dependientes del contexto en el cual se encuentran, a la vez que no son estáticos, sino que pueden ir cambiando de un estado a otro⁴⁸. Dentro de los estados más relevantes que han sido estudiados se encuentra el fenotipo de microglía asociado a enfermedades (DAM), la cual fue propuesta originalmente en la enfermedad de Alzheimer⁴⁹. Otros estados microgliales relevantes que se han planteado es el fenotipo microglial neurodegenerativo (MGnD⁵⁰), la microglía de acumulación de gotas lipídicas (LDAM⁵¹), microglía asociada a gliomas (GAM⁵²), microglía asociada a la sustancia blanca (WAM⁵³), microglía asociada a tractos axonales (ATM⁵⁴) y microglía asociada a regiones proliferativas (PAM⁵⁵), entre otras. Estos estudios, colocan en evidencia la riqueza de fenotipos microgliales presentes en diferentes contextos, alejando cada vez más la visión clásica de M1-M2, hacia una visión más

integradora que permita explicar en mayor detalle la plasticidad fenotípica de esta población celular.

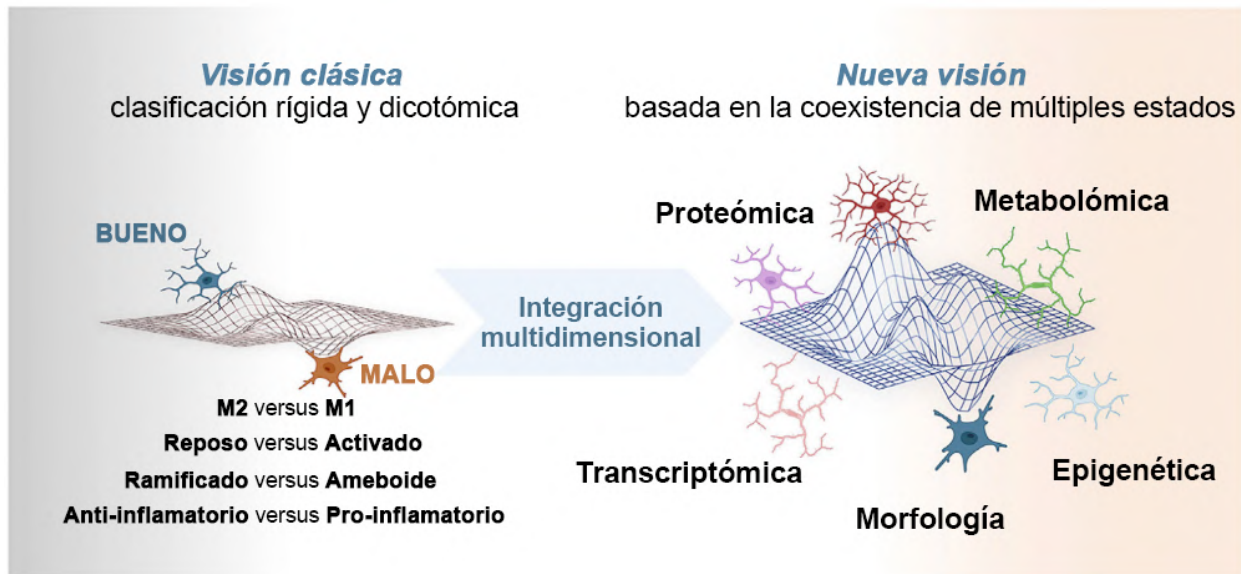


Figura 3. Visión actualizada sobre la clasificación de los fenotipos microgliales. Históricamente, la microglía ha sido tradicionalmente enmarcada en una categorización rígida dicotómica en “M1” o “M2”, que no se ajusta a la realidad de lo observado con las tecnologías más recientes. La visión actual sugiere la integración datos epigenéticos, transcriptómicos, metabólicos y proteómicos para explicar con mayor detalle la gama de fenotipos microgliales observados en diferentes contextos. Imagen adaptada de Paolicelli et al., 2022 ⁴⁸.

Esta plasticidad fenotípica de la microglía/macrófagos en diferentes contextos inflamatorios presenta una oportunidad para el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan regular las respuestas inflamatorias a partir de la modulación del fenotipo de los principales actores relevantes en el desarrollo de la respuesta. Cada vez más se están destinando esfuerzos a desarrollar estrategias que se basen en la modulación de la respuesta inflamatoria en lugar de promover la atenuación del sistema inmune en general. Este concepto se hizo más evidente con los ensayos clínicos de la metilprednisolona, un glucocorticoide con una potente capacidad de inmunosupresión, la cual constituyó el primer tratamiento aprobado para el uso en humanos luego de una lesión de médula espinal. Este tratamiento demostró ser efectivo en modelos preclínicos en animales, ya que se observaron mejoras en la recuperación funcional luego de este tratamiento^{56,57}. Cuando fue evaluado en humanos, la inmunosupresión con metilprednisolona falló en demostrar una mejora significativa en la recuperación de funciones luego de la lesión⁵⁸. Inclusive, demostró ser contraproducente en muchos casos, ya que la

inmunosupresión llevó a un aumento del riesgo de infecciones en personas traumatizadas, generando importantes complicaciones. A pesar de que se han planteado usos alternativos con posible efecto beneficioso sin generar complicaciones en humanos⁵⁹, el uso de este tratamiento evidenció un concepto muy importante a la hora de considerar el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas que tengan como base la modulación de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal.

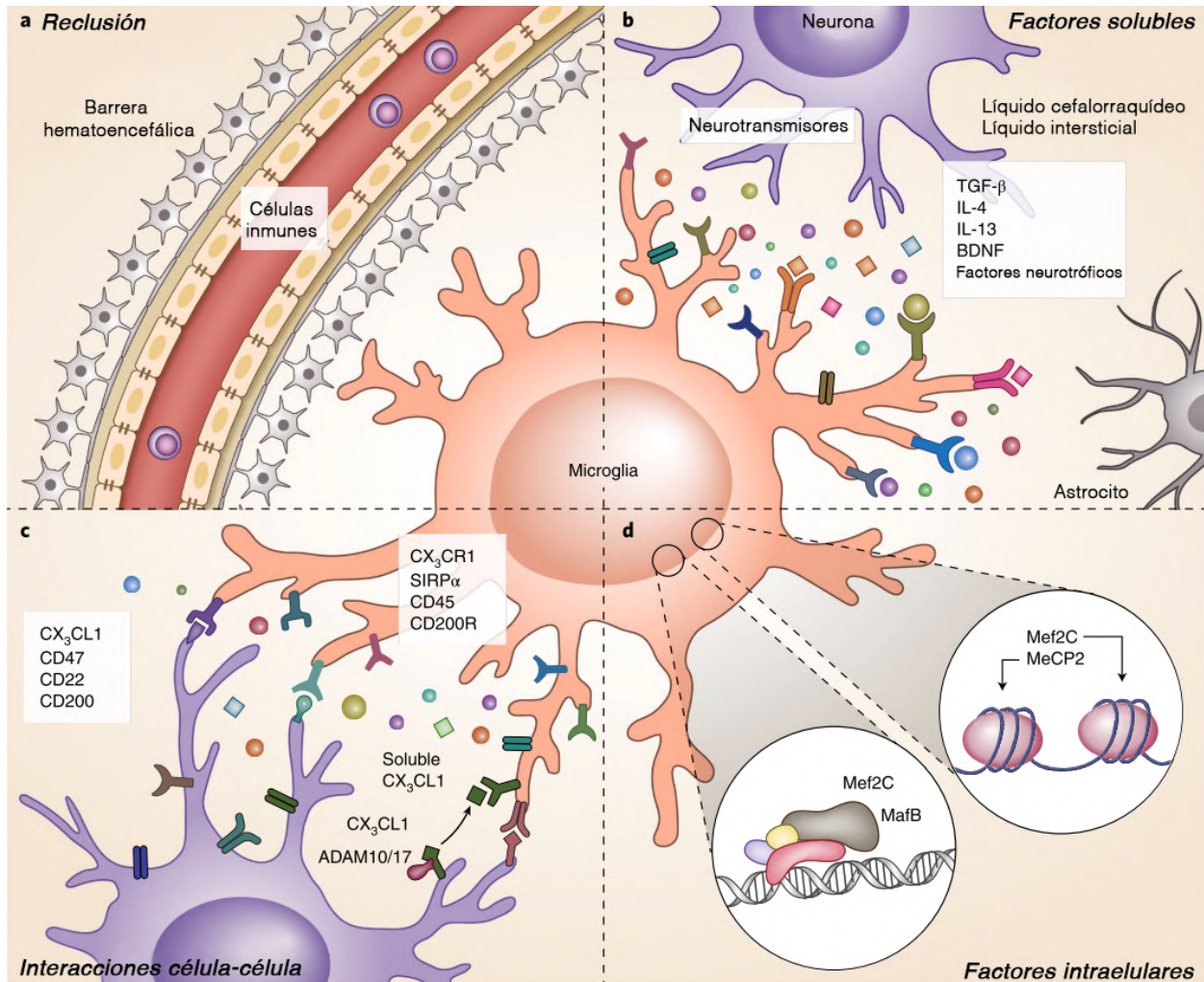


Figura 4. Mecanismos de control microglial. Cuatro tipos principales de mecanismos de control modulan el fenotipo microglial y regulan la actividad de la microglía en condiciones fisiológicas. **(A)** barreras físicas que separan el sistema nervioso central de las células inmunes circunscritas y sus señales, entre las que se incluyen la barrera hematoencefálica, el plexo coroideo y las meninges. **(B)** factores solubles regulan la capacidad de respuesta de la microglía. Estos comprenden neurotransmisores y citoquinas presentes en el tejido nervioso en estado estacionario o secretados luego de una alteración a la homeostasis. **(C)** las interacciones célula-célula, entre las que se encuentran CX₃CL1-CX₃CR1, CD47-SIRP α , CD22-CD45 y CD200-CD200R, promueven una variedad de señales intracelulares que permiten la regulación de la diversidad de fenotipos microgliales. **(D)** los factores de transcripción específicos de la microglía y los

reguladores de la cromatina promueven la expresión de factores que modulan la respuesta inmune y restringen las respuestas a estímulos inmunológicos. Mientras que algunos mecanismos de control están activos de manera continua y ubicua en todo el CNS, otros son específicos de áreas (diversidad regional) o se inducen sólo cuando se desvía el estado de homeostasis. Imagen adaptada de Deczkowska et al., 2018⁶⁰.

A su vez, la visión de los fenotipos de los principales actores celulares de la respuesta inflamatoria como un espectro de variaciones, se encuentra en la base de lo planteado previamente sobre la naturaleza dual de la neuroinflamación, donde se observan tanto aspectos beneficiosos como perjudiciales que dependen fuertemente del contexto. Esto plantea la necesidad de una modulación terapéutica cuidadosamente equilibrada, con un enfoque de precisión que promueva la disminución de los efectos dañinos de la respuesta neuroinflamatoria. Es por este concepto, así como también por lo planteado previamente, que cada vez más se están destinando esfuerzos en comprender los mecanismos que subyacen a los procesos inflamatorios en el sistema nervioso en los diferentes contextos, con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas que busquen la modulación de la respuesta inflamatoria de manera más precisa.

La modulación de la respuesta inflamatoria puede ocurrir en diferentes niveles, modificando los numerosos factores que determinan el fenotipo de las células inmunes y que por lo tanto determinan el tipo y magnitud de la respuesta inflamatoria. Los principales factores determinantes del fenotipo celular son la compartimentalización de los tejidos inmunológicamente separados, factores solubles, factores intracelulares intrínsecos e interacciones célula-célula (Figura 4)⁶⁰. Potencialmente, cualquiera de estos factores representa una oportunidad terapéutica, ya que la modificación de éstos va a determinar variaciones en el fenotipo celular y por lo tanto en la respuesta inflamatoria. En el contexto de la modulación de las interacciones célula-célula, en los últimos años se ha destacado a los inmunorreceptores como posibles dianas para el control y la modulación de la respuesta inflamatoria.

Inmunorreceptores como moduladores de la neuroinflamación

Los inmunorreceptores son moléculas que pueden hallarse en la superficie o el interior de las células del sistema inmune, así como también en forma soluble. Son componentes clave en la detección y eliminación de patógenos, así como en la respuesta frente al daño tisular. Estos receptores especializados permiten al sistema inmunológico reconocer y responder de manera específica a los peligros que amenazan la integridad del organismo. En el contexto de la neuroinflamación, son numerosos los inmunorreceptores que han sido implicados como reguladores del fenotipo microglial (Figura 5). Entre ellos se encuentran CX3CR1^{61,62}, CD45⁶³, SIRP α ⁶⁴, CD200R⁶⁵, TREM-2^{50,66} y las familias de Siglec⁶⁷ y CD300^{68,69}. La activación de SIRP α (también llamado CD172a) se ha relacionado con la inhibición de las actividades celulares, incluyendo la disminución de la producción de citoquinas^{70,71}, reducción de la adhesión de monocitos a la matriz extracelular⁷², reducción de la fagocitosis^{71,73-75} y detención de la maduración de las células dendríticas⁷¹. La interacción entre el receptor SIRP- α y su ligando CD47 ha adquirido relevancia en el contexto de la neuroinflamación en las últimas décadas, principalmente debido a su rol en la regulación de la fagocitosis. Este receptor es expresado por una variedad de células mieloides, entre ellas la microglía y macrófagos⁷⁶. La interacción de SIRP- α con CD47, desencadena señales inhibitorias que evitan la fagocitosis no deseada de células sanas^{74,75}. En el contexto de la neuroinflamación, se ha observado un aumento en la expresión de CD47 en las células del sistema nervioso central afectadas por lesiones o enfermedades. Este incremento tiene un impacto significativo en la interacción entre las células inmunológicas y las neuronales, ya que el aumento de CD47 puede inhibir la eliminación adecuada de células dañadas, lo cual conduce a la persistencia de la inflamación y la acumulación de desechos celulares en el cerebro.

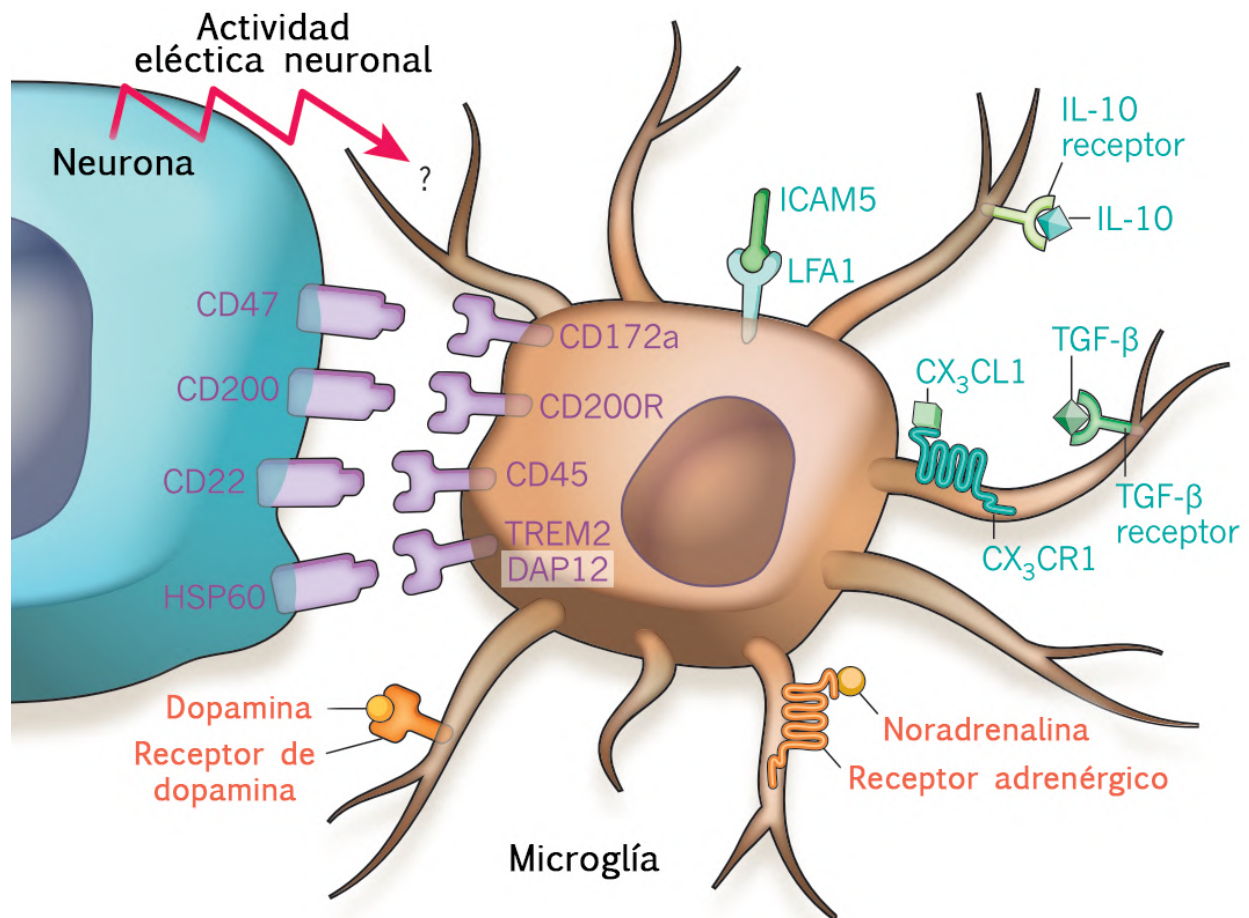


Figura 5. Influencias inhibitorias neuronales sobre la microglía. Las neuronas inhiben a la microglía de varias maneras: las influencias inhibitorias dependientes de la interacción célula-célula se muestran en violeta; las citoquinas solubles o las moléculas de adhesión y sus receptores se muestran en celeste, y los inhibidores solubles asociados a la neurotransmisión y sus receptores se muestran en naranja. Imagen adaptada de Ransohoff & Cardona 2010⁷⁷.

Otro inmunorreceptor que ha despertado un gran interés es TREM2 debido a su vinculación con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer⁷⁸ o de Parkinson⁷⁹. Se ha asociado la activación de TREM2 con la promoción de la fagocitosis^{50,80,81}, la producción de factores anti-inflamatorios y la regulación del metabolismo lipídico en las células microgliales⁸⁰. Similarmente, otra familia de receptores que ha adquirido relevancia es la familia de CD300, y en particular en nuestro grupo de investigación se han desarrollado numerosos estudios vinculando al receptor CD300f con diferentes patologías en contextos neuroinflamatorios como ser luego de un trauma encefálico⁶⁹, luego de una lesión de nervio ciático⁸², la depresión y ansiedad^{68,83}, enfermedad de Alzheimer⁸⁴ y con el envejecimiento del sistema nervioso. El receptor CD300f es expresado por células del sistema inmune, entre ellas la microglía y macrófagos, y se ha

demostrado que la activación de este receptor inhibe la producción de mediadores pro-inflamatorios^{85,86}. La importancia de CD300f, así como de los otros inmunorreceptores detallados previamente radica en su potencial como blanco terapéutico debido a sus roles en la regulación de las respuestas inmunes.

El inmunoreceptor CD200R1 y su ligando CD200

Familia del receptor CD200R

La familia de receptores CD200R comprende un grupo de glicoproteínas que desempeñan un papel crucial en la regulación de las respuestas inmunitarias y en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica⁸⁷. Los miembros de la familia CD200R se expresan predominantemente en células mieloides, como macrófagos⁸⁸⁻⁹¹, microglía⁹¹⁻⁹⁵, células dendríticas⁹⁶ y granulocitos^{89,93}, así como también en subconjuntos de linfocitos, incluyendo células asesinas naturales (NK) y linfocitos B y T⁹⁶⁻⁹⁸. A su vez, se ha reportado la expresión de estos receptores en algunos subtipos de astrocitos y oligodendrocitos en el SNC^{94,99,100}. Sus patrones de expresión pueden variar según el tipo celular y el estado de diferenciación. En humanos, esta familia está compuesta por dos isoformas de membrana celular y dos isoformas solubles⁸⁷, mientras que en ratones, la familia de CD200R está compuesta por cinco isoformas de membrana^{97,101}. De las isoformas estudiadas, CD200R1 es la más caracterizada, ya que se ha demostrado que en ratones, es la que presenta mayor afinidad con el ligando CD200¹⁰², que se describirá más adelante. Tras la activación de CD200R1, se desencadena una cascada de señalización que culmina en la inhibición de la producción de factores pro-inflamatorios, y por lo tanto se considera que el receptor CD200R1 tiene acción anti-inflamatoria. Además de CD200R1, la familia de receptores CD200R en ratones incluye el CD200R2, CD200R3, CD200R4 y CD200R5, los cuales comparten similitudes estructurales con CD200R1^{101,103}. Mientras se ha planteado que podrían interactuar con CD200 con una avidéz significativamente menor a la interacción CD200-CD200R1¹⁰², aún no se han caracterizado por completo los ligandos de CD200R2, CD200R3, CD200R4 y CD200R5 (Figura 6)¹⁰⁴. Interesantemente, se ha sugerido que estos otros miembros de la familia de CD200R, a diferencia de CD200R1, tienen actividad pro-inflamatoria de acuerdo a la estructura del dominio citoplasmático de estos receptores. De hecho, el análisis de las vías de señalización activadas por la unión de CD200, respalda la hipótesis de que la interacción de CD200 con los receptores CD200R2, CD200R3, CD200R4 y CD200R5 promueve la fosforilación de las moléculas adaptadoras DAP-10/DAP12 como parte de una cascada de señalización alternativa^{97,105}, la cual constituye una vía de señalización pro-

inflamatoria. La variante CD200R4, a pesar de que aún no se ha demostrado que tenga propiedades funcionales *in vivo*, presenta una alta homología con CD200R1¹⁰². Finalmente, el CD200R5 ha sido poco estudiado, pero se ha sugerido que puede representar un pseudogen que no es expresado en ratones¹⁰².

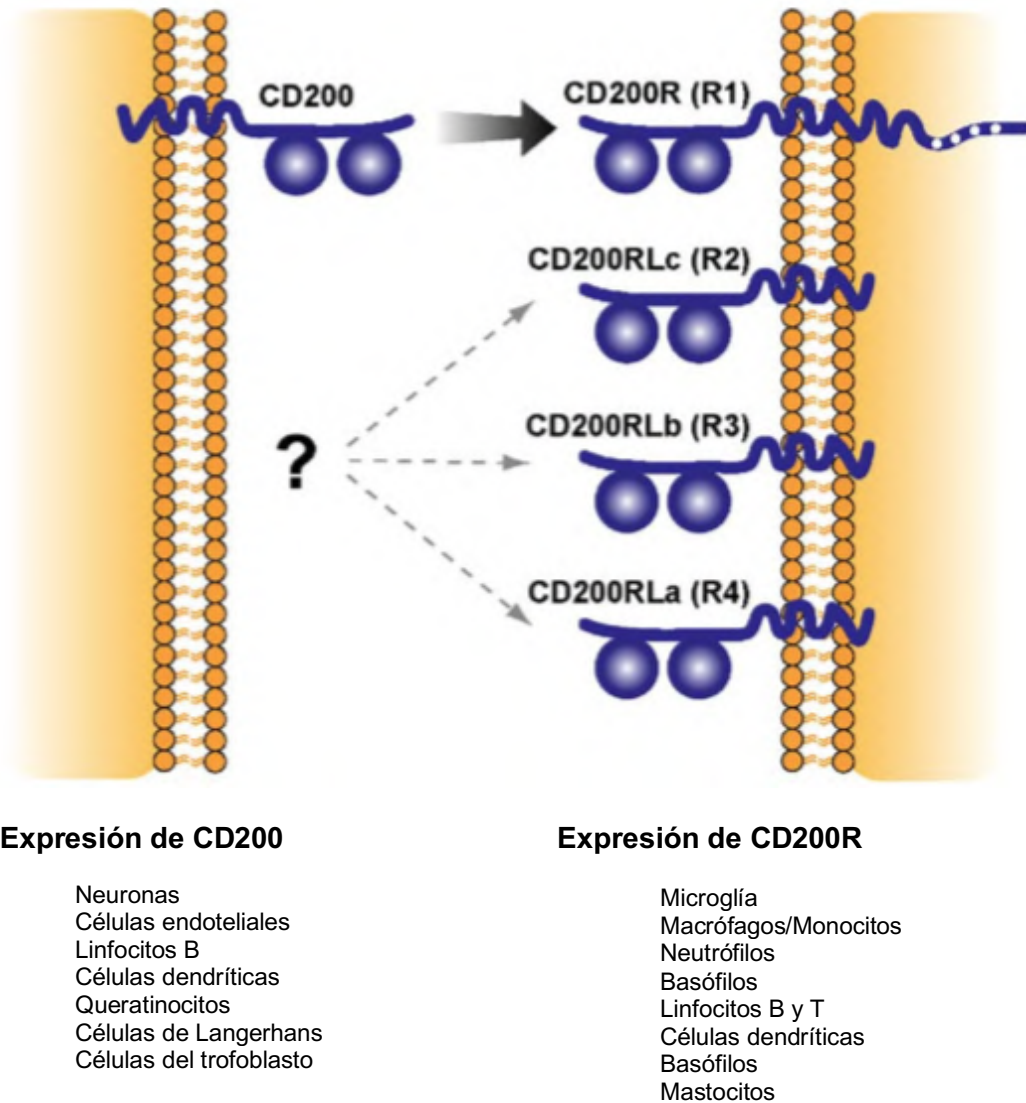


Figura 6. Tipos celulares que expresan CD200 y la familia de CD200R. La familia de receptores CD200R murinos consta de CD200R (R1) y tres glucoproteínas transmembrana relacionadas estructuralmente, CD200RLa-c (R4, R3 y R2, respectivamente). CD200 se une específicamente a CD200R1 con mayor avidez que a los otros miembros de la familia. No se han reconocido otros ligandos específicos para los homólogos de CD200R (CD200R2-4). Debajo se muestran los principales tipos celulares que expresan CD200 y CD200R en condiciones normales. Imagen adaptada de Rosenblum et al., 2006¹⁰⁴.

El ligando CD200

CD200, originalmente denominada MRC OX-2, es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de inmunoglobulinas y se encuentra relacionada estructuralmente con la familia de los receptores coestimuladores B7^{96,106}. La molécula de CD200 consiste en un dominio extracelular de inmunoglobulina, un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta que carece de motivos de señalización (Figura 7)⁶⁵. Se ha reportado la expresión de CD200 en una amplia variedad de tipos celulares: neuronas^{89,91,92,95,107}, células endoteliales^{93,108}, células B activadas y subtipos de células T⁹⁶, células dendríticas en reposo⁹⁶ y timocitos, entre otros⁹⁷. En el SNC, también se ha observado expresión en astrocitos y oligodendrocitos en ciertas condiciones específicas^{91,107}. Debido a su papel fundamental en la inmunorregulación, CD200 es una proteína ampliamente expresada en los tejidos nerviosos y linfoides, donde fue identificada por primera vez^{106,109}. Se ha observado que CD200 se encuentra enriquecido tanto en los elementos pre- como post-sinápticos de las sinapsis excitatorias¹¹⁰⁻¹¹². El estado de glicosilación de CD200 puede variar según el tejido, aunque no se ha demostrado que esto tenga un impacto funcional biológico¹¹³. Se ha descrito una forma truncada de CD200, producto de una variante de splicing alternativo, que se encuentra en forma soluble ya que carece del dominio transmembrana¹¹⁴. Se ha sugerido un rol regulador de esta proteína, ya que podría actuar de manera fisiológica como un competidor de CD200 de membrana, limitando la interacción con sus receptores.

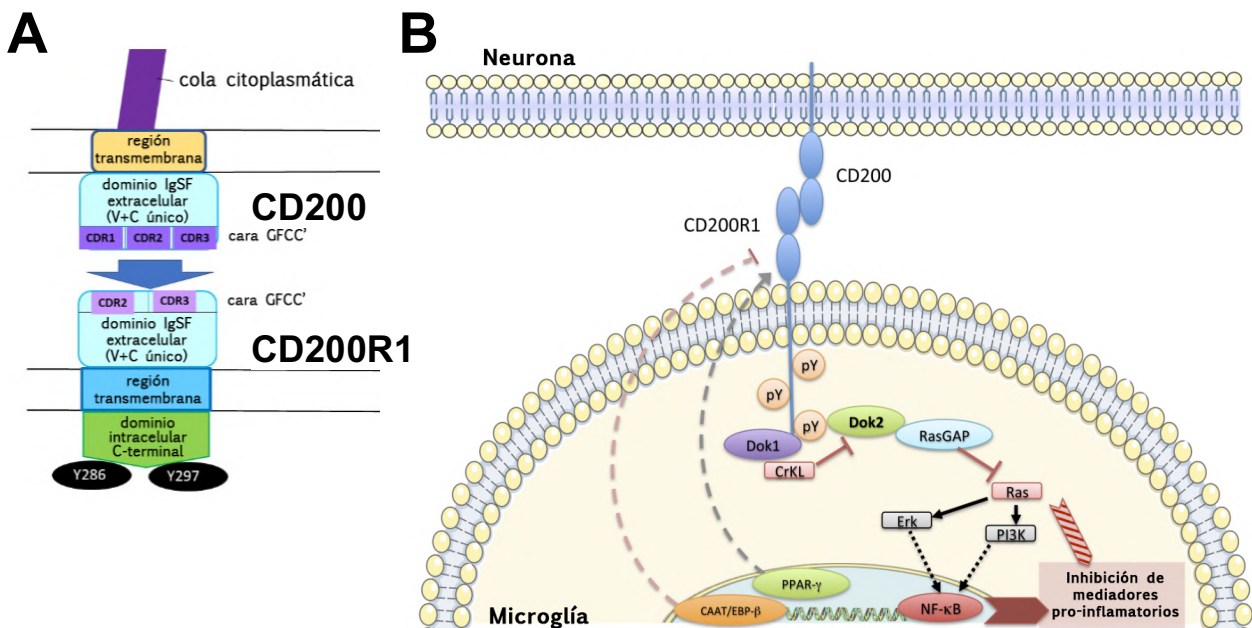


Figura 7. Estructura de CD200-CD200R1 y cascada de señalización intracelular desencadenada por la activación de CD200R1. (A) las interacciones CD200-CD200R1 ocurren a través de los dominios extracelulares de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF), donde las caras GFCC' desempeñan un papel crucial. Imagen adaptada de Kotwica-Mojzych et al., 2021 ¹¹⁵. (B) cascada de señalización intracelular desencadenada después de la unión de CD200 al receptor CD200R. En este ejemplo de interacción entre dos células, cuando CD200, presente en las neuronas, se une al CD200R1 microglial, se desencadena una cascada intracelular que conduce a la fosforilación de Dok1 y Dok2, lo que promueve la inhibición de las vías Ras-PI3K y Ras-ERK. Esto conduce a una inhibición de la secreción de señales pro-inflamatorias a través de la regulación negativa de NF- κ B, aunque pueden estar involucradas otras vías desconocidas. Por otro lado, otros factores de transcripción involucrados en la actividad pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, como el factor de unión a la región CAAT-beta o PPAR- γ , controlan la expresión de CD200R. Imagen adaptada de Manich et al., 2018 ⁸⁷.

Mecanismos intracelulares de la activación de CD200R1

El receptor CD200R1 tiene una estructura extracelular similar a la de CD200, con dos dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas extracelulares que interactúan con el ligando CD200, un dominio transmembrana y un gran dominio citoplasmático notoriamente diferente al de CD200. Este dominio citoplasmático desencadena una cascada de señalización que finaliza en la inhibición de la producción de mediadores pro-inflamatorios¹¹⁶. CD200R1 presenta varias particularidades que lo hacen inusual en comparación con la mayoría de los inmunorreceptores inhibitorios, ya que estos generalmente presentan en su dominio citoplasmático un motivo de inmunoreceptor inhibitorio basado en tirosina que recluta fosfatasa una vez activado. A diferencia de éstos, CD200R1 contiene motivos de fosfotirosinas en su dominio citoplasmático (Figura 7 B), que reclutan a los adaptadores DOK1/DOK2 y RasGap, los cuales promueven la inhibición de las vías de señalización Ras-ERK y PI3K^{116,117}. Como resultado de la inhibición de estas vías, se genera una reducción en la producción de señales pro-inflamatorias mediante la regulación negativa de la vía de NF- κ B. A pesar de que se ha demostrado únicamente el efecto sobre la vía de NF- κ B, también pueden estar participando otras vías aún desconocidas¹¹⁸.

La interacción CD200-CD200R1 como regulador de la inflamación

Luego de los trabajos que reportaron la presencia de CD200 en los tejidos linfoides y nerviosos, así como también los trabajos que reportaron la expresión de CD200R1 en las principales poblaciones celulares del sistema inmune, rápidamente se sugirió a la interacción entre CD200 y CD200R1 como un potencial actor relevante en la regulación de las respuestas inmunes, tanto en el sistema nervioso como en todo el organismo. La amplia expresión de CD200 presenta una

gran ventaja, ya que el organismo puede regular los niveles y gestionar localmente la actividad inmune y la inflamación específicamente¹⁰³. En uno de los primeros trabajos que demostraron la importancia de la interacción CD200-CD200R1 en la neuroinflamación, bloquearon esta interacción en un modelo murino de esclerosis múltiple⁹³. En este estudio, observaron una mayor severidad en el desarrollo de la patología y una exacerbación de los procesos inflamatorios. Posteriormente, otro estudio demostró que los ratones deficientes en la expresión de CD200, también presentan un desarrollo patológico mayor en el modelo de esclerosis múltiple, así como también una respuesta inmune exacerbada y mayor reactividad microglial en un modelo de lesión de nervio facial¹¹⁹. Estos estudios fueron fundamentales para evidenciar el importante rol de la interacción entre CD200 y CD200R1 en la regulación de los procesos inflamatorios en el sistema nervioso, a partir de los cuales se continuó con el estudio de esta interacción en diferentes contextos inflamatorios, tanto en el sistema nervioso como en el resto del organismo.

Aunque la interacción CD200-CD200R puede reducir la inflamación, desafortunadamente también puede suprimir la capacidad natural del cuerpo para combatir los tumores¹²⁰. En las últimas décadas se ha reportado una alta expresión anormal de CD200 por diversas células cancerígenas, lo cual se asociado con distintas leucemias¹²¹, melanoma maligno¹²² y varios cánceres neuroendocrinos¹²³. Se ha observado que la sobreexpresión de CD200 en células tumorales puede actuar como un mecanismo de escape inmunológico al suprimir la respuesta de las células inmunitarias contra el cáncer. Además, se ha demostrado que el gen que codifica CD200 ha sido adquirido por varios virus, entre ellos el herpes asociado al sarcoma de Kaposi¹²⁴ y el citomegalovirus de la rata¹²⁵, lo que les permite a estos patógenos suprimir los mecanismos inmunes antivirales de sus hospedadores.

Esta interacción entre CD200 y CD200R1 también ha sido estudiada en diferentes contextos de inflamación, particularmente en infecciones virales¹²⁶⁻¹²⁸ y bacterianas¹²⁹, artritis^{130,131} y en la supervivencia de trasplantes¹³². En un modelo de infección viral crónica de influenza, se observó que los macrófagos presentes en las vías respiratorias presentan una mayor expresión de CD200R1 que sus contrapartes sistémicas, mientras que el CD200 expresado por el epitelio de las vías respiratorias reduce la proliferación de los macrófagos pulmonares y la infiltración de linfocitos. Esto promueve un retraso en la eliminación de la influenza, pero a su vez disminuye la enfermedad pulmonar inflamatoria asociada a la infección^{126,127}. Por otro lado, se observó que la ausencia de CD200R1 en neutrófilos pulmonares genera una mayor carga bacteriana en un modelo de infección por la bacteria *Francisella tularensis*¹²⁹. En la artritis, se ha reportado que la

administración de CD200 de manera exógena soluble¹³³, así como también de un anticuerpo bloqueante de CD200R1¹³⁴, previenen el desarrollo de la enfermedad mediante la inhibición de la sensibilización al colágeno y una disminución de la expresión de TNF α e IFN- γ . Finalmente, se ha demostrado que CD200 prolonga la supervivencia de los aloinjertos en varios modelos animales (incluidos los aloinjertos de piel, riñón, corazón e intestino delgado). Este efecto se ha asociado con un cambio en la producción de citoquinas por las células inmunes, hacia una mayor producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, TGF β) y una disminución en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-2, IFN- γ , TNF- α).

En su conjunto, estas décadas de estudios de CD200 y CD200R1, ponen en evidencia el importante rol regulador de esta interacción en el control de la autoinmunidad, infección, alergia, trasplante y cáncer, así como también sugieren posibles roles de esta interacción en otras patologías y procesos inflamatorios a nivel de todo el organismo.

Aún más interesantemente, numerosos estudios han vinculado a la interacción CD200-CD200R1 en variados procesos neuroinflamatorios como la enfermedad de Alzheimer^{135,136} y de Parkinson¹³⁷⁻¹⁴¹, accidentes cerebrovasculares^{142,143}, esclerosis múltiple^{91,95,99,144}, dolor neuropático¹⁴⁵, depresión¹⁴⁶, envejecimiento del sistema nervioso¹¹⁰. A su vez, se ha estudiado el rol de esta interacción en el contexto de neuroinflamación luego de un trauma físico al sistema nervioso central y periférico, en un modelo de lesión de médula espinal^{89,108} y en lesión de nervio ciático^{147,148}, respectivamente. En estos extensos estudios, se ha reportado un efecto neuroprotector de la activación del receptor CD200R1 por el ligando CD200, mediado por una disminución de la producción de mediadores pro-inflamatorios y oxidativos. Apoyando este mecanismo neuroprotector, estudios *in vitro* han demostrado que la activación de CD200R1 tanto en microglía como en macrófagos confieren protección a las neuronas y promueven su supervivencia por medio de la reducción de la producción de mediadores pro-inflamatorios por parte de la microglía^{99,149} y macrófagos⁹⁰. En el SNC, la interacción entre el ligando CD200 presente en las neuronas con el receptor CD200R1 presente en las células de la microglía puede estar en la base del mantenimiento de esta población celular en un estado homeostático, en conjunto con otros inmunorreceptores como TREM-2, SIRP α y CX3CR1¹⁵⁰, que conforman un sistema robusto para asegurar el correcto funcionamiento de esta población celular en ausencia de estímulos inflamatorios. Estos sistemas actuarían de manera complementaria para asegurar la homeostasis del tejido en condiciones normales¹⁵¹.

CD200 también ha sido implicado con la reparación tisular y la recuperación de la homeostasis luego de disrupciones en los tejidos, ya que *in vitro* se ha observado que la adición de CD200 promueve la neuritogénesis¹⁵². Sin embargo, se ha planteado que este efecto sobre la regeneración puede deberse a que el ligando CD200 también puede unirse y activar al receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR)¹⁵², por lo que los efectos de CD200 pueden deberse a interacciones con otros receptores diferentes al CD200R1.

El rol de la interacción CD200-CD200R1 en el control de la proliferación y la apoptosis de la población de microglía también ha sido estudiado, donde se ha planteado que la activación de CD200R1 podría actuar como limitante de la proliferación de las células que lo expresan, principalmente durante los procesos inflamatorios fuera de la homeostasis^{153,154}. En esta misma dirección, se ha sugerido que la activación de CD200R1 puede inducir a la apoptosis en microglía y macrófagos¹⁴⁴. Sin embargo, pocos estudios han analizado el rol de esta interacción en estos procesos, por lo que aún resta analizar en mayor profundidad si efectivamente esta interacción participa en el control de estos procesos celulares. Similarmente, el impacto de la interacción CD200-CD200R1 en la fagocitosis debe ser analizada en mayor detalle, ya que son unos pocos los estudios que indagan en el rol de CD200R1 sobre esta función celular, que es de gran relevancia en los procesos que ocurren en las respuestas inflamatorias en el sistema nervioso, como se explicará más adelante. Estos estudios han sido realizados *in vitro* y han analizado únicamente la fagocitosis de β -amiloide^{155,156}. Estos trabajos demostraron que la activación de CD200R1 disminuye la capacidad de la microglía de fagocitar las placas β -amiloide¹⁵⁵ y que la microglía de ratones deficientes de CD200 tienen mayor fagocitosis de dichas placas¹⁵⁶, sugiriendo un rol de CD200R1 como un atenuante de la fagocitosis. Sin embargo, para poder conocer en mayor detalle el impacto de la activación de este receptor en dicha función celular, se debe analizar el efecto de la modulación de este receptor en la fagocitosis tanto *in vivo* e *in vitro* de otros componentes.

Estas décadas de trabajos estudiando la interacción CD200-CD200R1 han demostrado que esta interacción cumple un rol relevante en el control de distintos procesos relacionados con las respuestas del sistema inmune frente a diversos contextos, por lo que puede ser un potencial blanco para la modulación de la respuesta inflamatoria acorde al contexto en el cual ésta se desarrolla.

Teniendo en cuenta esta premisa, es crucial dar continuidad a estos estudios para analizar el papel de CD200-CD200R1 en diversos contextos inflamatorios. Esto nos permitirá descubrir tanto similitudes como diferencias en los procesos que subyacen a esta interacción en diferentes situaciones, y comprender en detalle los efectos beneficiosos de esta interacción para aplicarlos en diversos escenarios neuroinflamatorios. En nuestro trabajo actual, nos proponemos investigar esta interacción en tres modelos de inflamación del sistema nervioso, donde se evidencian una variedad de procesos mediante los cuales el sistema inmunitario y el sistema nervioso interactúan en respuesta a diferentes estímulos.

Modelos experimentales de neuroinflamación

Nos planteamos utilizar tres modelos experimentales murinos que cursan neuroinflamación en diferentes contextos, que además de permitirnos profundizar en los mecanismos que subyacen a la respuesta inflamatoria, a su vez representan problemáticas clínicas actuales que afectan a los humanos y por lo tanto impulsan el desarrollo de estrategias terapéuticas que favorezcan la mejora de la calidad de vida de los pacientes y el avance en el campo de la neuroinflamación.

En primer lugar, analizamos el papel de CD200-CD200R1 en un modelo de lesión en el sistema nervioso periférico (SNP), por medio de un aplastamiento del nervio ciático. A pesar de que luego de esta lesión se genera una neuroinflamación a nivel del SNC en la médula espinal, nos centramos en el análisis de los procesos que llevan a la degeneración y regeneración del tejido nervioso periférico, con el objetivo de esclarecer los mecanismos por los cuales CD200-CD200R1 participa en una situación donde ocurre una regeneración y recuperación exitosa luego de una lesión al tejido nervioso.

Por otro lado, con el fin de profundizar en el rol de CD200-CD200R1 en una lesión al SNC, utilizamos un modelo murino de lesión de médula espinal por contusión. Este modelo experimental es ampliamente utilizado para analizar los procesos neuroinflamatorios frente a un daño físico, donde se ve alterada la barrera hematoencefálica y el tejido nervioso se ve infiltrado con células del sistema inmune. Esto resulta de gran utilidad para comprender los mecanismos de comunicación entre los diferentes componentes celulares del sistema inmune a nivel sistémico y cómo interaccionan para determinar la magnitud y severidad de la neuroinflamación a nivel del SNC. Este modelo experimental no resulta de gran relevancia para el estudio del impacto de

CD200R1 en la regeneración axonal, ya que luego de una lesión de médula espinal es escasa, a diferencia de lo que ocurre luego de una lesión de nervio periférico, razón por la cual también utilizamos este tipo de lesiones para estudiar el rol de CD200R1 en este proceso.

Por último, exploramos el rol de CD200-CD200R1 en un modelo de neuroinflamación desencadenada por una inflamación sistémica mediante la administración intraperitoneal de lipopolisacárido, una sustancia que estimula el sistema inmunitario. Este enfoque nos permite examinar el papel de CD200R1 en los procesos neuroinflamatorios desde una perspectiva distinta, dado que la ausencia de daño físico implica que no se produce la entrada de células del sistema inmunitario desde la periferia al sistema nervioso. De esta manera, podemos aportar al conocimiento del rol de CD200-CD200R1 en la comunicación entre el sistema inmune a nivel periférico y en el SNC, así como también diseccionar el rol de CD200R1 a nivel de la microglía en desencadenar la respuesta neuroinflamatoria.

Lesiones traumáticas de nervio periférico

Estructura y fisiología del nervio periférico

Un nervio periférico se compone de múltiples fibras nerviosas dispuestas longitudinalmente agrupadas en fascículos. Los axones dentro de un nervio periférico pueden originarse en neuronas ubicadas en los ganglios de la raíz dorsal (neuronas sensoriales), los ganglios autónomos (neuronas autónomas) o en el asta ventral de la médula espinal y el tronco encefálico (motoneuronas)¹⁵⁷. Cada fascículo del nervio, además de tener fibras nerviosas mielínicas y amielínicas, también presentan otros componentes como la matriz extracelular que conforma el tejido conjuntivo y una vascularización importante. Los fibroblastos residentes de los nervios periféricos cumplen un rol en mantener la estructura y funcionamiento normal de los nervios periféricos al sintetizar componentes de la matriz extracelular y el tejido conjuntivo que organiza a las fibras nerviosas. A su vez, durante el proceso de desarrollo y de regeneración luego de una lesión, los fibroblastos producen una gran cantidad de factores neurotróficos que favorecen el crecimiento axonal¹⁵⁸. Por otro lado, los macrófagos residentes en los nervios periféricos, a pesar de no encontrarse en gran número, sus funciones permiten mantener la homeostasis del tejido nervioso en condiciones normales, aunque sus funciones se hacen más evidentes luego de una lesión como se verá más adelante^{159,160}. A su vez, estos macrófagos cumplen un rol fundamental

en promover la angiogénesis durante el proceso de regeneración luego de una lesión, ya que sintetizan y liberan factor de crecimiento endotelial.

Células de Schwann

Las células de Schwann constituyen la principal población glial del SNP, superando en número a las otras poblaciones no neuronales y cumpliendo una variedad de funciones, tanto durante el desarrollo, como en homeostasis y luego de una lesión¹⁶¹. Esta población celular presenta una plasticidad fenotípica notable, ya que tienen la capacidad de adaptarse y cambiar su forma y función en respuesta a diferentes estímulos y condiciones del entorno. Esta capacidad de plasticidad les permite desempeñar múltiples roles fundamentales al ser los principales responsables del desarrollo del tejido nervioso periférico, la homeostasis durante la adultez y la regeneración luego de una lesión.

Células de Schwann durante el desarrollo embrionario

Las células de Schwann se originan a partir de la cresta neural^{162,163}. Los precursores de células de Schwann siguen un proceso de diferenciación que continúa durante el desarrollo, donde aumentan cada vez más la expresión de S100-β, el cual mantienen inclusive en su estado totalmente diferenciado¹⁶². Durante el desarrollo del SNP, las células de Schwann son fundamentales para el crecimiento y maduración de varios componentes del tejido, tanto neurales, como no neurales. Promueven la angiogénesis por medio de la secreción de VEGF^{164,165} y la maduración de otros componentes del tejido conjuntivo circundante¹⁶⁶, así como también son responsables de organizar la clasificación radial de axones, un paso crucial para la correcta mielinización del SNP y la segregación de axones en fascículos¹⁶⁷.

Las células de Schwann durante la homeostasis

Durante la adultez y en condiciones normales, las células de Schwann son actores clave en el mantenimiento de la homeostasis del SNP, ya que además de formar la vaina de mielina, son responsables del almacenamiento y suministro de energía a los axones, proporcionando el acoplamiento metabólico necesario para la función y la homeostasis neuronal.

La mielina es un complejo de proteínas y lípidos que forma una vaina que protege y brinda soporte a los axones individuales¹⁶⁸. Cada célula de Schwann mielinizante está estrechamente

vinculada a un axón, envolviendo múltiples veces a éste y creando láminas ricas en mielina. Esto forma una capa que aísla el axón y permite la transmisión rápida de impulsos a través de la conducción saltatoria, ya que proporciona una vaina de alta resistencia y baja capacitancia. La mielinización aumenta la velocidad de conducción nerviosa de 20 a 100 veces en comparación con los axones no mielinizados. Además de facilitar una conducción más rápida de señales eléctricas, también proporciona factores fundamentales para la supervivencia de los axones. Los axones no mielinizados tienden a ser más pequeños y una sola célula de Schwann puede envolver múltiples axones sin formar una vaina de mielina. Cada célula de Schwann está rodeada por una lámina basal de colágeno tipo IV, fibronectina, laminina y proteoglicano de sulfato de heparán¹⁵⁷.

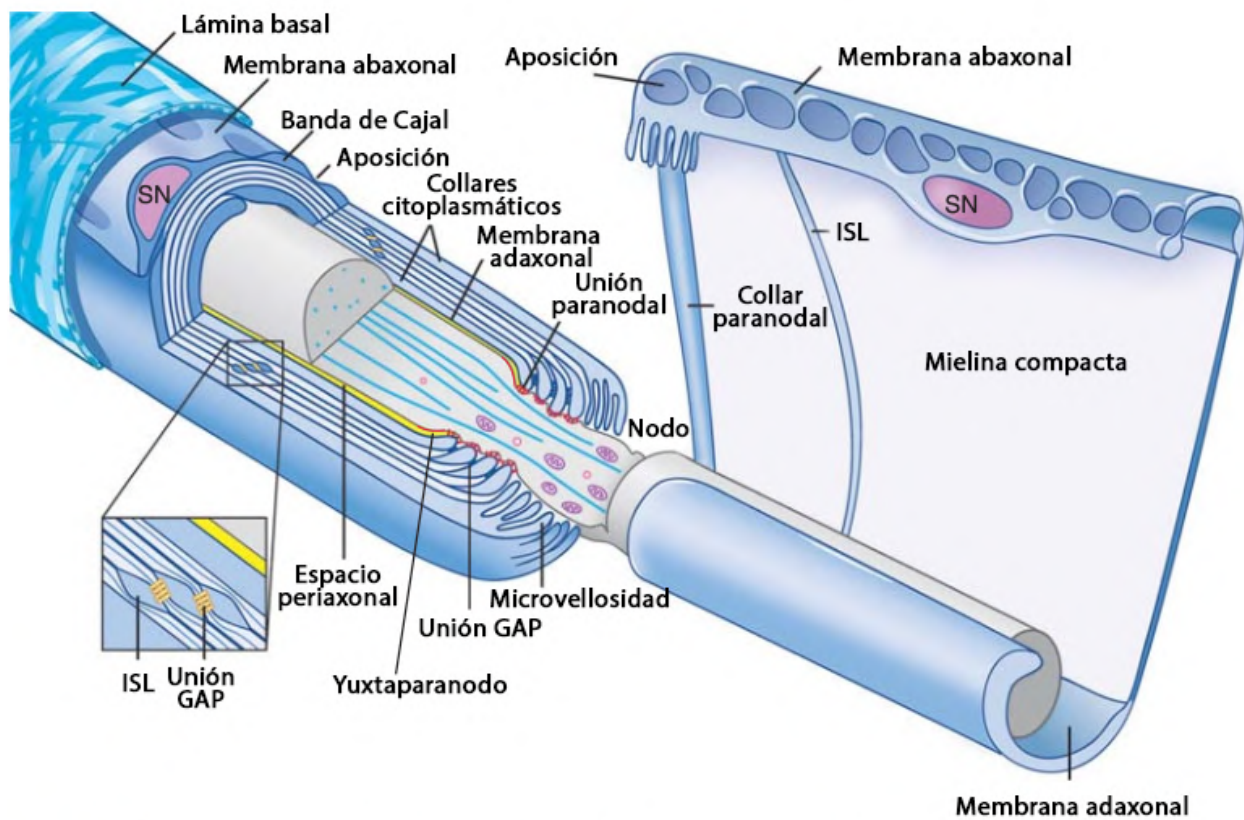


Figura 8. Organización de las células de Schwann mielinizantes. Representación de células de Schwann mielinizantes (en azul) rodeando un axón (en gris). La célula izquierda se muestra en sección longitudinal y la célula derecha se muestra desplegada. Las células de Schwann mielinizantes están rodeadas por una lámina basal, que está en contacto directo con la membrana abaxonal. El compartimento abaxonal contiene el núcleo de la célula de Schwann (SN); se divide en bandas de Cajal y yuxtaposiciones periódicas que se forman entre la membrana abaxonal y el giro exterior de la mielina compacta. La membrana adaxonal de la célula de Schwann está separada de la membrana axonal por el espacio periaxonal (mostrado en amarillo). La mielina compacta se interrumpe con incisuras de Schmidt-Lanterman

(ISL), que contienen citoplasma y están enriquecidas en uniones GAP. También se muestran los bucles y uniones paranodales (en rojo) y las microvellosidades de la célula de Schwann que contactan el axón en el nodo. El diámetro del axón se reduce en la región del nodo y los paranodos. Imagen adaptada de Salzer et al., 2015¹⁶⁹.

Las células de Schwann mielinizantes son células polarizadas radial y longitudinalmente^{170,171}. Estas células presentan distintos dominios de membrana, cada uno con un repertorio único de proteínas y un conjunto de compartimentos citoplasmáticos (Figura 8). A nivel de la membrana abaxonal (más externa), las aposiciones de mielina están interrumpidas por una red de canales citoplásmicos anastomosados, denominados bandas de Cajal¹⁷². Estos canales citoplásmicos se encuentran en el exterior de la célula de Schwann y proporcionan un conducto para el transporte de ARN y proteínas que se originan en el soma celular^{172,173}.

La mielina compacta es interrumpida por las incisuras de Schmidt-Lanterman (Figura 8 y 9). Estas hendiduras están presentes a lo largo del internodo y son más comunes en fibras de gran diámetro que están fuertemente mielinizadas y es probable que desempeñen un papel en el mantenimiento de la mielina. Las incisuras de Schmidt-Lanterman son estructuras con forma de resorte helicoidal debido a su continuidad citoplasmática en los enrollamientos de la membrana plasmática de las células de Schwann que se enrollan para formar la mielina compacta (Figura 9). Las incisuras se hacen evidentes por presentar un paquete de citoplasma entre las porciones adyacentes de mielina compacta¹⁷⁴. Durante mucho tiempo se ha considerado que las incisuras únicamente proporcionan un conducto para la comunicación entre los diferentes dominios de las células de Schwann¹⁷⁵. Estudios recientes sugieren que las hendiduras, que están enriquecidas en receptores tirosina quinasa, son a su vez sitios con importancia en la señalización autocrina¹⁷⁶.

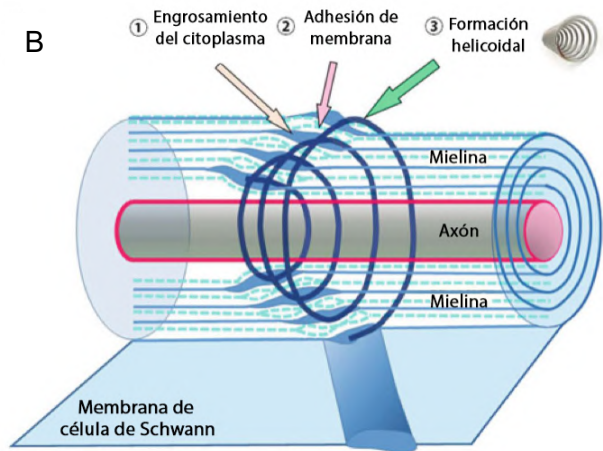
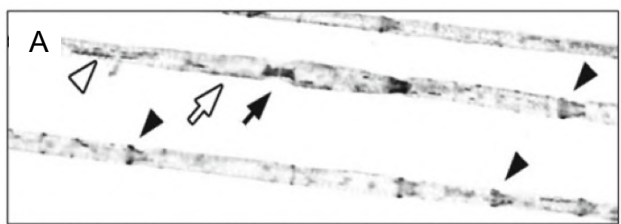


Figura 9. Estructura de las Incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL). (A) a nivel microscópico de luz, las ISL tienen una apariencia cónica o de cono truncado en los internodos (puntas de flecha negras), como se muestra mediante la tinción inmunohistoquímica de la proteína 4.1G en el nervio ciático de ratón. La proteína 4.1G también se localiza en los paranodos (flecha negra). La punta de flecha blanca y la flecha indican las bandas de Cajal. (B) esquema de las ISL, que muestra tres características estructurales: (1) engrosamiento del citoplasma, (2) adhesión de membranas y (3) un resorte helicoidal. Imagen adaptada de Terada et al., 2019 ¹⁷⁶.

Células de Schwann luego de una lesión

La plasticidad fenotípica de las células de Schwann es quizás más evidente luego de una lesión (Figura 10), donde experimentan una extensa reprogramación que promueve y guía la regeneración axonal y la reparación del tejido. Las células de Schwann que están en contacto con el segmento distal del axón (que quedó separado del soma), pierden contacto con éste y adoptan un fenotipo de reparación. Esta transformación fenotípica implica la disminución de la expresión de varios genes pro-mielinizantes¹⁷⁷. Este fenotipo pro-reparativo se caracteriza por la desintegración y eliminación de los axones y mielina dañados durante el proceso de degeneración Walleriana. Las células de Schwann con este fenotipo secretan factores tróficos para promover la supervivencia de las neuronas dañadas y el crecimiento de los axones. Posteriormente, las células de Schwann de reparación extienden procesos largos y paralelos alineados llamados bandas de Büngner que guían a los axones en crecimiento hacia su diana. Finalmente, las células de Schwann proliferan, aumentan la expresión de genes pro-mielinizantes, y vuelven a adquirir un fenotipo mielinizante (o no mielinizante), sobre los axones regenerados. La maquinaria de reparación requiere una regulación dinámica y coordinada de la plasticidad y reprogramación de las células de Schwann luego de una lesión, la cual se detalla a continuación.

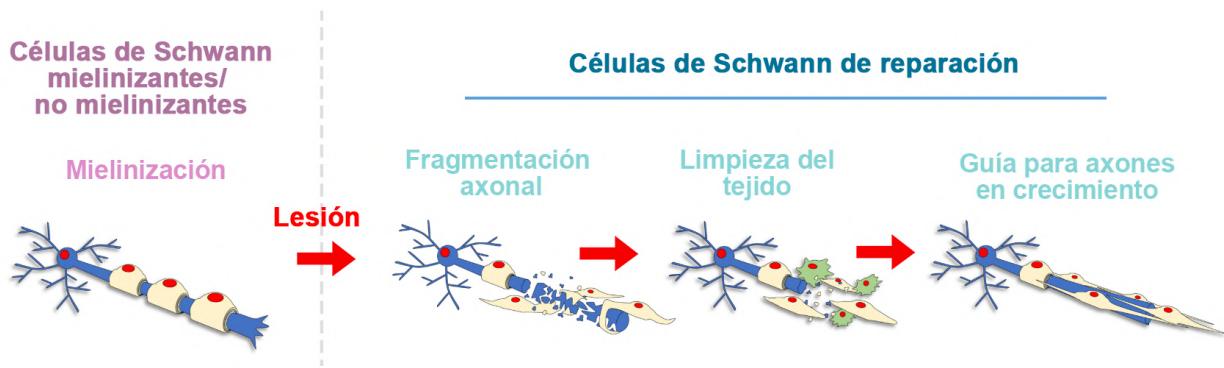


Figura 10. Fenotipos y funciones de las células de Schwann luego de una lesión. Luego de una lesión, las células de Schwann adquieren un fenotipo reparador, donde cumplen una variedad de funciones diferentes a las que realizan en condiciones de homeostasis, entre ellas la fragmentación axonal, la limpieza del tejido y actúan como guía para el crecimiento de axones. Imagen adaptada de Nocera 2020¹⁷⁷.

Lesiones traumáticas de nervios periféricos en humanos

Las lesiones traumáticas de nervios periféricos actualmente representan un importante problema de salud pública, principalmente a causa de una regeneración nerviosa incompleta y recuperación funcional deficiente en el 33 % de las lesiones. En consecuencia, la pérdida de la función normal de las extremidades puede resultar comúnmente en una morbilidad de por vida y una discapacidad permanente^{178,179}. Esto deja a muchos pacientes con secuelas a largo plazo, como dolor crónico, atrofia de los músculos blanco y alteración de la función motora o sensorial, generando importantes consecuencias socioeconómicas y psicosociales. Esto puede llevar a largas ausencias laborales por enfermedad, reasignaciones a nuevas tareas laborales y estrés psicológico¹⁸⁰. Las lesiones traumáticas de nervios periféricos generalmente se asocian con accidentes de tránsito, lesiones penetrantes, laceraciones, disparos, caídas, quemaduras, fracturas e isquemia¹⁸¹.

Uno de los sistemas clásicos de clasificación de las lesiones traumáticas de nervios periféricos es el propuesto por Seddon¹⁸², según la presencia de desmielinización y la extensión del daño a los axones y los tejidos conectivos del nervio, clasificando las lesiones en tres categorías (Figura 11). La forma más leve de lesión se llama neuropraxia, definida por desmielinización local sin daño a los axones y los tejidos conjuntivos. La neuropraxia generalmente ocurre por una compresión leve del nervio y da como resultado una disminución en la velocidad de conducción. Dependiendo de la gravedad de la desmielinización, los efectos pueden variar desde la conducción asincrónica hasta el bloqueo de la conducción, lo que provoca debilidad muscular.

El siguiente nivel se llama axonotmesis, que involucra daño directo a los axones además de desmielinización focal mientras se mantiene la continuidad de los tejidos conjuntivos del nervio. La forma más grave de lesión se llama neurotmesis, comúnmente debido a una laceración con un cuchillo, disparo o fragmento de vidrio, produciéndose una sección completa de los axones y las capas de tejido conjuntivo en la que se observa una discontinuidad completa del nervio. Esta clasificación fue luego ampliada por Sunderland para distinguir la extensión del daño en los tejidos conjuntivos¹⁸³.

Una de las lesiones traumáticas más frecuentes del nervio periférico es por aplastamiento que generalmente ocurren por una compresión aguda del nervio por un objeto o fragmento de hueso, lo que se corresponde con una axonotmesis con las clasificaciones previamente mencionadas¹⁸⁴.

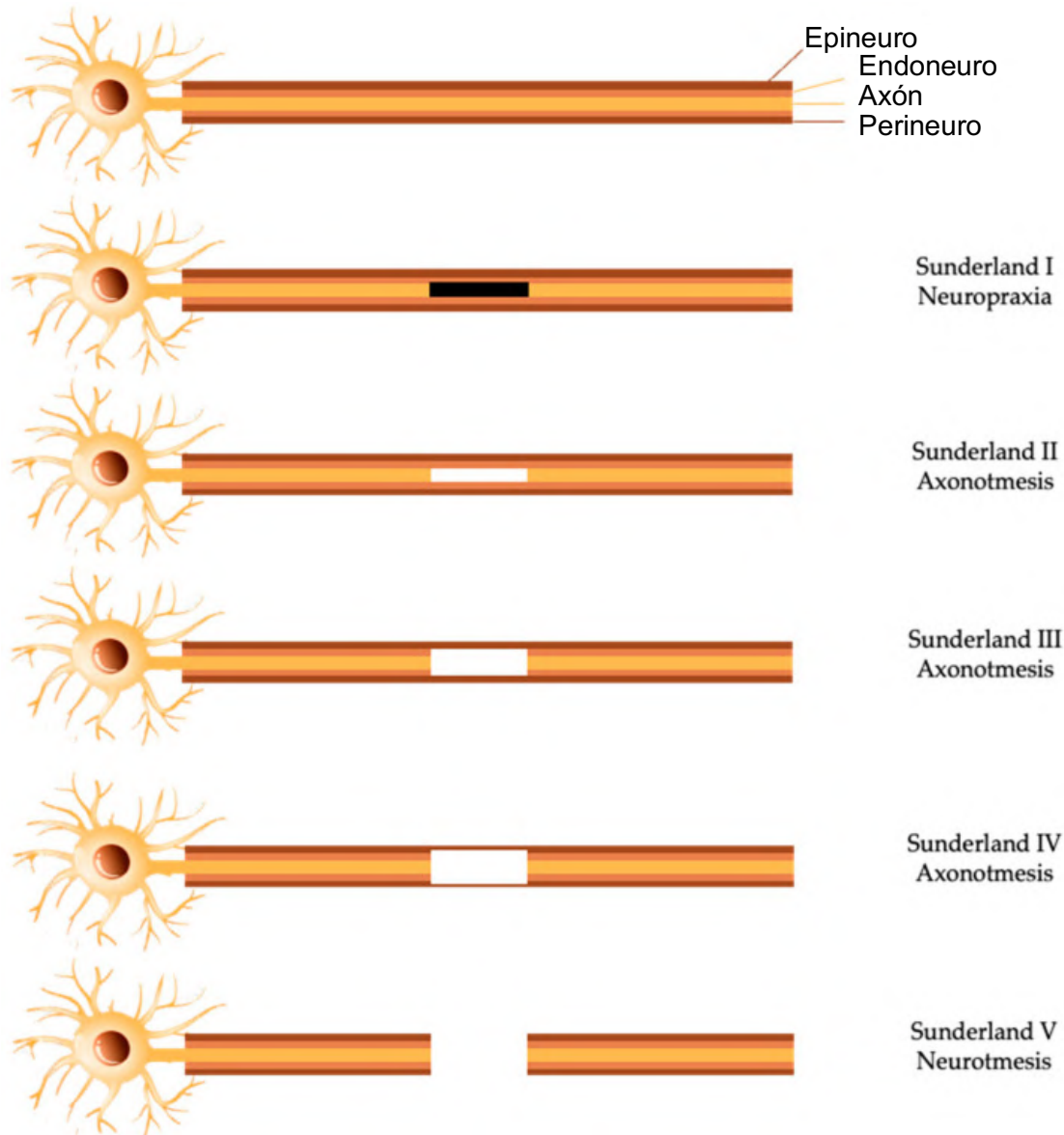


Figura 11. Clasificaciones de Seddon y Sunderland para las lesiones de nervio periférico. La clasificación de Seddon divide a las lesiones en tres categorías de severidad creciente: neuropraxia, axonotmesis y neurotmesis. En la neuropraxia ocurre una desmielinización local sin alterar la integridad del axón. En la axonotmesis, ocurre un daño a los axones, que lleva a la degeneración Walleriana de éstos, sin embargo, las capas de tejido conjuntivo del nervio permanecen intactas (al menos alguna de ellas), lo que permite la regeneración del nervio. Por último, la neurotmesis ocurre con la interrupción de los axones y de las capas de tejido conjuntivo del nervio (epineuro, perineuro y endoneuro), limitando la regeneración. Posteriormente a la clasificación de Seddon, Sunderland extendió estas categorías, principalmente para diferenciar entre los tipos de axonotmesis según las capas de tejido conjuntivo afectadas. Imagen adaptada de Lopes et al., 2022 ¹⁸⁵.

Eventos que ocurren luego de la lesión de nervio periférico

Una lesión traumática a un nervio periférico resulta en una pérdida de las funciones motoras y sensitivas asociadas a ese nervio. La recuperación de estas funciones se alcanza a través de la regeneración de los axones dañados y reinervación de los tejidos blanco. Sin embargo, para que ocurra una regeneración exitosa, es necesario que ocurran previamente una serie de procesos, tanto a nivel del SNC como en el nervio lesionado, con el fin de generar un ambiente propicio para la regeneración. Luego de una lesión, se observa una importante respuesta en los somas de las neuronas en el SNC y en los ganglios del SNP, cuyos axones fueron dañados a nivel del nervio periférico. Uno de los componentes más relevantes y evidentes de esta respuesta es la cromatólisis, que implica importantes cambios en la expresión génica y en la síntesis proteica¹⁸⁶. Esta respuesta en los somas neuronales se hace evidente en la microscopía a causa de la fragmentación de los cuerpos de Nissl, que corresponde con un reestructuramiento del retículo endoplasmático rugoso, indicando importantes cambios en la maquinaria de síntesis proteica. Estas neuronas lesionadas también generan una respuesta neuroinflamatoria en la médula espinal, teniendo un fuerte impacto sobre la microglía, y muchas veces se encuentra en la base de la generación del dolor neuropático que permanece luego de una lesión de nervio¹⁸⁷.

A nivel del tejido del nervio, luego de la lesión se desencadenan una serie de eventos celulares y moleculares que se desarrollan distales a los sitios de lesión hasta llegar a los tejidos diana denervados, denominados colectivamente como degeneración Walleriana¹⁸⁸. El objetivo de esta degeneración es eliminar los axones y la mielina dañada, lo cual es fundamental para lograr un ambiente permisivo para la regeneración. Numerosos estudios se han centrado en profundizar en los mecanismos que subyacen a la degeneración Walleriana, ya que se ha demostrado que es fundamental para lograr una recuperación exitosa.

Fases de la degeneración Walleriana

El proceso de degeneración Walleriana luego de una lesión traumática en el nervio periférico sigue una serie de fases que se muestran en la Figura 12. Inmediatamente después de la axotomía, el axón que se ha separado del soma pasa por una fase de latencia en la que su morfología general permanece sin cambios durante las primeras 24 horas, en la que se da un aumento rápido de los niveles de calcio (Ca^{2+}) axonal en los muñones proximal y distal del axón, principalmente debido a la entrada de calcio extracelular en el sitio de la lesión¹⁸⁹⁻¹⁹². Las

mitocondrias pierden su potencial de membrana y comienzan a hincharse, aumentando así la generación de especies reactivas de oxígeno. En última instancia, liberan sus reservas internas de Ca^{2+} , lo que culmina en una segunda ola de Ca^{2+} a largo plazo¹⁹³⁻¹⁹⁶. Durante estos procesos, la morfología axonal permanece sin cambios, a pesar de la desestabilización de los microtúbulos que ya fue iniciada^{193,197}.

Luego comienza abruptamente la segunda fase del proceso de degeneración Walleriana. El axón comienza a desensamblarse, haciendo evidente la fragmentación a nivel molecular, ultraestructural y morfológica¹⁹³. Los microtúbulos comienzan a desensamblarse, así como también los otros componentes del axoesqueleto. Comienza a observarse un efecto “perlado” del axón, en donde se observan fragmentos redondeados a modo de “collar de perlas”¹⁹⁸⁻²⁰⁰. Durante la fase de ejecución, las células de Schwann y las células fagocíticas especializadas que ingresan, no sólo eliminan los restos axonales resultantes, sino que también promueven activamente un aumento de la fragmentación axonal²⁰¹. La fragmentación de los axones se detecta por primera vez mediante microscopía óptica de 36 a 44 horas después de la sección del nervio en ratones y ratas. Luego, la destrucción del axón puede avanzar anterógradamente. La desintegración de la vaina de mielina, la proliferación y reorganización de las células de Schwann en las llamadas bandas de Büngner comienzan 2 días después de la lesión²⁰².

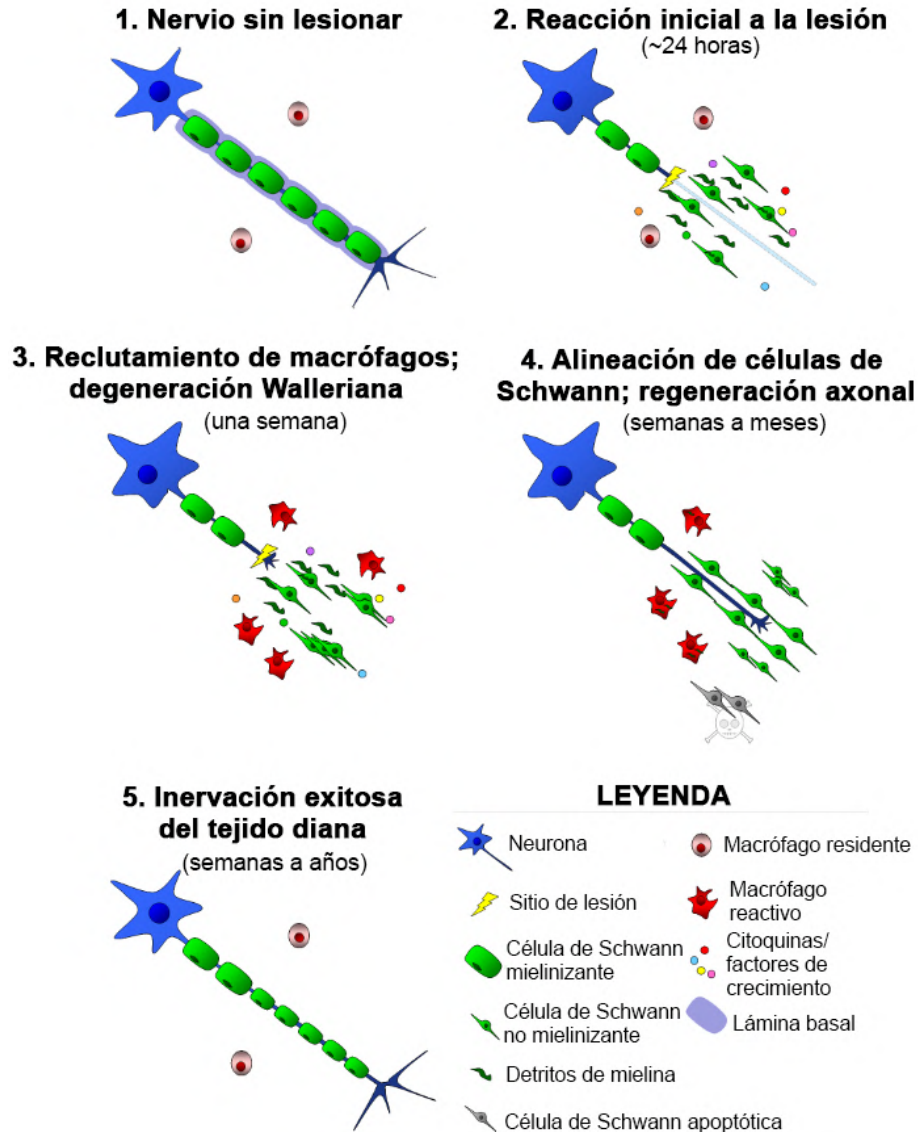


Figura 12. Fases de la degeneración Walleriana después de una lesión en el nervio periférico. 1. Se representa una neurona, con su axón mielinico en condiciones normales. 2. Poco después de la lesión, el axón permanece sin cambios visibles, y comienza la reacción dentro del cuerpo celular de la neurona: hipertrofia del soma celular, desplazamiento del núcleo a una posición excéntrica y la disolución de los cuerpos de Nissl (cromatólisis). Posteriormente las células de Schwann mielinizantes distales a la lesión dejan de formar la vaina de mielina. Estas células de Schwann luego proliferan dentro de sus tubos de lámina basal, producen citocinas/ factores tróficos y fagocitan los desechos desprendidos. 3. Una semana después de la lesión, las citoquinas producidas por las células de Schwann y los axones lesionados activan a los macrófagos residentes y llevan al reclutamiento de macrófagos desde la circulación sanguínea. Los macrófagos activados fagocitan la mielina dañada y los restos del axón, a la vez que producen factores que facilitan la migración de las células de Schwann y la regeneración del axón. 4. Después de un período de retraso, los axones lesionados forman un cono de crecimiento y comienzan a regenerarse a lo largo de las bandas de Büngner formadas por las células de Schwann. Estos tubos proporcionan un entorno de

crecimiento permisivo y guían a los axones en crecimiento hacia posibles objetivos periféricos. Las células de Schwann que han estado crónicamente separadas de un axón (durante algunos meses) son menos propensas a respaldar el crecimiento y es más probable que sufran apoptosis. 5. Si el axón puede atravesar el sitio de lesión y su entorno favorece su crecimiento a lo largo de todo el muñón distal, entonces el axón puede conectarse con objetivos periféricos. Aunque las células de Schwann mielinizantes vuelven a mielinizar la porción regenerada del axón, la mielina es más delgada y la longitud nodal es más corta que en la porción no lesionada del axón. Imagen adaptada de Gaudet et al., 2011 ²⁰³.

Principales células involucradas en la degeneración Walleriana

Un proceso de degeneración Walleriana exitoso depende de varios tipos celulares y de la interacción entre ellos. Casi inmediatamente después de la lesión traumática del nervio periférico, las células de Schwann se disocian de los axones, se desdiferencian y junto con los fibroblastos, secretan citoquinas que promueven la infiltración de las células del sistema inmune desde la circulación sanguínea. Los neutrófilos constituyen el primer tipo celular inmune en infiltrarse al tejido dañado, acumulándose en el tejido dañado dentro de las 8 horas luego de la lesión y alcanzando un máximo luego de las 24 horas²⁰⁴. Su presencia en el tejido es de corta duración, fagocitan brevemente los desechos luego de ingresar al tejido y rápidamente comienzan el proceso de apoptosis²⁰⁵. A pesar de que no se ha demostrado directamente el rol de los neutrófilos en la fagocitosis de mielina luego de una lesión de nervio periférico, este tipo celular se caracteriza por la capacidad elevada de fagocitar patógenos y utilizar enzimas hidrolíticas para digerir y eliminar desechos extraños^{206,207}. Se ha demostrado que la presencia de este tipo celular es fundamental para promover una correcta limpieza de la mielina luego de la lesión, en parte debido a su rol en la secreción de citoquinas y quimioquinas que favorecen la infiltración de macrófagos al sitio de la lesión y promueven un cambio fenotípico en los macrófagos que es fundamental para la fagocitosis y limpieza de la mielina del tejido nervioso dañado²⁰⁴.

En cuestión de días, los macrófagos derivados de la médula ósea se convierten en la población inmune predominante en el tejido dañado y en el segmento distal del nervio lesionado. En este proceso de reclutamiento está involucrada la proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 o CCL2) producida y secretada por las células de Schwann luego de la lesión²⁰⁸. Estos macrófagos además de limpiar el tejido de restos de mielina y células dañadas, también rescatan el preciado colesterol de la mielina y producen apolipoproteína E (ApoE)^{209,210}. A su vez, los macrófagos producen factores que promueven aún más la proliferación de células de Schwann^{209,211} desempeñando un rol fundamental en garantizar una exitosa degeneración Walleriana. Estos macrófagos permanecen en el nervio lesionado durante días o meses,

emigrando luego a los órganos linfáticos a través de la circulación o muriendo por apoptosis^{212,213}. A pesar de que los macrófagos tienen un rol fundamental en la fagocitosis de mielina luego de la lesión, las células de Schwann también son responsables de este proceso²¹⁴. La limpieza de los restos de mielina luego de una lesión en el nervio periférico comienza de 3 a 4 días después de la lesión y finaliza en un rango de 12 a 14 días en ratones²¹⁵.

Citoquinas y quimioquinas en la degeneración Walleriana

Los resultados que muestran la expresión de citoquinas luego de una lesión por aplastamiento del nervio periférico no han sido concluyentes. Por un lado, se ha planteado que la expresión de TNF α y TGF- β es bifásica, alcanzando el primer pico al día luego de la lesión y el segundo pico de expresión a los 7 días luego de la lesión²¹⁶. Por otro lado, otros estudios sugieren una fase única de inducción que alcanza su punto máximo al día de la lesión de TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-10²¹⁷.

Resulta relevante caracterizar los perfiles de producción de citoquinas durante la primera y segunda fase de la degeneración Walleriana, es decir antes y luego del reclutamiento de macrófagos. La primera fase se caracteriza por la producción de las citoquinas inflamatorias TNF α , IL-1 α , IL-1 β , GM-CSF e IL-6, mientras que la segunda fase se caracteriza por la producción de IL-10, IL-6 y por la reducción en la producción de TNF α e IL-1 β . Por tanto, la primera fase es mayoritariamente inflamatoria y la segunda predominantemente anti-inflamatoria.

La quimioquina MCP-1 (conocida también como CCL2, ligando de motivo C-C 2) y MIP-1a (proteína inflamatoria de macrófagos-1a; conocida también como CCL3) promueven la migración de monocitos en la sangre hacia los tejidos a través del endotelio de los vasos sanguíneos^{213,218}. La producción de CCL2 es inducida por TNF α e IL-1 β producido por las células de Schwann, en parte mediante la señalización a través de los receptores TLR (receptores tipo toll)²¹⁹. Estos eventos se correlacionan aún más con la aparición y la dinámica de reclutamiento de macrófagos al nervio lesionado, promovido por CCL2. En tejidos no neuronales, se ha sugerido que la producción de CCL2 es dependiente de la producción de IL-6 por fibroblastos²²⁰ y de TNF α e IL-1 β por células endoteliales²²¹. El reclutamiento de macrófagos también es promovido por CCL3²²². Estudios en tumores de células de Schwann y tejidos no neurales sugieren que las células de Schwann, los fibroblastos, las células endoteliales y los macrófagos pueden producir CCL3 tras la activación por TNF α , IL-1 α e IL-1 β ²²⁰⁻²²².

Degradación de la mielina durante la degeneración Walleriana

Se ha sugerido que la capacidad de recuperación y regeneración superior del SNP en comparación con el SNC puede explicarse, al menos en parte, por su mayor eficiencia en la eliminación de los restos de mielina, lo que permite una mejor regeneración de los axones y por lo tanto una mejor recuperación de las funciones luego de una lesión^{219,223,224}. En el SNC, los fragmentos de mielina pueden persistir en el sitio de una lesión del SNC durante meses o incluso años, donde inhiben los mecanismos de reparación esenciales²²⁵, mientras que en el SNP, los restos de mielina son eliminados del tejido nervioso una vez culminado el proceso de degeneración Walleriana. Es por esto que resulta relevante conocer los mecanismos que subyacen en las diferencias entre el SNP y el SNC en cuanto a la limpieza del tejido dañado luego de una lesión.

La remoción de los restos de mielina es fundamental para la reparación del tejido nervioso, ya que la mielina contiene moléculas que son fuertemente inhibitorias de la regeneración axonal²²⁶⁻²³⁰, en particular la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) es un fuerte inhibidor del crecimiento axonal *in vitro*^{227,228,230}.

La rápida eliminación de la mielina dañada también es fundamental para evitar el daño a los axones intactos en el caso de una lesión parcial. La mielina dañada puede activar el sistema del complemento para producir complejos de ataque a la membrana que dañan a las fibras nerviosas intactas adyacentes²³¹⁻²³³. Por lo tanto, la rápida eliminación de la mielina dañada puede impedir la producción de complejos de ataque a la membrana y el daño que estos causan. A pesar de esto, cabe señalar que la activación del complemento también tiene efectos beneficiosos en el proceso de degeneración Walleriana, ya que promueve el reclutamiento de macrófagos y la fagocitosis de la mielina dañada, promoviendo una rápida limpieza del tejido nervioso dañado.

Los factores que se han demostrado que cumplen un rol en mediar la fagocitosis de mielina degenerada son variados y dependen del tipo celular y del contexto inflamatorio. En macrófagos, se ha sugerido que el receptor del complemento 3 (CR3) y el receptor de tipo scavenger AI/II (SRA-AI/II) median la fagocitosis de la mielina degenerada por los macrófagos luego de una lesión traumática^{209,234}. Recientemente, también se ha sugerido un papel para el receptor FcγR y anticuerpos anti-mielina endógenos²³⁵. Cabe destacar que CR3 y SRA están involucrados de

manera similar en la fagocitosis de mielina por la microglía del SNC. Además del sistema del complemento, las citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y la interleuquina-1 β (IL-1 β), que se producen durante la degeneración Walleriana, también aumentan la fagocitosis de mielina por parte de los macrófagos²³⁶. Otra molécula que ha sido implicada con la activación de la fagocitosis de la mielina, tanto en macrófagos como células de Schwann es la Galectina-3 (previamente llamada MAC-2). Se ha observado que el curso temporal de la expresión de Galectina-3 y la dinámica de fagocitosis de mielina se correlacionan tanto en el SNC como en el SNP.

Regeneración luego de una lesión traumática de nervio periférico

A la vez que ocurre el proceso de degeneración Walleriana, comienza la regeneración axonal a medida que se limpia el tejido de los restos celulares. A pesar de que puede ocurrir la reinervación por la ramificación colateral de axones intactos, la gran mayoría de la recuperación depende de la regeneración de los axones dañados²³⁷. El proceso de reinervación por la formación de colaterales es poco frecuente y genera pérdida de especificidad motora, ya que una sola fibra nerviosa tiene bajo control a más fibras musculares de las que tenía previamente²³⁸. Por lo tanto, el mecanismo que promueve una mejor recuperación de las funciones luego de la lesión es la regeneración axonal. Un factor determinante en la capacidad de regeneración es la distancia al cuerpo neuronal. Cuanto más distal es la lesión al cuerpo de la neurona, más probable es que se regenere exitosamente, mientras que en las lesiones más proximales al soma, a menudo comienzan el proceso de muerte celular programada.

Los cambios en la expresión en las neuronas hacia un estado regenerativo ocurren en simultáneo con los eventos de la degeneración Walleriana. En el segmento proximal del axón dañado se forma un cono de crecimiento, que consiste en una estructura que guía la regeneración hacia su órgano diana. Se ha encontrado que el calcio tiene un rol importante en para promover la formación de conos de crecimiento en el segmento proximal del nervio lesionado²³⁹. La movilidad del cono de crecimiento depende de la presencia de receptores en su membrana y está determinada por un proceso denominado neurotropismo, en el cual la estructura puede ser atraída o repelida mediante moléculas solubles o a través del contacto con la matriz extracelular^{240,241}. Dentro de este grupo de moléculas guías se encuentran las semaforinas, efrinas y netrinas. Mientras que por otro lado, hay moléculas inhibitorias como la colapsina-1 que

promueven el colapso del cono de crecimiento, guiando de forma inhibitoria el crecimiento axonal²⁴².

Otro grupo de moléculas muy relevantes en la regeneración del nervio periférico luego de una lesión son los factores neurotróficos producidos por las células de Schwann y los fibroblastos. Los factores neurotróficos son péptidos que regulan la supervivencia neuronal, el crecimiento de axones y la formación de sinapsis durante el desarrollo normal, pero también después de una lesión. Dentro de los factores neurotróficos, se encuentra la familia de las neurotrofinas, que consiste en el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la neurotrofina-3 (NT-3) y neurotrofina-4/5 (NT-4/5)²⁴³⁻²⁴⁵. La expresión de NGF aumenta de modo bifásico en el lugar de la lesión y en el segmento distal del nervio lesionado. El primer pico ocurre a las horas luego de la lesión, mientras que el segundo de 2 a 3 días luego de la lesión. Las principales citoquinas mencionadas previamente presentes durante la degeneración Walleriana, como IL-1 α , IL-1 β y TNF- α promueven un aumento en la expresión de NGF en los fibroblastos, pero no en las células de Schwann. Interesantemente, el aumento en la expresión de ARNm de NGF y la producción de la proteína se correlaciona en parte, ya que el aumento a nivel de proteína se observa únicamente en el segundo pico de expresión del ARNm de NGF²⁴⁴. En las lesiones por aplastamiento, el aumento en la expresión es transitoria, sugiriendo que los axones que se regeneran luego del aplastamiento inhiben la expresión de NGF²⁴³. A su vez, la IL-6, además de tener propiedades moduladoras del sistema inmune innato, también tiene propiedades neurotróficas al promover la supervivencia neuronal y el crecimiento axonal²⁴⁶.

Además de ser la principal fuente de factores neurotróficos²⁴⁷, las células de Schwann desdiferenciadas proliferan dentro de los tubos endoneurales formados en la matriz extracelular. Estos tubos huecos, que se conocen como las bandas de Büngner, proporcionan un camino para que el axón en regeneración vuelva a crecer²⁴⁸. Además, las células de Schwann producen factores que se incorporan a la matriz extracelular, como ser la fibronectina y la laminina, fundamentales para el crecimiento axonal ya que los conos de crecimiento utilizan estas proteínas para la adhesión a la lámina basal de los tubos endoneurales²⁴⁹.

Inmunorreceptores en la degeneración Walleriana

Los procesos detallados previamente evidencian un rol fundamental del sistema inmune en el desarrollo de la degeneración Walleriana y en la regeneración luego de una lesión de nervio periférico. Una respuesta inmune deficiente durante la degeneración Walleriana tiene consecuencias detrimentales muy importantes en la recuperación luego de una lesión traumática de nervio periférico, por lo cual es fundamental comprender los mecanismos que son determinantes en el control de estas respuestas inflamatorias en el SNP. Dentro de estos mecanismos, los inmunorreceptores han sido ampliamente estudiados en el contexto de estos procesos, ya que la amplia variedad de estos receptores expresados por las células que participan en las respuestas frente al daño, son determinantes en el control del fenotipo y función de estas células, y por lo tanto cumplen un rol fundamental en la degeneración Walleriana.

Dentro de los estudios de los diferentes inmunorreceptores en contextos de lesión al SNP, varios trabajos han demostrado que uno de los principales mecanismos por los que las células de Schwann y las células del sistema inmune detectan la lesión de los axones cercanos, es a través de los receptores de tipo Toll (TLR)²⁵⁰. Estos receptores han sido implicados en el reconocimiento del daño tisular a través de la unión a ligandos endógenos que normalmente no están presentes en el medio extracelular. Ejemplos de estos ligandos son las proteínas de choque térmico²⁵¹, ARNm²⁵² y componentes degradados de la matriz extracelular²⁵³. Las células de Schwann expresan constitutivamente una variedad de TLR, como el TLR3, TLR4 y TLR7. La expresión de estos TLR sugiere que las células de Schwann desempeñan un rol de 'centinela' en el SNP, inspeccionando el microambiente a su alrededor para detectar daños en el tejido. Muchos de los cambios que ocurren luego de una lesión traumática de nervio periférico como la activación de factores de transcripción, expresión de citoquinas y la progresión de la degeneración Walleriana y recuperación funcional son dependientes de los TLR presentes en las células de Schwann. Se ha demostrado *in vitro*, que la expresión de los principales mediadores inflamatorios de la degeneración Walleriana como el TNF- α , iNOS y CCL2, dependen de la activación en de TLR2, TLR3 y TLR4 en las células de Schwann^{254,255}. Por lo tanto, se ha sugerido que ligandos de TLR endógenos liberados por los axones en degeneración, se unen a los TLR presentes en las células

de Schwann y las células inmunitarias, lo que lleva a la activación de cascadas inflamatorias que pueden ser esenciales para promover la regeneración de axones.

Previamente, en nuestro grupo de investigación evidenciamos un importante rol del inmunorreceptor CD300f en la regulación de la inflamación durante la degeneración Walleriana luego de una lesión de nervio ciático⁸². Este receptor, que se ha demostrado que tiene una actividad dual tanto activadora como inhibidora de las células inmunes, participa en el control de la infiltración de macrófagos en el tejido lesionado limitando su entrada, así como también regulando el fenotipo de estas células. Este control de la respuesta inflamatoria por parte de CD300f es fundamental para la regeneración del tejido y la reinervación de los tejidos blancos, favoreciendo una recuperación exitosa luego de la lesión.

Uno de los receptores inmunes inhibitorios que también ha sido ampliamente estudiado en el contexto de la respuesta inmune durante el proceso de degeneración Walleriana es SIRP α ²⁵⁶⁻²⁵⁹. La activación de SIRP α en las células mieloides tras la unión con el ligando CD47 promueve una disminución de la fagocitosis en estas células, por lo que se plantea que CD47 actúa como una señal que indica "no me comas". El ligando CD47 es expresado por las células de Schwann mielinizantes y en los oligodendrocitos (en el SNC), es decir que CD47 está presente en la mielina tanto en el SNC como en el SNP en condiciones normales protegiendo a la mielina de la fagocitosis por parte de los macrófagos y microglia⁷⁶. Sin embargo, este mecanismo puede representar un obstáculo cuando la mielina dañada debe ser eliminada rápidamente durante la degeneración Walleriana²⁶⁰⁻²⁶². Recientemente, se ha sugerido que la eliminación de SIRP α en las células mieloides favorece una limpieza de mielina más rápida y eficiente, lo que promueve una mejor recuperación luego de una lesión traumática de nervio periférico y podría ser utilizado como base para el desarrollo de estrategias terapéuticas que favorezcan la recuperación²⁶³.

Dentro de este grupo de receptores inmunes inhibitorios también se encuentra el receptor CD200R1. Previo al presente trabajo, un estudio evidenció la presencia de CD200 en el tejido de nervio ciático sin lesionar y luego de una lesión por aplastamiento, sugiriendo un posible rol de la interacción entre CD200 y CD200R1 en el proceso de degeneración Walleriana y en la recuperación luego de una lesión traumática de nervio periférico¹⁴⁷. En este estudio, a través de inmunohistoquímica de tejido de nervio ciático de rata, el cual está compuesto principalmente por fibras nerviosas mielínicas y amielínicas, demostraron la presencia de CD200 principalmente en los nodos de Ranvier y en las incisuras de Schmidt-Lanterman y en menor medida en el

neurilema, que constituye la porción de citoplasma más externa de las células de Schwann mielinizantes (Figura 13 A). Interesantemente, observaron que en un nervio parasimpático, que consiste principalmente en fibras no mielínicas, prácticamente todas las fibras nerviosas presentaron una marca intensa para CD200 (Figura 13 B). A su vez, observaron que a los 7 días luego de una lesión por aplastamiento, la presencia de CD200 en el tejido de nervio ciático lesionado disminuye principalmente en el sitio de la lesión y en el segmento distal del nervio lesionado (Figura 13 C-E).

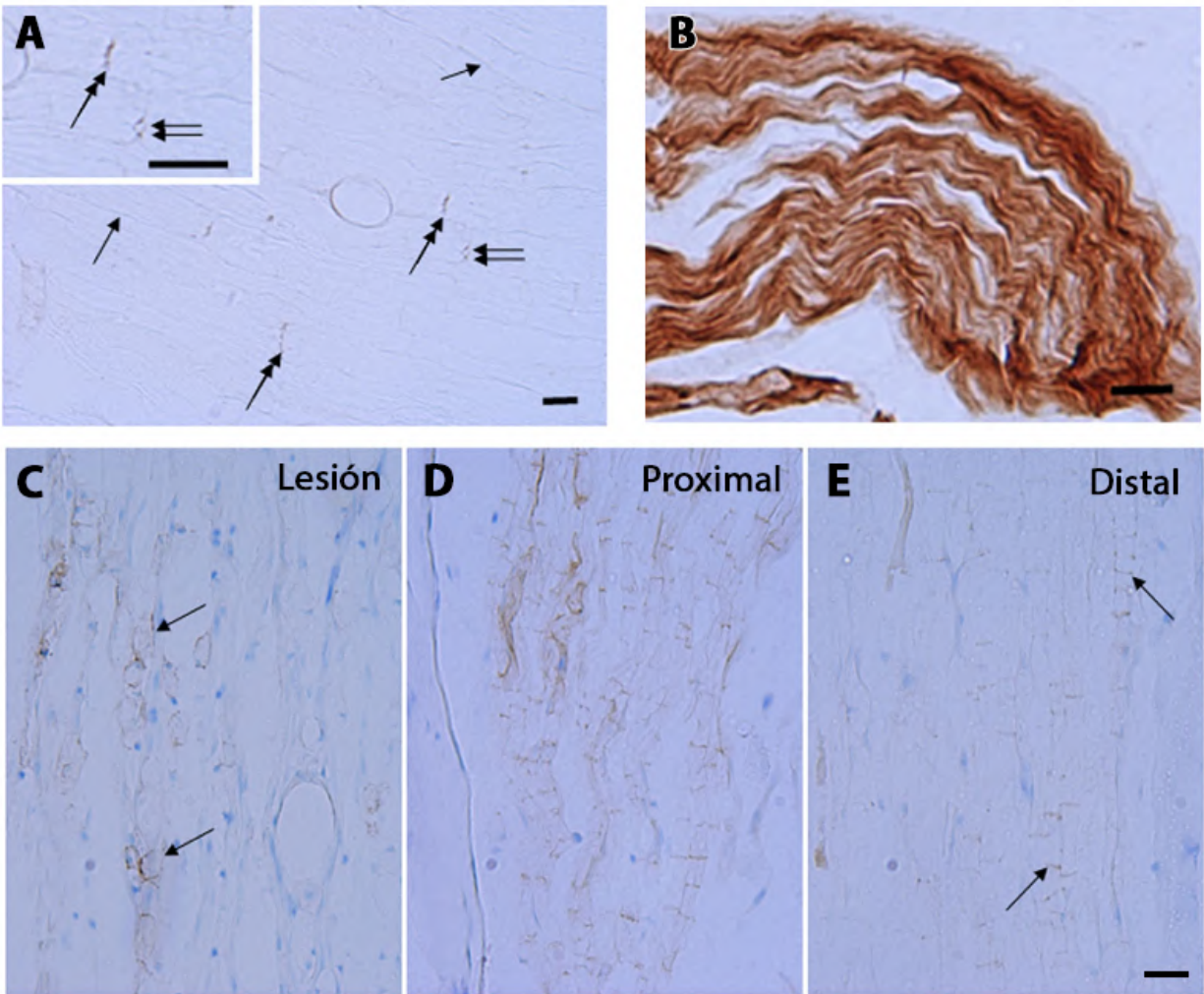


Figura 13. Expresión de CD200 en nervios periféricos de rata en condiciones normales. **(A)** inmunohistoquímica para CD200 en una sección longitudinal nervio ciático, en la que se evidencia la presencia de CD200 en el neurilema (flechas simples), en los nodos de Ranvier (flechas dobles) y en las incisuras de Schmidt-Lanterman (flechas con doble punta). **(B)** inmunohistoquímica para CD200 en tejido de nervio parasimpático post-ganglionar, compuesto predominantemente por fibras amielínicas, en donde se observa una marca más intensa. **(C-E)**: después de lesión se modifica el patrón de expresión en el nervio ciático, disminuyendo la inmunorreactividad para CD200 en el tejido. **(C)** en el sitio de la lesión se

observan algunas estructuras ovals vacuoladas que expresan CD200 (flechas). (D) en el segmento proximal se observa un aumento en el número de incisuras de Schmidt-Lanterman positivas para CD200. E: en el segmento distal se observa una disminución en la inmunorreactividad a CD200 en el muñón distal, mientras que algunas fibras de pequeño diámetro muestran un aumento en las incisuras de Schmidt-Lanterman (flechas) que son positivas para CD200. Barra de calibración: 20 µm. Imagen adaptada de Chang et al., 2011 ¹⁴⁷.

Este trabajo pone en evidencia la presencia del ligando de CD200R1, CD200, en el tejido nervioso periférico y su regulación luego de una lesión traumática, sugiriendo entonces un posible rol de esta interacción en la homeostasis en el SNP y en el proceso de degeneración Walleriana. Sin embargo, este trabajo no analiza el rol específico del receptor CD200R1, ya que se analiza únicamente la expresión del ligando CD200. Por lo tanto, es relevante estudiar en particular el rol de este receptor tanto en homeostasis como en los procesos que siguen a una lesión de nervio periférico.

Lesión de médula espinal

Generalidades de las lesiones de médula espinal

Las lesiones traumáticas al SNC, entre las que se encuentran las lesiones cerebrales traumáticas y las lesiones de médula espinal están siendo reconocidas progresivamente como prioridades mundiales de salud. Estas lesiones no solo resultan en pérdida de salud y discapacidad para las personas y sus familias, sino que también representan una carga para los sistemas de atención médica y las economías debido a los altos costos de atención médica y la pérdida de productividad. Las lesiones traumáticas de médula espinal no solo conducen a una posible discapacidad grave, sino que también pueden causar disfunciones de muchos órganos, incluidos el sistema respiratorio, gastrointestinal, urinario, así como también la piel, los huesos y las articulaciones²⁶⁴. La afectación de múltiples sistemas puede provocar trastornos del movimiento, complicaciones graves y una alta tasa de mortalidad tanto en la fase aguda como en la crónica. El alcance de la parálisis y la pérdida de funciones luego de una lesión dependen del segmento de la médula espinal lesionado. Los déficits neurológicos en humanos se evalúan con una puntuación denominada ASIA ²⁶⁵.

Los datos más recientes sobre la incidencia y prevalencia de lesiones de médula espinal indican que en 2016, a nivel global, 27 millones de personas padecen de una lesión de médula espinal y hay aproximadamente 930.000 nuevos casos de lesiones de médula espinal por año. En Uruguay, la tasa de nuevos casos reportada para 2016 se estimó en 19 casos cada 100.000 habitantes (Figura 14 A), constituyendo uno de los valores de incidencia más altos de la región. Esto tiene un fuerte impacto sobre la calidad de vida de las personas que padecen estas lesiones, e impone una fuerte carga económica a los países, con altos costos asociados al cuidado primario de los pacientes y a la pérdida de productividad ²⁶⁶.

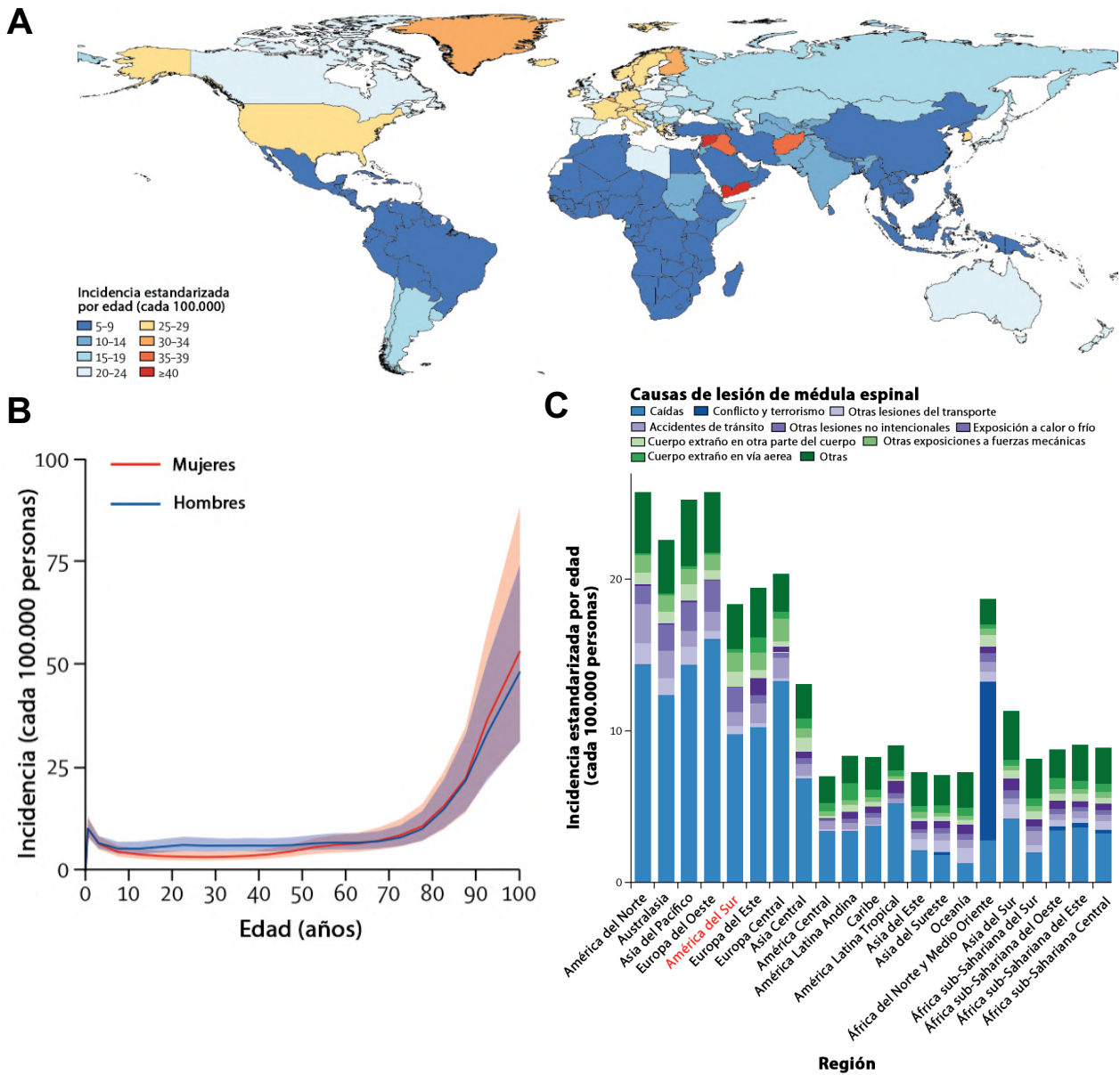


Figura 14. Incidencia y principales causas de las lesiones traumáticas de médula espinal a nivel global. (A) distribución global de la incidencia de lesiones traumáticas de médula espinal estandarizado por edad cada 100.000 habitantes en 2016. Se muestran los datos de ambos sexos en conjunto. Uruguay se encuentra entre los países de latinoamérica con mayor incidencia de lesiones de médula espinal con 19 nuevos casos por año cada 100.000 habitantes reportados en 2016. **(B)** incidencia global de las lesiones traumáticas de médula espinal por debajo del cuello, en función de la edad en mujeres (rojo) y hombres (azul). Se observa una incidencia creciente en las lesiones a partir de los 70 años, tanto en mujeres como en hombres, principalmente a causa de caídas. **(C)** incidencia de las lesiones traumáticas agrupadas por la causa de la lesión para diferentes regiones del mundo. En América del Sur las principales causas de las lesiones de médula espinal son las caídas y accidentes de tránsito. Imagen adaptada de James et al., 2019²⁶⁶.

En la Figura 14 B se observa los valores de incidencia de lesiones de médula espinal a nivel global evaluados según la edad y el sexo. Este estudio permite evidenciar una mayor incidencia en personas mayores a 70 años, tanto en hombres como mujeres. Sin embargo, en jóvenes de 20 a 30 años, se observa una mayor incidencia en hombres que en mujeres. Las causas que generan lesiones traumáticas de médula son muy variadas y difieren en las diferentes regiones y países, como se observa en la Figura 14 C. En nuestra región, así como en la mayoría de otras regiones y a nivel global, la principal causa de lesiones de médula espinal son las caídas, lo cual explica una mayor incidencia en personas mayores a 70 años. En segundo lugar, se encuentran los accidentes de tránsito como una de las principales causas de las lesiones de médula espinal²⁶⁶.

Actualmente no existen tratamientos efectivos que promuevan la recuperación de funciones perdidas luego de una lesión de médula espinal, y por lo tanto la prevención es el único mecanismo por el cual se puede lograr una disminución en la carga global generada por las lesiones de médula espinal²⁶⁵. Teniendo en cuenta las dificultades que se han tenido al trasladar terapias que demostraron ser eficientes en modelos preclínicos al uso en humanos, resulta especialmente importante estudiar en mayor detalle los mecanismos que subyacen a los procesos fisiopatológicos luego de una lesión de médula espinal para el desarrollo de estrategias terapéuticas que permitan la recuperación de las funciones perdidas luego de una lesión traumática. En este contexto, a su vez, es interesante comprender y comparar los mecanismos que se desarrollan luego de una lesión al SNP y que llevan a una recuperación exitosa, con los mecanismos que ocurren luego de una lesión al SNC.

Modelos murinos experimentales de lesión de médula espinal

La mayoría de las formas de lesiones de la médula espinal observadas en humanos pueden replicarse en modelos murinos, que incluyen lesiones completas e incompletas a diferentes niveles o segmentos de la médula espinal^{267,268}. Estos modelos varían principalmente en el lugar de lesión y el mecanismo de lesión, teniendo cada uno sus ventajas y desventajas, por lo que hay que tener en cuenta el aspecto de las lesiones de médula espinal a ser estudiado al momento de elegir el modelo experimental. En cuanto a las lesiones a nivel cervical, numerosos argumentos éticos y médicos limitan el uso de lesiones bilaterales debido a que estas lesiones paralizan tanto las extremidades anteriores como las posteriores, generando diversas complicaciones postoperatorias, por lo que se sugiere el uso de lesiones unilaterales en el caso

de que sean a nivel cervical²⁶⁹. A niveles torácicos bajos, la lesión de la médula espinal causa parálisis de las extremidades posteriores y el correspondiente deterioro de las funciones sensoriales y del sistema autónomo. Los animales con lesiones torácicas pueden movilizarse utilizando sus extremidades anteriores, por lo que los pueden estudiarse durante varios meses después de la lesión, siempre que se realice el vaciado asistido de la vejiga durante el tiempo que sea necesario y que se lleven a cabo los cuidados correspondientes, como el tratamiento de infecciones urinarias y lesiones cutáneas. Las lesiones en la médula espinal lumbar o sacra suelen causar síntomas que se restringen a la cola, por lo que su uso es limitado. A pesar de que la mayor parte de las lesiones en humanos ocurren a nivel cervical²⁷⁰, muchos experimentos que demuestran principios básicos, como por ejemplo la respuesta inflamatoria en la médula, las lesiones a niveles inferiores suelen ser suficientes. El modelo de lesión a nivel cervical generalmente se usa para evaluaciones preclínicas avanzadas, cuando la eficacia de una terapia ha sido previamente demostrada en lesiones de nivel inferior, o para evaluar funciones específicas controladas a nivel cervical, como la función respiratoria, las extremidades superiores y las funciones motoras más finas de las manos²⁶⁹.

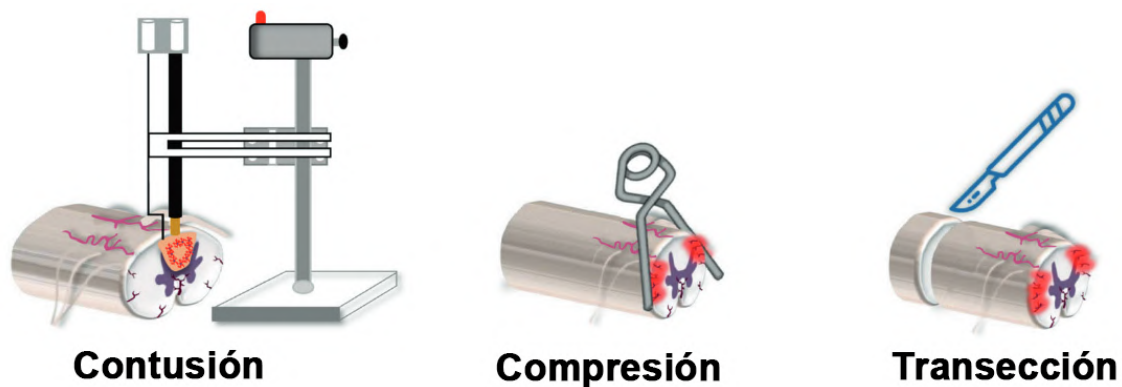


Figura 15. Principales modelos experimentales murinos de lesión de médula espinal utilizados actualmente: contusión, compresión y transección. Imagen adaptada de Fan et al., 2022²⁷¹.

Según el mecanismo de lesión, los modelos de lesión de médula espinal se pueden clasificar en contusión, compresión, tracción, luxación, transección o químicos (se muestran los tres modelos más utilizados en la Figura 15). Los modelos de contusión, en los que se aplica una fuerza transitoria para desplazar y dañar la médula espinal, incluyen dispositivos de caída de peso, electromagnéticos y de presión de aire. Los modelos de compresión se caracterizan por la compresión de la médula espinal durante un período prolongado. Los modelos de tracción

aplican fuerzas opuestas para estirar la médula espinal, mientras que los modelos de luxación causan lesiones mediante el desplazamiento lateral de las vértebras. La transección implica la sección parcial o completa de la médula espinal en un nivel particular, y una de las principales ventajas es que puede ser utilizado para evaluar la regeneración a través del área lesionada, a diferencia de los modelos de contusión y compresión. Finalmente, los modelos mediados químicamente buscan replicar y acentuar algunos procesos del daño secundario, como la isquemia o la pérdida de mielina. Las lesiones de la médula espinal en humanos suelen ser causadas por caídas u otras formas de impacto físico que aplastan el canal óseo y comprimen la médula espinal. Por lo tanto, los modelos experimentales más utilizados consisten en exponer la médula espinal por medio de una laminectomía, donde se quita parte de la vértebra y luego somete la médula espinal expuesta a una compresión o una contusión²⁷². Las lesiones por contusión históricamente se han realizado por medio de un dispositivo que deja caer un peso sobre la médula espinal²⁷³, pero más recientemente se realizan por medio de un pistón controlado por computadora que golpea la médula espinal con una fuerza precisa, produciendo resultados más reproducibles²⁷⁴. Una de las principales limitaciones que se han planteado en cuanto al uso de modelos murinos de lesión de médula espinal en comparación con las lesiones en humanos, es la diferencia anatómica de los tractos de fibras espinales entre humanos y ratas y ratones²⁷⁵, por lo que se ha planteado que puede estar en la base de algunas de las diferencias observadas en la recuperación luego de la lesión entre humanos y ratas y ratones²⁶⁸. Se ha sugerido que estas diferencias pueden estar en la base de los numerosos casos de tratamientos que han demostrado efectividad en modelos preclínicos, pero han fallado en demostrar un efecto sobre la recuperación de las funciones luego de una lesión. También se ha sugerido que las distancias más largas que deben recorrer los axones en humanos en comparación con los modelos murinos puede ser otra diferencia fundamental que influya en este aspecto²⁶⁸. Sin embargo, estos modelos experimentales han demostrado ser de gran utilidad para comprender los procesos y mecanismos que ocurren luego de una lesión de médula espinal y que determinan la propagación del área dañada y la pérdida de las funciones.

Propagación del daño secundario luego de una contusión medular

Un daño físico agudo en la médula espinal desencadena una serie de eventos que propaga el área de daño inicial, denominada daño primario, hacia una mayor extensión de daño tisular determinado por una serie de factores que transcurren en un lapso de semanas a meses.

Inicialmente, un trauma inicial mecánico puede generar la muerte de los diferentes tipos celulares presentes en el tejido nervioso, lo que desencadena una cascada de mecanismos que activamente propagan el daño hacia el tejido adyacente (Figura 16)²⁷⁶. Este proceso activo por el cual se propaga el daño se conoce como daño secundario, y muchas estrategias terapéuticas que están siendo estudiadas para promover la recuperación luego de una lesión se enfocan en limitar la propagación del daño secundario con el fin de preservar el tejido nervioso que no fue afectado por el trauma inicial. Los factores que contribuyen y determinan la extensión del daño secundario son variados, entre ellos se encuentran la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno a causa de una disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad y alteraciones en la irrigación sanguínea por hemorragia e isquemia. Sin embargo, se ha destacado a la respuesta inflamatoria como uno de los principales componentes determinantes de la extensión del daño secundario y por lo tanto, gran parte del esfuerzo se ha centrado en comprender los mecanismos que subyacen a esta respuesta inflamatoria para desarrollar estrategias terapéuticas que modulen esta respuesta¹³.

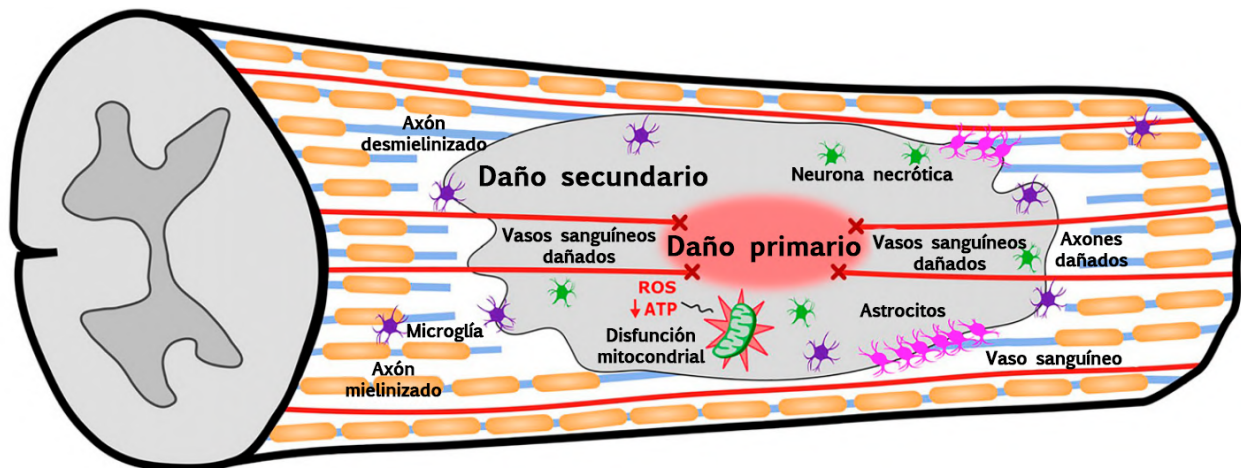


Figura 16. Procesos involucrados en la propagación del daño al tejido nervioso luego de una lesión de médula espinal. El alcance del daño después de una lesión de médula espinal es una combinación del daño físico inicial (daño primario) y una serie de procesos que conforman el daño secundario y que promueven la propagación del área de tejido nervioso dañado luego de la lesión. La lesión primaria genera un daño en la vascularización de la médula espinal, reduciendo la entrega local de oxígeno, lo que disminuye la función mitocondrial y la síntesis de ATP, a la vez que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Durante el daño secundario ocurre la muerte neuronal, desmielinización y fragmentación axonal, reactividad microglial y formación de la cicatriz glial por parte de los astrocitos. Imagen adaptada de Scholpa et al., 2017²⁷⁶.

Respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal

Después de una lesión en la médula espinal, se desencadenan una serie de procesos inflamatorios en la zona afectada. Estos procesos implican la liberación de diversas citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, que atraen células del sistema inmune al sitio de la lesión. El propio daño físico, la entrada de estas células y el desarrollo de la respuesta inflamatoria afectan la integridad de la barrera hematoencefálica, la cual se ve alterada a las 3 horas posteriores a la lesión y permanece así hasta una semana después. Esta respuesta resulta de una compleja interacción entre numerosos tipos celulares, que establecen un diálogo para desarrollar la respuesta de manera coordinada. Dentro de esos tipos celulares se encuentran los diferentes tipos de células gliales y células del sistema inmune que ingresan desde la periferia (Figura 17). En ausencia de lesión, las células gliales apoyan la transmisión y función normal neuronal, manteniendo la homeostasis del tejido nervioso. Al presentar una alteración tan importante, estas células gliales adoptan nuevas funciones. Los astrocitos adoptan un nuevo fenotipo desarrollando lo que se conoce como astrogliosis, siendo más intensa y evidente en el tejido que rodea al sitio de la lesión, formando la cicatriz glial²⁷⁷. Esta cicatriz es el producto de la proliferación y migración de los astrocitos reactivos y se forma entre los 5 a 14 días post-lesión (dpi) en roedores, permaneciendo luego de manera crónica. La influencia de esta cicatriz en el desarrollo de la fisiopatología de la lesión de médula espinal es dual, ya que por un lado ayuda a restringir la propagación de componentes de la inflamación y células del sistema inmune hacia el tejido que no fue dañado, limitando la propagación del daño secundario. Sin embargo, por otro lado esta cicatriz genera un impedimento para el crecimiento axonal limitando la capacidad de regeneración y recuperación luego de la lesión²⁷⁸.

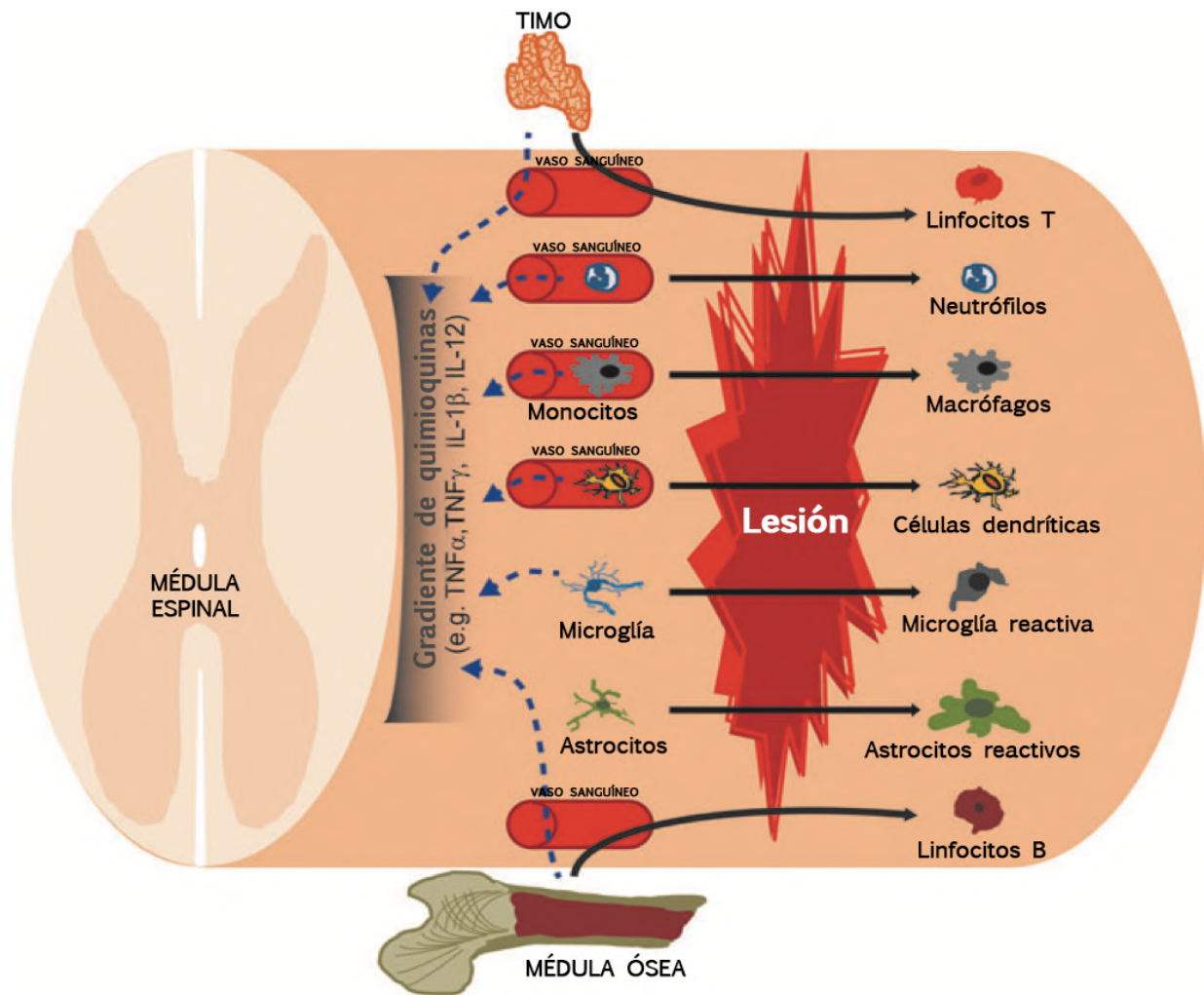


Figura 17. Respuestas de las principales células involucradas en la respuesta a una lesión de la médula espinal. Después de una lesión, la microglía y los astrocitos adquieren un fenotipo reactivo, mientras que el daño a los vasos sanguíneos y aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica permite la infiltración de neutrófilos, macrófagos y células dendríticas al tejido lesionado. La lesión en la médula espinal también promueve la migración de linfocitos B y T desde la médula ósea y el timo, respectivamente. La infiltración de leucocitos puede ocurrir a través de la trans migración a través de los vasos sanguíneos (flecha azul discontinua) en respuesta a un gradiente de quimioquinas con una alta concentración en el tejido de la médula espinal lesionada. Imagen adaptada de Bowes et al., 2014²⁷⁹.

Uno de los tipos celulares más relevantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria es la microglía, ya que a diferencia de lo que ocurre con las lesiones en el SNP, es la principal población del sistema inmune presente en el tejido nervioso al momento de la lesión, y por lo tanto es la encargada de orquestar la respuesta inflamatoria inicial^{134,35,280}. En presencia de una lesión, la microglía reconoce señales de daño tisular generadas por el impacto físico inicial,

adoptando un fenotipo reactivo e iniciando una serie de cambios morfológicos y funcionales. Este cambio fenotípico implica la disminución en la expresión de genes asociados al fenotipo homeostático de la microglía como Tmem119, SiglecH, P2ry12^{281,282}, comprometiendo las funciones normales que lleva a cabo este tipo celular para mantener la homeostasis del tejido nervioso. El fenotipo reactivo se asocia a un aumento en la fagocitosis y la expresión de citoquinas y quimioquinas³⁹. Luego de la lesión, el número de microglía en el tejido dañado aumenta progresivamente hasta la semana post-lesión y luego se mantiene en niveles elevados (Figura 18). Este aumento del número de microglía se debe a la proliferación de las células residentes en el tejido, así como también por la migración de estas células desde otras regiones de la médula espinal hacia el sitio lesionado^{283–285}.

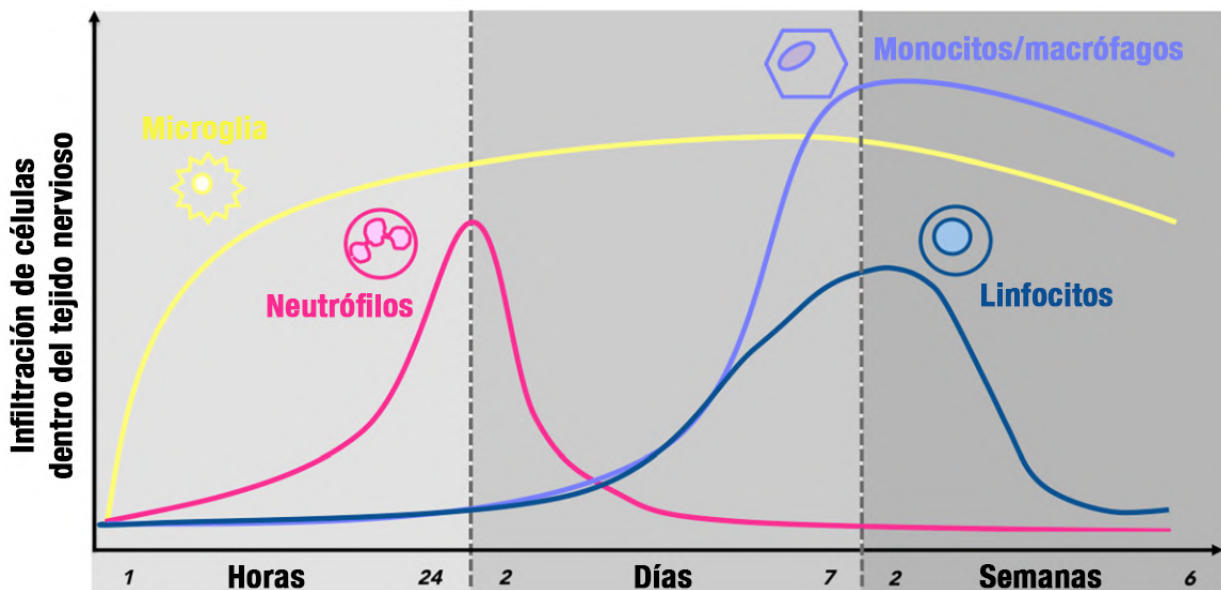


Figura 18. Dinámica temporal de las principales poblaciones del sistema inmune luego de un daño físico al SNC en ratones. Aumento del número de la microglía (en amarillo) residente e ingreso de leucocitos en circulación sanguínea al sitio de la lesión. El mayor número de neutrófilos (en rosado) se observan a las 24 horas post-lesión y disminuye rápidamente, mientras que los macrófagos (en celeste) y linfocitos (en azul) presentan un pico de ingreso a los 7 días post-lesión. Imagen adaptada de Neirinckx et al., 2014²⁸⁶.

El reclutamiento de las células inmunes al tejido lesionado ocurre de manera secuencial (Figura 18)²⁸⁶. Los neutrófilos constituyen la primera población celular inflamatoria en llegar al sitio de la lesión, alcanzando un número máximo de células a las 24 horas después de la lesión. Más

tardíamente ingresan al tejido nervioso lesionado los monocitos/macrófagos circulantes alcanzando un número máximo en el tejido a los 7 días luego de la lesión. Los linfocitos invaden progresivamente el sitio de la lesión, encontrándose en mayor número en el sitio de la lesión entre la primera y segunda semana luego de la lesión²⁸⁷.

Neutrófilos en la respuesta frente a una lesión de médula espinal

La activación de la microglía frente a las señales de daño promueve la liberación de citoquinas y quimioquinas que atraen a células del sistema inmune desde los tejidos periféricos hacia el área de tejido lesionado. La primera población celular en alcanzar un gran número en el tejido son los neutrófilos, al igual que ocurre con las respuestas inflamatorias en otros tejidos, al igual que como fue descrito previamente para el caso del nervio ciático. Los neutrófilos son reclutados desde el torrente sanguíneo y migran a través de barreras endoteliales para llegar al sitio lesionado, siendo altamente sensibles a señales quimiotácticas como CXCL1, IL-8, interferón-gamma, C5a y CXCL12^{288,289}. Una vez en el tejido lesionado secretan citocinas, liberan el contenido de sus gránulos citoplasmáticos, fagocitan restos celulares, favoreciendo la limpieza del tejido y el reclutamiento de otras células del sistema inmune²⁹⁰. Los neutrófilos suelen considerarse perjudiciales en el contexto de las lesiones traumáticas al SNC, ya que se acumulan en el tejido lesionado secretando proteasas y enzimas oxidativas, lo que promueve una mayor pérdida de tejido nervioso. Respaldando esta noción sobre el rol perjudicial de los neutrófilos, se ha propuesto que estas células poseen capacidad neurotóxica^{291,292}. Una menor acumulación de neutrófilos en la lesión se asoció con una reducción de citocinas proinflamatorias, una disminución de la apoptosis y el estrés oxidativo, y una recuperación motora significativa, lo que apoya esta noción negativa de los neutrófilos²⁹³.

Sin embargo, otros estudios sugieren un rol beneficioso de los neutrófilos en los procesos que ocurren luego de una lesión de médula espinal^{294,295}. Estos trabajos han demostrado que el agotamiento de los neutrófilos circulantes por la administración del anticuerpo bloqueante Gr1 empeora los déficits neurológicos después de una lesión de médula espinal en ratones y también conduce a una mayor expresión de citoquinas, como CXCL1, CCL2 y CCL9, y una mayor cicatrización del tejido²⁹⁵. A su vez, otros estudios sugieren que los neutrófilos podrían contribuir a la elaboración de un entorno adecuado para la regeneración axonal²⁹⁶. Por lo tanto, el rol de los neutrófilos en los procesos de lesión y reparación deben abordarse de manera más específica ya que hay cada vez más evidencia de que los neutrófilos también ejercen efectos beneficiosos

en el contexto de daño al SNC. Esto probablemente ocurra a través de la iniciación de la reparación tisular, lo que nos lleva a reevaluar el rol de los neutrófilos en los procesos que ocurren luego de una lesión de médula espinal.

Linfocitos en la respuesta frente a una lesión de médula espinal

La infiltración linfocítica al tejido dañado ocurre progresivamente durante la primera semana después de la lesión y se mantiene crónicamente²⁹⁷⁻²⁹⁹, a pesar de que el número de linfocitos reclutados en el sitio de la lesión es bajo en comparación con los otros tipos celulares del sistema inmune reclutados a la lesión. Aún no está del todo definida la contribución de los linfocitos a la progresión o a la resolución de los eventos fisiopatológicos en el lugar de la lesión. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado la participación de los linfocitos en los mecanismos inflamatorios que se desarrollan luego de una lesión de médula espinal. Se ha reportado una mejora en la recuperación funcional luego de la lesión en ratones que carecen de linfocitos B y T^{300,301}. En esta misma dirección, el tratamiento con Ciclosporina A y tacrolimus, los cuales son inhibidores de la proliferación de linfocitos T³⁰², se asoció con una mejora en la recuperación funcional y un aumento en la supervivencia de neuronas motoras en la médula espinal³⁰³⁻³⁰⁶. El tratamiento con estos fármacos redujo la infiltración de células T en el tejido nervioso dañado, a la misma vez que se observó una reducción en la activación de macrófagos, posiblemente debido a una menor producción de citoquinas por parte de los linfocitos T en el sitio de la lesión. Todos estos resultados sugieren un rol perjudicial en el desarrollo de los procesos fisiopatológicos que siguen a una lesión de médula espinal por parte de los linfocitos.

A su vez, se ha sugerido que los linfocitos son fundamentales en el desarrollo de un proceso que se ha denominado autoinmunidad inducida por trauma (AIT)^{307,308}. Estudios en humanos y en modelos animales han demostrado que el trauma activa un repertorio endógeno de linfocitos reactivos al SNC. La frecuencia de linfocitos T reactivos a proteínas de la mielina como la MBP, está aumentada en el suero de pacientes con lesión medular³⁰⁹⁻³¹¹, y también se ha observado que los pacientes con una lesión de médula espinal tienen niveles crónicamente elevados de autoanticuerpos en suero^{310,312,313}. El impacto patológico de la AIT no está del todo claro aún, ya que no se ha demostrado que los linfocitos autorreactivos sean responsables del desarrollo de enfermedades autoinmunitarias en individuos con lesión de médula espinal. Esto puede deberse a la inducción de mecanismos reguladores y reparadores que se activan de manera paralela con los mecanismos perjudiciales reportados. También es posible que los efectos perjudiciales de la AIT sean enmascarados por la manifestación de otros síntomas convergentes en el paciente con

lesión de médula espinal³¹⁴. Estos estudios ponen en evidencia que aún queda mucho por estudiar en cuanto al rol de los linfocitos en los mecanismos subyacentes a los problemas generados por las lesiones de médula espinal, y el potencial del desarrollo de estrategias que tengan como blanco estas poblaciones celulares para promover mejoras en la recuperación de las funciones luego de una lesión de médula espinal.

Macrófagos en la respuesta frente a una lesión de médula espinal

Luego de una lesión en la médula espinal, las señales como CCL2, provenientes de la microglía y otras células presentes en el sitio de la lesión, reclutan macrófagos derivados de monocitos desde la circulación hacia el parénquima lesionado³¹⁵. En las etapas más agudas de la lesión durante el primer día, la microglía es la principal encargada de fagocitar el material dañado³¹⁶. Cuando los macrófagos ingresan a la médula espinal lesionada de 2 a 3 días después de la lesión, comienzan a fagocitar axones y otros componentes dañados del tejido nervioso. Para el día 7 post-lesión cuando alcanzan su máximo número en el tejido lesionado, superan ampliamente a la microglía en la capacidad de fagocitosis de los componentes del tejido dañado³¹⁶. Se ha sugerido que los macrófagos derivados de monocitos están mucho más especializados en fagocitar tejido dañado en la médula espinal lesionada que la microglía. Se ha planteado que el rol principal de la microglía en las etapas sub-agudas de la lesión es intentar restaurar el tejido a la homeostasis normal y por lo tanto dejan la tarea de fagocitosis del tejido dañado y las células apoptóticas a los macrófagos derivados de monocitos³¹⁶. Trabajos *in vitro* evidenciaron que los macrófagos no responden de la misma manera a la fagocitosis de mielina, neutrófilos apoptóticos o de glóbulos rojos³¹⁷, por lo que se debe profundizar en el estudio de esta función celular en los macrófagos en diferentes situaciones y analizar el impacto sobre el desarrollo de los procesos fisiopatológicos luego de una lesión de médula espinal.

Además de su rol en la fagocitosis, los macrófagos presentan una variedad de funciones que son de gran relevancia en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en la regeneración luego de una lesión de médula espinal. Se ha planteado que los macrófagos que ingresan al tejido lesionado pueden promover tanto la propagación de la lesión, como la regeneración³¹⁸⁻³²¹. Estos efectos divergentes podrían atribuirse a diferentes subconjuntos de macrófagos y la activación de cascadas de señalización intracelular específicas, ya que la población de macrófagos derivados de monocitos que ingresan al tejido presenta gran heterogeneidad en sus funciones y fenotipos celulares.

Varios estudios han demostrado que la eliminación o la inhibición funcional de los macrófagos en las etapas agudas de la lesión es neuroprotectora y promueve la recuperación de las funciones^{318,319,321}. Se ha sugerido que la causa más probable es que la microglía y los monocitos recién reclutados se diferencian en macrófagos proinflamatorios M1 en los sitios de la lesión³²². Las células M1 se mantienen en los sitios de la lesión durante semanas después de la lesión, en parte porque los mecanismos de señalización proinflamatoria persisten de manera crónica en el tejido lesionado. Se ha sugerido que la respuesta polarizada hacia macrófagos tipo M1 luego de una lesión de médula espinal dificulta la recuperación funcional, en parte por la propagación de cascadas neurodegenerativas secundarias que promueven la retracción de axones³²³. Los mecanismos que median estos efectos negativos de los macrófagos M1 son variados, pero se ha propuesto que la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y de enzimas proteolíticas por parte de estas células son los principales mediadores de estos efectos negativos en el contexto de una lesión de médula espinal³²⁴. A pesar de esto, también se observa una respuesta de macrófagos con fenotipo asociado al M2 luego de una lesión de médula espinal en el sitio lesionado, pero ésta es de corta duración, encontrándose principalmente entre los 3 a 7 días posteriores a la lesión³²². Una característica fenotípica distintiva de los macrófagos M2 es la expresión aumentada del receptor de manosa (CD206)⁴³. CD206 se une a células apoptóticas y necróticas y facilita la eliminación sin desencadenar señales inflamatorias³²⁵. Teniendo en cuenta estas diferencias en los fenotipos de la población de macrófagos a nivel de la médula espinal lesionada, se ha sugerido que promover la respuesta M2 podría representar un mecanismo para el desarrollo de estrategias terapéuticas que busquen mejorar la eliminación de restos del tejido dañado, al tiempo que promuevan la regeneración axonal y la recuperación funcional³²².

Como fue mencionado previamente, los monocitos migran hacia el lugar de la lesión y experimentan una diferenciación en macrófagos en múltiples fases. En ratones, se observa una primera fase que inicia aproximadamente 3 días después de la lesión y alcanza su punto máximo alrededor de los 7 días. Después de una ligera disminución, una segunda fase comienza a los 14 días, llegando a otro pico a los 60 días, y se mantiene estable durante al menos 180 días después de la lesión^{287,297}. Interesantemente, se observó que al impedir esta fase tardía de infiltración de macrófagos mediante la inhibición del receptor C5a empeora la recuperación locomotora, lo que sugiere que esta población de macrófagos que aparece tardíamente es beneficiosa para la recuperación funcional luego de la lesión²⁹⁷. En los seres humanos, se

observa un patrón temporal agudo similar, pero aún no se sabe si también presentan una segunda fase de infiltración de macrófagos³²⁶.

Estudios iniciales demostraron que los monocitos circulantes que se dirigen a los sitios de inflamación se originan desde la médula ósea³²⁷. Inclusive, más recientemente se ha demostrado que médula ósea en los huesos adyacentes al SNC (cráneo o vértebras) constituyen uno de los sitios donde se originan los macrófagos y neutrófilos que migran a las meninges y al parénquima del nervioso luego de una lesión³²⁸. Sin embargo, estudios más recientes en un modelo de ratón con lesión isquémica en el miocardio demostraron que los macrófagos inflamatorios también derivan de reservorios extramedulares de monocitos. Específicamente, se encontró que los monocitos en el bazo migran hacia la circulación y se acumulan en el miocardio lesionado, donde se diferencian en macrófagos^{329,330}. A su vez, se asoció a los macrófagos provenientes del bazo que migran hacia los tejidos dañados con un fenotipo principalmente pro-inflamatorio. Luego de este estudio, también se ha demostrado la migración de macrófagos desde el bazo hacia el SNC, particularmente luego de un accidente cerebrovascular³³¹ y luego de una lesión de médula espinal³³².

El bazo como interfaz neuroinmune después de una lesión de médula espinal

Los estudios anteriormente mencionados posicionaron al bazo como un actor fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal y como un potencial blanco sobre el cual actuar para modular la respuesta inflamatoria a nivel de todo el organismo y en la médula espinal luego de una lesión.

El bazo es un órgano muy relevante en la coordinación de la respuesta periférica ante la presencia de antígenos, ya sea debido a infecciones o daño en los tejidos, así como también participa en la filtración de la sangre y la remoción de eritrocitos dañados y/o envejecidos³³³. A pesar de que existe la noción de que el bazo no es esencial, su importancia se hace evidente cuando se realiza una esplenectomía, ya que esto duplica el riesgo de que una persona desarrolle tromboembolias fatales y contraiga infecciones que pueden ser letales.

Como fue mencionado previamente, el bazo tiene un rol fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal luego de una lesión, ya que es la principal fuente de macrófagos que ingresan al sitio lesionado en las etapas agudas de la lesión. Además, el bazo es un lugar fundamental de coordinación entre la respuesta inmune innata y adaptativa, por lo que también puede asociarse con otros procesos fisiopatológicos que ocurren luego de la lesión vinculados con la autoinmunidad³³⁴. Sin embargo, la importancia del bazo luego de una lesión de médula espinal no se limita a los efectos que se pueden observar en el tejido nervioso dañado, sino que tiene un impacto sobre otras funciones sistémicas fundamentales luego de un trauma, inclusive se asocia con la principal causa de muerte luego de una lesión de médula espinal que es la neumonía³³⁵. Se ha descrito una serie de síntomas asociados con las lesiones de médula espinal, particularmente cuando se dan en los segmentos superiores, conocido como síndrome de depresión inmunológica inducido por lesión de la médula espinal (SCI-IDS, por su sigla en inglés) que se caracteriza por una disfunción leucocitaria general y leucopenia, así como también se observa una marcada atrofia del bazo^{336,337}. Este funcionamiento alterado y deficiente del sistema inmune facilita el desarrollo de infecciones como la neumonía, en pacientes politraumatizados que generalmente se encuentran en un estado muy delicado, generando complicaciones que pueden ser letales.

A pesar de que las causas del desarrollo de SCI-IDS aún no están del todo claras, se ha planteado que un factor determinante es la alteración de la comunicación entre el sistema nervioso y el bazo. Este órgano presenta una extensa inervación por parte del sistema nervioso autónomo, en forma de fibras noradrenérgicas que se extienden por todo el tejido del bazo, principalmente en las zonas donde se concentran grandes números de células inmunes (Figura 19 B). La función inmune del bazo está bajo control del sistema nervioso autónomo, lo que coloca al bazo en una situación única como interfaz neuroinmune, coordinando la comunicación entre ambos sistemas para controlar las respuestas inflamatorias. Esta inervación del bazo es un componente fundamental en un mecanismo de control de la respuesta inmune a nivel sistémico llamado “reflejo colinérgico anti-inflamatorio”³³⁸. Este reflejo es un mecanismo fisiológico que permite mantener la inflamación bajo control, al prevenir la propagación excesiva de la respuesta del sistema inmune frente a daños o patógenos. Una vez que se detectan altos niveles de moléculas pro-inflamatorias, este reflejo actúa a modo de freno para evitar la retroalimentación positiva de las células del sistema inmune y una respuesta inflamatoria descontrolada. Los principales mecanismos que participan en este reflejo colinérgico anti-inflamatorio se esquematizan en la Figura 19 A³³⁹.

Frente a un estímulo como una infección o daño tisular, en las etapas más agudas de las respuestas inflamatorias se liberan grandes cantidades de citoquinas que alcanzan la circulación sanguínea. Este aumento de citoquinas pro-inflamatorias en sangre es detectado a nivel de los quimiorreceptores en el cuerpo carotídeo y vagal^{340,341}, causando la activación de las vías aferentes sensoriales del nervio vago que alcanzan a los cuerpos neuronales preganglionares en el núcleo motor dorsal (DMN) del nervio vago ubicado en el tronco encefálico. Las fibras nerviosas eferentes motoras parasimpáticas del DMN luego activan neuronas postganglionares ubicadas en el ganglio celíaco³⁴². Estas neuronas simpáticas adrenérgicas luego inervan al bazo a través del nervio esplénico (Figura 19). La activación de estas terminaciones nerviosas genera la liberación de noradrenalina en el bazo, estimulando la producción y liberación de acetilcolina por parte de los linfocitos T³⁴³. La acetilcolina alcanza a los macrófagos esplénicos, actuando sobre el receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha 7nAChR$ y generando en los macrófagos una cascada de señalización que culmina en la reducción de la producción de mediadores pro-inflamatorios como TNF α e IL1 β , al bloquear la vía inflamatoria mediada por NF- κB ^{341,344}.

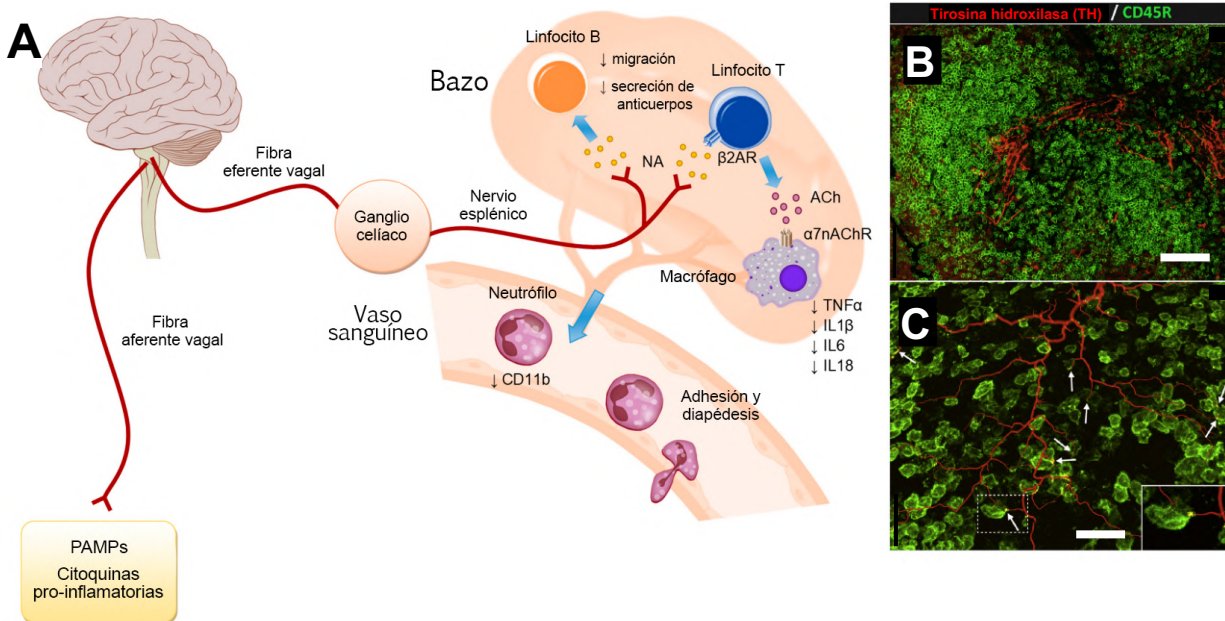


Figura 19. Ilustración del reflejo colinérgico anti-inflamatorio y la innervación por el sistema nervioso autónomo simpático del bazo. (A) En el reflejo colinérgico anti-inflamatorio, el nervio vago aferente responde a los mediadores inflamatorios y envía señales al tronco encefálico, donde se origina una señal que es transmitida por el nervio vago eferente hacia el nervio esplénico y el bazo. Esto provoca la liberación de noradrenalina (NA) en el bazo. Los linfocitos T CD4⁺ que expresan el receptor beta-2 de adrenalina

(β 2AR) captan NA y liberan acetilcolina (ACh). La acetilcolina inhibe la producción de citocinas proinflamatorias en los macrófagos que expresan el receptor α 7nAChR (receptores nicotínicos de acetilcolina α 7). Además, el reflejo anti-inflamatorio reduce la expresión de CD11b en los neutrófilos y disminuye la secreción de anticuerpos y la migración de linfocitos B. Imagen adaptada de Ramos-Martinez et al., 2021³³⁹. **(B)** inmunofluorescencia de tejido del bazo donde se muestra el patrón de la inervación simpática en el bazo. Las neuronas simpáticas que inervan el bazo tiñen positivamente para la tirosina hidroxilasa (rojo) y se observan con frecuencia extendiendo procesos hacia las zonas de linfocitos B CD45R⁺ (en verde) en la pulpa blanca. Barra de escala=75 μ m. **(C)** a mayor aumento se observa la estrecha proximidad entre los axones y los linfocitos B, con puntos de contacto entre el axón y la célula indicados en amarillo y contactos sinápticos presumibles indicados por flechas blancas. Barra de escala=20 μ m. B y C son imágenes adaptadas de Noble et al., 2018³⁴⁵.

Además de inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los leucocitos esplénicos, la activación de estas fibras noradrenérgicas simpáticas conduce a la apoptosis de estas poblaciones celulares y a la atrofia del bazo³³⁷, así como también inhibe la migración de linfocitos T³⁴⁶ y neutrófilos³⁴⁷ hacia la circulación sanguínea. Finalmente, este reflejo colinérgico anti-inflamatorio también participa en la resolución de la inflamación, al estimular la liberación de mediadores lipídicos, entre ellas las resolvinas, protectinas, lipoxinas y maresinas³⁴⁸.

La observación de estos mecanismos, rápidamente evidenciaron el potencial terapéutico del reflejo colinérgico anti-inflamatorio como un fuerte candidato para la modulación de las respuestas inflamatorias en diferentes condiciones patológicas en las que se ven involucradas las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune presentes en el bazo, incluido en numerosas patologías en las cuales se ha demostrado que la neuroinflamación es un componente fundamental en determinar la fisiopatología³⁴⁹. La estimulación con agonistas colinérgicos ha demostrado resultados beneficiosos en la reducción de la inflamación en la encefalomiелitis autoinmune experimental³⁵⁰⁻³⁵², la enfermedad de Parkinson³⁵³ y de Alzheimer³⁵⁴⁻³⁵⁶, la epilepsia³⁵⁷, la depresión^{358,359} y la esquizofrenia^{360,361}.

Algunos estudios han planteado efectos beneficiosos en la recuperación funcional tras la modulación de la respuesta del bazo luego de una lesión de médula espinal. La esplenectomía previa a la lesión de médula espinal en ratones demostró mejorar la recuperación funcional y una patología asociada a la lesión atenuada³³². Esto se atribuyó principalmente a la ausencia de leucocitos provenientes del bazo al sitio de la lesión en la médula espinal en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria, lo que promueve un ambiente menos pro-inflamatorio y una mayor neuroprotección. Particularmente, se observó en un modelo murino de lesión de médula espinal, que la esplenectomía previa a la lesión generó una gran reducción en el número de macrófagos

derivados de monocitos a los 7 días después de la lesión³³². Sin embargo, se observó que la segunda ola de macrófagos que ocurre hacia las dos semanas post-lesión se mantiene, lo que sugiere que los macrófagos que ingresan a la zona lesionada durante las primeras etapas de la respuesta inflamatoria provienen principalmente del bazo, y que a su vez coincide con una mayor proporción de macrófagos con fenotipo pro-inflamatorio. Mientras que más tardíamente ingresan macrófagos con un fenotipo predominantemente pro-regenerativo y migran desde la médula ósea hacia la circulación sanguínea y luego a la médula lesionada. Luego de una lesión medular a nivel medio torácico, el control sobre el bazo permanece en su mayoría intacto, mientras que el control simpático sobre la médula ósea que se encuentra bajo el control de los segmentos inferiores de la médula espinal se ve alterado^{336,362}. Aún no se ha establecido el impacto de estas diferencias en el control nervioso de la médula ósea y el bazo sobre la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal. Se debe profundizar en mayor detalle en el aporte de cada uno de estos órganos sobre la respuesta inflamatoria, ya que el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la movilización de células de estos órganos puede ampliar las posibilidades de tratamientos para modular la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal.

Como fue mencionado previamente, los inmunorreceptores presentan una oportunidad única como blancos para la modulación de las respuestas inflamatorias debido a su variedad de funciones y de efectos que tiene sobre diferentes vías de señalización dentro de las células del sistema inmune. Por lo tanto, resulta relevante el estudio de estos inmunorreceptores a nivel del bazo y de la médula ósea como potenciales blancos de modulación. Dentro de los inmunorreceptores en cuestión, CD200R1 emerge como un componente de gran relevancia en la modulación de la respuesta inflamatoria en el bazo tras una lesión de médula espinal, por diversas razones. Una de ellas radica en que la activación de CD200R1 afecta la vía de NF- κ B, el cual es un componente fundamental del reflejo colinérgico anti-inflamatorio. A su vez, el órgano donde se expresa CD200R1 en mayor medida es en el bazo (Figura 20). Esto puede colocar a CD200R1 como un potencial actor relevante en el control de la activación de las células inmunes del bazo luego de la lesión y por lo tanto de la migración de estas células hacia la médula espinal lesionada. Por lo tanto, resulta relevante analizar el rol del receptor CD200R1 y del ligando CD200 en el bazo luego de una lesión de médula espinal.

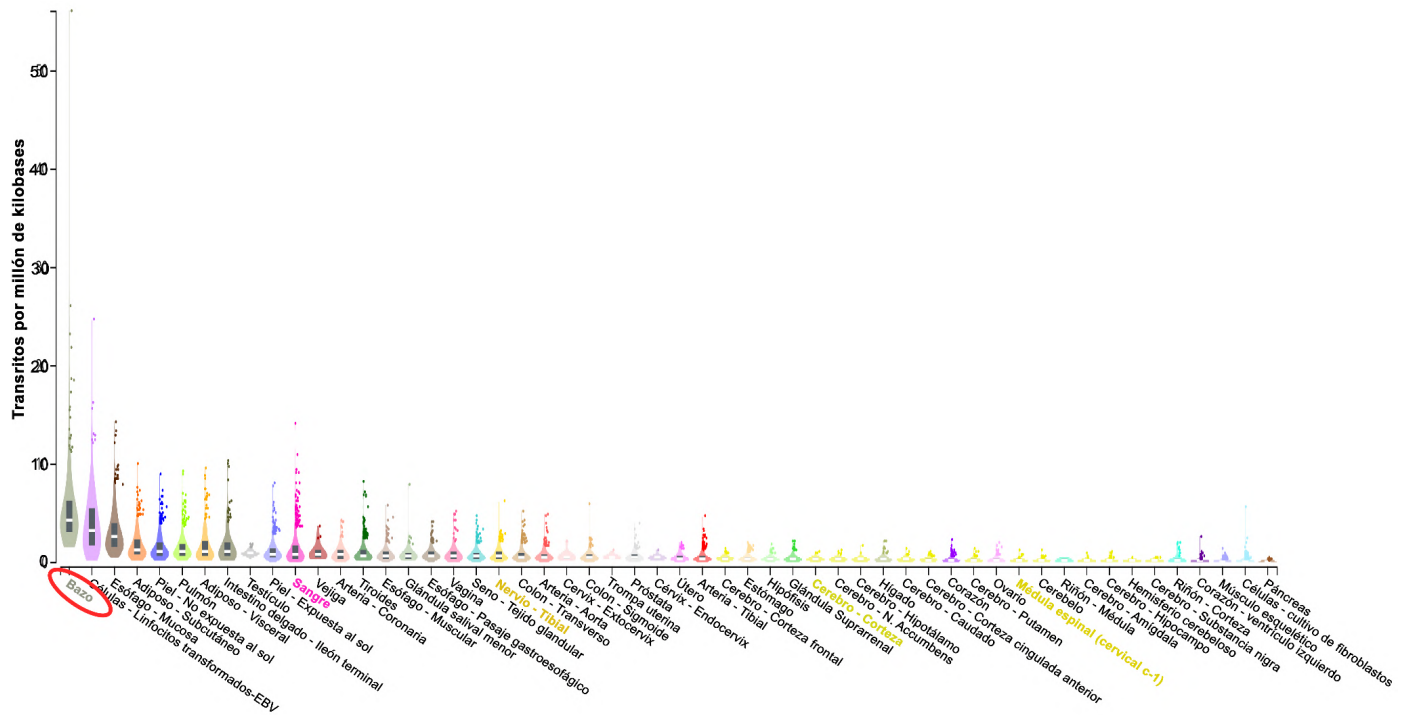


Figura 20. Expresión de CD200R1 en diferentes tejidos humanos. Se obtuvieron muestras de 54 voluntarios sin enfermedades y se analizó la expresión en diferentes tejidos por secuenciación de ARN. Los valores de expresión para cada órgano se muestran normalizados como transcritos por millón de kilobases. El bazo es el órgano con mayor expresión de CD200R1 en todo el organismo (señalado con círculo rojo). Otros órganos relevantes para el presente trabajo se señalan con sus respectivos colores. Imagen adaptada³⁶³.

Interacción CD200-CD200R1 luego de una lesión de médula espinal

La interacción entre CD200 y CD200R1 ya ha sido estudiada en el contexto de la lesión de médula espinal por nuestro grupo⁸⁹ y otros¹⁰⁸. Estos estudios evidenciaron un rol de esta interacción en el desarrollo de la respuesta inflamatoria a nivel local en el sitio de la lesión, limitando la inflamación y la progresión del daño en el tejido nervioso. En el trabajo previo por nuestro grupo de investigación, observamos que la modulación de la interacción CD200-CD200R1 genera alteraciones en la recuperación de las funciones locomotoras y de la respuesta inflamatoria luego de la lesión de médula espinal. Al bloquear el receptor con un anticuerpo bloqueante específico que se une a CD200R1 e impide su interacción con el ligando CD200, observamos un empeoramiento en la recuperación de las funciones locomotoras, que se asoció

con una respuesta inflamatoria exacerbada y una mayor pérdida de tejido nervioso. Por el contrario, cuando activamos el receptor con un agonista, observamos una mejora en la recuperación funcional asociada a un rol neuroprotector del receptor⁸⁹. El estudio realizado por Cohen y sus colaboradores¹⁰⁸ destaca la relevancia del ligando CD200 presente en las células endoteliales formadas luego de una lesión. En este contexto, identificaron a CD200 como uno de los factores determinantes en la regulación de las células mieloides a nivel de la médula espinal.

A pesar de que estos trabajos hasta el momento han demostrado un rol importante de CD200-CD200R1 en la propagación del daño luego de una lesión de médula espinal, debido a su rol como reguladores de la actividad de las células del sistema inmune que infiltran al tejido lesionado, no se ha estudiado el rol de esta interacción en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de la lesión a nivel de todo el organismo. El estudio de la respuesta a nivel global del organismo es sumamente relevante ya que podría permitir comprender con mayor detalle los procesos que ocurren fuera del sitio lesionado pero que tienen un impacto en el daño al tejido nervioso, lo que puede llevar al desarrollo de estrategias terapéuticas poco invasivas y más precisas para la modulación de la respuesta inflamatoria que permitan una mayor recuperación luego de las lesiones traumáticas a la médula espinal.

Inflamación sistémica por administración de lipopolisacárido (LPS)

En el contexto de la neuroinflamación, en las últimas décadas se ha planteado a la modulación de la inflamación periférica como un enfoque prometedor en el desarrollo de estrategias terapéuticas, principalmente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas³⁶⁴. Considerando que CD200-CD200R1 ha sido ampliamente estudiado en contextos de inflamación, tanto en el sistema nervioso como en otros sistemas del organismo, resulta relevante el estudio de la interacción en las respuestas inflamatorias que se originan fuera del sistema nervioso pero que conllevan a cierto grado de neuroinflamación. En este sentido, un modelo experimental que tiene muchas ventajas para analizar estos procesos es el de inflamación sistémica por administración de lipopolisacárido (LPS). El LPS es una endotoxina que se encuentra en la membrana externa de bacterias gramnegativas, y es utilizado frecuentemente como un inflamógeno modelo, ya que cuando entra en contacto con células del sistema inmune, es reconocido como un PAMP que desencadena una potente respuesta inflamatoria de la cual se conocen muchos mecanismos. La estimulación del LPS en células de mamíferos ocurre a través de una serie de interacciones con varias proteínas, incluyendo la proteína de unión al LPS (LBP), CD14, la proteína-2 de diferenciación de mieloides MD-2 y el receptor-4 de tipo Toll (TLR4) (Figura 21)^{365,366}. LBP es una proteína de transporte soluble que se une directamente al LPS y facilita la asociación entre el LPS y CD14^{367,368}. CD14 es una proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol, que también existe en forma soluble. CD14 facilita la transferencia del LPS al complejo receptor TLR4/MD-2 y modula el reconocimiento del LPS³⁶⁹. La unión del LPS al TLR4 desencadena cascadas de señalización intracelular por medio de las vías dependiente e independientes de MyD88, que promueven la transcripción de NF- κ B y la liberación de grandes cantidades de TNF α , así como IL-1, IL-6, IL-18 e IL-12³⁷⁰. Esta "tormenta de citocinas" temprana tiene efectos directos e indirectos que amplifican la inflamación a nivel de todo el organismo.

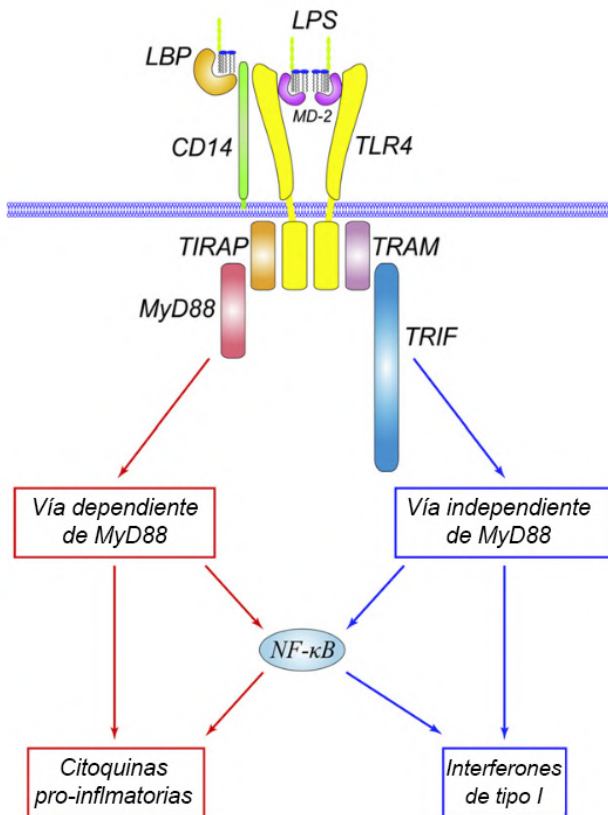


Figura 21. Resumen de las vías de señalización de LPS-TLR4. El reconocimiento del LPS es facilitado por la proteína de unión de LPS (LBP) y CD14, y es mediado por el complejo receptor TLR4/MD-2. La señalización de LPS-TLR4 se puede dividir en vías dependientes de MyD88 y vías independientes de MyD88, que median la activación de genes proinflamatorios y de interferón Tipo I. La activación de NF-κB forma parte de ambas vías de señalización y constituye una de las respuestas más importantes frente a la estimulación de las células con LPS. Imagen adaptada de Lu et al., 2008³⁷¹.

Neuroinflamación frente a la estimulación con LPS

La inflamación periférica generada por la estimulación del sistema inmune con LPS es percibida por el SNC. Esta activación del sistema inmune es comunicada al SNC a través de varias vías neurales y humorales, y estas señales de inflamación son interpretadas y propagadas dentro del SNC. La comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, la cual es bidireccional, resulta en la propagación de las señales de inflamación en el SNC por parte de la microglía, que aumentan la producción a nivel local de citoquinas y quimioquinas^{372,373}. Este efecto del LPS administrado periféricamente es probablemente mediado a través de receptores de LPS ubicados fuera del SNC en lugar de actuar directamente sobre la microglía, ya que se observó que la capacidad del LPS de atravesar la barrera hematoencefálica es escasa³⁷⁴.

Probablemente, estas señales de inflamación alcanzan el SNC mediante varios mecanismos que impactan diferentes regiones del cerebro. Las citoquinas producidas como resultado de respuestas inflamatorias podrían activar las fibras sensoriales vagales que transmitirían la

activación a diferentes regiones en el SNC. Además, los estímulos inflamatorios circulantes podrían activar macrófagos de barrera, ubicados en las meninges y en los espacios perivasculares, desencadenando la producción local de prostaglandinas³⁷⁵.

Como consecuencia de la propagación de las señales neuroinflamatorias en el SNC, ocurre la inducción de un proceso que se denomina “comportamiento de enfermedad” o “*sickness behaviour*” en inglés. Esto comprende una respuesta coordinada mediada por la unidad neurovascular³⁷⁶ y las células gliales residentes^{372,377}, que causan los cambios evidentes fisiológicos y conductuales, incluyendo fiebre, hipofagia, letargo, apatía, disminución de la actividad e interacción social reducida³⁷⁸. Estos cambios conductuales son evolutivamente adaptativos y necesarios para redistribuir los recursos del huésped y combatir infecciones^{8,9}, ya que se ha visto que interrupciones en esta respuesta tienen un efecto negativo en la morbilidad y mortalidad¹⁰. Por lo tanto, cuando esta respuesta está adecuadamente controlada y se resuelve, es un ejemplo de neuroinflamación aguda que es adaptativa y beneficiosa, a diferencia de los ejemplos que se han descrito hasta ahora. Sin embargo, se han reportado condiciones en las que una única administración de LPS sistémico promueve un estado de neuroinflamación crónica y pérdida neuronal³⁷⁹. Estas observaciones se realizaron administrando dosis muy altas de LPS intraperitoneal, por lo que estos efectos observados podrían deberse a estas condiciones exacerbadas de inflamación en donde se desencadena una respuesta descontrolada, representando un caso donde el sistema es llevado al extremo.

Luego de la administración periférica de LPS, varios trabajos han reportado un aumento en el número de microglía a nivel del cerebro, así como también importantes cambios morfológicos característicos de la microglía activada (Figura 22)³⁸⁰⁻³⁸⁵. Se ha documentado ampliamente que la inyección periférica de LPS induce una variedad de efectos centrales mediados, en parte, por las citoquinas proinflamatorias liberadas principalmente por la microglía, entre ellas IL-1 β , TNF α e IL-6 desempeñan un papel clave en la inducción y mantenimiento de la respuesta^{386,387}. A su vez, estas citoquinas llevan a la activación temporal de los astrocitos además de las células microgliales³⁸⁸ (Figura 22). Además de las citoquinas, los efectos de la activación de la microglía dependen de otros importantes mediadores como el óxido nítrico, especies de superóxido, eicosanoides y ácido quinolínico^{389,390}.

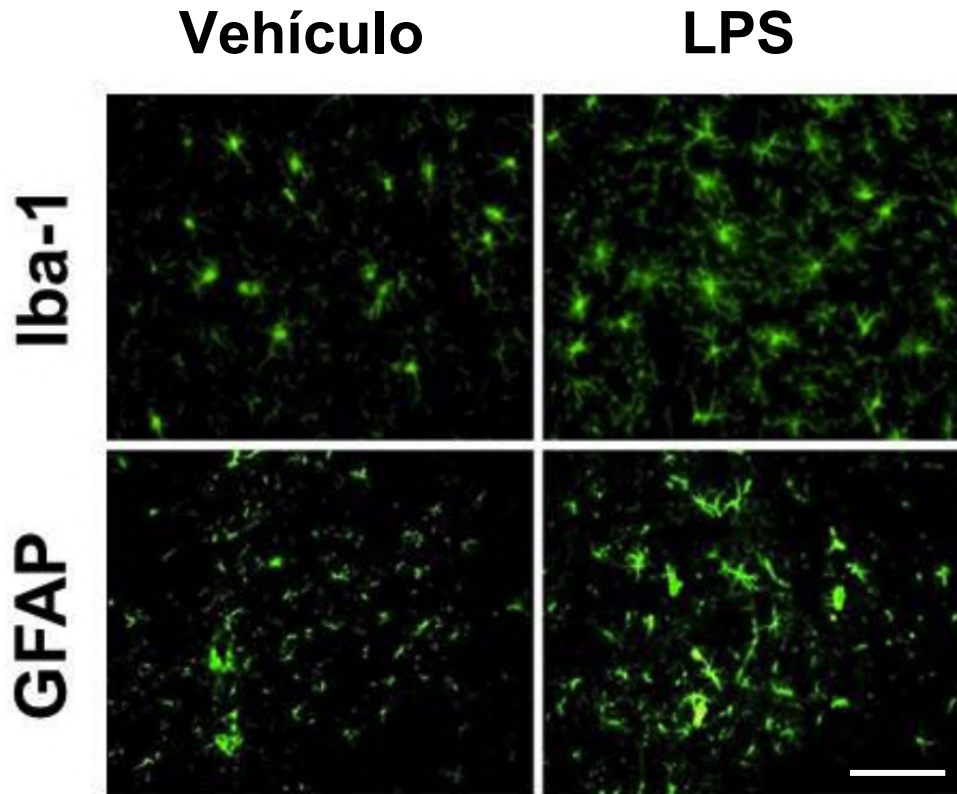


Figura 22. Respuesta de la microglía y astrocitos frente a la administración de LPS intraperitoneal. Se muestran secciones representativas de corteza cerebral de ratones a las 24 horas de la administración con LPS o con vehículo. A nivel de la corteza cerebral, se observan importantes cambios morfológicos experimentados por la microglía y astrocitos, así como también se hace evidente el aumento del número de células en el tejido. Barra de calibración: 200 μ m. Imagen adaptada de Jin et al., 2014 ³⁸².

Otra de las diferencias fundamentales entre este modelo experimental de neuroinflamación en comparación con los vistos hasta el momento, es que ocurre sin comprometer la integridad de la barrera hematoencefálica. Esto significa que no se produce la entrada de células inmunitarias periféricas en el SNC³⁷⁸, a diferencia de los modelos de lesiones traumáticas en los que observamos una infiltración considerable de células del sistema inmune hacia el tejido nervioso. Esto nos permite analizar en mayor detalle los procesos en los que se ve involucrada la microglía, sin tener una interacción directa con otros tipos celulares del sistema inmune. A pesar de que hay una comunicación entre la microglía en el SNC y las células inmunes en los tejidos periféricos, como fue mencionado previamente, esta comunicación es indirecta y por lo tanto nos permite profundizar en el rol específico de la microglía en los procesos neuroinflamatorios.

CD200-CD200R1 en la neuroinflamación desencadenada por LPS

En el contexto de la activación microglial luego de la estimulación con LPS a nivel sistémico, se ha sugerido a la interacción entre CD200 y CD200R1 como un actor fundamental en este proceso, debido a la naturaleza de CD200R1 en el mantenimiento de la microglía en un estado homeostático. En este sentido, un estudio reportó una rápida disminución en la expresión de CD200R1 en el cerebro de ratones a las 4 horas luego de la administración sistémica de LPS, que se mantiene hasta las 24 horas³⁹¹. A su vez, reportaron una reducción de la expresión de CD200 en el cerebro a las 4 horas de la administración de LPS, pero que retorna a valores normales dentro de las 24 horas posteriores. Sin embargo, en este trabajo utilizaron dosis muy altas de LPS, mientras que otros estudios que utilizan dosis más bajas no reportan esta disminución de CD200R1 luego de la administración sistémica de LPS¹¹⁰.

El rol de CD200-CD200R1 en los procesos que llevan a la activación de la microglía luego de una administración de LPS ha sido demostrado en numerosos estudios, tanto *in vivo*^{105,110,391-393} como *in vitro*³⁹²⁻³⁹⁵. En todos estos estudios se plantea a la interacción entre CD200 y CD200R1 como uno de los factores determinantes en el mantenimiento de la microglía en un estado de homeostasis, que se ve afectado luego de la administración con LPS, lo que determina una activación y el desarrollo de una respuesta inflamatoria por parte de las células microgliales. La relevancia de esta interacción se manifiesta claramente cuando ésta es modulada, ya que se ha observado que su bloqueo o ausencia conlleva a una respuesta inflamatoria a nivel del SNC exacerbada luego de la administración de LPS³⁹⁵. Mientras que cuando se activa el receptor por medio de agonistas de CD200R1, la respuesta inflamatoria frente al LPS se ve atenuada^{105,392-394,396}. Sin embargo, hasta el momento, no hay estudios que analicen la respuesta a nivel del SNC luego de una administración sistémica de LPS cuando el receptor CD200R1 no es expresado de manera constitutiva. Esto permitiría analizar tanto el rol del receptor a nivel del SNC, como la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune a nivel del todo el organismo en condiciones de una inflamación sistémica.

El bazo en una inflamación sistémica

Como fue mencionado previamente, la respuesta inflamatoria fuera del SNC determina los efectos de la neuroinflamación a nivel central en el modelo de administración de LPS. Por lo tanto, los principales órganos responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria luego de

la administración de LPS tienen un rol directo en determinar la magnitud de la neuroinflamación. Debido a que el LPS alcanza la circulación sanguínea, el bazo es el principal responsable del filtrado de la sangre para reconocer potenciales señales de daño o de patógenos, lo que coloca al bazo como un actor fundamental en la inflamación sistémica. Cuando se administra LPS en un organismo huésped sano, luego de alcanzar el bazo por la circulación sanguínea, se activan diferentes tipos celulares del sistema inmune, entre los que se encuentran los macrófagos en la zona marginal y pulpa roja del bazo³⁹⁷, los neutrófilos³⁹⁸ y los linfocitos³⁹⁹. Esto lleva a la activación de estas células y a la liberación de una gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, desencadenando la respuesta inflamatoria a nivel sistémico. Si esta respuesta inflamatoria esplácnica no está adecuadamente regulada, se puede producir un síndrome de shock séptico fatal y una falla multiorgánica⁴⁰⁰. En este sentido, el reflejo colinérgico anti-inflamatorio explicado previamente tiene un importante papel en el control de la respuesta inflamatoria para que no llegue a causar un shock séptico. Dentro de los modelos murinos experimentales utilizados para inducir este shock séptico se encuentra la administración de LPS a dosis extremadamente altas (15 mg/kg), la contaminación e infección peritoneal y la ligadura y punción cecal⁴⁰¹.

Luego de la estimulación con LPS, una de las observaciones que hacen más evidente su importancia en este modelo experimental es la esplenomegalia, es decir el aumento de tamaño del bazo^{401,402}. Interesantemente, esta esplenomegalia se observa inclusive en presencia de un aumento de la apoptosis a nivel del bazo⁴⁰¹, que probablemente tenga una base en la activación del reflejo colinérgico anti-inflamatorio. Sin embargo, el aumento en el tamaño del bazo se debe probablemente a un aumento en el número de células presentes en este órgano luego de la administración de LPS⁴⁰¹, ya sea por la proliferación de células³⁹⁸, la migración de células (principalmente monocitos y neutrófilos) hacia este órgano o por la acumulación de eritrocitos en la pulpa roja⁴⁰¹.

Estas observaciones colocan al bazo como un actor principal en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de una inflamación sistémica. Teniendo en cuenta que la neuroinflamación observada en este modelo experimental depende de la intensidad de esta respuesta inflamatoria que es transmitida al SNC, resulta relevante comprender los mecanismos que ocurren a este nivel para dilucidar los mecanismos que pueden tener un impacto sobre la neuroinflamación. Como fue mencionado previamente, el bazo es el órgano que expresa en mayor proporción al receptor CD200R1, por lo tanto, es un potencial candidato como actor fundamental en el desarrollo de la respuesta de este órgano frente a LPS y podría ser un importante determinante

de la severidad de la neuroinflamación resultado de la inflamación sistémica. Uno de los trabajos por el grupo de Gorczynski demostró que CD200R1 promueve la atenuación de los efectos del LPS en cultivo de esplenocitos¹⁰⁵, por lo que esto sugiere que al estar ausente el receptor en las células del bazo, podría promover una respuesta inflamatoria sistémica exacerbada que resulta en una neuroinflamación exacerbada. Por el contrario, la activación de CD200R1 a nivel del bazo podría constituir una estrategia para modular la neuroinflamación de manera indirecta sin tener que intervenir sobre el SNC.

HIPÓTESIS

La interacción entre el ligando CD200 y el inmunorreceptor CD200R1 tiene un rol fundamental en la modulación de la neuroinflamación frente a diferentes estímulos inflamatorios. Esta modulación es dependiente del contexto de inflamación, por lo que comprender en profundidad los mecanismos en los que se ve implicada esta interacción puede permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas que busquen la modulación de la neuroinflamación frente a un daño al sistema nervioso.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol de la interacción entre CD200 y CD200R1 en diferentes modelos experimentales de neuroinflamación con el propósito de comprender los mecanismos que intervienen en la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, tanto en condiciones normales como patológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Capítulo 1:

- a. **Objetivo específico 1:** Determinar el rol de la interacción CD200-CD200R1 en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de nervio ciático, así como también determinar su impacto sobre la regeneración y recuperación por medio de la modulación de esta interacción.

2. Capítulo 2:

- a. **Objetivo específico 2:** Profundizar en los mecanismos que subyacen a la activación de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal, analizando la respuesta inflamatoria a nivel local en el tejido nervioso lesionado y vinculándolo con su rol en la respuesta de otros tejidos relevantes en el desarrollo de la inflamación. Profundizar en el rol de CD200R1 en la fagocitosis de mielina.

3. Capítulo 3:

- a. **Objetivo específico 3:** Analizar el rol de CD200R1 en el desarrollo de la neuroinflamación producto de una inflamación sistémica por LPS, vinculando los procesos que ocurren a nivel periférico con la neuroinflamación a nivel del SNC.

4. Capítulo 4:

- a. **Objetivo específico 4:** Evaluar la ventana temporal terapéutica del tratamiento con proteínas recombinantes basadas en la activación de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal.
- b. **Objetivo específico 5:** Desarrollar nuevas proteínas recombinantes que activen CD200R1 y permitan formas de administración poco invasivas para la modulación de la neuroinflamación en diferentes contextos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de animales

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética en el Uso Animal (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo (licencias 005-19 y 001-22) y fueron conducidos de acuerdo con las guías internacionales FELASA, las leyes nacionales, las guías éticas de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y las guías ARRIVE para el reporte de la experimentación animal. Los procedimientos experimentales realizados en la Universitat Autònoma de Barcelona fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales estándar controladas (ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, 20 ± 1 °C, humedad entre 40-60%) en cajas de 4 a 6 animales y con agua y comida *ad libitum*.

Para los estudios de lesión de nervio ciático, se utilizaron machos y hembras C57BL/6 de 10 a 12 semanas de edad, con un peso de 25 a 30 g. Para todos los análisis del capítulo 1 se utilizaron machos, salvo en el análisis de citometría de flujo. También se utilizaron en uno de los análisis hembras de 10 a 14 semanas de edad CD200R1^{+/+} *wild type* (*wt*) o CD200R1^{-/-} *Knock-out* (*KO*) (B6N.129S5-Cd200r1tm1Lex/Mmucd) adquiridos de Mutant Mouse Resource and Research Centers (UC Davis), con fondo C57BL/6. El rango de masa corporal para las hembras fue de 19 a 22 g y para los machos de 23 a 27 g.

Para los estudios del capítulo 2, capítulo 3 y capítulo 4/objetivo específico 5 se utilizaron ratones hembras *wt* y CD200R1-*KO* de 10 a 14 semanas de edad y rango de peso de 19 a 22 g.

Para el capítulo 4, objetivo específico 4 donde se evaluó la administración de CD200-His luego de una lesión de médula espinal se utilizaron ratones hembras C57BL/6 (obtenidos de Charles River) de 8 a 10 semanas de edad con un peso entre 20 y 22 g.

Lesión de médula espinal y cuidados post-operatorios

Previo a todos los procedimientos quirúrgicos, los animales fueron anestesiados con ketamina (90 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) de administración intraperitoneal (i.p.). Para realizar las lesiones de médula espinal por contusión, se le realizó a los ratones anestesiados una laminectomía a la altura de la 11^a vértebra torácica⁴⁰³, que se corresponde con el primer segmento lumbar de la médula espinal⁴⁰⁴. La laminectomía consiste en realizar una pequeña incisión en la piel y músculo subyacente, para luego exponer la médula espinal quitando fragmentos de hueso de la 11^a vértebra, con la precaución de no tocar el tejido medular. Una vez que la médula espinal queda expuesta únicamente en el segmento determinado, se procede a inmovilizar el animal por medio de la sujeción de la columna vertebral (Figura 23B y C). Luego se realiza la lesión de médula espinal por contusión utilizando el dispositivo PinPoint PCI3000 Precision Cortical Impactor (Hatteras Instruments) (Figura 23 D). Este dispositivo controlado por computadora permite regular el impacto de un pistón de 1 mm de diámetro sobre la médula espinal, al controlar la velocidad, la distancia de desplazamiento sobre la médula espinal y el tiempo que permanece el pistón sobre la médula espinal. Se analizaron diferentes condiciones de impacto del pistón para analizar la severidad de la lesión y determinar las condiciones óptimas de velocidad, distancia y tiempo que generan una lesión con una ventana de recuperación lo suficientemente amplia para observar diferencias en la recuperación funcional luego de la lesión. Las condiciones que se determinaron óptimas y fueron utilizadas para los posteriores análisis fueron: velocidad: 1.5 m/s, distancia: 1.2 mm, tiempo que se mantuvo el pistón sobre la médula espinal después de la llegar a la distancia: 0 segundos. Una vez realizada la lesión, se procedió a cerrar la herida mediante suturas 5-0 para suturar los músculos y grapas (FST, 7.5 x 1.75 mm) para aproximar la herida de la piel. Finalmente se colocaron los ratones en una manta térmica hasta que finalizó el efecto de la anestesia. Luego de la completa recuperación de la anestesia, los ratones fueron administrados con tramadol (5 mg/kg; i.p.) como tratamiento analgésico una vez por día durante 72 horas post-lesión. La expresión manual de la vejiga se realizó una vez por día hasta alcanzar el completo control de la vejiga.

En las lesiones para el estudio de la administración de CD200-His dentro del parénquima de la médula espinal a las 24 y 48 horas post-lesión, se utilizó el contusor Infinite Horizon Impactor (Precision Scientific) (Figura 23 A), debido a que este es el dispositivo con el que cuenta la Universitat Autònoma de Barcelona para realizar las contusiones. Estas lesiones fueron

realizadas con una fuerza de 60 kdynes y un desplazamiento de la médula espinal de 500-550 μm .

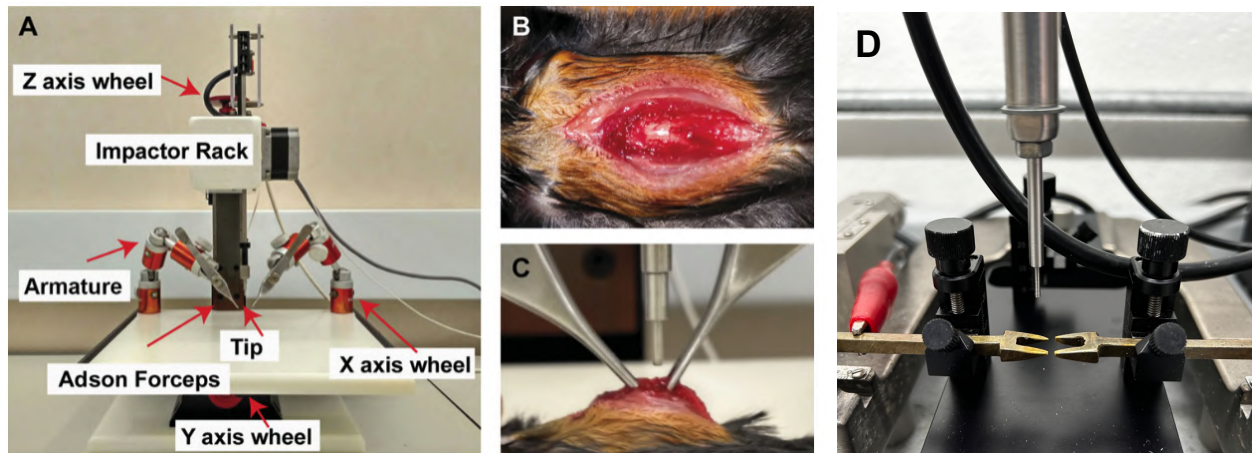


Figura 23. Configuración experimental y dispositivos utilizados para realizar las lesiones de médula espinal. (A) Imagen del dispositivo Infinite Horizon Impactor (Precision Scientific), utilizado para realizar las lesiones donde se evaluó el efecto de la administración de CD200-His. (B) Imagen superior que muestra la médula espinal expuesta a la altura de T11, luego de realizar la laminectomía. (C) Imagen que muestra el sistema de sujeción de la columna vertebral utilizado en conjunto con el dispositivo Infinite Horizon Impactor. También se observa la punta del pistón utilizado para realizar la contusión controlada de la médula. Imágenes A-C adaptadas de Amo-Aparicio et al., 2018⁴⁰³. (D) Imagen del pistón y el sistema de sujeción de la columna cerebral utilizado con el dispositivo PinPoint PCI3000 Precision Cortical Impactor (Hatteras Instruments).

Lesión de nervio ciático

El procedimiento quirúrgico fue realizado en el nervio ciático derecho de ratones anestesiados con Ketamina 90 mg/kg y Xilacina 10 mg/kg i.p. Luego de una incisión en la piel a la altura del nervio, se procedió a abrir el plano fascial entre el glúteo mayor y el bíceps femoral para exponer al nervio ciático derecho⁴⁰⁵. El nervio se aplastó a unos 45 mm de la punta del tercer dedo durante 30 segundos con una pinza.

Inyecciones dentro del nervio ciático

Las inyecciones se realizaron directamente en el nervio ciático inmediatamente antes de realizar la lesión por aplastamiento en el lugar exacto de la lesión. Para ello, se inyectaron 2 μg de rat anti-mouse CD200R1 (Clone OX-131; FcSilent™ Absolute Antibody; Oxford, UK) o rat-IgG1

(FcSilent™ Absolute Antibody; Oxford, UK) en un volumen de 2 μ L, utilizando una aguja Hamilton de calibre 33 conectada a una jeringa Hamilton de 10 μ L. Estos dos anticuerpos recombinantes fueron diseñados para minimizar la unión del receptor Fc γ R y también demostraron tener menor unión del sistema del complemento. Se ha demostrado que el anti-CD200R1 utilizado es específico para el CD200R1 en ratones C57BL/6, ya que no reconoce al CD200R2, CD200R3 y CD200R4⁴⁰⁶. Ambos anticuerpos fueron suministrados libres o en muy bajas concentraciones de endotoxinas (nivel de endotoxinas menor a 1 EU/mL).

Todos los experimentos de lesión de nervio ciático fueron realizados en machos, a excepción de los análisis por citometría de flujo que fueron realizados en hembras, debido a la disponibilidad de animales de ese sexo al momento de realizar los experimentos.

Tratamiento con lipopolisacárido (LPS)

Ratones hembra *wt* y *CD200R1-KO* fueron administrados con 2 mg/kg masa corporal de lipopolisacárido (LPS, Sigma) o vehículo control (PBS) i.p. Se disecó y colectó tejido a las 16 o 24 horas post-administración. Se registró el peso corporal y del bazo luego de su disección.

Administración de CD200-His dentro del tejido de médula espinal

La administración dentro del tejido de la médula espinal se realizó a las 24 y 48 horas luego de haber realizado la lesión, por medio de la introducción de una aguja de vidrio de 30 μ m de diámetro (marca Eppendorf) acoplada a una jeringa Hamilton de 10 mL. En el lugar de la lesión, sobre la línea m´dia de la médula espinal, se introdujo la aguja hasta 0.4 mm dentro del tejido y se inyectó 1 μ L de CD200-His (1.22 μ g/ μ L) o vehículo control (PBS) a una velocidad constante de 2 μ L/min controlada por un inyector automático (KDS 310 Plus; KD Scientific). La punta de la aguja se mantuvo dentro del tejido de la médula espinal por 3 minutos luego de cada inyección para evitar el reflujo del líquido hacia fuera del tejido. La proteína recombinante CD200-His fue producida por la empresa Sinobiological (China) en células HEK293 y fue suministrada sin conservantes para poder ser administrada *in vivo*.

Evaluación funcional y test comportamentales

Índice funcional del ciático

La recuperación de las funciones después de la lesión de nervio ciático fueron evaluadas a través del índice funcional del ciático. Antes de la lesión y a 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21 y 28 dpl se marcó la superficie de las patas traseras con tinta y se dejaron caminar los ratones a través de una pasarela con papel en la base para evidenciar las pisadas. Luego se midió la longitud de la huella y la distancia entre el primer y quinto dedo para 3 pisadas de cada pata. Teniendo en cuenta estos parámetros se calculó el índice funcional del ciático como fue propuesto por *Inserra et al.*⁴⁰⁷. Se promedió el valor del índice funcional del ciático para las 3 pisadas evaluadas en cada pata y se normalizaron restando el valor basal previo a la lesión para cada animal.

Basso Mouse Scale

La recuperación de las funciones locomotoras luego de una lesión de médula espinal fue evaluada a 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21 y 28 días post-lesión (dpl) colocando a los animales en un campo abierto y observando diferentes parámetros de la locomoción. Utilizando la escala Basso Mouse Scale (BMS)⁴⁰⁸, se evaluó la función locomotora de acuerdo a los parámetros de movimiento y coordinación de los miembros inferiores observados por dos observadores independientes, sin conocimiento sobre los grupos experimentales. El puntaje consenso se tuvo en cuenta para determinar el puntaje final. En la Tabla 1 se muestran los parámetros de la locomoción a observar para determinar el puntaje en la escala BMS. A los 28 dpl se determina si el ratón presenta determinados movimientos para cada miembro inferior, otorgándole un puntaje a cada una de ellas y haciendo un promedio entre ambos miembros para determinar el puntaje total del ratón a ese día post-lesión. El puntaje en la escala BMS fue utilizado como control de un correcto procedimiento quirúrgico y de lesión para excluir lesiones parciales. Ratones con un puntaje mayor a 0 en el BMS a 1 dpl o con una diferencia mayor a 2 puntos entre un miembro y el otro fueron excluidos debido a una lesión incompleta o lateralizada respectivamente.

Tabla 1. Puntajes del 0 al 9 en la escala Basso Mouse Scale y las acciones locomotoras a observar en los ratones lesionados para determinar el puntaje del ratón. Tabla adaptada de Basso et al., 2006⁴⁰⁸.

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

Test de campo abierto

Se realizó el test de campo abierto con el fin de evaluar la actividad locomotora de los ratones luego de la inoculación con LPS. Este test comportamental fue realizado durante la etapa de luz del ciclo bajo condiciones de bajo ruido y luz roja. El campo abierto consiste en una caja de acrílico de dimensiones 40 cm x 60 cm x 50 cm de alto. El software Any Maze fue utilizado para el seguimiento del video y el registro de la actividad. Los animales fueron expuestos a la arena

durante 6 minutos y se registró la distancia horizontal total recorrida. La arena fue limpiada con etanol 10% entre animales para eliminar rastros de animales anteriores que pudieran interferir con los resultados.

Análisis de preservación de vías motoras por potenciales evocados

Para la evaluación del estado de preservación de las vías motoras centrales, se registraron potenciales motores evocados en el músculo gastrocnemio en respuesta a una estimulación eléctrica transcraneal de la corteza motora⁴⁰⁹ de ratones anestesiados. La estimulación realizada consistió en pulsos unitarios rectangulares de 0,1 ms de duración, entregados a través de agujas a modo de electrodos introducidos subcutáneamente (Figura 24). El cátodo se colocó sobre el cráneo por encima de la corteza somatosensorial y el ánodo sobre la nariz. Posteriormente a la estimulación, se midieron diferentes parámetros de la respuesta en el músculo gastrocnemio, entre ellos la amplitud de la respuesta y la latencia. Todos los potenciales fueron amplificados y mostrados en un osciloscopio digital (Tektronix 450S).

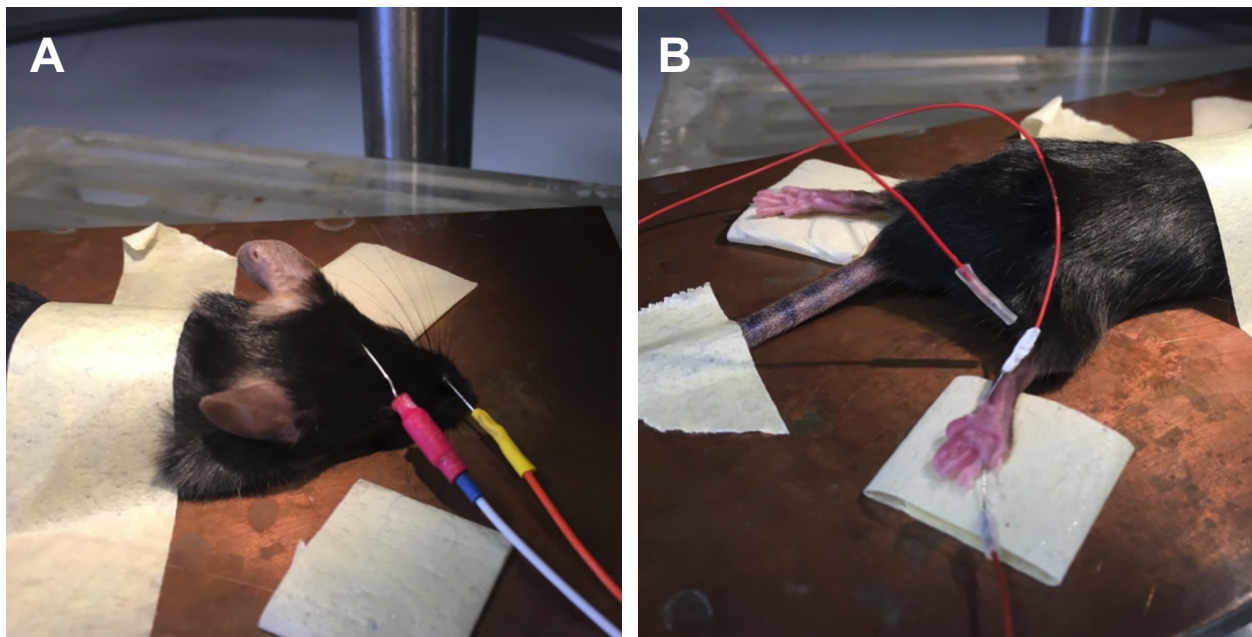


Figura 24. Configuración experimental para el análisis de potenciales motores evocados. (A) Colocación de electrodos para la estimulación subcutánea. El cátodo se colocó sobre el cráneo (electrodo rojo) y el ánodo (amarillo) sobre la nariz. **(B)** Colocación de electrodos para el registro en el músculo gastrocnemio.

Diseño y producción de la proteína recombinante CD200-X

La proteína recombinante CD200-X fue diseñada para contener un dominio de CD200 que se une y active al CD200R1, y un dominio de penetración celular "X". La producción de la proteína fue llevada a cabo por la Dra. Claudia Ortega de la Unidad de Ingeniería de Proteínas del Institut Pasteur de Montevideo. Se transfectaron células EXPI293F en suspensión a una concentración de 2×10^6 células/ml con el vector de expresión pCMVTwin. El sobrenadante fue purificado por columna de afinidad a streptactina a través del StrepTagII. Se obtuvieron alrededor de 6 mg de proteína, con un peso molecular superior al teórico, debido a la glicosilación de la proteína propiciado por el sistema de expresión utilizado.

Cultivos celulares

Macrófagos derivados de la médula ósea

Los macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM: bone marrow derived macrophages) fueron obtenidos a partir de ratones hembras *wt* o *CD200R1-KO*. Luego de la perfusión de los ratones con PBS, se disecó la tibia y fémur de una de las patas traseras limpiando el tejido muscular adyacente. Se extrajo la médula ósea de las diáfisis de los huesos por medio de lavado con DMEM/F12 con 10% de FBS y Penicilina/Streptomycin (DMEM/F12 completo). Luego de una centrifugación a 500 G durante 5 minutos, se resuspendió el pellet en 1 mL de medio DMEM/F12 completo y se contó el número de células. Los BMDM se cultivaron durante 7 días a 37° C en atmósfera húmeda controlada con 5% de CO₂ en placas de Petri de 100 mm con medio DMEM/F12 completo y 20 ng/mL de factor estimulante de colonias de macrófagos recombinante (M-CSF, Biolegend #576406). Posteriormente, las células fueron plaqueadas en placas de 24 o 96 pocillos, si fueron utilizadas para el análisis de expresión de citoquinas o para el análisis de fagocitosis, respectivamente.

Para los experimentos de expresión de citoquinas, las células fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos a una densidad de 200.000 células por pocillo durante 24 horas a 37° C en medio DMEM/F12 completo y 20 ng/mL de M-CSF. Posteriormente, las células fueron incubadas con los diferentes tratamientos (LPS 100 ng/mL y/o CD200-X a 1 o 5 µg/mL) durante 24 horas a 37° C en medio DMEM/F12 completo y 5 ng/mL de M-CSF. Finalmente se guardó el sobrenadante y las células fueron lisadas con 300 µL de Trizol para su posterior análisis.

Células de la línea BV-2

La línea celular BV-2 fue cultivada a 37° C en atmósfera húmeda controlada con 5% de CO₂. Se utilizó el medio RPMI 1640 GlutaMAX suplementado con 10% de FBS. Para su mantenimiento en cultivo se utilizaron botellas de tipo T de 25, 75 y 150 cm². Se realizaron cambios de medio cada 2-3 días y se realizaron pasajes de las mismas cuando alcanzaban un 80 % de confluencia utilizando tripsina-EDTA para su disgregación. Se utilizó la línea reportera BV-2 NF-κB hGFP previamente generada mediante transfección con el plásmido pNF-κB-hrGFP. Este plásmido contiene un promotor con múltiples sitios de unión al factor de transcripción NF-κB, por lo tanto la expresión del gen reportero GFP se induce al activarse dicha vía transcripcional. Se sembraron 25.000 células por pozo en placas de 96 pocillos. Luego de 24 horas se adicionó el tratamiento correspondiente y se incubaron durante 2 horas a 37 °C, previo al agregado del estímulo pro-inflamatorio LPS (100 ng/mL). 24 h después se levantaron las células con Tripsina-EDTA 0.25% y se resuspendieron en medio de cultivo para su análisis por citometría de flujo con el equipo Attune NxT. Se utilizó DAPI (1:1000, Sigma D9542) para determinar la viabilidad celular. Se realizaron los tratamientos además del LPS: CD200-X a 0.1, 1, 5 o 10 µg/mL; CD200-Fc (R&D Systems, 3355-CD) a 1 o 5 µg/mL. El mantenimiento y tratamiento de los cultivos de células BV-2 fue realizado en conjunto con Karen Perelmuter de la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo.

Citometría de flujo

Tejido de médula espinal

Luego de ser anestesiados, los ratones fueron perfundidos con PBS frío para eliminar rastros de sangre y se disecaron 6 mm de tejido de médula espinal centrado en la lesión. El tejido fue cortado con una tijera en pedazos más pequeños y fue incubado por 30 minutos a 37°C para la disgregación enzimática con colagenasa 0.125% (Sigma C9407) y DNAsa 0.125% (Sigma D4527) en PBS sin calcio y magnesio. Luego de la digestión, el tejido fue disgregado mecánicamente a través de una malla de 70 µm y la suspensión de células en buffer de disociación (FBS 2%, EDTA 0.1M en PBS) fue centrifugada a 500 x G por 10 minutos. Cada muestra fue posteriormente dividida en tubos para el marcaje con anticuerpos o en un tubo control sin marca para determinar la autofluorescencia. Las células fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con la mezcla de anticuerpos. Luego de lavados, las células fueron procesadas en el citómetro Attune NxT y analizadas con el software FlowJo. Los siguientes anticuerpos fueron utilizados para marcar las poblaciones celulares en la médula espinal a modo de realizar la estrategia de selección de poblaciones de acuerdo con *Amo-Aparicio et al., 2018*⁴⁰³ y *Lago et al., 2018*⁸⁹: CD45-eFluor405 (1:200, eBioscience 48-0451-82), CD11b-APC-Cy7 (1:100, Biologend 101226), F4/80-PerCP-Cy5.5 (1:100 eBioscience 45-4801-82) Ly6G-PE (1:200, Biologend 127608) y Ly6C-FITC (1:100, Biologend 128005). La población de microglía se seleccionó como CD11b⁺ CD45^{low}, mientras que el resto de las células mieloides se seleccionaron como CD11b⁺ CD45^{high}. A partir de esa población, los neutrófilos se seleccionaron a partir de la población Ly6G⁺ y los macrófagos a partir de la población Ly6G⁻ F4/80⁺.

Citometría de flujo de células del bazo

Luego de la perfusión con PBS, se disecó el bazo de los ratones y un tercio de este tejido fue procesado para citometría de flujo. El tejido fue cortado en trozos pequeños y fue incubado por 30 minutos a 37°C para la disgregación enzimática con colagenasa 0.125% y DNAsa 0.125% en PBS sin calcio y magnesio. Luego de la digestión, el tejido fue disgregado mecánicamente a través de una malla de 70 µm y la suspensión de células en buffer de disociación (FBS 2%, EDTA 0.1M en PBS) fue centrifugada a 500 x G por 10 minutos. El pellet de células fue resuspendido en 1 mL de FBS y 10% de DMSO. Los crioviales fueron congelados lentamente utilizando un Mr

Frosty (ThermoFisher, #5100-0001) con alcohol isopropílico y las células fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis. Para su análisis las células fueron descongeladas rápidamente y luego de un lavado fueron incubadas durante 1 hora a 4°C con la mezcla de anticuerpos. Luego de lavados, las células fueron procesadas en el citómetro Attune NxT y analizadas con el software FlowJo. Los siguientes anticuerpos fueron utilizados para marcar las poblaciones celulares en el bazo de acuerdo a *Rose et al., 2011*⁴¹⁰: CD11b-APC-Cy7 (1:100, Biolegend 101226), Ly6G-PE (1:200, Biolegend 127608), CD11c-FITC (1:100, Biolegend 117305), CD19-APC (1:100, Biolegend 152409), CD3-FITC (1:100, Biolegend 100204), CD4-PE (1:100, Biolegend 100408). A partir de las células vivas (DAPI⁻), la población de linfocitos B se seleccionó a partir de las células CD19⁺. De las células CD19⁻, los linfocitos T se seleccionaron como CD3⁺, mientras que las células dendríticas como CD11c⁺. De las CD11c⁻, los neutrófilos se seleccionaron como Ly6G⁺, y los macrófagos como Ly6G⁻ SSC^{low}, mientras que los eosinófilos como Ly6G⁻ SSC^{high}.

Análisis de fagocitosis de mielina por citometría de flujo

Obtención de mielina y conjugación a pHrodo

Para la obtención de mielina purificada y la conjugación a pHrodo se siguió el protocolo de *Gomez-Lopez et al., 2021*⁴¹¹. Para ello, los ratones fueron sacrificados y perfundidos con PBS frío para remover la sangre y se disecaron los hemisferios cerebrales. El tejido fue cortado con tijeras en pequeños trozos y fue incubado por 30 minutos a 37°C para la disgregación enzimática con colagenasa 0.125% y DNAsa 0.125% en PBS sin calcio y magnesio. Luego de la digestión, el tejido fue disgregado mecánicamente a través de una malla de $70\ \mu\text{m}$ y la suspensión de células en buffer de disociación (FBS 2%, EDTA 0.1M en PBS) fue centrifugada a $500 \times G$ por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en PBS y llevado hasta un volumen final de 5.6 mL y posteriormente se añadió 1.4 mL de Percoll de densidad 1.22 g/mL. Luego se colocaron cuidadosamente por debajo de esta mezcla 2 mL de Percoll de densidad 1.088 g/mL utilizando una pipeta de vidrio hasta el fondo del tubo, quedando separadas las dos fases de percoll. Finalmente se colocaron 2 mL de PBS por encima de la mezcla de percoll y la muestra de tejido cuidadosamente de no mezclar las fases. Luego de una centrifugación de $600 \times G$ por 20 minutos a temperatura ambiente, se colectó la fase entre el PBS y el percoll, donde se ubica la mielina.

Luego se procedió a la cuantificación proteica de la mielina por medio del método del ácido bicunculínico (BCA) según *Smith et al., 1985*⁴¹² en una placa de 96 pocillos. La curva de calibración se realizó con concentraciones conocidas (0, 31.25, 62.5, 125, 500, 1000, 1500 y 2000 µg/µL) de seroalbúmina bovina (BSA) diluidas en PBS. En cada pocillo (por duplicado) se colocaron 8 µL de las muestras de tejido diluidas previamente 1:50 en PBS y de las diferentes concentraciones de BSA. Luego de incubar las muestras con 200 µL de la mezcla BCA/CuSO₄ (50 mL de BCA y 1 mL de CuSO₄ al 4%) durante 30 minutos a 37°C, se realizó la medición de absorbancia a 562 nm. Con los valores de absorbancia de la curva estándar de BSA, se realizó una regresión lineal a partir de la cual se interpolaron los valores de absorbancia de las diferentes muestras de tejido para determinar la concentración total de proteínas.

Una vez obtenida la fracción de mielina, se procedió a la conjugación con el pHrodo reconstituido en DMSO. Para la conjugación se incubaron 277.5 µg de la fracción de mielina purificada en PBS a pH 8.0 con el pHrodo durante 45 minutos en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se centrifugó a 4000 x G durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 950 µL de PBS a pH 7.4 para obtener mielina conjugada a pHrodo con una concentración final de 0.3 µg/mL.

Fagocitosis en tejido de médula espinal

Luego de obtener la suspensión de células a partir del tejido de médula espinal como fue descrito previamente (ver sección de citometría de flujo de tejido de médula espinal), los tubos destinados al análisis de la fagocitosis de mielina fueron incubados durante 4 horas a 37 °C en oscuridad con 3 µg de mielina conjugada a pHrodo según *Gomez-Lopez et al., 2021*⁴¹¹. Luego de un lavado, se procedió al marcaje de las células con los anticuerpos mencionados previamente y al análisis por citometría de flujo utilizando el citómetro Attune NxT y el software FlowJo para la cuantificación.

Fagocitosis en cultivo celular de macrófagos derivados de la médula ósea

Luego de la diferenciación de los precursores durante 7 días se plaquearon las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 75.000 células por pocillo durante 1 día en medio DMEM/F12 completo con 20 ng/mL de M-CSF. Se realizó el tratamiento con CD200-X (5 o 100 µg/mL) y/o LPS (100 ng/mL) durante 24 horas. Luego las células se incubaron con 1.8 µg de mielina conjugada a pHrodo en medio DMEM/F12 completo con 5 ng/mL de M-CSF durante 1 hora. Finalmente, las células fueron levantadas con tripsina durante 30 minutos y analizadas en el citómetro Attune Nxt y el software FlowJo para la cuantificación. Las células se incubaron con DAPI (1:1000, Sigma D9542) durante unos segundos previos a la adquisición para evidenciar las células muertas.

Procesamiento histológico

Nervio ciático

Los ratones fueron anestesiados profundamente con pentobarbital y se realizó la perfusión intracardíaca con 40 mL de paraformaldehído (PFA, Sigma) al 4% frío en buffer fosfato (PB) 0.1 M. Se disecaron 10 mm del nervio ciático lesionado y sin lesionar desde la salida de la columna vertebral. Los nervios fueron post-fijados con PFA al 4% en 0.1 M PB durante 3 horas y luego de un lavado con PBS fueron crioprotectados en solución de sacarosa (Sigma) al 30% en PBS a 4 °C por al menos 48 horas. Posteriormente, las muestras fueron embebidas en un compuesto soluble en agua de glicoles y resinas (Tissue-Tek; Sakura) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras de nervio ciático congeladas se cortaron en el criostato Leica CM1850 UV, y las secciones de 8 µm fueron colectadas en portaobjetos de vidrio gelatinizados y almacenadas a -20 °C hasta su posterior análisis.

Para realizar la inmunofluorescencia sobre las secciones en portaobjetos, se dejaron descongelar las secciones a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego de lavados con PBS y PBS + Tritón 1%, se procedió al bloqueo de las muestras durante 1 hora a temperatura

ambiente con PBS + 1% Tritón X-100 + 10% suero fetal bovino (FBS; GIBCO 10270-106). Se incubaron las secciones con los anticuerpos primarios rata anti-CD200 (1:100; Serotec MCA1958), conejo anti- S100 β (1:150; Sigma SAB5700647), rata anti-Ly6G (1:200; Biolegend 127601) y/o lectina de *Lycopersicon esculentum* (1:100; Sigma L9389) diluidos en PBS + 1% Tritón X-100 + 10% FBS durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBS + Tritón 1%, las secciones fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios diluidos 1:400 en PBS + 1% Tritón X-100 + 10% FBS: anti-rata Alexa 488 (Invitrogen), anti-conejo Alexa 633 (Invitrogen) o Streptavidina 660 (Invitrogen). Luego de lavados con PBS, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con DAPI (1:1000, Sigma D9542). Finalmente, se montaron las muestras con glicerol 80% en PBS y se obtuvieron imágenes confocales utilizando el microscopio ZEISS LSM 880.

El número total de neutrófilos en las secciones de nervio ciático fue determinado a 1 día post-lesión por medio del conteo de células totales Ly6G⁺ en la sección. Luego de la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, se obtuvieron imágenes de epifluorescencia de toda la sección longitudinal de nervio ciático a 63x con el microscopio ZEISS LSM 800, y las imágenes individuales fueron juntadas para formar toda la sección de nervio. Tres secciones por animal fueron utilizadas para cuantificar el número de células Ly6G⁺. El conteo de células fue realizado con el software ImageJ y el número de células fue normalizado por el área total de la sección longitudinal del nervio ciático.

Separación (teasing) de fibras nerviosas en nervio ciático

Para la inmunofluorescencia de fibras aisladas, nervios ciáticos de ratones sin lesionar fueron disecados e inmersos inmediatamente en PFA al 4% en 0.1 PB durante 3 horas. Luego de lavados con PBS, el tejido de nervio ciático fue colocado sobre un portaobjetos gelatinizado y se procedió a la separación de las fibras nerviosas. En primer lugar, el tejido fibroso perineural fue removido y los fascículos de fibras nerviosas fueron separadas progresivamente bajo lupa utilizando agujas (Alcon 8065446520). Se dejó secar el tejido para permitir la adherencia al portaobjetos y luego se procedió al bloqueo de las fibras nerviosas separadas con PBS + 1% Tritón + 10% FBS, por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios rata anti-CD200 (1:100; Serotec MCA1958) y conejo anti- S100 β (1:150; Sigma SAB5700647) diluidos en PBS + 1% Tritón + 10% FBS durante toda la noche a temperatura

ambiente. Luego de los lavados con PBS + Tritón 1%, las fibras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios anti-rata Alexa 488 (Invitrogen) y anti-conejo Alexa 633 (Invitrogen) diluidos 1:400 en PBS. Luego de los lavados con PBS, las muestras se incubaron con DAPI (1:1000, Sigma D9542) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las muestras con PBS y se montaron utilizando glicerol 80% en PBS. Se obtuvieron imágenes confocales de las fibras separadas utilizando un microscopio confocal ZEISS LSM 880 y se analizaron posteriormente utilizando el software ImageJ.

Nervio tibial

El nervio tibial fue colectado a los 28 dpl para el análisis de remielinización luego de la lesión de nervio ciático. Luego de la perfusión con PFA 4%, se disecaron los nervios tibiales a nivel del tobillo y post-fijados en glutaraldehído al 2% en 0.1M PB. Luego las muestras fueron incluidas en resina Epon para la preparación de cortes semifinos. Para ello, las muestras de tejido de nervio tibial fueron incluidas en una solución de osmio al 1.5% en PB durante 60 a 90 minutos. Luego de lavados con PB, las muestras fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de etanol hasta llegar al 100% de etanol. Posteriormente las muestras fueron incluidas en soluciones crecientes de resina en acetona, para luego dejar las muestras en resina durante toda la noche. Finalmente, se colocaron las muestras en los recipientes con resina para formar los bloques durante 48 horas a 60 °C y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los cortes semifinos fueron realizados con el vibratomo Leica VT1000 y se colectaron secciones transversales del nervio tibial de 1 µm de grosor. Se realizó la tinción de las secciones con azul de metileno durante 1 minuto. Se capturaron imágenes de toda la sección transversal del nervio tibial a 10x utilizando el microscopio Olympus CX41 con la cámara Media Cybernetics PLS-A662 acoplada a una computadora. Se obtuvieron por muestreo al azar imágenes a 100x que representaran al menos el 30% del área total transversal del nervio. Luego se cuantificó el área total de la sección transversal del nervio con las imágenes a 10x y se realizó el conteo de fibras mielínicas con las imágenes a 100x utilizando el software ImageJ. Finalmente se normalizó el número de fibras mielínicas de acuerdo con el área transversal del nervio.

Inervación de la piel

La inervación de la piel fue evaluada por medio del análisis de densidad de fibras nerviosas presentes en la epidermis de las patas traseras. Para ello, se disecó el tejido de la piel de las patas traseras a los 28 días post-lesión de nervio ciático y sin lesionar, y se procesó el tejido de la misma manera que el nervio ciático hasta el paso de congelamiento del tejido. Previo al congelamiento del tejido, se disecó aún más el tejido de la piel para quedarse únicamente con la almohadilla plantar correspondiente para su posterior análisis. El tejido de la almohadilla fue cortado en criostato Leica en secciones de 70 μm que fueron colectadas en medio OLMOS y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Para realizar el marcaje por inmunofluorescencia de las secciones de piel de las patas traseras, en primer lugar se realizaron lavados con PBS para eliminar el medio OLMOS de las secciones y luego se bloqueó el tejido con PBS + 1% Tritón + 10% FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego las secciones fueron incubadas durante 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario de conejo anti-producto del gen de proteína 9.5 (PGP9.5, 1:500; Cedarlane CL7756AP), el cual marca las fibras nerviosas en la epidermis. Luego de lavados con PBS + Tritón 1%, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario de burro anti-conejo Cy3 (1:200; Millipore) durante 24 horas a 4°C . Luego de los lavados, se colocaron las secciones en portaobjetos gelatinizados y se montaron con glicerol 80% en PBS. Cinco secciones de cada muestra de piel fueron utilizadas para cuantificar las fibras nerviosas presentes en la epidermis de las almohadillas plantares. Las secciones de tejido fueron examinadas utilizando un microscopio Olympus IX81 y las imágenes de secciones longitudinales fueron adquiridas a 20x con la cámara AxioCam MRm Zeiss acoplada a una computadora. Para la cuantificación y posterior análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ. Se cuantificó el área total de la epidermis en cada sección y se contó el número de fibras nerviosas PGP9.5⁺. Finalmente se normalizó el número de fibras nerviosas de acuerdo al área total de la epidermis en cada sección. Se midieron tres secciones por muestra y se tomó el valor promedio de las tres secciones como el valor final de fibras por área de epidermis.

Médula espinal

El tejido de médula espinal se obtuvo de ratones hembras C57BL6/J, *wt* o *CD200R1-KO* a los 28 días post contusión de médula espinal. El tejido se obtuvo de la misma manera como fue detallado previamente para el nervio ciático. Se disecaron 6 mm de médula espinal con el epicentro en la lesión. Las secciones de tejido transversales se realizaron con el criostato Leica. Se realizaron 4 series de portaobjetos, en el cual se colocaron secciones transversales de 14 μm

de grosor, por lo que las secciones adyacentes en el mismo portaobjetos representan una separación de 140 μm de la médula espinal. Los portaobjetos con los cortes seriados de la médula espinal fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Bazo

El bazo de ratones hembras *wt* o *CD200R1-KO* fue disecado luego de la perfusión del animal con PFA 4% a las 24 horas o 15 días post lesión de médula espinal. Luego del procesamiento de tejido ya mencionado para el tejido de nervio ciático, se hicieron secciones del tejido de bazo de 70 μm de grosor y se colocaron en medio OLMOS. Las secciones se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. Las fibras noradrenérgicas en el bazo fueron detectadas y cuantificadas por inmunofluorescencia para la tirosina hidroxilasa⁴¹³. Luego de lavados con PBS para eliminar el OLMOS de las secciones de bazo, se realizó el bloqueo del tejido con PBS + 1% Tritón + 10% FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las secciones en flotación con el anticuerpo primario conejo anti-tirosina hidroxilasa (Abcam, ab6211) diluído 1:100. Luego de lavados con PBS + Tritón 1%, se incubaron con el anticuerpo secundario de detección anti-conejo Alexa 633 (Invitrogen) diluído 1:400. Luego de lavados con PBS se colocaron las secciones en portaobjetos de vidrio gelatinizados y se montaron con glicerol 80% en PBS. Se adquirieron imágenes de epifluorescencia con el microscopio Zeiss LSM 800 a un aumento de 20x. Las imágenes de toda la sección del bazo fueron luego juntadas para formar una composición de todo el tejido. Utilizando el software ImageJ se cuantificó el área total de tejido de la sección y el área positiva para tirosina hidroxilasa determinando un único umbral de intensidad de fluorescencia. Se cuantificaron tres secciones por animal y se utilizó el valor promedio de área tirosina hidroxilasa positiva normalizada por el área total de tejido del bazo.

Cuantificación del número de microglía en cerebro

Para la cuantificación del número de células microgliales en el cerebro, se sacrificaron los ratones *wt* y *CD200R1-KO* a las 24 horas luego de la administración con LPS 2 mg/kg intraperitoneal. Se realizó la perfusión intracardiaca con 40 mL de PFA 4% frío en PB. Se disecó el cerebro y se post-fijó con PFA 4% durante 4 horas. Luego se crioprotegió el tejido con sacarosa 30% en PBS a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por al menos 48 horas. Posteriormente se realizaron secciones coronales del cerebro de

30 μm de espesor, se colocaron en medio OLMOS y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior procesamiento.

Para cuantificar el número de microglía, se realizó la detección de microglía por inmunohistoquímica contra Iba-1. Para ello, se realizaron lavados con PBS para eliminar el OLMOS de las secciones de cerebro, se realizó el bloqueo del tejido con PBS + 1% Tritón + 10% FBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Previo a la incubación con los anticuerpos, se inactivó la peroxidasa endógena incubando a las secciones de tejido con metanol 70% en PBS 30% y H_2O_2 2% durante 10 minutos. Posterior a los lavados con PBS + Tritón 1%, se incubaron las secciones en flotación con el anticuerpo primario conejo anti-Iba-1 (1:500, Wako 019-19741) durante toda la noche. Luego de lavados con PBS + Tritón 1%, se incubó el tejido con el anticuerpo secundario de detección anti-conejo HRP (1:250, Invitrogen). Luego de lavados con PBS, se incubaron las secciones con DAB 0,5mg/ml en PBS + H_2O_2 0.3% para revelar la marcación. Finalmente, se colocaron las secciones en portaobjetos de vidrio gelatinizados, se deshidrataron las muestras con concentraciones crecientes de etanol y xilol, y se montaron con medio DPX. Posteriormente, se adquirieron imágenes a 20x de la corteza cerebral adyacente y superior al hipocampo con el microscopio Olympus CX41 acoplado a la cámara Media Cybernetics PL-A662. Utilizando el software ImageJ, se cuantificó el número de células Iba-1⁺ en tres secciones por animal y se normalizó con el área total de tejido en la imagen.

Análisis de limpieza de mielina en el tejido

Para el análisis de la limpieza de mielina, se utilizaron secciones longitudinales de 8 μm de grosor de nervio ciático, así como también series de secciones de 14 μm de médula espinal y se realizó la tinción con Luxol Fast Blue (LFB; Sigma). Luego de deshidratar las muestras por el pasaje de alcoholes de concentración creciente, las secciones fueron incubadas durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una solución de 1 mg/mL de LFB en etanol 95% y 0.05% de ácido acético. Luego, las secciones fueron lavadas con agua destilada antes de ser desteñidas con una solución de Li_2CO_3 0.05% en agua destilada por 10 segundos. Luego de un breve pasaje por etanol 70%, las secciones fueron deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol y xilol para ser montadas en medio DPX (Sigma). Se adquirieron imágenes a 20x con el microscopio Olympus CX41 acoplado a la cámara Media Cybernetics PL-A662. Utilizando el software ImageJ, se

cuantificó el área LFB⁺ en tres secciones por animal y se normalizó con el área total de tejido en la imagen.

Análisis de degradación de mielina en el tejido

Para el análisis de la degradación de mielina, las secciones de nervio ciático fueron teñidas con Oil Red O (ORO, Sigma). Para ello, las secciones fueron incubadas en una solución con ORO al 60% en alcohol isopropílico durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego colocadas bajo agua corriente durante 30 minutos. Las secciones fueron luego montadas en glicerol 80% en PBS. Se adquirieron imágenes a 20x con el microscopio Olympus CX41 acoplado a la cámara Media Cybernetics PL-A662. Utilizando el software ImageJ, se cuantificó el área ORO⁺ en tres secciones por animal y se normalizó con el área total de tejido en la imagen.

Análisis de parámetros sanguíneos

Analizador hematológico

Se realizó el análisis de parámetros sanguíneos por medio de un analizador hematológico a partir de una muestra de sangre de ratones *wt* o *CD200R1-KO* en condiciones normales, luego de una lesión de médula espinal o luego de la administración con LPS. Se colectó la sangre de la aurícula derecha en tubos con EDTA-2K (1:10, Wiener Lab QC-1898552-W), luego de que los ratones fueron anestesiados profundamente y previo al momento de realizar la perfusión intracardíaca. Las muestras de sangre fueron analizadas con el analizador hematológico Mindray-BC 5000 Vet.

Análisis de la expresión génica

Extracción y purificación de ARN mensajero

Con el fin de evaluar los niveles de expresión génica para diferentes genes relacionados con la respuesta inflamatoria en los diferentes tejidos, se realizó la extracción de ARN de nervio ciático y de macrófagos derivados de médula ósea, se retrotranscribieron las muestras a ADN copia y luego se analizaron diferentes genes por PCR cuantitativa (qPCR). En primer lugar, los ratones fueron anestesiados profundamente con pentobarbital y se realizó la perfusión intracardíaca con

PBS frío para eliminar la sangre. Se disecaron los tejidos (nervio ciático, bazo y/o 8 mm de médula espinal centrado en la lesión) y fueron congelados inmediatamente con nitrógeno líquido. Luego, las muestras de nervio ciático fueron homogeneizadas en 500 μ L de Trizol (SIGMA, T9424) mientras que las muestras de bazo y médula espinal fueron homogeneizadas en 800 μ L de Trizol, utilizando el dispositivo T10 basic ULTRA-TURRAX (IKA) durante 1 minuto, manteniendo las muestras en hielo. Luego de una centrifugación a 13.000 xG durante 1 minuto, se procedió a la purificación de la fase acuosa utilizando el kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, R2070). Para el caso de la extracción de ARN de BMDM, las células fueron lisadas en 300 μ L de trizol y el procedimiento de aquí en más fue el mismo que para las muestras de tejido.

Brevemente, luego de quedarse con el sobrenadante de la muestra homogeneizada en trizol, se mezcló con el mismo volumen de etanol 100%. Todo el volumen se cargó en las columnas del kit y se centrifugaron las columnas. Luego de un lavado con el buffer *Wash* del kit, se incubaron las columnas con 80 μ L de ADNasa (6 U/ μ L) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavados con el buffer *Pre-wash*, se realizó un lavado con el buffer *Wash* para eliminar todos los restos de los reactivos utilizados y se procedió a eluir el ARN retenido en la columna con agua libre de ARNasas y ADNasas. Las muestras de nervio ciático y de BMDM fueron eluidas en un volumen de 50 μ L de agua, mientras que las muestras de bazo y médula espinal fueron eluidas con 80 μ L de agua. Luego, se cuantificó la concentración de ARN y la pureza de las muestras utilizando el dispositivo Nanodrop o Quanterix. Luego se procedió a realizar la retrotranscripción de las muestras de ARN, teniendo en cuenta que todas las muestras analizadas por qPCR fueron procesadas simultáneamente para tener una cantidad de ADN copia similar.

Retrotranscripción del ARN mensajero a ADN copia

A modo de que todas las muestras tengan la misma concentración de ARN, se diluyeron todas las muestras de ARN a analizar en simultáneo con agua libre de ARNasas y ADNasas hasta la menor concentración presente en las muestras. Para la retrotranscripción se utilizó el kit M-MLV RT (Invitrogen, #28025-013). Se incubaron las muestras durante 5 minutos a 65 °C con una mezcla de nucleótidos (10 mM) y random primers (250 ng/ μ L). Luego fueron incubadas durante 2 minutos a 37 °C con buffer First Strand 1X y DTT (0.1 M). Finalmente, las muestras fueron

incubadas con la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT durante 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 37 °C y 15 minutos a 70 °C.

Amplificación por PCR cuantitativa

Con el fin de analizar los niveles de expresión génica en los diferentes tejidos, se analizaron las muestras de ADN copia por qPCR. TaqMan Fast Advanced Master Mix (Invitrogen, 4444557) fue añadido a las muestras de ADN copia, junto con las siguientes sondas: CD200 (Mm00487740_m1), CD200R1 (Mm00491164_m1), IL1- β (Mm01336189_m1), IL-6 (Mm00446190_m1), IL-10 (Mm01288386_m1), TGF- β (Mm00178820_m1), TNF α (Mm00443258_m1), INF- γ (Mm001168134_m1), CCL2 (Mm00441242_m1), CCL3 (00441259_g1), CD68 (Mm00444543_m1). La reacción de amplificación fue realizada con el termociclador QuantStudio 3 (Thermo-Fisher), siguiendo las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 20 segundos a 60 °C. La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando las eficiencias de la PCR en tiempo real y la desviación del punto de cruce de una muestra desconocida frente a un control. El control endógeno GAPDH (Mm99999915_g1) se incluyó para estandarizar cada reacción con respecto a la integridad del ARN y como control de carga.

Secuenciación de ARN y análisis transcripcional

Para el análisis transcripcional, siguiendo el protocolo detallado anteriormente, se realizó la extracción de ARN total de uno de los hemisferios cerebrales. Los ratones se sacrificaron a las 16 horas de la administración i.p. de LPS (2 mg/kg masa corporal) o vehículo (PBS). Se utilizaron ratones hembra *wt* y *CD200R1-KO* de 12 semanas de edad, con un tamaño de muestra de cuatro animales por grupo experimental. Luego de la extracción, se determinó la calidad del ARN con el dispositivo NanoDrop ND-1000 (Thermo-Fisher). Las muestras de ARN fueron enviadas a MacroGen (Corea del Sur) para su secuenciación. Se utilizó el kit de preparación de muestras TruSeq Stranded mRNA LT de Illumina para la construcción de la biblioteca y se obtuvieron lecturas pareadas (150x2 pares de bases) mediante secuenciación Illumina. El posterior análisis de los resultados de secuenciación fue realizado en conjunto con Natalia Rego de la Unidad de Bioinformática del Institut Pasteur de Montevideo. Se utilizó BBduk⁴¹⁴ para recortar las lecturas. La calidad de las secuencias crudas y procesadas se evaluó con FastQC v0.11.9⁴¹⁵ y MultiQC v1.11⁴¹⁶. Se utilizó STAR⁴¹⁷ para mapear las lecturas al genoma del ratón utilizando el genoma y anotaciones de referencias de Genconde M32 (ensamblaje primario GRCm39); el alineamiento

se realizó utilizando las opciones estándar de ENCODE⁴¹⁸. Los perfiles de expresión a nivel génico se obtuvieron utilizando FeatureCounts v2.0.1⁴¹⁹ con las opciones *-p -s 2 -M--fraction*.

Sobre las matrices de expresión obtenidas, se utilizó el paquete DESeq2 v1.36.0 de R para normalizar los datos, corregir por la profundidad de secuenciación de las bibliotecas y realizar pruebas de expresión diferencial. Se realizó un prefiltrado mínimo de la matriz para conservar sólo los genes que tenían al menos 10 lecturas. Se realizaron análisis de componentes principales con los paquetes de R FactoMineR v2.4⁴²⁰ y factoextra v1.0.7, usando los datos transformados por estabilización de varianza (*vst, blind=TRUE*) y seleccionando los 500 genes más variables. Para estimar los cambios en los niveles de expresión entre los genotipos *wt* y *CD200R1-KO* y su significancia estadística, se utilizó la prueba de Wald con el diseño “tratamiento + genotipo”, tanto para la hipótesis $|\log_2FC| > 0$ como $|\log_2FC| > 1$. Se realizó una corrección del tamaño del efecto estimado (\log_2FC) mediante el método *apeglm*⁴²¹ implementado en DESeq2. Para la corrección de las pruebas múltiples, se utilizó un enfoque estratificado de falsos descubrimientos con p-valores corregidos por Benjamini-Hochberg. Definimos como genes diferencialmente expresados aquellos que presentaban un valor de p corregido por *FDR* < 0.1 y $abs(\log_2FC \text{ corregido por } apegm) > 0.35$, umbral que implica un tamaño mínimo de efecto del 25% aproximadamente. El gráfico de volcán se produjo con el paquete R/Bioconductor EnhancedVolcano v1.14.0. Se realizó el análisis de sobre-representación de las vías de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)⁴²² y *Gene Ontology* (dominio de Procesos Biológicos - GO:BP)⁴²³, usando los paquetes de R/Bioconductor *ClusterProfiler*, *enrichplot*, y *org.Mm.eg.db*.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los datos en las gráficas de columnas se muestran como el promedio \pm el desvío estándar (SD), mientras que en las gráficas de puntos a diferentes tiempos se muestran como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). Para los análisis estadísticos donde se compararon los genotipos frente a otra variable independiente, se utilizó el test de ANOVA de dos vías seguido del test post-hoc de Bonferroni. Para los datos experimentales con más de un grupo experimental y una variable independiente se utilizó el test de ANOVA de una vía seguida del test post-hoc de Bonferroni o de Tukey. Para la comparación de las diferencias de promedios de dos grupos experimentales se utilizó el test t de Student de dos colas. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Capítulo 1 / Objetivo específico 1: Rol de CD200-CD200R1 en una lesión de nervio periférico

En primer lugar, nos planteamos estudiar el rol de la interacción entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1 en el sistema nervioso periférico en condiciones normales y luego de una lesión traumática. Este abordaje nos brinda la oportunidad de adentrarnos en una comprensión más profunda de los mecanismos que subyacen a la degeneración Walleriana y la regeneración del SNP. Al aumentar nuestro entendimiento de estos procesos, podemos evidenciar las diferencias clave entre las respuestas a una lesión en el SNP y el SNC, que en última instancia contribuyen a promover la regeneración del tejido nervioso tras un trauma y una recuperación eficaz y parte de los resultados de este trabajo fueron publicados recientemente¹⁴⁸.

Caracterización de la expresión de CD200 y CD200R1 en el nervio ciático normal y luego de una lesión traumática

Expresión de CD200 en nervio ciático

Estudios previos demostraron la presencia por inmunohistoquímica de CD200 en nervio ciático de rata sin lesionar, principalmente en las células de Schwann, y un descenso a los 7 dpi¹⁴⁷. Teniendo esto en cuenta, nos planteamos profundizar en la caracterización de la expresión de CD200 en nervio ciático de ratón en condiciones normales y a diferentes tiempos post-lesión. Para ello, realizamos inmunofluorescencia de secciones longitudinales de nervio ciático sin lesionar, utilizando anticuerpos que reconocen a CD200 en conjunto con otros marcadores para evidenciar qué tipo celular y/o estructura es el que expresa CD200. En primer lugar, marcamos CD200 en conjunto con S100- β , el cual es utilizado como marcador de células de Schwann en el SNP, con el fin de confirmar la presencia de CD200 en este tipo celular¹⁶². Por un lado,

observamos la presencia de CD200 en estructuras en donde se evidencia una interrupción de la vaina de mielina con S100- β , sugiriendo la presencia de CD200 en los nodos de Ranvier (flechas en la Figura 25 A-C), como fue descrito previamente. Sin embargo, observamos a su vez la presencia de CD200 en estructuras negativas para S100- β , señaladas con las puntas de flechas en la Figura 25 A-C. Se ha reportado que las células endoteliales expresan CD200 en altos niveles¹⁰⁸, por lo tanto, nos propusimos analizar si estas estructuras CD200⁺/S100- β ⁻ correspondían a vasos sanguíneos, también teniendo en cuenta la morfología alargada observada de estas estructuras en las inmunofluorescencias. Para ello, utilizamos la lectina de tomate, la cual se une a las células endoteliales, y observamos una co-localización de CD200 con estas estructuras (Figura 25 D-F), por lo que confirmamos la presencia de CD200 en las células endoteliales presentes en el nervio ciático sin lesionar. Luego, para caracterizar en mayor detalle la localización de CD200 en las células de Schwann y en los diferentes dominios que éstas presentan, realizamos la técnica de “teasing” de fibras nerviosas del nervio ciático sin lesionar. Esta técnica nos permite aislar una única fibra nerviosa, permitiendo un mayor detalle de las diferentes regiones de ésta⁴²⁴. Por medio de esta técnica confirmamos la presencia de CD200 en los nodos de Ranvier (flechas en Figura 25 G-I) al igual que en las inmunofluorescencias de secciones longitudinales del nervio ciático. Sin embargo, esta técnica nos permitió evidenciar la presencia de CD200 en las incisuras de Schmidt-Lanterman (puntas de flecha en Figura 25 G-I).

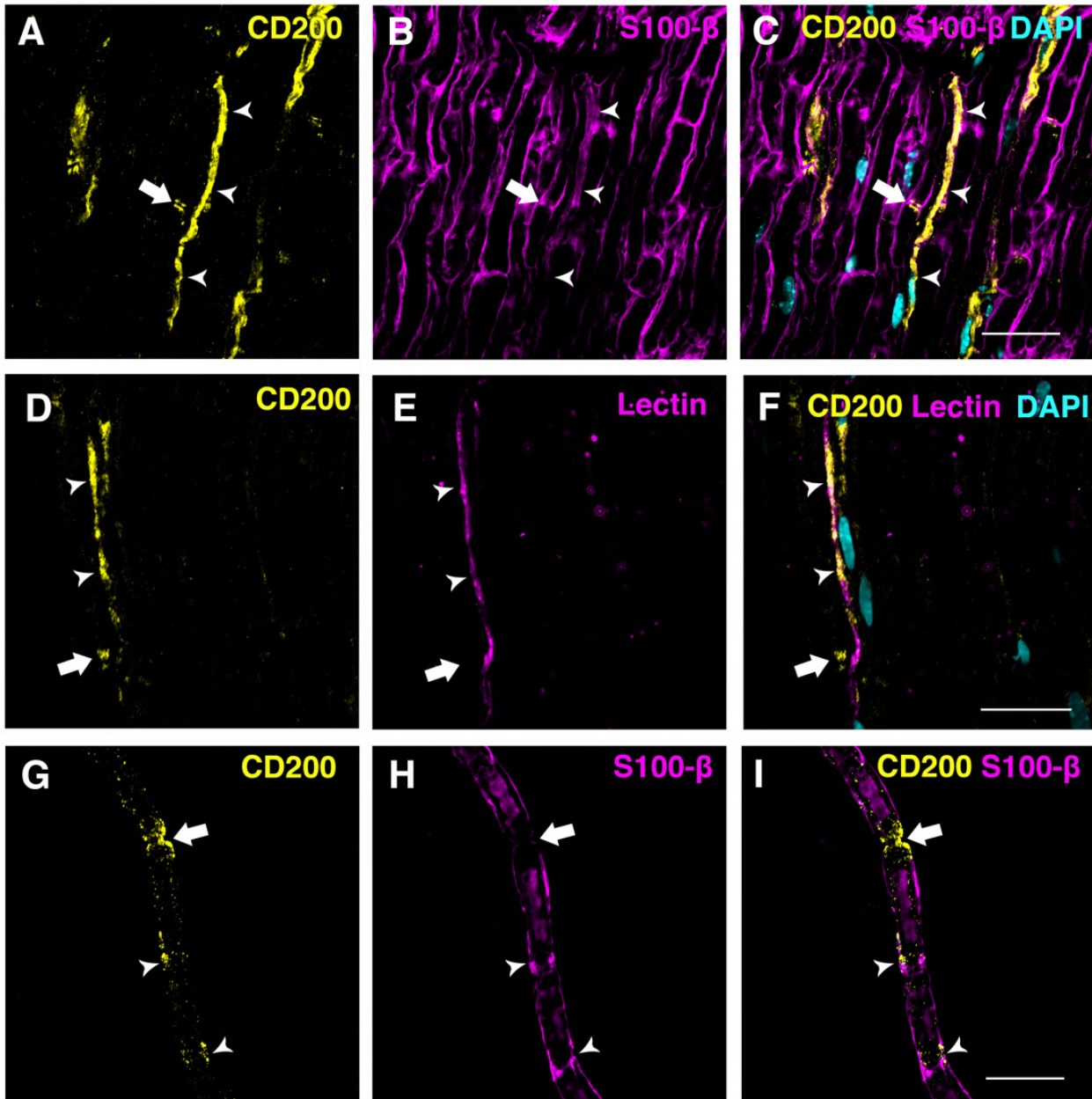


Figura 25. Localización de CD200 en el nervio ciático en condiciones normales. (A-F) En las imágenes se observa un plano confocal de 1 μm de inmunofluorescencia en secciones longitudinales de nervio ciático sin lesionar. CD200 (en amarillo) se observa en los nodos de Ranvier (flechas) y en los vasos sanguíneos (puntas de flecha). S100- β (en magenta) es expresado por las células de Schwann, mientras que la lectina de tomate (en magenta) es un marcador de células endoteliales. (G-I) Imágenes de un plano confocal de 1 μm de inmunofluorescencia de fibras de nervio ciático sin lesionar “teased”. Se observa la presencia de CD200 en los nodos de Ranvier (flechas) y en las incisuras de Schmidt-Lanterman (puntas de flecha). Escala: 30 μm .

En una siguiente instancia, nos propusimos analizar en detalle la dinámica temporal y espacial de los cambios de expresión de CD200 luego de una lesión de nervio por aplastamiento. Para ello, analizamos la presencia de CD200 en el nervio ciático por PCR cuantitativa e inmunofluorescencia a 1, 7, 14 y 28 dpl (Figura 26). Por PCR cuantitativa observamos un descenso leve pero rápido en la expresión de CD200 a las 24 horas post-lesión que se mantiene hasta los 7 dpl (Figura 26 A), lo que concuerda con lo observado por *Chang et al.*¹⁴⁷ por inmunofluorescencia a los 7 dpl. A los 14 dpl observamos un aumento en la expresión de CD200 que se mantiene en altos niveles hasta los 28 dpl cuando comparamos con los valores a 1 y 7 dpl, mientras que cuando comparamos con la condición naïve observamos una tendencia a duplicar la expresión de CD200 ($p = 0.06$, ANOVA de una vía seguido de test post-hoc de Bonferroni). Por inmunofluorescencia confirmamos el descenso a las 24 horas post-lesión en segmento distal del nervio lesionado (Figura 26 B). A las 24 horas post-lesión, no detectamos CD200 en vasos sanguíneos, pero sí en los nodos de Ranvier, sugiriendo que el descenso de CD200 a las 24 horas post-lesión puede deberse a la pérdida de CD200 en los vasos sanguíneos y no en las células de Schwann. A los 7 dpl se observa un leve aumento, comparado con las 24 horas post-lesión, en la presencia de CD200 principalmente en estructuras que se asemejan a vasos sanguíneos. A los 14 dpl confirmamos el aumento de la presencia de CD200 en el nervio ciático observado por PCR cuantitativa.

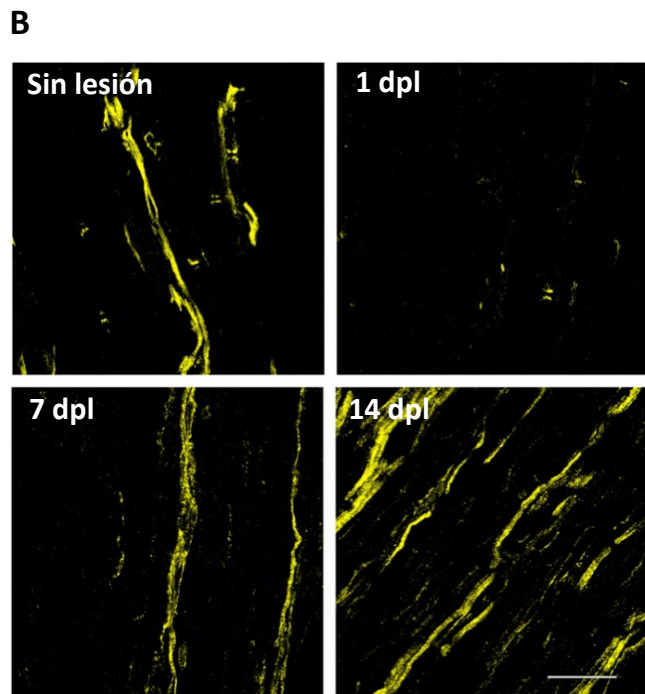
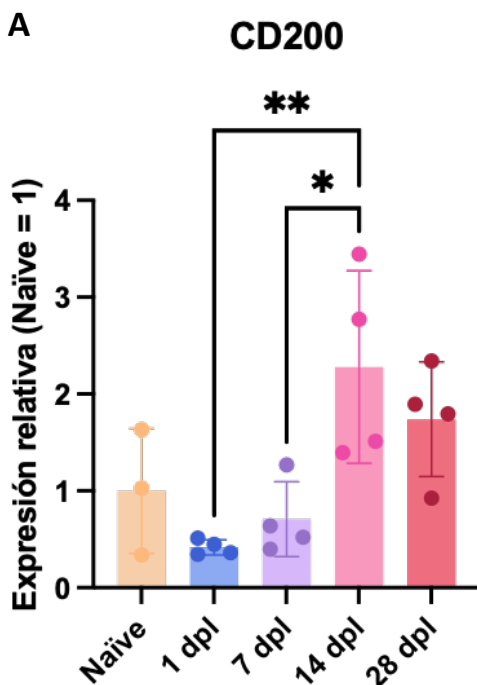


Figura 26. Cambios en la expresión de CD200 luego de una lesión de nervio ciático por aplastamiento. (A) La expresión de CD200 en el nervio ciático evaluada por PCR cuantitativa en tiempo real, disminuye a las 24 horas post-lesión y permanece en bajos niveles a los 7 dpl. A los 14 dpl se observa un aumento que se mantiene hasta los 28 dpl (ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Newman-Keuls * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n=3-4$ animales por punto de tiempo) **(B)** A nivel del tejido del nervio ciático lesionado, por inmunofluorescencia para CD200 (en amarillo) se observa una disminución a las 24 horas post-lesión, principalmente por la pérdida de CD200 en vasos sanguíneos. A los 14 dpl se observa un aumento en la marca para CD200 en concordancia con lo observado por PCR cuantitativa.

Análisis de la expresión de CD200R1 en nervio ciático

Previo a la publicación de nuestro grupo¹⁴⁸, no se había analizado la dinámica temporal de CD200R1 en nervio ciático antes y después de una lesión, así como tampoco el rol de este receptor en los procesos que ocurren tras la lesión. Al igual que lo que ocurre con otros inmunoreceptores que se encuentran en muy baja proporción en las células, y considerando que en condiciones normales, la presencia de células mieloides en el tejido que puedan expresar CD200R1 es escasa y se reduce a unos pocos macrófagos residentes⁴²⁵, la detección del receptor CD200R1 por inmunofluorescencia en el tejido del nervio ciático presenta muchas complicaciones. Por lo tanto, nos propusimos analizar la dinámica de expresión de CD200R1 en el tejido de nervio ciático por PCR cuantitativa y por citometría de flujo, las cuales permiten evidenciar con mayor precisión la presencia de CD200R1. En primer lugar, por PCR cuantitativa analizamos los cambios en la expresión de CD200R1 en el nervio ciático sin lesionar y a 1, 7, 14 y 28 dpl (Figura 27 A). Después de la lesión se observó una tendencia al aumento de la expresión de CD200R1, principalmente a los 14 dpl cuando comparamos con la condición naïve ($p = 0.06$, ANOVA de una vía con test post-hoc de Bonferroni), donde aumentó 19 veces en comparación con la condición basal. Luego, nos propusimos determinar en mayor detalle cuáles son las poblaciones celulares que expresan CD200R1 en el nervio lesionado y su dinámica espacio-temporal. Mediante citometría de flujo, fue analizada la presencia de CD200R1 en las poblaciones de macrófagos y neutrófilos luego de la lesión, ya que comprenden las principales poblaciones del sistema inmune que ingresan al tejido nervioso participando activamente en la degeneración Walleriana^{426,427}. Observamos un rápido ingreso de neutrófilos y macrófagos al nervio lesionado como ya se describió anteriormente. Mientras que los neutrófilos rápidamente

disminuyeron en número encontrándose en bajos números a los 5 dpl, la población de macrófagos continuó aumentando en número hasta alcanzar el pico máximo a los 5 dpl. Luego, a los 14 dpl la población de macrófagos disminuye pero permanece en niveles más altos que en condiciones normales sin lesionar. Al analizar la presencia de CD200R1 en la población de macrófagos residentes, es decir en el nervio en condiciones normales, observamos que a pesar de que se encuentran en baja cantidad, alrededor de un 60% de estos macrófagos residentes en el nervio son CD200R1⁺. Interesantemente, esta proporción de macrófagos CD200R1⁺ se mantiene constante luego de la lesión (Figura 27 C). A su vez, la medida de la mediana de intensidad de fluorescencia para CD200R1 en la población de macrófagos, nos permitió evidenciar que luego de la lesión, los macrófagos presentes en el nervio expresan una menor cantidad de CD200R1 que los macrófagos residentes en condiciones normales (Figura 27 D). En conjunto, estos resultados sugieren que a pesar de que la proporción de macrófagos que expresan CD200R1 se mantiene constante, luego de la lesión los macrófagos expresan una menor cantidad de CD200R1. Sin embargo, dado que ingresa una gran cantidad de macrófagos y neutrófilos al tejido nervioso lesionado, observamos un aumento neto en los niveles de expresión de CD200R1 en el tejido de nervio por PCR cuantitativa. En cuanto a la población de neutrófilos, observamos que a las 24 horas post-lesión, aproximadamente un 10% de los neutrófilos expresan CD200R1 (datos no mostrados en gráficos).

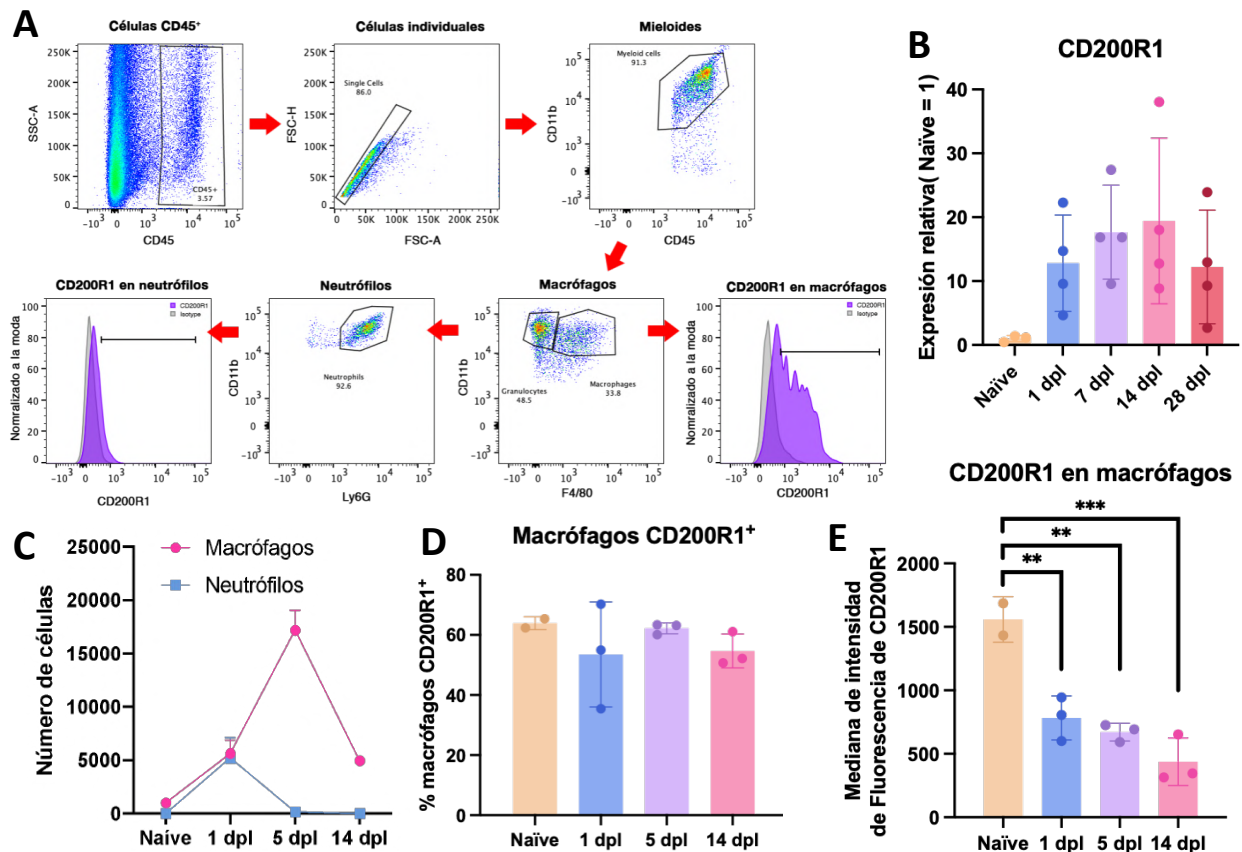


Figura 27. Expresión de CD200R1 ARNm en nervio en condiciones normales y luego de una lesión por aplastamiento. (A) Estrategia de selección de las poblaciones de macrófagos y neutrófilos en el nervio por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de la marca de CD200R1 en comparación con el isotipo control en la población de macrófagos y neutrófilos. **(B)** Expresión de CD200R1 a nivel de ARNm aumenta después de la lesión. **(C)** Cuantificación del número total de macrófagos y neutrófilos en el nervio ciático sin lesionar (naïve) y a 1, 5 y 14 dpl. **(D)** Porcentaje de macrófagos que expresan CD200R1 en condiciones naïve y a 1, 5 y 14 dpl. **(E)** Mediana de intensidad de fluorescencia de CD200R1 expresado en macrófagos (ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Bonferroni $**p < 0.01$, $***p < 0.001$; $n=2-3$ animales por punto de tiempo).

Efecto del bloqueo de CD200R1 *in vivo* luego de una lesión de nervio ciático

Considerando los resultados previos, observamos que la interacción CD200-CD200R1 presenta cambios temporales en el nervio ciático luego de una lesión y que estas proteínas se encuentran

presentes en los principales tipos celulares que participan en el proceso de degeneración Walleriana, sugiriendo un posible rol de esta interacción en la regulación de los eventos que ocurren luego de una lesión. Por lo tanto, nos propusimos profundizar en el rol de CD200-CD200R1 en los procesos que forman parte de la degeneración Walleriana y en la regeneración y recuperación luego de una lesión por aplastamiento.

Con este fin, realizamos lesiones por aplastamiento y seguidamente inyectamos en el sitio de la lesión un anticuerpo que se une y bloquea al receptor CD200R1, impidiendo su interacción con el ligando CD200. Se ha demostrado que este anticuerpo se une a CD200R1 en ratones C57BL/6 y que previene la señal inhibitoria correspondiente⁴⁰⁶. Luego de realizar una única administración del anticuerpo bloqueante y de realizar la lesión por aplastamiento, analizamos en mayor profundidad si este bloqueo tiene un impacto en la respuesta inflamatoria luego de la lesión en el marco del proceso de degeneración Walleriana, así como también evaluar si esto tiene un efecto a nivel de la regeneración del tejido y la recuperación de las funciones locomotoras luego de la lesión.

Impacto sobre la respuesta inflamatoria al bloquear CD200R1 a nivel local luego de una lesión de nervio ciático

En primer lugar, evaluamos si el bloqueo de CD200R1 luego de la lesión del nervio ciático, genera un cambio en el perfil de expresión de citoquinas de forma aguda a las 24 horas post-lesión. Por medio del análisis de PCR en tiempo real, observamos, según lo esperado, que la lesión por aplastamiento generó un aumento significativo de IL-1 β , TNF- α , IL-6, CCL2 y CCL3 a las 24 horas de la lesión en el grupo tratado con vehículo (Figura 28). Sin embargo, no se observó un aumento significativo de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en los nervios de ratones administrados con anti-CD200R. A pesar de esto, no se observaron diferencias significativas en la expresión de las citoquinas analizadas entre el grupo administrado con vehículo o con anti-CD200R1.

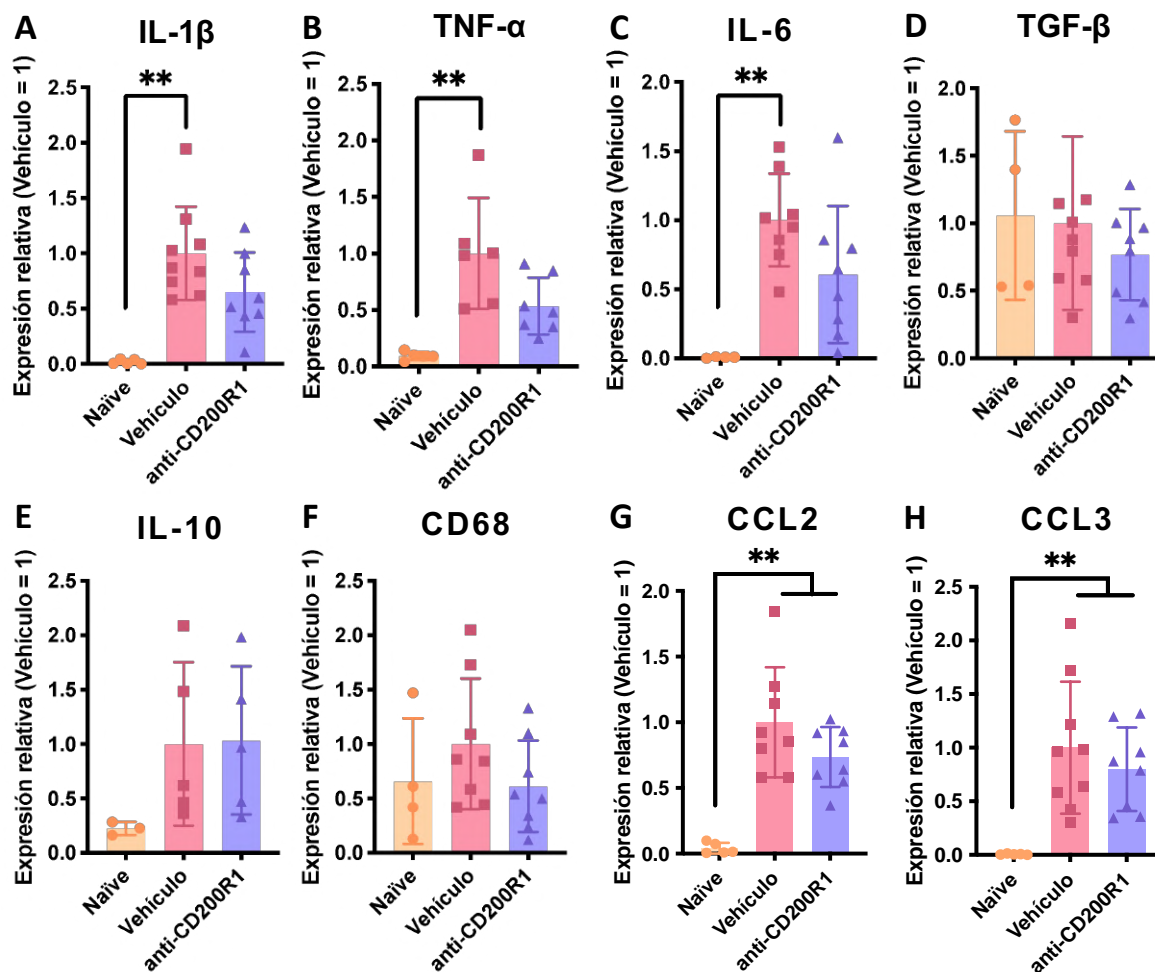


Figura 28. Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real del tejido de nervio ciático a 24 horas post-lesión para evaluar el efecto del bloqueo de CD200R1 en la expresión de citoquinas. Se observó un aumento significativo en los niveles de IL1- β (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) a las 24 horas post-lesión en los nervios de animales administrados con vehículo pero no se observa un aumento significativo en los animales del grupo con anti-CD200R1. No se observan diferencias significativas en los niveles de expresión de TGF- β (D), IL-10 (E) y CD68 (F) entre las condiciones analizadas. Se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de CCL2 y CCL3 luego de la lesión tanto para el grupo control como para el grupo con anti-CD200R1, pero no se observaron diferencias significativas al bloquear CD200R1 en comparación con el grupo control. (Test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post hoc de Bonferroni; ** $p \leq 0.01$ vs grupo Naïve)

Para profundizar en los posibles efectos del bloqueo de CD200R1 en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de la lesión de nervio ciático, analizamos la dinámica temporal de las poblaciones de macrófagos y neutrófilos en el nervio a las 24 horas post-lesión, así como también

posibles efectos sobre el fenotipo de estos tipos celulares, por citometría de flujo e inmunofluorescencia del tejido de nervio ciático. La estrategia de selección de poblaciones a partir de una muestra de tejido de nervio ciático lesionado por citometría de flujo se muestra en la Figura 29 A. La administración de anti-CD200R1 inmediatamente después de la lesión del nervio ciático, generó una disminución en el número de macrófagos presentes en el parénquima nervioso a las 24 horas post-lesión (Figura 29 A) con respecto al grupo control. Con el fin de analizar el fenotipo de estos macrófagos presentes en el tejido, analizamos por citometría de flujo la presencia de los marcadores pro-inflamatorios Ly6C^{428,429} y CD16/32^{430,431}, así como también el marcador CD206 el cual se ha asociado a un fenotipo más anti-inflamatorio³²⁵. No observamos diferencias en la proporción de macrófagos que expresan los marcadores pro-inflamatorios Ly6C y CD16/32 (Figura 29 B) entre el grupo administrado con el anti-CD200R1 y el grupo control. Sin embargo, el bloqueo de CD200R1 generó un aumento en la proporción de macrófagos CD206⁺ a las 24 horas post-lesión en el nervio ciático (Figura 29 B), sugiriendo que el bloqueo de CD200R1 promueve la presencia de macrófagos con fenotipo regenerativo a tiempos tempranos.

En cuanto a la población de neutrófilos, por citometría de flujo no observamos diferencias significativas en el número de células en el tejido lesionado a las 24 horas post-lesión a causa de la administración de anti-CD200R1 en comparación con la administración de vehículo (Figura 29 C). Sin embargo, por inmunofluorescencia del tejido de nervio ciático lesionado, utilizando un anticuerpo que reconoce Ly6G, que se utiliza para reconocer neutrófilos tanto por citometría de flujo como por inmunofluorescencia, observamos que el bloqueo de CD200R1 redujo de manera significativa el número de neutrófilos en el nervio lesionado (Figura 29 D y E).

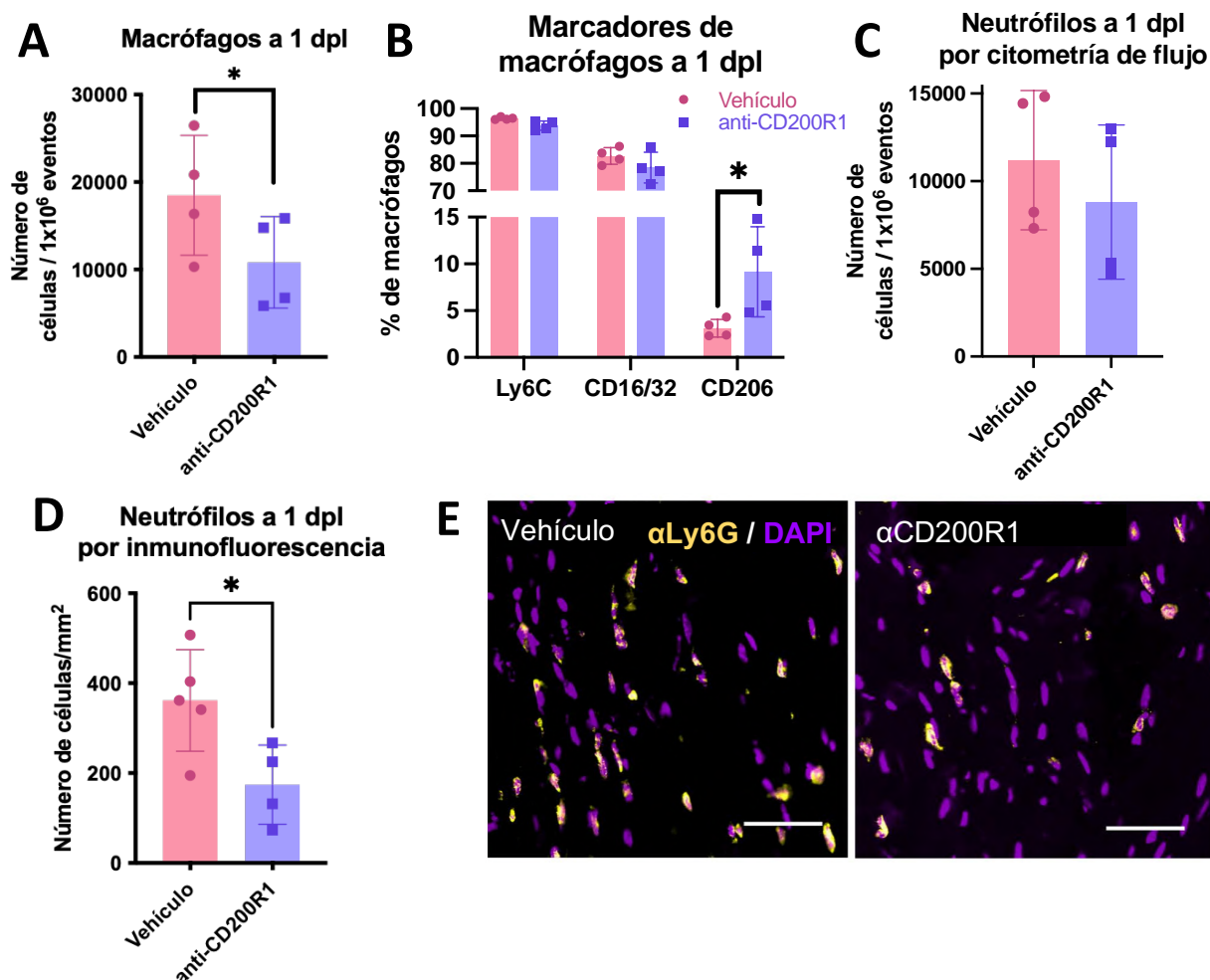


Figura 29. El bloqueo de CD200R1 promueve una menor infiltración de macrófagos y neutrófilos en el nervio ciático a las 24 horas post-lesión. (A) El análisis por citometría de flujo del tejido de nervio ciático a las 24 horas post-lesión permitió evidenciar un menor número de macrófagos en el nervio lesionado a causa del bloqueo de CD200R1 (Prueba t de Student; $*p \leq 0.05$ vs Vehículo). (B) La administración de anti-CD200R1 en el nervio no tuvo efecto en la proporción de macrófagos Ly6C+ y CD16/32+, sin embargo el bloqueo de CD200R1 generó que haya una mayor proporción de macrófagos CD206+ en el nervio ciático a las 24 horas post-lesión (Prueba t de Student; $*p \leq 0.05$ vs Vehículo). (C) Por citometría de flujo no se observa una diferencia significativa en el número de neutrófilos a las 24 horas post-lesión por la administración de anti-CD200R1 (Prueba t de Student vs Vehículo). (D) A través de la cuantificación de células Ly6G+ en secciones de nervio ciático por inmunofluorescencia se observó un menor número de neutrófilos en el nervio ciático a las 24 horas post-lesión en animales del grupo con anti-CD200R1 en comparación con el grupo control. (Prueba t de Student; $*p \leq 0.05$ vs Vehículo). (E) Inmunofluorescencia representativa utilizando anti-Ly6G (en amarillo) y DAPI (en violeta), para evidenciar neutrófilos en secciones de nervio a las 24 horas post-lesión. Se observan los núcleos polilobulados característicos de los neutrófilos en las células Ly6G+ (barra de calibración: 100 μ m).

Luego analizamos el efecto del bloqueo de CD200R1 en la respuesta inflamatoria a tiempos más tardíos luego de una lesión traumática de nervio ciático, con el fin de determinar si al afectar la respuesta de manera aguda, se ven modificados los procesos de la degeneración Walleriana en tiempos más tardíos. En primer lugar, analizamos la infiltración de macrófagos a los 7 dpl, debido a su relevancia como momento crucial en la respuesta inflamatoria al encontrarse el mayor número de macrófagos en el tejido. A su vez constituye un momento bisagra en la respuesta inflamatoria ya que comienzan a ocurrir cambios que dirigen la respuesta hacia la reparación y resolución^{316,326}. Por citometría de flujo, no observamos diferencias significativas en el número de macrófagos a los 7 dpl en los nervios inyectados con anti-CD200R1 en comparación con los administrados con vehículo (Figura 30 A). A su vez, tampoco se observaron diferencias en la proporción de macrófagos Ly6C+ y CD16/32+, considerados marcadores de fenotipo pro-inflamatorio, así como tampoco en la proporción de macrófagos CD206+, considerado un marcador de fenotipo resolutivo (Figura 30 B). Inclusive, cuando evaluamos el número de macrófagos en el tejido a los 28 dpl por inmunofluorescencia, no encontramos una diferencia significativa a causa del bloqueo de CD200R1 al momento de la lesión (Figura 30 C y D). Esto nos llevó a considerar que el efecto del bloqueo de CD200R1 al momento de la lesión genera cambios en la respuesta inflamatoria temprana y de forma aguda, pero que no altera los procesos inflamatorios que ocurren más tardíamente en el proceso de degeneración Walleriana. Sin embargo, no podemos descartar que la falta de efecto luego de administrar el anticuerpo bloqueante también se deba a efectos compensatorios de otros inmunoreceptores y vías intracelulares que permiten mantener la robustez de estos procesos a pesar de la falta de señalización por parte de un receptor.

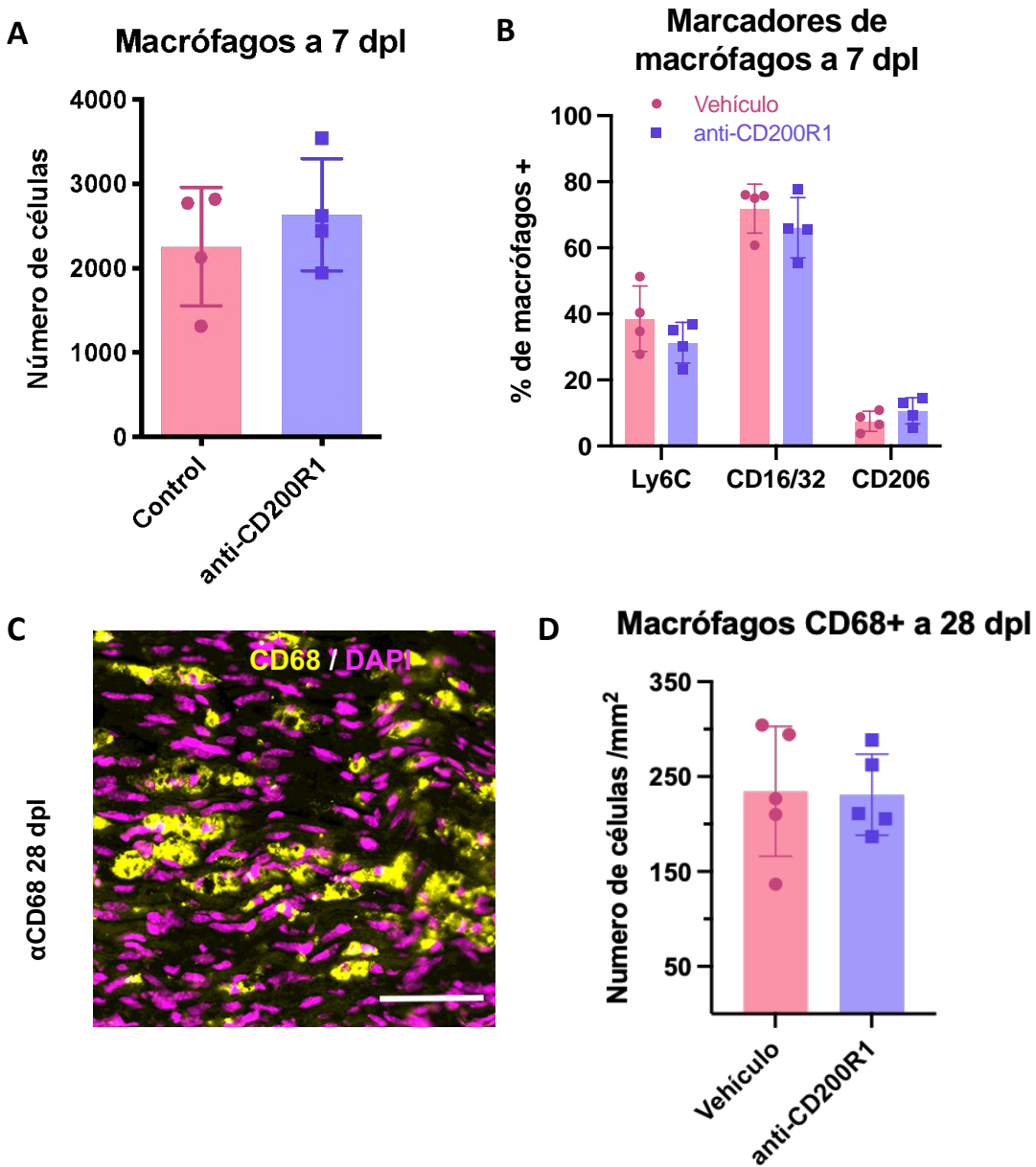


Figura 30. Análisis de la respuesta inflamatoria tardía a los 7 y 28 días post-lesión de nervio ciático. (A) El análisis de tejido de nervio ciático a los 7 dpl muestra que no hay diferencias significativas en el número de macrófagos en el nervio lesionado luego de una semana post-lesión cuando se bloquea CD200R1 de forma aguda en el momento de la lesión. (B) Este bloqueo tampoco modifica el fenotipo de los macrófagos a los 7 dpl en el nervio ciático ya que no se observan diferencias significativas en la proporción de macrófagos Ly6C⁺, CD16/32⁺ o CD206⁺ por citometría de flujo. (C) Inmunofluorescencia representativa de una sección distal de nervio ciático a los 28 dpl, utilizando anti-CD68 (en amarillo) y DAPI (en magenta). Se observan macrófagos, con su característico aspecto “espumoso” debido a la cantidad de productos de fagocitosis en su citoplasma. Barra de calibración: 100 μm. (D) No se observa una diferencia significativa en el número de macrófagos CD68⁺ en el nervio lesionado a los 28 dpl a causa del bloqueo de CD200R1 al momento de la lesión. (Test t de Student vs Vehículo)

Análisis de la limpieza de mielina en el nervio ciático luego del bloqueo de CD200R1

Posteriormente, exploramos si este patrón de respuesta inflamatoria, que se encuentra alterado en las etapas iniciales, pero vuelve a la normalidad en etapas posteriores, ejerce algún efecto sobre otros factores que influyen en el proceso de degeneración Walleriana. Entre ellos, la limpieza de los restos de mielina es un proceso fundamental para lograr una regeneración y recuperación funcional exitosa, que dependen en gran medida de la respuesta inflamatoria en el transcurso de la primera semana. En una primera instancia analizamos la presencia de mielina a 1, 3, 7 y 28 dpl en el tejido de nervio lesionado, con el fin de evaluar si el bloqueo de CD200R1 tiene un impacto en la dinámica temporal de la limpieza de mielina y la formación de nuevas fibras mielínicas. Para ello, por medio de la tinción de Luxol Fast Blue evaluamos el área de mielina en el tejido del nervio lesionado a diferentes tiempos post-lesión. No observamos diferencias significativas en el área de mielina en los diferentes tiempos post-lesión analizados entre los nervios a los cuales se les administró anti-CD200R1 o vehículo (Figura 31 A y B), lo cual concuerda con la respuesta inflamatoria normal evidenciada previamente a los 7 y 28 dpl. En una segunda instancia analizamos la presencia de lípidos neutros a 7 dpl por medio de la tinción con Oil Red O de los nervios lesionados (Figura 31 C y D). Esta tinción nos permite analizar la acumulación de gotas de lípidos neutros y por lo tanto podemos evaluar la degradación de lípidos^{432,433}. Tampoco observamos diferencias significativas en la acumulación de lípidos a los 7 dpl, sugiriendo que el bloqueo agudo de CD200R1 al momento de la lesión no tiene un efecto significativo sobre la desmielinización y remielinización durante el proceso de degeneración Walleriana. Sin embargo, la falta de diferencias significativas a nivel histológico no implica directamente que no tiene efecto a nivel del funcionamiento fisiológico de las fibras nerviosas presentes en el nervio lesionado, por lo que nos planteamos determinar si estas alteraciones en la respuesta inflamatoria aguda tienen un efecto a nivel de la recuperación funcional que se relaciona, no solo con la regeneración de las fibras nerviosas dañadas, sino que también con la capacidad de estas fibras de cumplir su función normal.

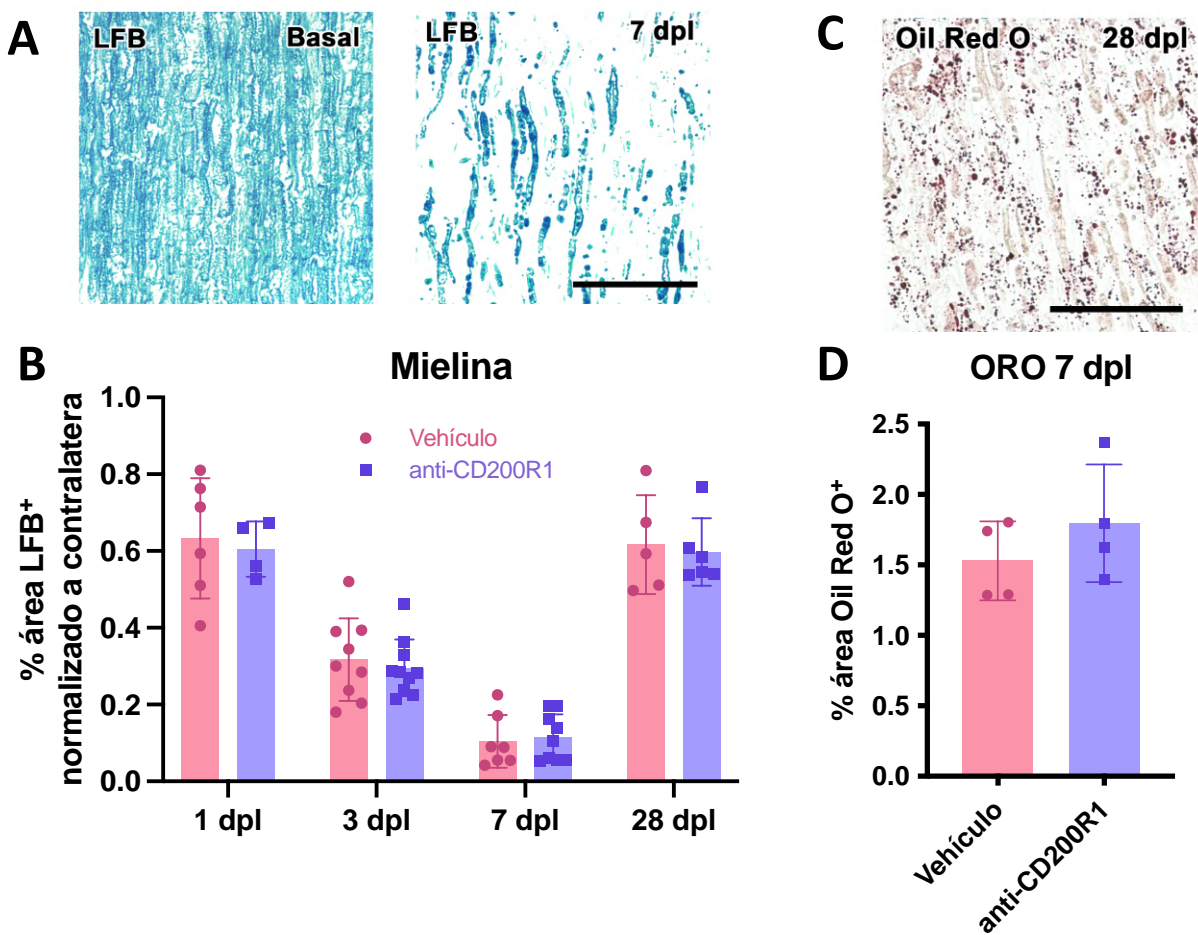


Figura 31. El bloqueo agudo de CD200R1 no tiene efecto en la limpieza de mielina, así como tampoco en la población de macrófagos en el nervio ciático lesionado a los 7 dpl. (A) Imagen representativa de una sección de nervio ciático teñido con Luxol Fast Blue condiciones normales (basal) y a los 7 dpl. Barra de calibración: 50 μ m. (B) La cuantificación de área de mielina teñida con Luxol Fast Blue (LFB) a 1, 3, 7 y 28 dpl permitió evidenciar que el bloqueo de CD200R1 al momento de la lesión no tiene efecto en la limpieza de la mielina (ANOVA de dos vías). (C) Imagen representativa de una sección de nervio ciático a los 28 dpl teñida con Oil Red O. Barra de calibración: 50 μ m. (D) El bloqueo de CD200R1 no tiene efecto en la degradación de lípidos neutros luego de la lesión ya que no se observan diferencias significativas en el porcentaje del área de nervio teñida con Oil Red O (ORO) (Test t de Student).

Limitación en la recuperación de las funciones luego de una lesión de nervio ciático a causa del bloqueo de CD200R1 localmente

Con el fin de determinar el impacto del bloqueo agudo de CD200R1 localmente sobre la recuperación motora de la pata lesionada a través del análisis de la pisada al caminar, lo que

permite calcular el índice funcional del ciático. Este índice fue desarrollado para ratas⁴³⁴ y adaptado para ratones⁴⁰⁷. Realizamos el seguimiento luego de la lesión evaluando el índice a 1, 3, 5, 7, 10, 14, 17, 21 y 28 dpl (Figura 32). Luego de una lesión por aplastamiento, el índice funcional del ciático disminuye un 95% comparado con el valor previo a la lesión, manteniéndose en bajos niveles hasta los 14 dpl, donde se observa una mejora muy marcada abrupta. Luego la tasa de mejoría continúa en aumento hasta los 28 dpl, aunque en menor medida, hasta llegar a un valor similar al previo a la lesión. Interesantemente, observamos que cuando bloqueamos CD200R1 por medio de la administración del anticuerpo bloqueante en el nervio ciático al momento de la lesión, los ratones tienen una peor recuperación de las funciones locomotoras cuando comparamos con los ratones a los cuales se les administró vehículo (Figura 32). Esta diferencia se hace más evidente a partir de los 17 dpl.

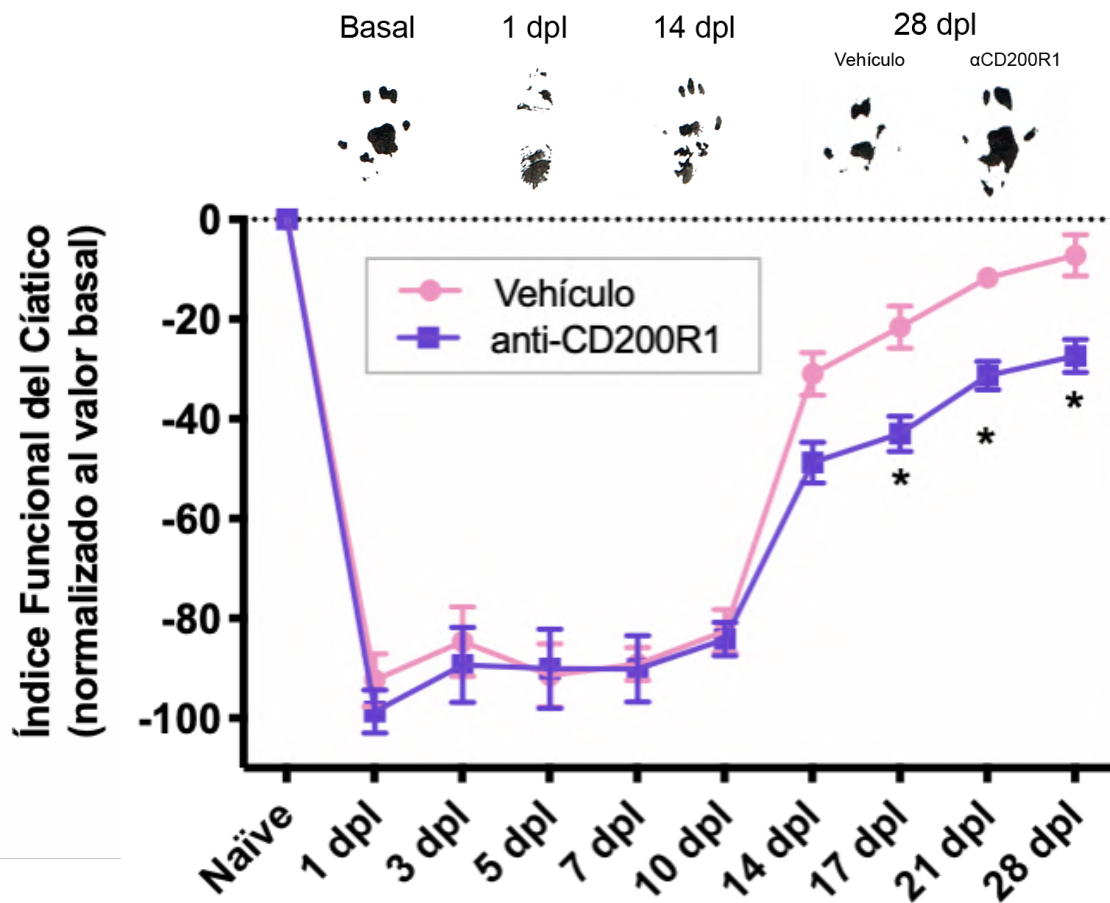


Figura 32. El bloqueo de CD200R1 en el nervio ciático promueve una peor recuperación de las funciones luego de una lesión por compresión. En la parte superior se muestran imágenes representativas de las pisadas de la pata lesionada en el tiempo. La recuperación de las funciones luego de la lesión de nervio se evaluó a través del índice funcional del nervio ciático en el cual se analizan

*parámetros de la pisada de las patas traseras al caminar. Los valores se muestran normalizados para cada ración con respecto a la medida del índice basal previa a la lesión. El seguimiento de los ratones lesionados hasta los 28 dpl permitió evidenciar que el bloqueo de CD200R1 por medio de la administración de un anticuerpo al momento de la compresión promueve una peor recuperación funcional. (ANOVA de dos vías, tratamiento $p = 0.002$, interacción $p = 0.03$, test post-hoc de Bonferroni * $p \leq 0.05$; $n = 9$ vehículo $n = 8$ α CD200R1).*

Reinervación de la piel y regeneración no se ven afectadas al bloquear CD200R1 localmente luego de la lesión de nervio ciático

A su vez, evaluamos la reinervación de la piel, analizando la cantidad de fibras PGP9.5+ en la epidermis de las almohadillas de las patas traseras lesionadas y sin lesionar (Figura 33 A). A los 28 dpl observamos un número significativamente menor de fibras PGP9.5+ a nivel de la epidermis en los dos grupos con lesión, sin que haya diferencias entre los tratamientos (Figura 33 B), sugiriendo que el bloqueo de CD200R1 no generó un impacto sobre la regeneración de estas fibras sensitivas a nivel de las patas. A su vez, evaluamos el número de fibras nerviosas mielínicas en el nervio tibial, con el fin de evaluar la regeneración y remielinización de los axones en una región que se encuentra distal a la lesión (Figura 33 C). Este análisis reveló una disminución en el número de fibras mielínicas en el nervio tibial después de 28 días de la lesión con ambos tratamientos en comparación con la condición sin lesión. Esto indica que, a pesar de la recuperación funcional evaluada por el índice funcional del ciático se asemeja mucho a los valores iniciales al mes de la lesión, la regeneración axonal y la mielinización no alcanzaron su estado inicial (Figura 33 D). También podemos evidenciar que el bloqueo de CD200R1 al momento de la lesión no tiene un efecto sobre el número de fibras mielínicas a los 28 dpl, apoyando lo observado con el análisis de la reinervación de la piel.

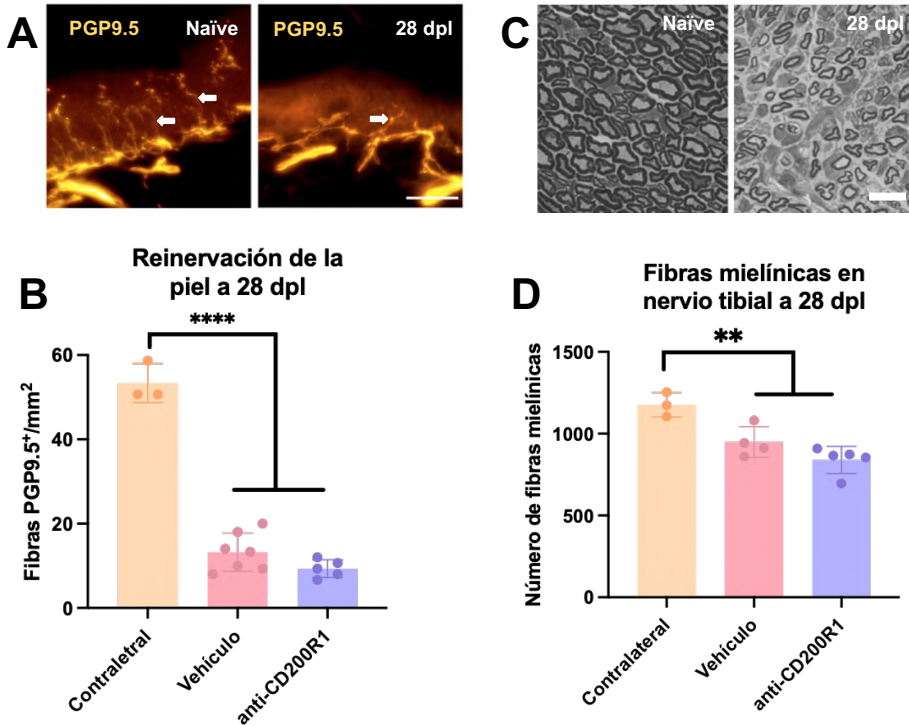


Figura 33. Cuantificación de la reinervación de la piel de las patas traseras inervadas por el nervio ciático. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencias de la piel de una almohadilla de las patas traseras en las que se observan las fibras PGP9.5⁺. Barra de calibración: 100 μ m (B) Cuantificación de las fibras PGP9.5⁺ para evaluar la reinervación a los 28 dpl de la piel de la almohadilla de las patas traseras. Se observa una disminución significativa en la cantidad de fibras PGP9.5⁺ en la piel a los 28 dpl, pero no se observan diferencias entre los animales administrados con el anticuerpo bloqueando o con el vehículo. (ANOVA de una vía seguido por test post-hoc de Tukey; **** $p \leq 0.0001$ vs Contralateral). (C) Imágenes representativas de secciones transversales semifinas de nervio tibial en condiciones normales (naïve) y a los 28 dpl. Barra de calibración: 10 μ m. (D) Cuantificación de las fibras mielínicas en toda la sección transversal de nervio tibial en condiciones normales y a los 28 dpl en animales tratados con vehículo o con anti-CD200R1 al momento de la lesión. Se observa una reducción significativa en el número de fibras mielínicas a los 28 dpl en comparación con la condición naïve, tanto para el grupo inyectado con vehículo o con anti-CD200R1. No se observan diferencias significativas en el número de fibras mielínicas a los 28 dpl causadas por la administración de anti-CD200R1 en comparación con la administración de vehículo (ANOVA de una vía seguido por test post-hoc de Tukey; ** $p \leq 0.01$ vs Contralateral).

Evaluación *in vivo* de la proteína CD200-His en la recuperación funcional luego de una lesión de nervio ciático

Con el objetivo de determinar si la activación del receptor CD200R1 tiene un efecto contrario a lo observado cuando bloqueamos la interacción con su ligando, administramos de la misma manera la proteína recombinante CD200-His dentro del nervio al momento de realizar la lesión. Esta proteína recombinante fue diseñada para unirse y activar al receptor CD200R1. Estudios anteriores de nuestro grupo de investigación han evidenciado un efecto neuroprotector que favorece la recuperación funcional en un modelo de lesión medular tras la administración de CD200-His⁸⁹. Por lo tanto, nos planteamos evaluar el efecto de la administración del agonista luego de una lesión por aplastamiento del nervio ciático, analizando el índice funcional del ciático hasta los 28 dpl (Figura 34). Este análisis nos permitió evidenciar que la activación de CD200R1 sobre los valores fisiológicos por medio de la administración de la proteína recombinante agonista no tiene ningún efecto sobre la recuperación de las funciones locomotoras luego de una lesión traumática de nervio ciático. Sin embargo, esto no implica que la activación de CD200R1 no juegue un papel en los procesos posteriores a una lesión que promueven la regeneración y la recuperación, ya que previamente hemos observado que bloquear la activación de este receptor no conduce a una recuperación exitosa. La falta de efecto observada tras la administración de CD200-His podría atribuirse al hecho de que, en condiciones normales, una lesión por aplastamiento representa un modelo en el cual se produce una regeneración exitosa, como lo indican los valores del índice funcional que vuelven a niveles similares a los anteriores a la lesión. En consecuencia, es posible que no exista margen para mejorar estos valores más allá de lo considerado normal.

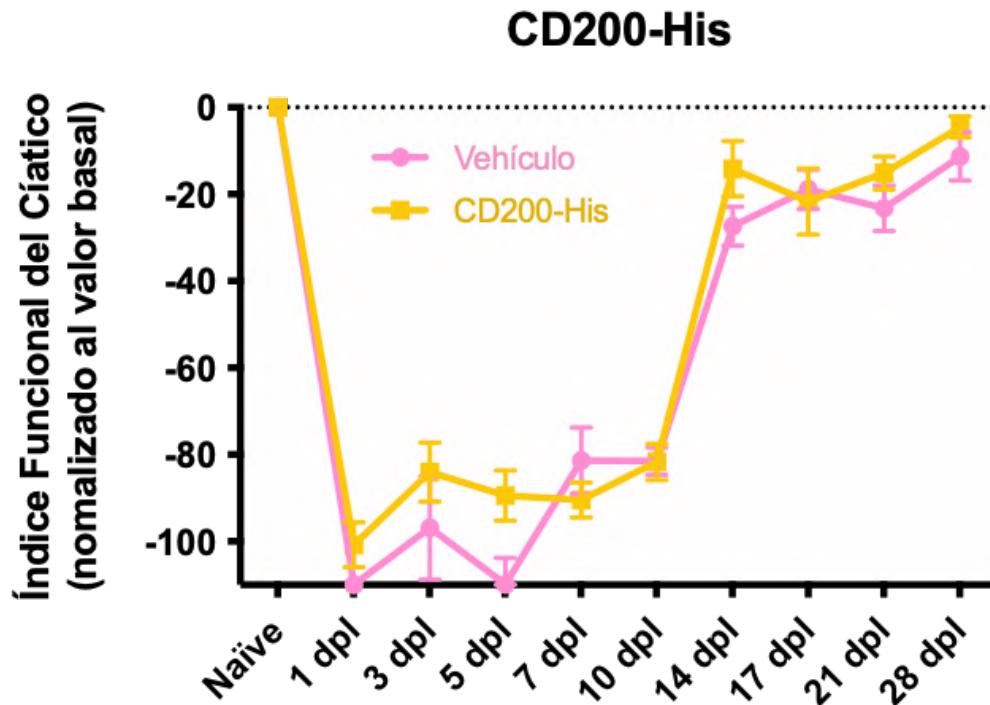


Figura 34. Análisis del efecto de la activación de CD200R1 en la recuperación luego de una lesión de nervio ciático. La administración en el nervio ciático al momento de la lesión de la proteína recombinante CD200-His no tuvo efecto en la recuperación de las funciones evaluadas por el índice funcional del ciático. Se puede observar que normalmente (en la condición que se administró el vehículo PBS), la recuperación alcanza a los valores del índice previos a la lesión, de la misma manera que con la administración con CD200-His (ANOVA de dos vías, tratamiento $p = 0.068$, interacción $p = 0.19$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 7$ vehículo, $n = 8$ CD200-His).

Recuperación funcional luego de una lesión de nervio ciático en ratones knock-out para CD200R1

Considerando los resultados previos en los que el bloqueo al momento de la lesión de la interacción entre CD200 y CD200R1 localmente en el sitio de la lesión sugieren cambios en la respuesta inflamatoria y en la recuperación de funciones locomotoras, nos planteamos evaluar si la ausencia de manera constitutiva en todo el organismo también tiene cambios en la recuperación luego de una lesión de nervio ciático. Para ello realizamos lesiones por aplastamiento del nervio ciático de ratones *knock-out* para CD200R1, los cuales no expresan CD200R1 en todas las células (*CD200R1-KO*) y comparamos la recuperación de las funciones locomotoras contra los ratones *wt* que sí expresan CD200R1. A pesar de que parece observarse

una recuperación levemente peor en los ratones *CD200R1-KO*, no se observaron diferencias significativas en la progresión del índice funcional del ciático hasta los 28 dpl, entre los ratones que expresan *CD200R1* y los que no (Figura 35), sugiriendo que la ausencia de *CD200R1* a nivel constitutivo no tiene un efecto significativo en la recuperación de las funciones luego de una lesión de nervio ciático.

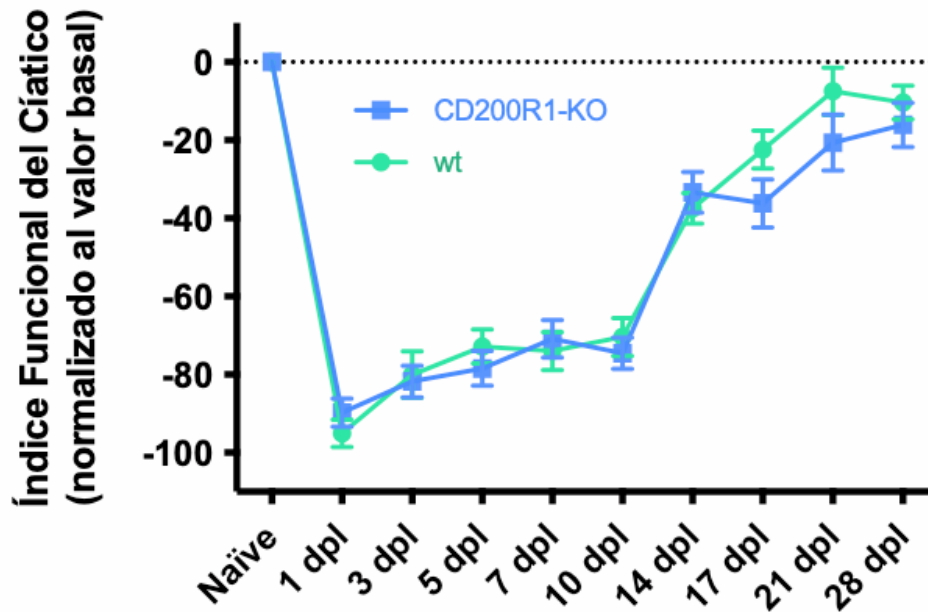


Figura 35. Evaluación de la recuperación de funciones locomotoras en ausencia de *CD200R1*. Por medio del análisis de las pisadas de las patas traseras se calculó el índice funcional del ciático a diferentes tiempos post-lesión. No se observan diferencias significativas entre el índice funcional del ciático a los tiempos post-lesión analizados entre los ratones que no expresan *CD200R1* (*CD200R1-KO*) y los que sí lo hacen (*wt*) (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.49$, interacción $p = 0.10$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 9$ por genotipo).

Resumen de los principales resultados del Capítulo 1/Objetivo específico 1

En el nervio ciático de ratón en condiciones normales, se evidenció la presencia de CD200 principalmente en los vasos sanguíneos, y en las fibras nerviosas en los nodos de Ranvier y las incisuras de Schmidt-Lanterman. Luego de una lesión por aplastamiento, la expresión de CD200 en el nervio disminuye, recuperando la expresión a partir de la segunda semana. Por otro lado, la expresión de CD200R1 se evidenció en condiciones normales en los macrófagos residentes, mientras que luego de la lesión aumenta considerablemente la presencia del receptor en el tejido lesionado, principalmente debido a la entrada de macrófagos y neutrófilos, que invaden el tejido y expresan este receptor. Al bloquear e impedir la interacción entre CD200 y CD200R1 en el nervio al momento de la lesión, se observaron cambios en las etapas agudas de la respuesta inflamatoria, principalmente promoviendo un ambiente menos pro-inflamatorio, sugerido por la presencia de menos neutrófilos y macrófagos a las 24 horas de la lesión. A pesar de que el bloqueo de la interacción al momento de la lesión no tiene efecto en la desmielinización y remielinización luego de la lesión, así como tampoco en la respuesta inflamatoria en tiempos más avanzados, se observó que el bloqueo promueve una peor recuperación de las funciones locomotoras luego de la lesión. Sin embargo, no se observaron diferencias en la regeneración axonal y en la reinervación de la piel generadas por este bloqueo. Interesantemente, cuando se analizó la recuperación de las funciones locomotoras en los ratones *CD200R1-KO*, los cuales no expresan el receptor de manera constitutiva, no se observaron diferencias significativas en la recuperación, a diferencia de lo observado con el bloqueo agudo. Finalmente, la administración dentro del nervio lesionado al momento de la lesión de un agonista del receptor no generó ningún efecto sobre la recuperación de las funciones locomotoras luego de la lesión.

Capítulo 2 / Objetivo específico 2: Papel de CD200R1 en la respuesta frente una lesión de médula espinal por contusión

Las diferencias fundamentales en los procesos que ocurren luego de una lesión traumática en el SNP y el SNC, son determinantes en la capacidad de regeneración y recuperación luego de lesiones a las diferentes regiones del sistema nervioso. A pesar de que se han estudiado extensamente los mecanismos que ocurren luego de una lesión al SNP y al SNC y que se conocen algunas de las diferencias en estos mecanismos entre un tipo de lesión y otro, aún queda mucho por comprender en cuanto al impacto de estas diferencias y cómo utilizarlas a nuestro favor para promover la recuperación. La interacción entre CD200 y CD200R1 representa una oportunidad interesante para estudiar un mecanismo de modulación de la respuesta inflamatoria en ambas situaciones de lesión y su rol en determinar las diferencias en la regeneración y recuperación. Por un lado, el modelo de lesión por aplastamiento del nervio ciático, nos resulta útil para analizar las condiciones que llevan a una regeneración y recuperación exitosa luego de una lesión al sistema nervioso. A diferencia de los que ocurre con las lesiones al SNC, las cuales llevan a discapacidades crónicas a causa de una regeneración y recuperación ineficaz e incompleta. Como modelo de lesión traumática al SNC utilizamos la lesión de médula espinal por contusión en ratones, en el cual se observa una escasa capacidad de recuperación funcional luego de la lesión. Previamente en nuestro grupo de investigación, evidenciamos un crucial rol de CD200-CD200R1 en el desarrollo de la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal luego de una lesión, que es determinante de la capacidad de recuperación de las funciones locomotoras⁸⁹. Por lo tanto, nos planteamos profundizar en el rol de esta interacción en este modelo de lesión al SNC, analizando en mayor detalle los mecanismos subyacentes a la activación del receptor CD200R1 y su participación en los procesos que ocurren luego de las lesiones y que favorecen o empeoran la regeneración del tejido nervioso y la recuperación de las funciones.

Puesta a punto del modelo de lesión de médula espinal por contusión

Con el fin de poner a punto el modelo de lesión de médula espinal, utilizando las instalaciones y dispositivos en el Institut Pasteur, evaluamos diferentes condiciones de lesión para determinar la combinación de parámetros de la lesión que permitan una recuperación en la cual se pueda observar un potencial efecto en la recuperación de las funciones locomotoras, ya sea una mejora o un empeoramiento en ésta. El dispositivo utilizado para realizar las lesiones es el PinPoint PCI3000 Precision Cortical Impactor, el cual debió ser adaptado para sostener a la médula espinal mientras que es golpeada por el pistón (imagen en apartado de materiales y métodos). Este dispositivo permite controlar 3 parámetros relacionados con la lesión: la velocidad con la que el pistón desciende sobre el tejido; la distancia desplazada una vez que el pistón entra en contacto con el tejido (profundidad) y el tiempo de permanencia una vez alcanzada la profundidad determinada. De acuerdo con estudios preliminares, determinamos mantener fijos los parámetros de velocidad en 1.5 m/s y tiempo de permanencia en 0 segundos, y a partir de allí evaluar diferentes profundidades para determinar la ventana de recuperación óptima. La recuperación de las funciones locomotoras fue evaluada utilizando la escala de Basso para ratones (BMS⁴⁰⁸), en la cual se evalúan diferentes parámetros de la locomoción, otorgándole un puntaje de acuerdo con los parámetros observados mientras los ratones caminan libremente. Con el fin de determinar el parámetro óptimo de la profundidad para generar lesiones de médula espinal por contusión que nos permitan observar efectos positivos y negativos en la recuperación de las funciones locomotoras, analizamos la recuperación con las condiciones de lesión de velocidad y tiempo mencionadas previamente, en conjunto con la profundidad a 1.0, 1.2 y 1.5 mm (Figura 36 A). Se observó que la lesión menos severa generó una recuperación funcional muy rápida, ya que a partir de los 5 dpl el puntaje en el BMS alcanzó valores muy similares a los previos de la lesión, sugiriendo que estas condiciones de lesión no serían las óptimas al dificultar la capacidad de observar posibles efectos positivos o mejoras en la recuperación de las funciones locomotoras luego de la lesión. Generalmente en estudios donde se utiliza el modelo de lesión de médula espinal por contusión en ratones, cuando los animales presentan movimiento en las patas traseras (puntaje en el BMS > 0) a las 24 horas de la lesión, se excluye a esos animales del estudio debido a que se considera que algo en el procedimiento de la lesión fue incorrecto. Esto sugiere que las condiciones de lesión menos severas utilizadas no son suficientes para lograr un daño suficiente para lograr una reproducibilidad de acuerdo con los modelos utilizados

en la actualidad. Por otro lado, la lesión más severa a 1.5 mm, generó una escasa recuperación funcional, ya que los ratones a los 28 dpl alcanzan a un puntaje de 1 en el BMS, lo cual implica únicamente un movimiento de talón. Esto implica que la lesión a 1.5 mm de profundidad no resulta de gran utilidad para evaluar efectos que puedan empeorar la recuperación funcional. Teniendo en cuenta esto, determinamos que las condiciones óptimas para realizar las lesiones requeridas en este trabajo son: profundidad de impacto de 1.2 mm, velocidad de impacto 1.2 m/s y tiempo de lesión de 0 segundos. Este tipo de lesiones nos permite una ventana de evaluación, en la cual se puede observar una mejora o deterioro en la recuperación funcional luego de la contusión medular. Estas condiciones son las que serán utilizadas de aquí en adelante salvo que se mencione lo contrario.

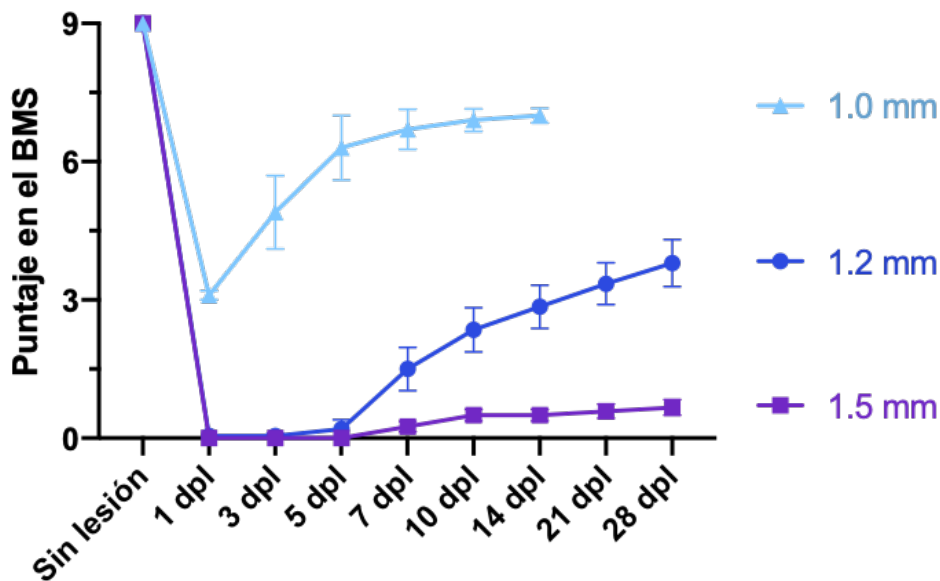


Figura 36. Puesta a punto del modelo de lesión de médula espinal por contusión. Por medio de la escala de BMS, se evaluó la recuperación de las funciones locomotoras luego de una lesión de médula espinal. Se realizaron lesiones con diferente profundidad para evaluar su efecto sobre la recuperación y determinar las condiciones óptimas para generar lesiones que permitan observar efectos positivos como negativos en la capacidad de recuperación de la locomoción. Las profundidades de lesión realizadas fueron 1.5 mm (en violeta), 1.2 mm (en azul) y 1.0 mm (en celeste). A una profundidad de 1.5 mm, se genera una lesión muy severa que dificulta la recuperación funcional, mientras que a 1.0 mm se genera una lesión incompleta, evidenciada por un puntaje de BMS de 3 a las 24 horas post-lesión. La lesión a 1.2 mm genera una ventana de recuperación óptima y es la que se utilizará en adelante. (n=5 a 1.0 mm, n=10 a 1.2 mm, n=6 a 1.5 mm).

Respuesta inflamatoria local luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1

Efecto de la ausencia de CD200R1 en la dinámica temporal de las principales poblaciones celulares de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal

En trabajos previos de nuestro laboratorio, evidenciamos el importante rol de la interacción entre CD200 y CD200R1 en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal por contusión⁸⁹. Por lo tanto, en primer lugar, nos planteamos profundizar en los mecanismos que subyacen al rol de CD200-CD200R1 en los procesos neuroinflamatorios a nivel local luego de una lesión de médula espinal, analizando el impacto de la ausencia de CD200R1 de manera constitutiva en todo el organismo. Con este fin analizamos la dinámica temporal de las principales poblaciones celulares involucradas en la respuesta inflamatoria mediante citometría de flujo a partir de tejido de médula espinal lesionado. Analizamos la presencia de las poblaciones de microglía, macrófagos y neutrófilos en el tejido lesionado a los 1, 3, 7 y 14 dpl, así como también diferentes marcadores indicadores de su fenotipo. En la Figura 37 A, se puede observar la estrategia de selección de poblaciones en el tejido de médula espinal por citometría de flujo. Realizamos a su vez una cirugía control (Sham), donde se llevó a cabo la laminectomía de la misma manera pero no la contusión de la médula, analizando el tejido a las 24 horas desde la cirugía. Por este medio evidenciamos que en el caso de la cirugía control se observó la población de microglía (CD11b^{bajo}, CD45^{bajo}), pero no se observó una gran densidad de eventos en la población de células mieloides infiltrantes (CD11^{balto}, CD45^{alto}). Por el contrario, a las 24 horas de la contusión medular sí se observó claramente un aumento en el número de células infiltrantes (CD11^{balto}, CD45^{alto}) debido a la rotura de la barrera hematoencefálica (Figura 37 A). Con respecto a la población microglial y según lo reportado anteriormente⁴⁰³, se observó un aumento progresivo luego de la lesión, alcanzando un pico máximo a los 7 dpl (Figura 37 B). La ausencia de CD200R1 no tuvo un impacto en el número de células microgliales en la médula espinal luego de la lesión en los tiempos post-lesión analizados. La población de neutrófilos alcanzó el número máximo de células en el tejido lesionado a las 24 horas post-lesión y luego

rápidamente decayó (Figura 37 C). La ausencia de CD200R1 no tuvo un efecto en el número de neutrófilos a 1 y 7 dpl, sin embargo se observó una disminución significativa en el número de neutrófilos en el tejido lesionado a los 3 dpl en los ratones que no expresan CD200R1. Por otro lado, se observó que el número de macrófagos en la médula espinal alcanza un máximo luego de una semana post-lesión (Figura 37 D), con una dinámica temporal muy similar a la población de microglía. Interesantemente, se observó un aumento significativo en el número de macrófagos en el tejido de médula espinal lesionado en los ratones *CD200R1-KO* a las 24 horas post-lesión. A su vez, la ausencia de receptor generó que a las 24 horas post-lesión haya una mayor proporción de macrófagos Ly6C⁺ en el sitio de la lesión (Figura 37 E). Se considera que los macrófagos Ly6C⁺ comprenden una subpoblación de macrófagos con un fenotipo pro-inflamatorio⁴²⁸⁻⁴³⁰. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de CD200R1 promueve alteraciones principalmente en la población de macrófagos, de manera transitoria en los momentos iniciales de la respuesta inflamatoria luego de la lesión, promoviendo un ambiente más pro-inflamatorio.

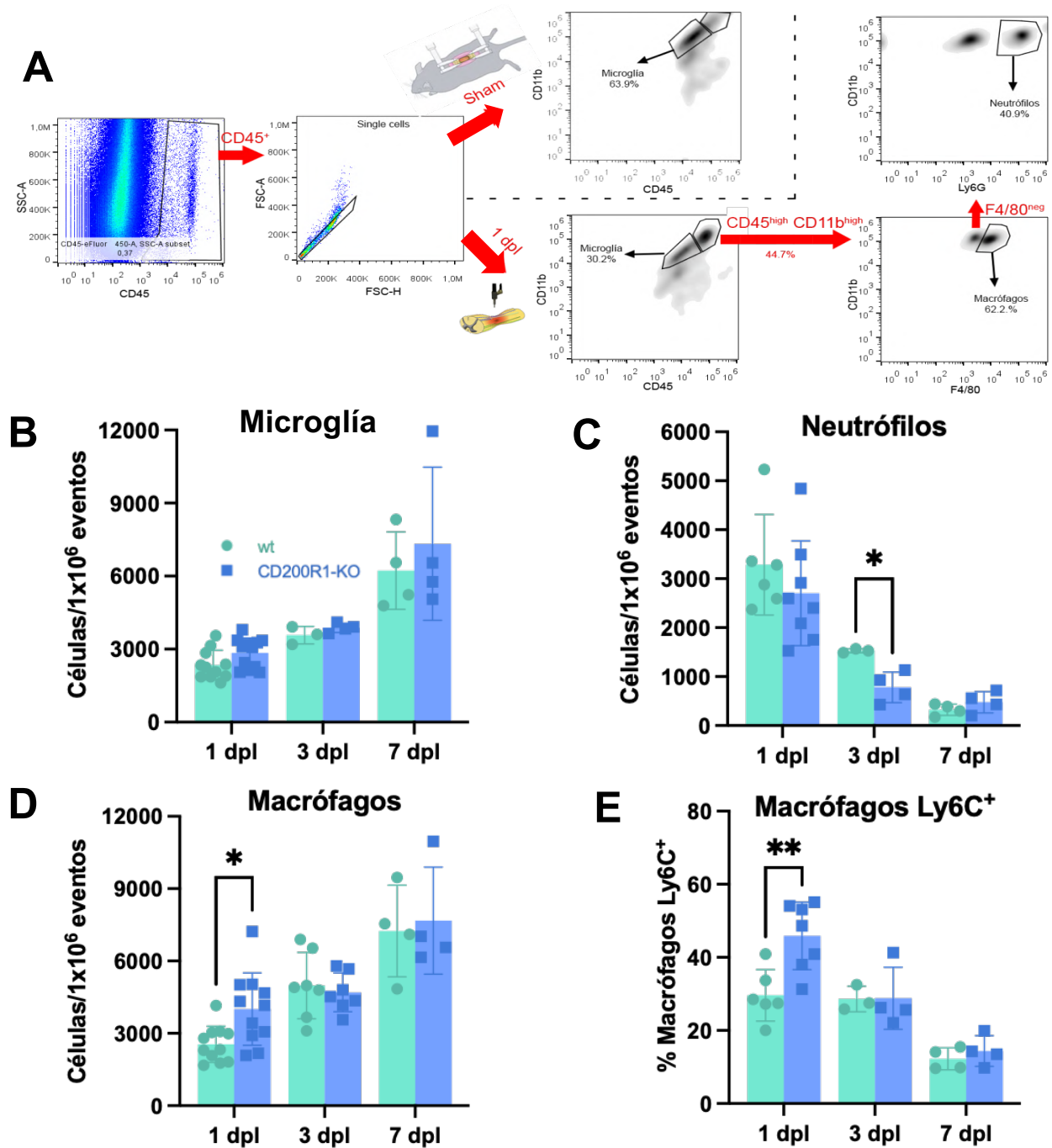


Figura 37. Efecto de la ausencia de CD200R1 en la dinámica temporal de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en el tejido de médula espinal por citometría de flujo a 1, 3, y 7 días post-lesión (dpi). (A) Estrategia de selección de poblaciones de microglía, macrófagos y neutrófilos a partir de citometría de flujo de tejido de médula espinal. Gráficos representativos de una médula espinal lesionada a las 24 horas (inferior) y de una médula espinal con cirugía control (Sham) donde se realizó laminectomía sin impactar la médula (superior), donde no se observa infiltración de macrófagos y neutrófilos. (B-E) Número de células de las poblaciones analizadas en el sitio de la lesión, normalizado por el número total de células. En verde se representan los valores para los ratones wild-type (wt) y en azul

los ratones knock-out para CD200R1 (CD200R1-KO). Poblaciones representadas: **(B)** microglía; **(C)** neutrófilos; **(D)** macrófagos y **(E)** porcentaje de macrófagos positivos para Ly6C (ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Bonferroni; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Impacto de la ausencia de CD200R1 en la fagocitosis de mielina

Como fue mencionado previamente, la fagocitosis de mielina y de restos celulares, es un proceso fundamental luego de una lesión al sistema nervioso ya que en los restos de mielina dañados hay componentes que son inhibitorios para la regeneración, y por lo tanto que limitan la recuperación de funciones. Se ha planteado que la fagocitosis incompleta e ineficiente de mielina en el SNC durante el proceso de degeneración Walleriana es una de las principales diferencias con el SNP que provocan que no se pueda alcanzar una regeneración y recuperación exitosa, a diferencia de lo que ocurre en el SNP.

Por lo tanto, resulta relevante comprender el rol de CD200R1 en la fagocitosis, particularmente de restos de mielina. Para ello, en primer lugar analizamos la fagocitosis de mielina *in vitro* en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) de ratones *wt* o *CD200R1-KO*. La capacidad fagocítica fue evaluada utilizando mielina conjugada a la sonda pHrodo^{411,435}. Esta herramienta resulta muy útil para estudiar la capacidad fagocítica, ya que en este caso nos permite estudiar el ingreso de la mielina a los lisosomas, el cual es un indicativo de los procesos de fagocitosis que ocurren en las células. La presencia de mielina-pHrodo dentro de los BMDM se analizó por citometría de flujo. A su vez, se evaluó la fagocitosis frente al LPS, el cual constituye un fuerte estímulo inflamatorio y se ha demostrado que genera una disminución en la fagocitosis de los BMDM⁴³⁶. Analizando la mediana de intensidad de fluorescencia para pHrodo, observamos que los macrófagos que provienen de ratones *CD200R1-KO* fagocitan menos mielina que los macrófagos que sí expresan el receptor (Figura 38 B y C). A su vez, luego de incubar con LPS, la fagocitosis de los macrófagos *wt* disminuyó, mientras que la fagocitosis en los macrófagos que no expresan CD200R1 la fagocitosis es la misma en presencia o ausencia de LPS. Estos resultados sugieren un rol de CD200R1 en la fagocitosis de mielina por parte de los BMDM *in vitro*.

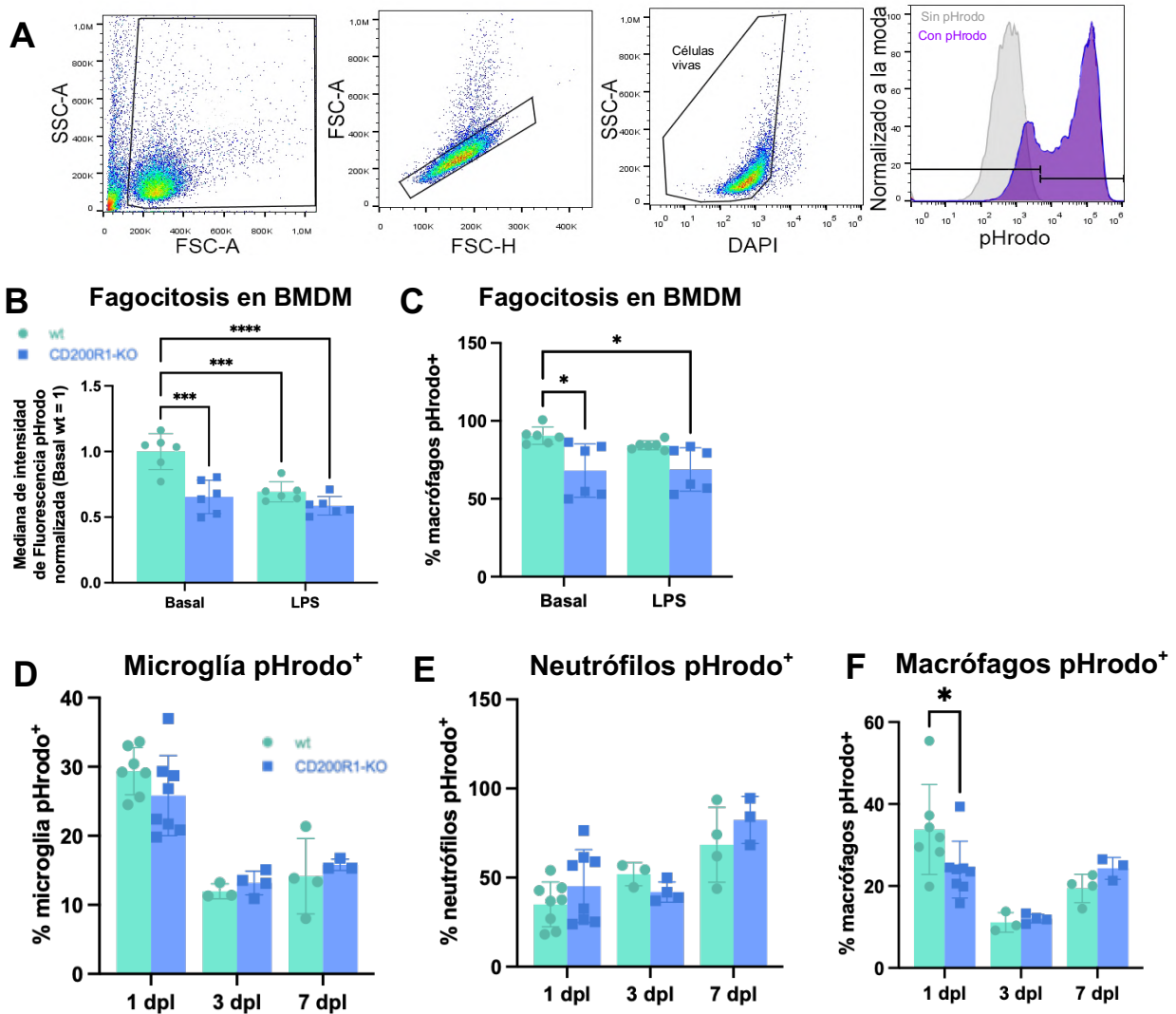


Figura 38. Impacto de la ausencia de CD200R1 en la fagocitosis de mielina in vivo y ex vivo. (A) Estrategia de selección de poblaciones de macrófagos derivados de médula ósea. Las células vivas se identifican por la ausencia de marcación con DAPI. Se muestran histograma representativos de un cultivo sin mielina-pHrodo (en gris) y uno incubado con mielina-pHrodo (en violeta). **(B y C)** Estudio in vitro utilizando macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM), donde se evaluó la fagocitosis de mielina-pHrodo. Los BMDM se obtuvieron a partir de animales wt y CD200R1-KO y se incubaron solo con mielina conjugada a pHrodo o en conjunto con LPS 100 ng/mL y luego fueron analizados por citometría de flujo. **(D)** Mediana de intensidad de fluorescencia y **(C)** porcentaje de células positivas para pHrodo en los BMDM de animales wt y CD200R1-KO donde se observa una menor fagocitosis en los macrófagos que carecen de CD200R1 en condiciones basales pero no luego de la estimulación con LPS. (ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Bonferroni; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) **(D-F)** a partir del tejido de médula espinal lesionado de ratones wt o CD200R1-KO a 1, 3 y 7 dpi, se analizó la capacidad fagocítica de microglía **(E)**, neutrófilos **(F)** y macrófagos **(G)** a partir de la incubación del homogeneizado con mielina conjugada a pHrodo (ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc de Bonferroni; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Luego analizamos la fagocitosis de mielina en las principales poblaciones celulares que participan en la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal, y que tienen capacidades fagocíticas, que corresponde a la microglía, macrófagos y neutrófilos. Para ello, se disgregó el tejido de médula espinal lesionado a 1, 3 y 7 dpl, y se incubó la suspensión de células con mielina conjugada a pHrodo durante 4 horas, de acuerdo con el protocolo planteado por *Gómez-López et al.*⁴¹¹. La presencia de pHrodo en las células se analizó por citometría de flujo en las distintas poblaciones. En las Figuras 38 D-F se puede observar la dinámica temporal de la fagocitosis en estas poblaciones luego de una lesión de médula espinal. La población microglial presenta una disminución en la fagocitosis de mielina-pHrodo a los 3 dpl que se mantiene hasta los 7 dpl, mientras que en la población de neutrófilos se mantiene relativamente constante durante los tiempos post-lesión analizados. Los macrófagos presentan una dinámica similar a la de la microglía, observándose un descenso en la presencia de mielina-pHrodo a los 3 dpl que aumenta levemente a los 7 dpl.

La ausencia de CD200R1 no afecta la fagocitosis de mielina por parte de la microglía y de los neutrófilos. Sin embargo, se observa una disminución significativa en la proporción de macrófagos que fagocitan mielina-pHrodo a las 24 horas post-lesión en los ratones *CD200R1-KO* (Figura 38 F), lo que coincide con lo observado *in vitro* con los macrófagos derivados de la médula ósea.

Recuperación de funciones locomotoras luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1

Con el fin de profundizar en el rol de CD200R1 en el desarrollo de la patología luego de una lesión de médula espinal, realizamos el seguimiento de los ratones *CD200R1-KO* y *wt* durante 28 dpl evaluando diferentes parámetros de la locomoción a través de la escala BMS mencionada previamente. En la Figura 39 A se puede observar la puntuación obtenida durante los 28 días de seguimiento. A los 5 dpl, se observan los primeros signos de ganancia de función, aumentando progresivamente hasta alcanzar un puntaje de alrededor de 3 en el BMS, el cual constituye la capacidad de apoyar la planta de las patas traseras. Interesantemente y contrario a lo esperado, observamos que la ausencia de CD200R1 no tuvo impacto en la recuperación de funciones locomotoras luego de la contusión medular. Dado que el bloqueo de la interacción entre CD200 y CD200R1 en la médula espinal generó una peor recuperación funcional luego de la lesión, esperábamos un efecto en la misma dirección cuando el receptor está ausente en todo el organismo ya que no va a ocurrir la señalización por la activación del receptor.

La extensión de pérdida de tejido nervioso y la recuperación funcional por lo general están estrechamente relacionadas. Salvo que existan mecanismos de plasticidad a nivel del tejido preservado que permitan mantener las funciones del tejido dañado, una peor recuperación funcional se asocia con una mayor pérdida de tejido nervioso. Por lo tanto, nos planteamos analizar si se observa un impacto en la neuroprotección, con el fin de profundizar en los factores que expliquen la falta de efecto a nivel de la recuperación funcional. Para ello, realizamos el análisis de la preservación de mielina a través de la tinción con Luxol Fast Blue en secciones transversales seriadas de las médulas espinales lesionadas (Figura 39 B y C). Este análisis evidenció que no hay diferencias en el área de mielina perdida luego de la lesión en los ratones *CD200R1-KO* comparado con los *wt* (Figura 39 C). Esto concuerda con lo observado previamente, ya que es un factor que generalmente se asocia directamente con la recuperación de las funciones locomotoras. En su conjunto estos resultados sugieren que la ausencia de CD200R1 de manera constitutiva en todo el organismo no tiene un impacto en el resultado final funcional y en la preservación del tejido nervioso luego de una lesión por contusión. Esto puede deberse a numerosas causas que serán discutidas en mayor profundidad más adelante.

Interesantemente, observamos que los ratones *CD200R1-KO* perdieron una mayor proporción del peso corporal luego de la lesión (Figura 39 D), indicando que posiblemente haya alteraciones sistémicas causadas por la ausencia de *CD200R1*, que no tienen un impacto en la recuperación de funciones locomotoras, pero pueden tener un impacto en otras funciones corporales igual de importantes y que se ven afectadas luego de una lesión de médula espinal.

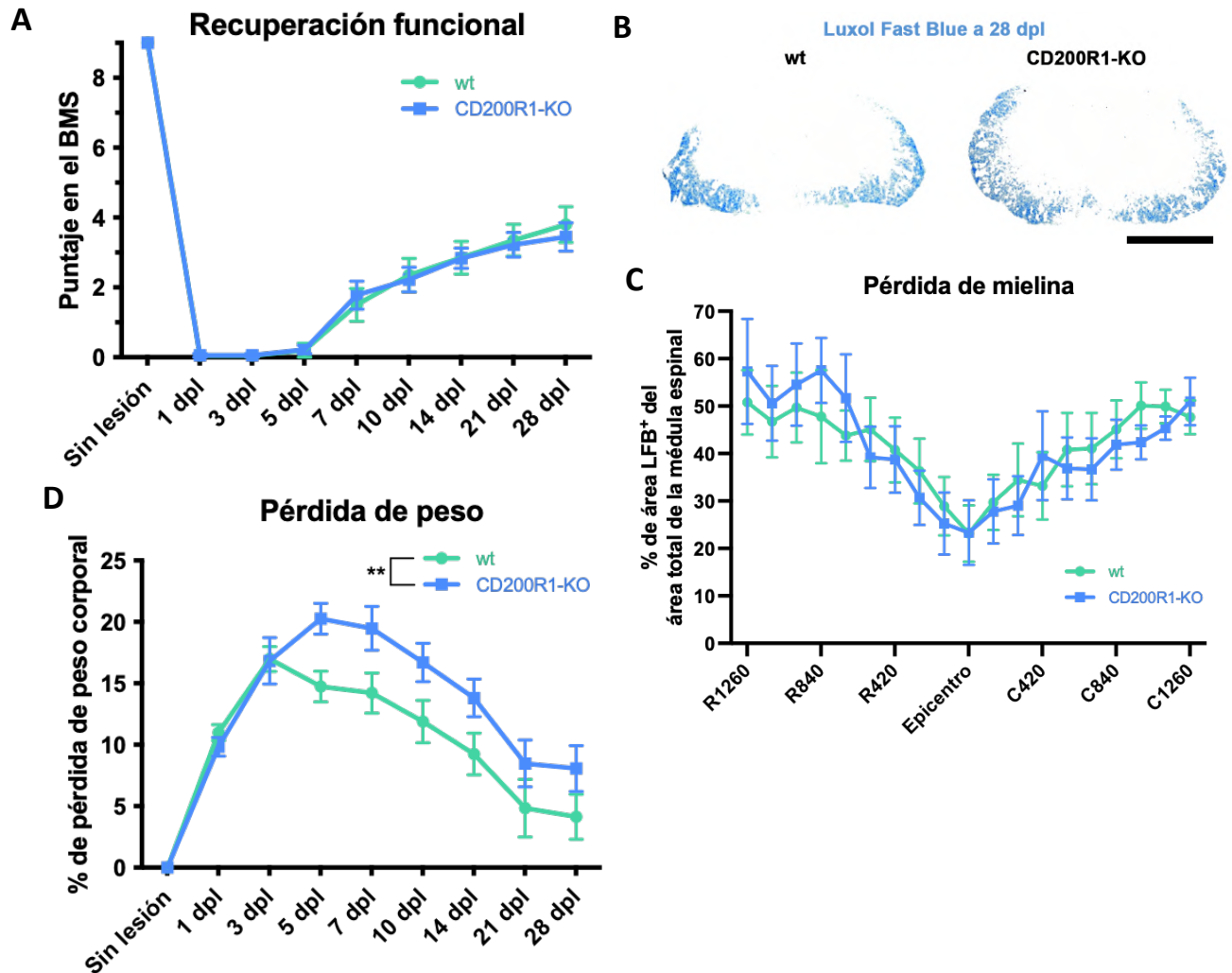


Figura 39. Recuperación de funciones locomotoras en ausencia de *CD200R1* luego de una lesión de médula espinal. (A) No se observan diferencias en la recuperación de funciones locomotoras evaluadas a través de la escala BMS hasta los 28 dpl entre los ratones *CD200R1-KO* y wt (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.92$, interacción $p = 0.97$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 10$ wt, $n = 9$ *CD200R1-KO*). (B) imágenes representativas de secciones transversales de médula espinal de ratones wt y *CD200R1-KO* en el epicentro de la lesión a los 28 dpl, teñidas con *Luxol Fast Blue* (en azul) para evidenciar el área de tejido ocupado por mielina. Barra de calibración: 500 μm . (C) La preservación de mielina a los 28 dpl se evaluó a través de la cuantificación del área marcada con *Luxol Fast Blue* en secciones seriadas cada

14 μm centradas en el epicentro en dirección caudal y rostral. Se indican las distancias desde el epicentro en sentido rostral (R420-R1260: de 420 a 1260 μm en sentido rostral) y caudal rostral (C420-C1260: de 420 a 1260 μm en sentido caudal). No hay diferencias significativas en el área de mielina a los 28 dpl entre los ratones CD200R1-KO y wt (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.99$, interacción $p = 0.90$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 6$ wt, $n = 5$ CD200R1-KO). **(D)** La ausencia de CD200R1 genera una mayor pérdida de peso luego de una contusión medular. (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.08$, interacción $p = 0.005$, test post-hoc de Bonferroni, $**p < 0.01$; $n = 10$ wt, $n = 9$ CD200R1-KO).

Análisis de parámetros sanguíneos luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1

En vista de que los ratones CD200R1-KO pierden una mayor proporción del peso corporal, sugiriendo alteraciones a nivel sistémico, nos planteamos analizar otros parámetros indicadores de funciones sistémicas relacionadas al desarrollo de la patología luego de una lesión de médula espinal. La comunicación entre el sitio de la lesión en la médula espinal y otros tejidos es fundamental durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria. La circulación sanguínea es uno de los principales componentes de esa comunicación entre el tejido lesionado y el resto de los tejidos y comprende la principal vía por la cual ingresan componentes celulares y humorales de la respuesta inflamatoria al tejido lesionado. Por lo tanto, nos planteamos analizar si la ausencia de CD200R1 tiene un impacto a nivel de las células de la sangre, con el fin de profundizar en los mecanismos que subyacen a las alteraciones sistémicas generadas por la ausencia de este receptor.

Evaluamos el número de leucocitos en sangre, en condiciones sin lesionar y a diferentes tiempos post-lesión de médula espinal (Figura 40), utilizando el analizador hematológico Mindray BC-5000. En condiciones normales, no se observaron diferencias en el número de leucocitos en sangre entre los ratones CD200R1-KO y wt, salvo en la población de linfocitos donde se observó un menor número en los ratones CD200R1-KO (Figura 40 C). Luego de la cirugía control (Sham) y a 1, 3, 7, 14 y 28 dpl no se observaron diferencias en el número de leucocitos, neutrófilos, macrófagos y linfocitos a causa de la ausencia de CD200R1.

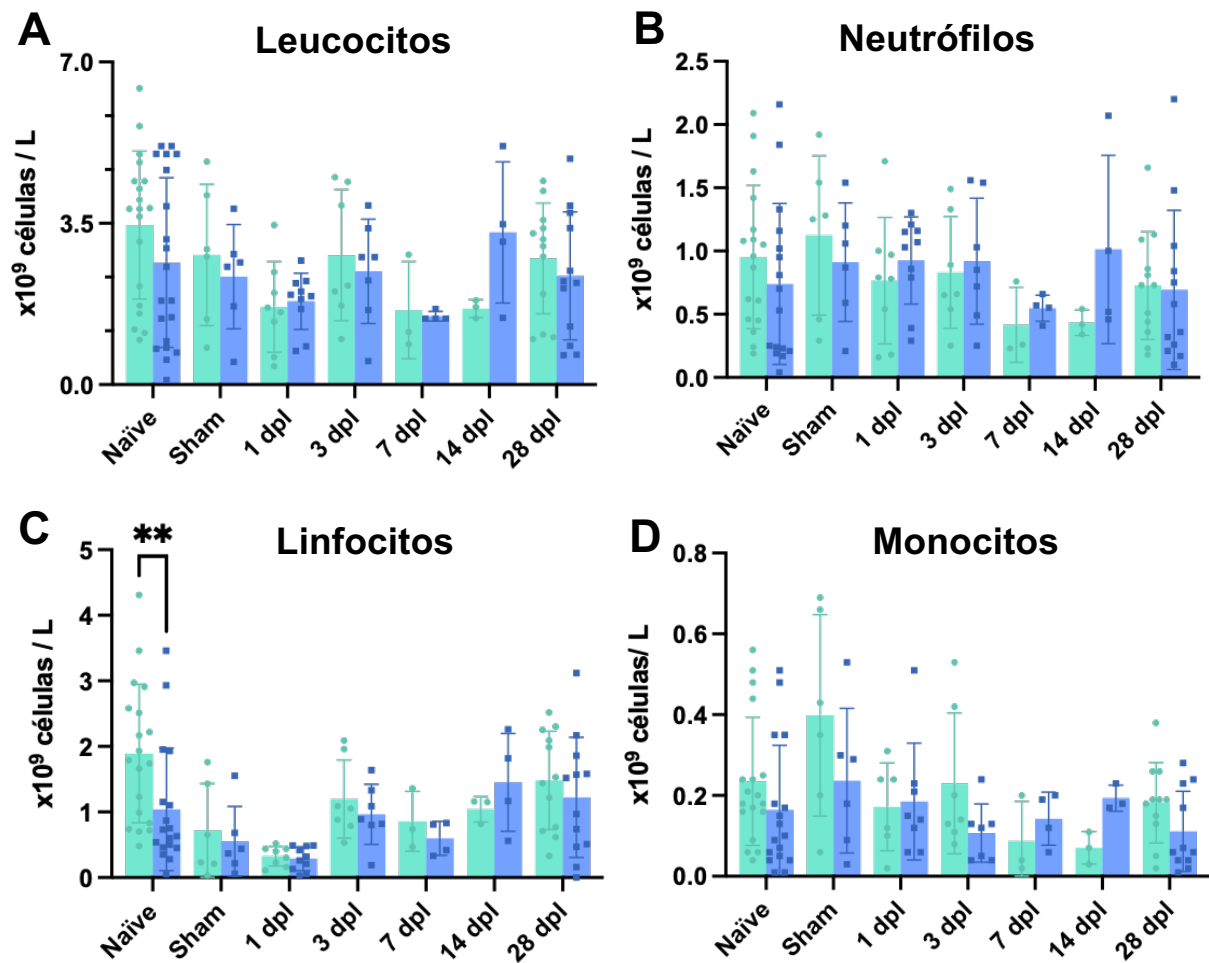


Figura 40. Número de células de las principales poblaciones celulares de leucocitos en sangre en condiciones normales, luego de una cirugía control (Sham) o a 1, 3, 7, 14 y 28 dpl en ratones CD200R1-KO y wt, evaluadas a través del analizador hematológico. (A) Se observa un menor número de leucocitos en ratones CD200R1-KO en comparación con los wt únicamente en condiciones sin lesionar. Luego de la cirugía control o de la lesión de médula espinal no se observan diferencias (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.56$, interacción $p = 0.11$, test post-hoc de Bonferroni, $*p < 0.05$). (B) La ausencia de CD200R1 no afecta el número de neutrófilos en sangre en condiciones normales y luego de la lesión (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.61$, interacción $p = 0.44$, test post-hoc de Bonferroni). (C) El número de linfocitos en sangre en condiciones normales en ratones CD200R1-KO es menor en comparación con ratones wt, pero luego de la lesión control o de una lesión de médula espinal no se observan diferencias

(ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.04$, interacción $p = 0.08$, test post-hoc de Bonferroni, $**p < 0.01$). **(D)** No se observan diferencias en el número de monocitos en las condiciones analizadas entre los ratones *CD200R1-KO* y ratones *wt* (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.46$, interacción $p = 0.43$, test post-hoc de Bonferroni).

Alteraciones en el bazo frente a una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1

El bazo es considerado un órgano del sistema inmune que es fundamental en el desarrollo de la respuesta inflamatoria luego de una lesión de médula espinal, ya que actúa como reservorio de células del sistema inmune que pueden migrar hacia el sitio de la lesión^{332,333,345,437-439}. El bazo comprende una interfaz neuroinmune, en la cual se comunican el sistema nervioso y el sistema inmune. Este órgano se encuentra inervado por el sistema nervioso autónomo y se ha planteado que la activación de estas fibras nerviosas adrenérgicas participa en la movilización de células del sistema inmune presentes en el bazo hacia la circulación sanguínea^{346,347}. A pesar de que aún está en discusión, se ha planteado que la gran parte de los macrófagos presentes en la médula espinal a los 7 dpl provienen del bazo³³², aunque los que provienen de la médula ósea también son relevantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en la médula espinal lesionada. A su vez, el bazo es uno de los órganos del cuerpo con mayores niveles de expresión de CD200R1 (Figura 20). Por lo tanto, nos propusimos analizar el impacto que tiene la ausencia de CD200R1 en el bazo en condiciones normales y luego de una lesión de médula espinal.

Cambios en el peso del bazo luego de una lesión de médula espinal

En este estudio, evaluamos el peso del bazo en condiciones normales y en diferentes momentos posteriores a una lesión en la médula espinal. El peso del bazo es considerado un indicador de la respuesta de este órgano a diversos estímulos inflamatorios^{331,333}. En condiciones normales y después de una laminectomía de control (sham), observamos que el peso del bazo en los ratones *CD200R1-KO* es menor que el de los ratones *wt* (Figura 41). A las 24 horas después de la lesión de la médula espinal, observamos una ligera atrofia en el bazo de los ratones *wt* y *CD200R1-KO*. Interesantemente, el peso del bazo de ambos genotipos es similar a 1, 3 y 14 días después de la lesión, donde no se observan diferencias significativas. Sin embargo, hacia el día 28 después de la lesión, el peso del bazo vuelve a la normalidad tanto en los ratones *wt* como en

los *CD200R1-KO*, y se vuelve a observar un peso del bazo significativamente más bajo en los ratones *CD200R1-KO*. Estos resultados sugieren que el receptor desempeña un papel importante en la respuesta del bazo ante daños específicos en la médula espinal, en contraposición a daños generales. Esto se evidencia al observar que, frente a la cirugía de control donde la médula espinal queda intacta, se observa lo mismo que en condiciones normales, mientras que luego de la lesión de médula espinal no.

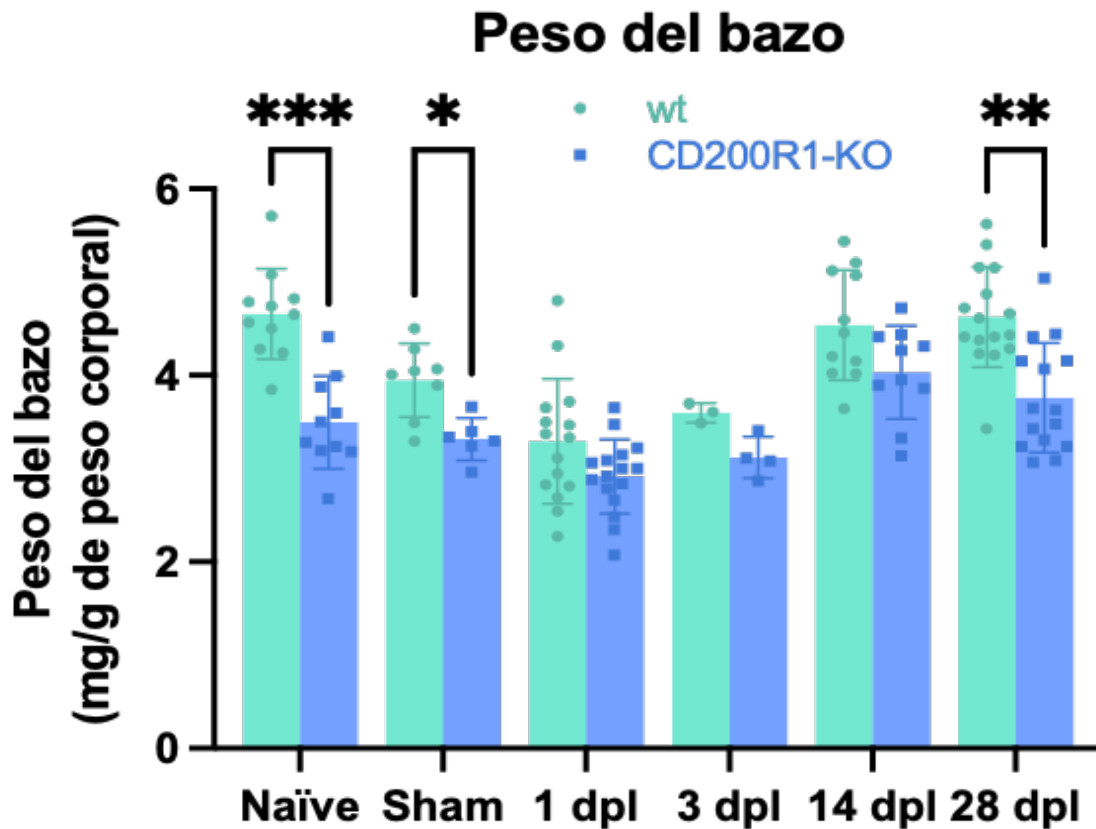


Figura 41. *Peso del bazo normalizado por el peso corporal en ratones *CD200R1-KO* y *wt* en condiciones normales (naïve), luego de una laminectomía de control (sham) y a 1, 3, 14 y 28 dpl. En condiciones normales y luego de una laminectomía control, el peso del bazo de los ratones *CD200R1-KO* es significativamente menor al de los ratones *wt* que expresan el receptor. A 1 y 3 dpl, se observa un descenso en el peso del bazo, tanto en los ratones *wt* como en los *CD200R1-KO*, que vuelve a restaurarse a los valores normales hacia los 14 y 28 dpl. Cuando se compara el peso del bazo entre los ratones *wt* y *CD200R1* a 1, 3 y 14 dpl, no se observan diferencias significativas, mientras que a los 28 dpl sí se observa un peso del bazo significativamente menor en los ratones *CD200R1-KO* (ANOVA de dos vías, genotipo $p < 0.0001$, interacción $p = 0.107$, test post-hoc de Bonferroni, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).*

Análisis de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en el bazo en ausencia de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal

Luego analizamos las principales poblaciones celulares del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendrítica y linfocitos) presentes en el bazo en condiciones normales (naïve) y a 1, 3 y 14 días post-lesión de médula espinal en presencia o ausencia de CD200R1. El objetivo fue evaluar si la ausencia de CD200R1 tiene un efecto en la movilización y/o apoptosis de células a nivel de este órgano luego de una lesión, que explique al menos en parte las alteraciones observadas a nivel del peso del bazo. Observando la dinámica temporal de las diferentes poblaciones, se puede apreciar que el número de macrófagos aumenta en el bazo a los 14 dpl (Figura 42 B), similar a lo que ocurre con la población de eosinófilos (Figura 42 D) y células dendríticas (Figura 42 E). Por otro lado, la población de neutrófilos presenta un aumento bifásico, ya que se observan dos picos a 1 y 14 dpl, en comparación con el naïve (Figura 42 C). Los linfocitos B y T presentan dinámicas temporales similares, sin tener importantes cambios en número luego de la lesión de médula espinal (Figura 42 F-H), a pesar de que se observa un leve descenso en el número de linfocitos B hacia los 14 dpl (Figura 42 F). En cuanto al efecto de la ausencia de CD200R1 en la dinámica temporal del número de células de estas poblaciones, las diferencias se observan únicamente a los 14 dpl, donde la ausencia del receptor promueve un menor número de neutrófilos en el bazo (Figura 42 C), y una tendencia hacia un menor número de macrófagos (Figura 42 B). Por el contrario, se observa un leve aumento en el número de linfocitos B a los 14 dpl en el bazo de ratones *CD200R1-KO* (Figura 42 F).

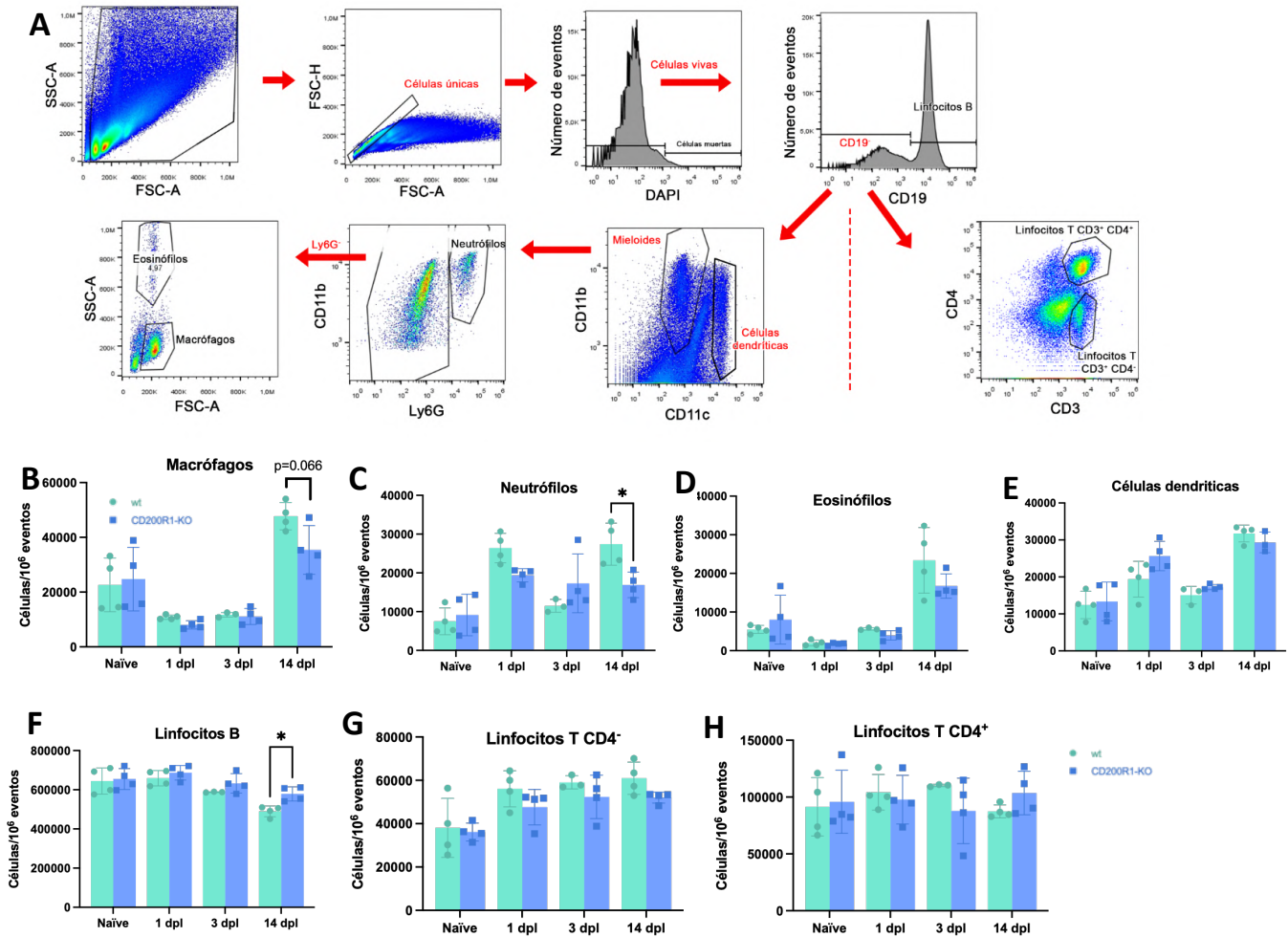


Figura 42. Análisis de las poblaciones de células mieloides y linfocitos en el bazo luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1. (A) Estrategia de selección de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en el bazo por citometría de flujo a partir de tejido. **(B-H)** Se evaluó el número de **(B)** macrófagos, **(C)** neutrófilos, **(D)** Eosinófilos, **(E)** células dendríticas, **(F)** linfocitos B, **(G)** linfocitos T CD4⁻ y **(H)** linfocitos T CD4⁺ en el tejido de bazo a 1, 3, 7 y 14 días post-lesión de médula espinal. A los 14 dpl se observó un número de neutrófilos significativamente menor en el bazo de ratones CD200R1-KO en comparación con los wt **(C)**, así como también una tendencia ($p=0.066$) en la misma dirección para la población de macrófagos **(B)**. Por otro lado, se observó un aumento leve pero significativo de linfocitos B en el bazo de los ratones CD200R1-KO a los 14 dpl **(F)**. (ANOVA de dos vías, test post-hoc de Bonferroni, * $p < 0.05$)

Análisis de la inervación de fibras noradrenérgicas en el bazo en ausencia de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal

Como fue mencionado previamente, el bazo constituye una interfaz neuroinmune, ya que presenta una rica inervación por parte del sistema nervioso autónomo. Esta inervación es un componente fundamental del reflejo colinérgico anti-inflamatorio que ayuda a controlar las respuestas inflamatorias, actuando como un freno que evita respuestas inflamatorias exacerbadas que puedan ser perjudiciales. Las fibras que inervan el bazo provienen de neuronas que se encuentran en el ganglio celíaco y constituyen principalmente neuronas noradrenérgicas, que liberan noradrenalina en el bazo cuando se activa el reflejo colinérgico anti-inflamatorio³⁴². Teniendo en cuenta que se observaron alteraciones importantes en el bazo en los ratones *CD200R1-KO*, nos planteamos analizar si son debidas a alteraciones en la inervación del bazo por parte del sistema nervioso autónomo, evaluando la presencia de fibras noradrenérgicas en el tejido del bazo a 1 y 15 luego de la lesión de médula espinal. Se analizó la inervación del bazo a estos tiempos post-lesión debido a que se ha reportado que se comienzan a ver cambios en estas fibras noradrenérgicas ya a las 24 horas post-lesión y que los niveles máximos reportados de fibras en el bazo post-lesión es a los 15 dpi⁴¹³. Para ello realizamos inmunofluorescencia en el tejido del bazo utilizando anticuerpos que reconocen la enzima tirosina hidroxilasa (TH), la cual está presente en las fibras noradrenérgicas al ser un componente necesario para la síntesis del neurotransmisor^{440,441}. En la Figura 43 A se observa una imagen representativa de la presencia de TH en el tejido del bazo donde se evaluó el área del bazo ocupada por las fibras noradrenérgicas. Contrario a lo reportado por Monteiro, no observamos un aumento en el área marcada por TH a los 15 días con respecto a las 24 horas post-lesión, sino que observamos un leve descenso no significativo, no habiendo diferencias significativas en ausencia de CD200R1. (Figura 43 B). Debido a que no analizamos el área de fibras TH⁺ en condiciones normales o luego de una cirugía control sin lesión de médula espinal, no podemos determinar si se observa el descenso a las 24 horas post-lesión reportados por Monteiro et al.⁴¹³

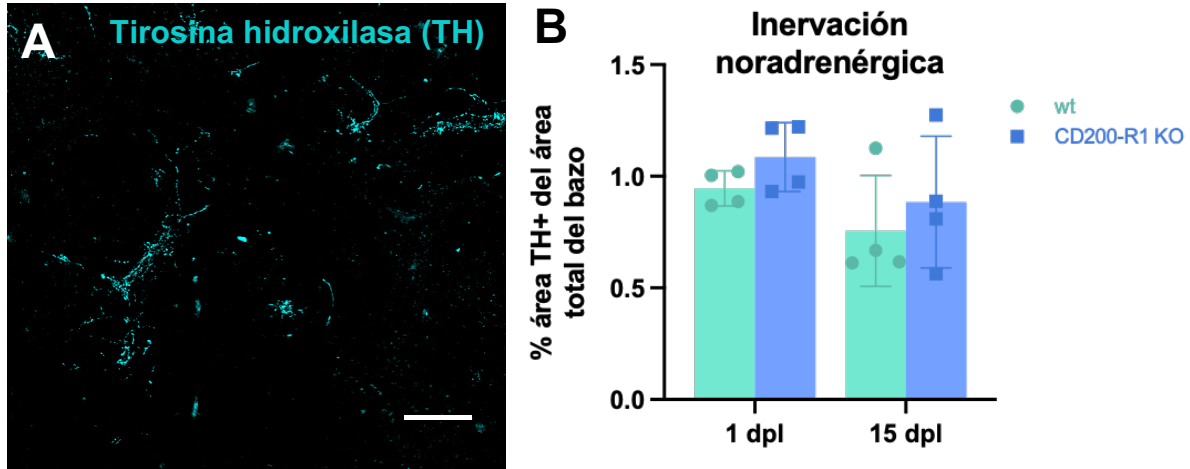


Figura 43. Inervación de fibras noradrenérgicas en el bazo a 1 y 15 días post lesión de médula espinal. (A) Imagen representativa de inmunofluorescencia del bazo para la tirosina hidroxilasa (TH), donde se observan las fibras noradrenérgicas. Barra de calibración: 200 μ m. **(B)** Cuantificación del área ocupada por las fibras noradrenérgicas en el bazo a 1 y 15 días post-lesión de médula espinal. No se observan diferencias significativas en el área positiva para tirosina hidroxilasa entre 1 y 15 dpl, así como tampoco entre los ratones wt y CD200R1-KO (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.23$, interacción $p = 0.96$, test post-hoc de Bonferroni).

Resumen de principales resultados obtenidos con el modelo de lesión de médula espinal por contusión

En primer lugar, se logró poner a punto un modelo de lesión de médula espinal por contusión en ratones, generando una lesión reproducible y robusta que permite observar posibles efectos en la recuperación de las funciones locomotoras. Por citometría de flujo observamos que la ausencia del receptor tiene un efecto principalmente en los macrófagos en la etapa aguda de la respuesta inflamatoria, promoviendo una mayor infiltración de macrófagos Ly6C⁺. La ausencia del receptor CD200R1 promueve una disminución de la fagocitosis de mielina *in vitro* en macrófagos derivados de médula ósea, y cuando se analiza con células obtenidas del tejido de la médula espinal lesionado. Interesantemente, la ausencia del receptor no tuvo efecto en la recuperación de funciones locomotoras y en la preservación de mielina luego de la lesión de médula espinal. Sin embargo, los ratones *CD200R1-KO* pierden una mayor proporción del peso corporal luego de la lesión, sugiriendo alteraciones sistémicas. Al analizar las poblaciones de leucocitos en sangre, no observamos diferencias, tanto en condiciones normales como luego de la lesión generadas por la ausencia de CD200R1. Al analizar el peso del bazo, observamos que el peso del bazo de los ratones *CD200R1-KO* en condiciones normales y luego de una cirugía control es menor que el de los ratones *wt*, mientras que en las etapas agudas a la lesión de médula espinal, ya no se observan diferencias en el peso del bazo comparando los genotipos. Interesantemente, la diferencia en el peso del bazo se restaura hacia los 28 dpl, observándose un menor peso del bazo en los ratones *CD200R1-KO*. La ausencia de CD200R1 no generó diferencias en la innervación noradrenérgica en el bazo luego de una lesión de médula espinal.

Capítulo 3 / Objetivo específico 3: CD200-CD200R1 en un contexto de inflamación sistémica por administración de LPS

LPS es un componente de la pared bacteriana y actúa como un inmunoestimulante ya que activa una fuerte respuesta inflamatoria a través de la activación de receptores como TLR4 que lleva a la producción de citoquinas pro-inflamatorias^{373,431,442}. Se ha observado que la interacción CD200-CD200R1 tiene un rol en el desarrollo de la respuesta frente al LPS y que el bloqueo de esta interacción *in vitro* promueve una mayor pérdida de neuronas luego de este estímulo inflamatorio³⁹⁵. Por lo tanto, nos planteamos profundizar en los mecanismos por los cuales CD200R1 modula la neuroinflamación cuando las señales provienen de una inflamación periférica que es comunicada al SNC.

Efecto de la ausencia de CD200R1 sobre la neuroinflamación en el SNC luego de la administración de LPS

Una de las características más evidentes de la administración sistémica de LPS es el comportamiento de enfermedad^{443,444}. Una forma de evaluarlo es mediante el test de campo abierto, donde se analiza la exploración espontánea de los animales midiendo la distancia total recorrida. Este test se realizó a las 24 horas después de la administración de LPS o de vehículo control, donde se evidencia una clara reducción en la distancia explorada. Esto se relaciona al desarrollo de la respuesta adaptativa del comportamiento de enfermedad frente a una inflamación sistémica ya descrita previamente⁴⁴⁵. En condiciones homeostáticas, en ausencia del estímulo inflamatorio, los ratones *CD200R1-KO* recorren la misma distancia que los ratones *wt* en el campo abierto (Figura 44), mientras que a las 24 horas de la administración de LPS, observamos que los ratones *CD200R1-KO* recorren una distancia significativamente menor en el campo abierto. Esto sugiere una exacerbación significativa del comportamiento de enfermedad a causa de la ausencia del receptor. Esto podría indicar una posible alteración de la respuesta inflamatoria a nivel del SNC en ausencia de CD200R1.

Con el fin de profundizar en estas posibles alteraciones a nivel de la respuesta neuroinflamatoria en el SNC frente al LPS, analizamos si la ausencia de CD200R1 tiene un impacto en el número de microglía a nivel de la corteza cerebral, tanto en condiciones homeostáticas como luego de un estímulo inflamatorio con LPS. Para ello, realizamos inmunohistoquímica de tejido del cerebro utilizando el anticuerpo anti-Iba1 para evidenciar microglía. En condiciones homeostáticas no se observan diferencias en el número de microglía en la corteza cerebral entre genotipos (Figura 44 B). Mientras que a las 24 horas de la administración de LPS no observamos cambios en el número de microglía en ratones *wt*, los ratones *CD200R1-KO* presentan una tendencia a un mayor número de microglía con respecto a los *wt*, sugiriendo que este receptor en la microglía puede estar mediando los efectos observados a nivel comportamental.

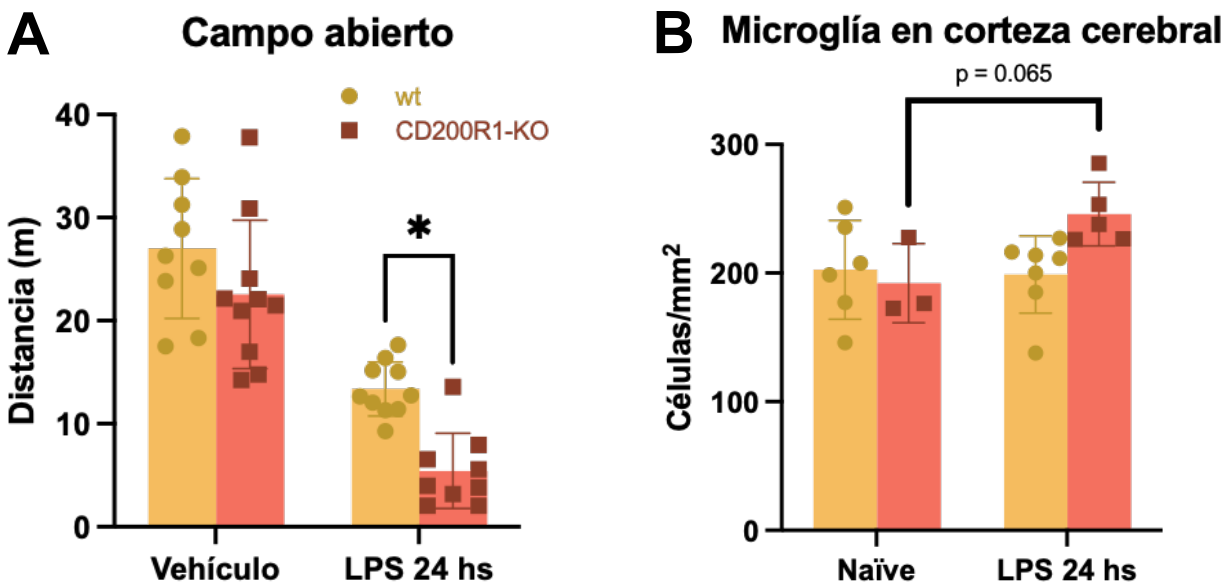
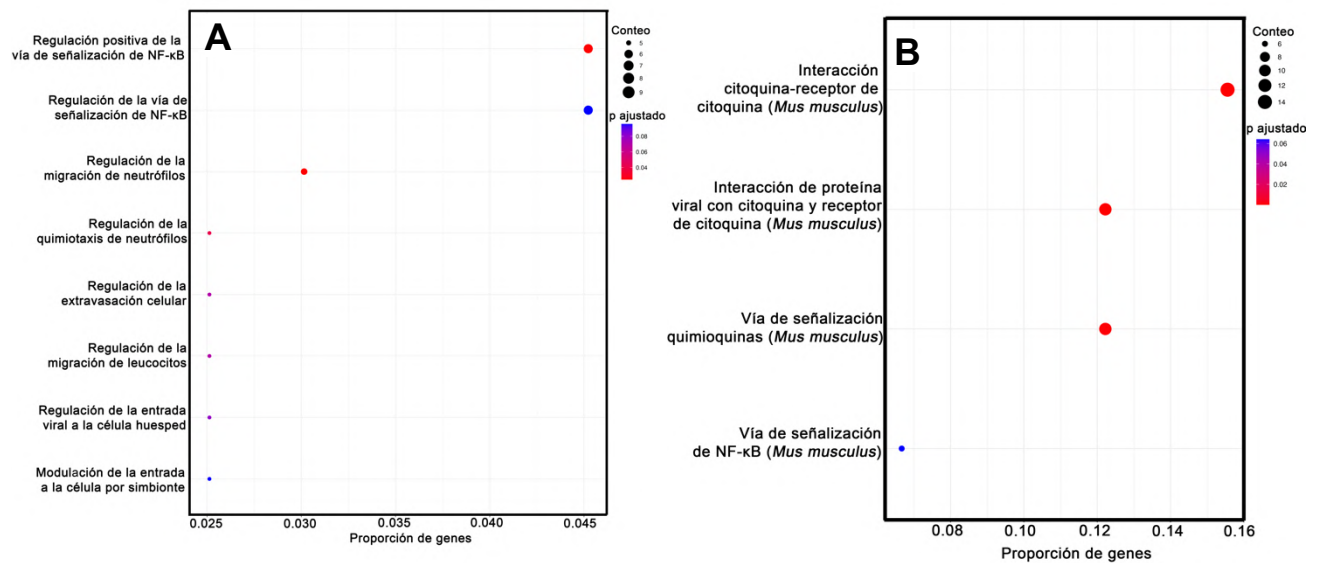


Figura 44. Alteraciones en la locomoción luego de la administración con LPS en los ratones *CD200R1-KO* y número de microglía en corteza cerebral. (A) El test de campo abierto reveló que los ratones *CD200R1-KO* caminan una menor distancia a las 24 horas de la administración de LPS en comparación con los ratones *wt*, mientras que luego de la administración con vehículo no se observan diferencias (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.0013$, interacción $p = 0.33$, test post-hoc de Bonferroni, $*p < 0.05$). (B) Número de microglía en secciones de corteza cerebral normalizado por área, en condiciones normales (naïve) y a las 24 horas de la administración de LPS.

expresión se encuentra aumentada en los cerebros de ratones CD200R1-KO en comparación con los ratones wt, mientras que en el lado izquierdo se muestran los genes con una expresión reducida en los ratones CD200R1-KO en comparación con los ratones wt.

Posteriormente, analizamos cuáles son los genes que se encuentran diferencialmente expresados en ausencia de CD200R1 (Figura 44 B). Para este análisis, evaluamos el efecto del genotipo considerando como covariable el tratamiento con buffer salino o LPS. Es decir, evaluamos el efecto del genotipo controlando por el del tratamiento. Encontramos 904 genes expresados diferencialmente entre ambos genotipos, considerando genes con un p-valor ajustado menor a 0.10. Cuando consideramos únicamente los genes con un cambio en el nivel de expresión corregido mayor al 25%, esta lista de genes se reduce a 266. En la Figura 44 B, se presenta el resultado de este análisis en forma de *volcano plot*. Notablemente, dentro de estos genes diferencialmente expresados, CD200R1 y CD200R4 presentaron una reducción significativa en los ratones CD200R1-KO en comparación con los ratones wt (datos que no se muestran).

Como primera aproximación a entender las funciones celulares en las que intervienen estos genes diferencialmente expresados, analizamos la sobrerrepresentación de estos genes en términos de procesos biológicos de la base de *Gene Ontology* (GO^{423}) (Figura 45 A) y de diferentes vías de señalización intracelular de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* ($KEGG^{422}$) (Figura 45 B). Estos análisis permitieron evidenciar una sobre-representación de los genes asociados a la regulación de la vía de NF- κ B, así como también de la regulación de la migración leucocitaria, particularmente de los neutrófilos (Figura 45 A). Por otro lado, también se vieron sobrerrepresentados los genes asociados a las interacciones entre citoquinas y quimioquinas con sus receptores (Figura 45 B). Estas observaciones respaldan la hipótesis de que CD200R1 desempeña un papel fundamental en la regulación de los procesos neuroinflamatorios en el sistema nervioso central. La ausencia de CD200R1 conduce a alteraciones en vías de señalización celular críticas para la regulación y desarrollo de respuestas inflamatorias.



Hasta el momento hemos realizado este análisis preliminar y estamos empezando a profundizar en los análisis que nos permitirán comprender en mayor detalle el rol de estos genes en las diferentes vías y funciones celulares, así como también explorar de qué manera la ausencia de CD200R1 se asocia con las alteraciones en la neuroinflamación y en el comportamiento evidenciados previamente.

Alteración del bazo en ausencia de CD200R1 en un contexto de inflamación sistémica

Luego de observar alteraciones en la respuesta inflamatoria a nivel del SNC después de la administración con LPS, nos planteamos evaluar alteraciones en órganos periféricos relevantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria frente a este estímulo. Uno de los principales órganos que responden frente a este estímulo es el bazo, el cual tiene como una de sus funciones detectar posibles patógenos y señales de daño presentes en la sangre³³³. Contrario a lo observado luego de una lesión de médula espinal, la estimulación con LPS por vía intraperitoneal promueve un aumento en el peso del bazo, principalmente debido a la proliferación de células del sistema inmune adaptativo frente a este estímulo^{401,402}.

Como era de esperarse, observamos que el bazo de los ratones *wt* que expresan CD200R1 aumenta de peso luego de la administración con LPS (Figura 46 A y B). Sin embargo, observamos que el peso del bazo se mantiene constante en los ratones *CD200R1-KO* a las 16 y 24 horas luego de la administración, observándose un menor peso del bazo en comparación con el de los ratones *wt*, sugiriendo así una alteración de la respuesta del bazo frente a este estímulo y por lo tanto de un posible rol de CD200R1 en el desarrollo de esta respuesta.

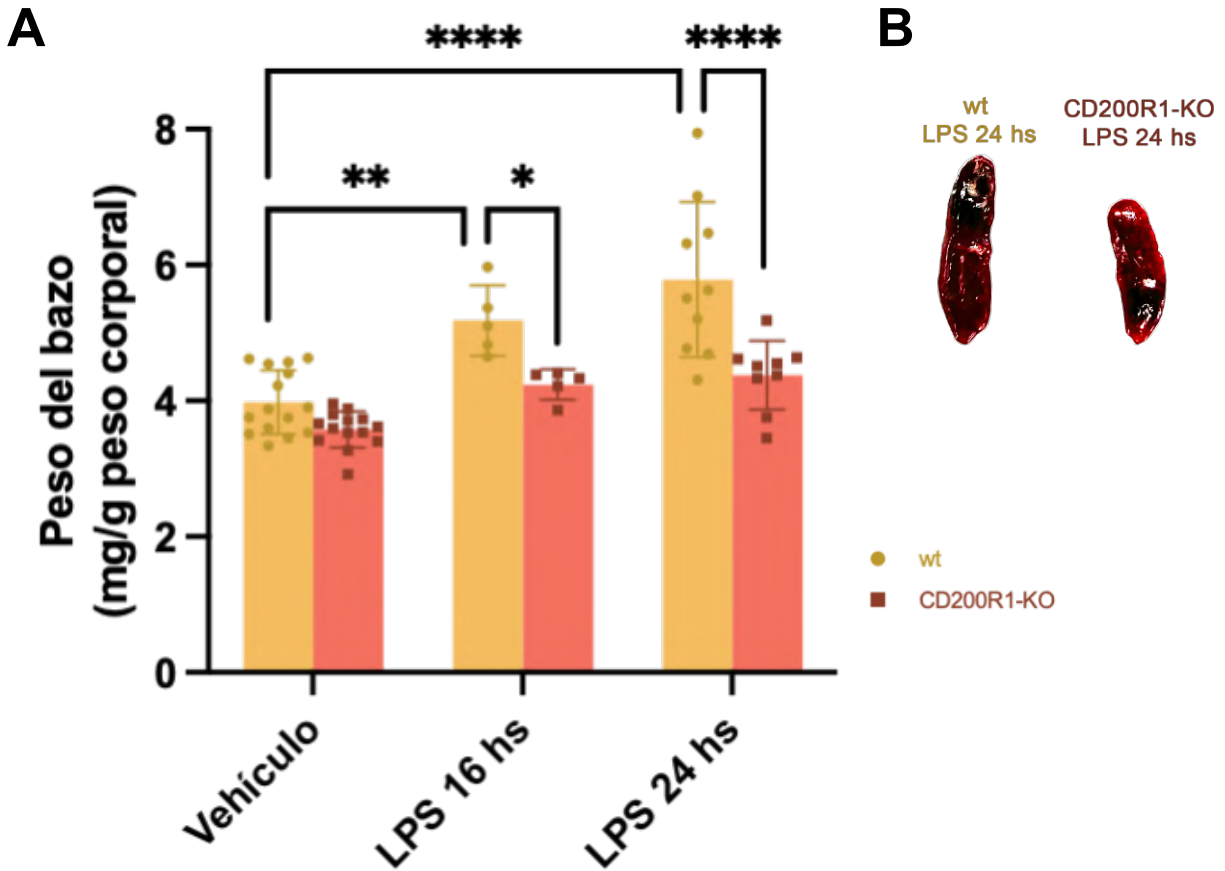


Figura 46. Cambios en el peso del bazo normalizado por el peso corporal luego de la administración de LPS. (A) El bazo de los ratones wt aumenta significativamente a las 16 y 24 horas de la administración de LPS, mientras que el bazo CD200R1-KO se mantiene inalterado (ANOVA de dos vías, genotipo $p < 0.0001$, interacción $p = 0.025$, test post-hoc de Bonferroni; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$). **(B)** Imágenes representativas de un bazo de ratón wt (a la izquierda) y CD200R1-KO (a la derecha) a las 24 horas de la administración con LPS, donde se observa un tamaño menor del bazo de ratón CD200R1-KO en comparación con el del wt.

Estos resultados sugieren alteraciones sistémicas a nivel de varios órganos relevantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria frente a un estímulo externo. Por lo tanto, nos propusimos profundizar en los posibles mecanismos de estas alteraciones y sus posibles efectos a nivel de la neuroinflamación. En primer lugar, analizamos las poblaciones celulares mieloides y linfoides en el bazo luego de la administración con LPS para evaluar si la alteración en la respuesta del bazo es generada por diferencias en las poblaciones celulares presentes en el órgano a las 24 horas de haber administrado el LPS (Figura 47). En condiciones de homeostasis (luego de la administración de vehículo control), no se observaron diferencias significativas en el número de

macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos en el bazo a causa de la ausencia de CD200R1. Interesantemente, luego de la administración de LPS, observamos un aumento significativo en el número de macrófagos (Figura 47 A) y eosinófilos (Figura 47 C), y una tendencia en la misma dirección en el número de neutrófilos (Figura 47 B) en el bazo de los ratones *CD200R1-KO*, en comparación con el aumento del número de estas poblaciones en el bazo de los ratones *wt*. Tanto la población de linfocitos B y T, como de células dendríticas no se vieron afectadas por la falta de CD200R1 (Figura 47 D-G).

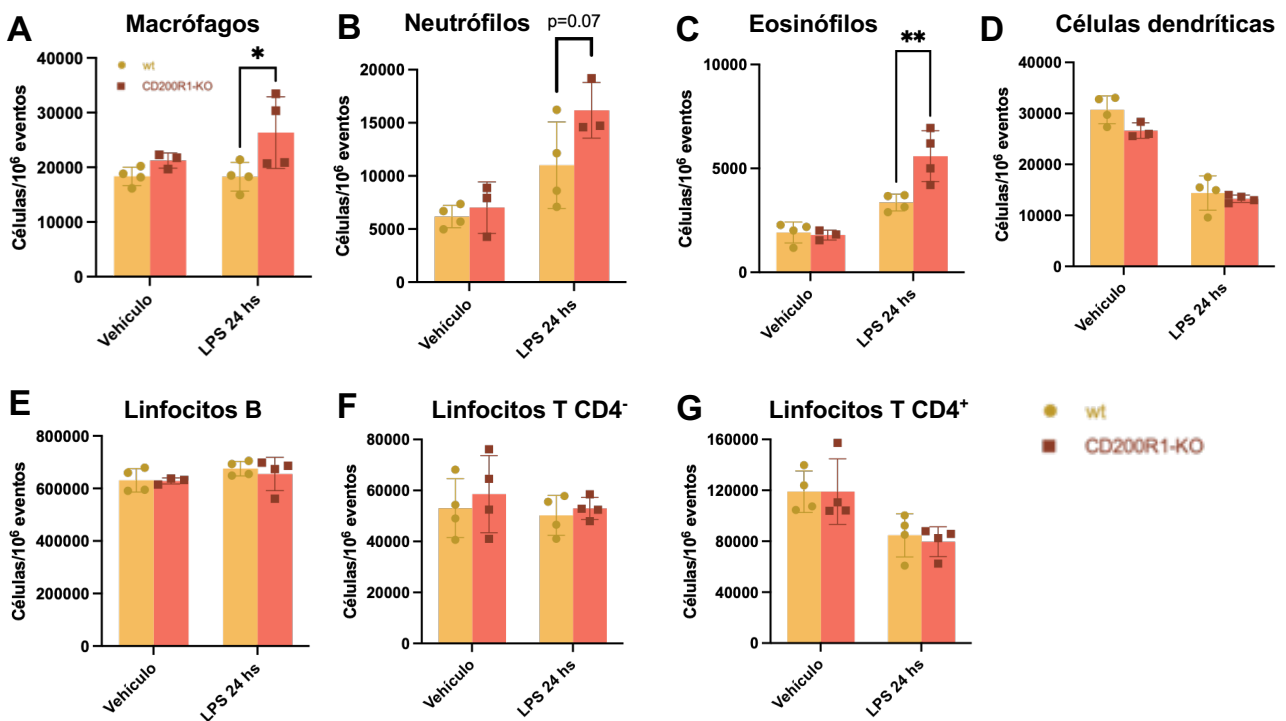


Figura 47. Análisis de las principales poblaciones mieloides y linfoides presentes en el bazo de hembras luego de la administración con LPS. No se observan diferencias significativas en las poblaciones analizadas luego de la administración con vehículo cuando el receptor CD200R1 está ausente, así como tampoco a las 24 horas de administración de LPS en las poblaciones de (E) linfocitos B, (F-G) linfocitos T (CD4 positivos y negativos) y (D) células dendríticas. Sin embargo, se observa un aumento significativo a las 24 horas de la administración de LPS en las poblaciones de (A) macrófagos y (C) eosinófilos de los ratones *CD200R1-KO* en comparación con los *wt*. Se observa una tendencia a un mayor número de neutrófilos (B) en el bazo de ratones *CD200R1-KO* en comparación con los bazos de ratones *wt* a las 24 horas de administración con LPS (ANOVA de dos vías, genotipo $p < 0.0001$, interacción $p = 0.025$, test post-hoc de Bonferroni; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Número de leucocitos en sangre en ausencia de CD200R1 en un contexto de inflamación sistémica

Luego analizamos el impacto de la ausencia de CD200R1 en la sangre, otro factor fundamental en el desarrollo de las respuestas inflamatorias, y en particular en la respuesta inflamatoria luego de la administración con LPS. En primer lugar, analizamos las principales poblaciones de leucocitos en sangre 24 horas luego de la administración de vehículo salino o de LPS por vía intraperitoneal (Figura 48). Observamos que luego de la administración con LPS se observa un mayor número de leucocitos en sangre en los ratones *CD200R1-KO* en comparación con los ratones *wt* (Figura 48 A). Este aumento se debe principalmente a un mayor número de monocitos (Figura 48 B) y neutrófilos (Figura 48 C) en sangre en ratones *CD200R1-KO* a las 24 luego de la administración con LPS. No observamos diferencias en el número de linfocitos en sangre generados por la ausencia de CD200R1 luego de la administración con LPS ni con vehículo.

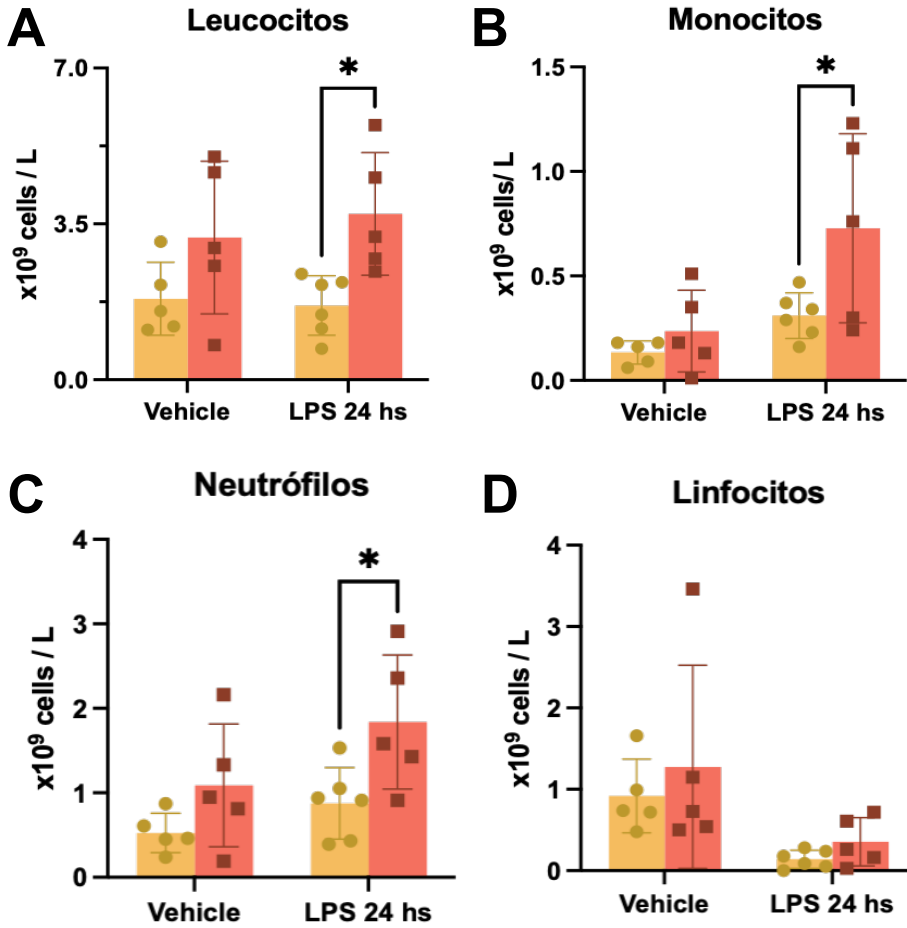


Figura 48. Número de leucocitos en sangre a las 24 horas de la administración con LPS o vehículo en hembras CD200R1-KO o wt. Luego de la administración con vehículo no se observan diferencias en las poblaciones celulares analizadas entre los ratones CD200R1-KO y wt. La ausencia de CD200R1 genera un aumento en el número de **(A)** leucocitos en sangre (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.004$, interacción $p = 0.52$, test post-hoc de Bonferroni; $*p < 0.05$), **(B)** monocitos (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.028$, interacción $p = 0.16$, test post-hoc de Bonferroni; $*p < 0.05$) y **(C)** neutrófilos a las 24 horas de la administración con LPS (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.008$, interacción $p = 0.44$, test post-hoc de Bonferroni; $*p < 0.05$). **(D)** No se observan alteraciones en el número de linfocitos en sangre a las 24 horas de la administración con LPS por la ausencia de CD200R1 (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.34$, interacción $p = 0.80$, test post-hoc de Bonferroni).

Resumen de resultados obtenidos con el modelo de inflamación sistémica

Al evaluar el impacto de la ausencia de CD200R1 a nivel comportamental en un contexto de inflamación sistémica, observamos una marcada reducción en la distancia explorada en el test campo abierto en los ratones *CD200R1-KO*, un comportamiento típico de la respuesta adaptativa del "comportamiento de enfermedad" frente a la inflamación sistémica. Esto sugiere una exacerbación significativa de este comportamiento, sugiriendo un posible papel regulatorio del CD200R1 en la respuesta neuroinflamatoria en el SNC después de la administración de LPS. A su vez, la tendencia observada en los ratones *CD200R1-KO* hacia un mayor número de microglía en la corteza cerebral frente a la administración de LPS apoya esta hipótesis. La alteración de la respuesta inflamatoria en presencia de LPS también se observó en el bazo, donde se observó que CD200R1 es necesario para promover el aumento del peso del bazo frente a este estímulo. A pesar de observarse un peso menor en el bazo de los ratones *CD200R1-KO* a las 24 horas después de la administración de LPS, se evidenció un mayor número de las principales poblaciones mieloides en este órgano, mientras que no se observaron diferencias en las poblaciones linfoides. Esto sugiere que el CD200R1 es necesario para el desarrollo de la respuesta inflamatoria normal a nivel del bazo frente a un estímulo inflamatorio como lo es el LPS. A nivel de la sangre también observamos importantes alteraciones en las poblaciones de leucocitos a las 24 horas después de la administración de LPS a causa de la ausencia de CD200R1. Se observó un mayor número de leucocitos totales en los ratones *CD200R1-KO*, principalmente debido a un mayor número de células mieloides ya que no se observaron diferencias en la población de linfocitos. En su conjunto, estos resultados evidencian una respuesta inflamatoria exacerbada en los ratones *CD200R1-KO* frente al LPS a nivel sistémico. Esto refuerza la importancia de evaluar la respuesta a nivel global, para entender en mayor detalle los mecanismos que pueden estar afectando a la neuroinflamación sobre el sistema nervioso.

Capítulo 4: Desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la activación de CD200R1

Previamente, en el grupo de investigación desarrollamos y evaluamos estrategias terapéuticas para la modulación de la neuroinflamación basadas en la producción y administración de diferentes proteínas recombinantes con dominios de CD200. En este contexto, observamos que la administración de la proteína recombinante CD200-His en la médula espinal al momento de la lesión confiere neuroprotección la cual se asoció con una mejora en la recuperación de las funciones locomotoras⁸⁹.

Objetivo específico 4: Evaluación de la ventana temporal terapéutica para la activación de CD200R1 en el tejido de médula espinal lesionado

Teniendo en cuenta que la proteína recombinante CD200-His tuvo un efecto positivo en la recuperación de las funciones locomotoras cuando fue administrada dentro del tejido de la médula espinal en el momento de la lesión, analizamos la ventana temporal sobre la cuál se puede actuar para poder promover una mejora en la recuperación de las funciones, teniendo en cuenta que en humanos, la posibilidad de recibir un tratamiento suele retrasarse por varias horas luego de la lesión. Para ello, realizamos la administración intramedular de la proteína CD200-His a las 24 y 48 horas luego de realizar la contusión medular y realizamos el seguimiento funcional durante 28 días. No observamos un efecto significativo en la recuperación funcional evaluada a través de la escala de BMS cuando la proteína CD200-His es administrada en el tejido lesionado de la médula espinal a las 24 (Figura 49 A) o a las 48 horas post-lesión (Figura 49 B).

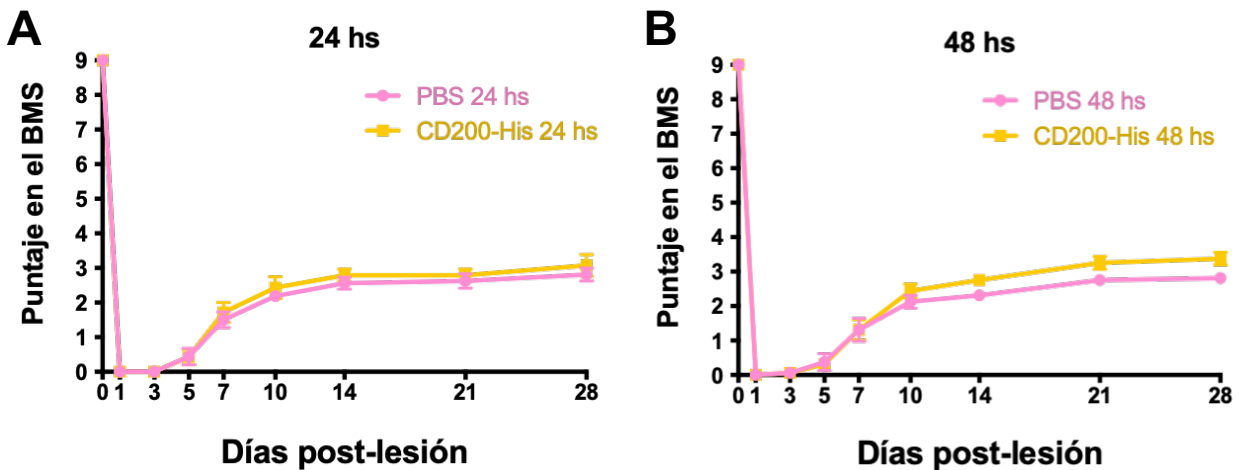


Figura 49. Evaluación del efecto de la administración de CD200-His dentro del tejido de médula espinal a las 24 y 48 horas post-lesión. Por medio de la escala de BMS se evaluó el efecto de la administración de CD200-His a las (A) 24 y (B) 48 horas post-lesión en la recuperación de las funciones locomotoras. No se observan diferencias significativas en el tratamiento con CD200-His a las (A) 24 horas post-lesión (ANOVA de dos vías, tratamiento $p = 0.53$, interacción $p = 0.92$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 8$ PBS, $n = 7$ CD200-His), ni a las (B) 48 horas post-lesión (ANOVA de dos vías, tratamiento $p = 0.29$, interacción $p = 0.16$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 8$ PBS, $n = 8$ CD200-His).

A su vez, evaluamos el efecto de esta administración retrasada de CD200-His sobre la preservación del tejido nervioso luego de la lesión. En primer lugar, analizamos el área de mielina a los 28 dpl a través de la tinción de Luxol Fast Blue en secciones transversales seriadas de la médula espinal (Figura 50 A y B). Observamos que la administración de CD200-His a las 24 o 48 horas post-lesión no tuvo efecto en el área ocupada por mielina en los cortes seriados de médula espinal. Sin embargo, un área similar ocupada por mielina no necesariamente implica que estas fibras mielínicas sean igualmente funcionales. Por lo tanto, nos propusimos analizar el efecto de la administración retrasada de CD200-His en la preservación de las vías motoras por medio de la evaluación de los potenciales motores evocados. Brevemente, esta técnica consiste en estimular la corteza cerebral motora y observar la respuesta a nivel de los músculos en las extremidades inferiores. Sin embargo, concomitantemente con los resultados obtenidos de la recuperación de las funciones locomotoras y de la preservación de mielina luego de la lesión, observamos que la administración de CD200-His tanto a las 24 como a las 48 horas post-lesión no tuvo efecto en la amplitud o la latencia de los potenciales motores evocados analizados en el músculo gastrocnemio (Figura 50 C y D).

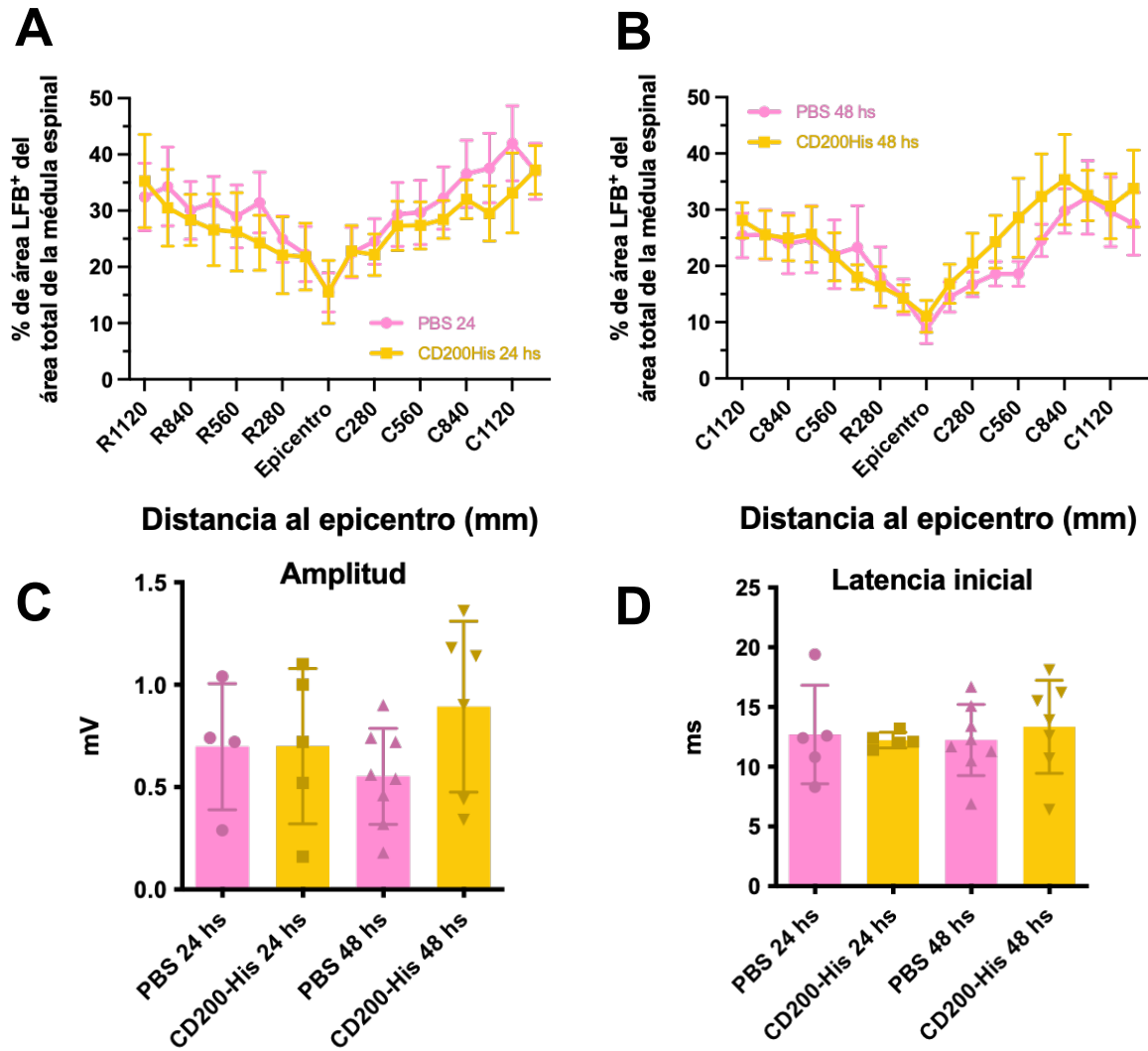


Figura 50. Efecto de la administración retrasada de CD200-His sobre la neuroprotección evaluada a los 28 dpl. (A y B) Se evaluó el efecto de la administración a las (A) 24 y (B) 48 horas post-lesión, sobre la preservación de la mielina por medio de la cuantificación del área positiva para la tinción de Luxol Fast Blue en secciones transversales seriadas de médula espinal a los 28 dpl. Se indican las distancias desde el epicentro en sentido rostral (R280-R1120: de 280 a 1120 μ m en sentido rostral) y caudal rostral (C280-C1120: de 280 a 1120 μ m en sentido caudal). El área de mielina es mínima en el epicentro de la lesión y aumenta progresivamente en ambos sentidos. La administración a las (A) 24 horas (ANOVA de dos vías, tratamiento $p = 0.67$, interacción $p = 0.95$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 7$ PBS, $n = 6$ CD200-His) y a las (B) 48 horas post-lesión no tuvo efecto sobre la pérdida de mielina en la médula espinal luego de la lesión (ANOVA de dos vías, tratamiento $p = 0.63$, interacción $p = 0.94$, test post-hoc de Bonferroni; $n = 6$ PBS, $n = 7$ CD200-His). (C y D) Se analizó el efecto de la administración retrasada de CD200-His sobre la preservación de las vías motoras a través de la evaluación de potenciales motores evocados. Se estimuló a nivel de la corteza motora y se registró la (C) amplitud y (D) latencia de la respuesta en el músculo gastrocnemio. La administración a las 24 y 48 horas de CD200-His no tuvo un efecto significativo en la (C) amplitud de la respuesta en el músculo gastrocnemio (ANOVA de una vía seguida de la prueba

post hoc de Bonferroni), ni en la (D) latencia a la respuesta (ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Bonferroni), las cuales son indicadores de la funcionalidad de las fibras a nivel de la médula espinal, sugiriendo en conjunto que la administración retrasada de CD200-His no tiene efecto sobre la neuroprotección luego de una lesión de médula espinal.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la ventana temporal donde la administración de CD200-His tiene un efecto en la recuperación luego de una lesión de médula espinal es acotada a las etapas más agudas de la respuesta inflamatoria, probablemente teniendo un efecto si es administrada en las primeras horas luego de la lesión.

Objetivo específico 5: Desarrollo de nuevas proteínas recombinantes agonistas de CD200R1

Dado que la administración dentro del tejido medular representa una intervención sumamente invasiva, y más compleja desde el punto de vista terapéutico, nos planteamos el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas menos invasivas, así como también evaluar la posibilidad de desarrollar estrategias que no solo actúen a nivel de la médula espinal, sino que también a nivel sistémico. Con el fin de evaluar estas posibles vías de administración alternativas, nos planteamos el desarrollo de nuevas proteínas recombinantes que puedan ingresar al SNC cuando son administradas de manera exógena. Para ello, diseñamos una proteína recombinante denominada CD200-X, que consiste en un dominio de CD200, cuyo fin es unirse y activar al receptor CD200R1, y por otro dominio formado por un péptido de penetración celular.

Efecto in vitro de la proteína CD200-X sobre la activación de la vía de NF- κ B en la línea celular BV-2

Con el fin de evaluar el posible efecto de la proteína CD200-X previo al uso in vivo, utilizamos una línea celular microglial denominada BV-2⁴⁴⁶. Como fue mencionado previamente, la activación del receptor CD200R1 desencadena una cascada de señalización intracelular que culmina en la atenuación de la vía pro-inflamatoria NF- κ B. Por lo tanto, evaluamos si la proteína recombinante CD200-X tiene la capacidad de reducir la activación de esta vía *in vitro*. Con este

fin, utilizamos la línea celular BV-2, derivada de microglía de ratones C57BL/6, la cual fue modificada para expresar GFP como reportero de la activación de NF- κ B. Estos experimentos fueron realizados en conjunto con la Unidad de Biología Celular del Institut Pasteur de Montevideo, quienes realizaron los cultivos celulares y tratamiento de las células. La activación de la vía NF- κ B fue analizada por citometría de flujo luego de la incubación de estas células con LPS durante 24 horas, el cual promueve la estimulación de la vía de NF- κ B^{431,447-449}, en conjunto con diferentes concentraciones de la proteína recombinante CD200-X, bajo la hipótesis de que esta proteína al unirse al receptor CD200R1 promueve la atenuación de la activación generada por el LPS. Interesantemente, cuando se incubaron las células con la proteína CD200-X a diferentes concentraciones en ausencia de LPS, se observó una activación de la vía de NF- κ B, principalmente cuando se utiliza la proteína a concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pero no cuando se utiliza a 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (barras violetas en la Figura 51), sugiriendo el efecto contrario al esperado en ausencia de estímulo inflamatorio. Cuando agregamos el LPS en conjunto con el CD200-X a diferentes concentraciones, observamos que CD200-X no tuvo un efecto significativo en la activación de la vía NF- κ B (barras azules en la Figura 51). A modo de control, utilizamos la proteína recombinante disponible comercialmente CD200-Fc, la cual ha sido utilizada en numerosos estudios y ha demostrado tener un efecto dependiente de la activación de CD200R1^{110,155,442,450}. Al incubar las células con esta proteína en ausencia de LPS, a diferencia del CD200-X, no se observó un efecto en la activación de la vía de NF- κ B (barras rosadas en Figura 51). Sin embargo, cuando incubamos a las células con CD200-Fc en presencia de LPS, al igual que con CD200-X, no observamos un efecto significativo en la activación de NF- κ B.

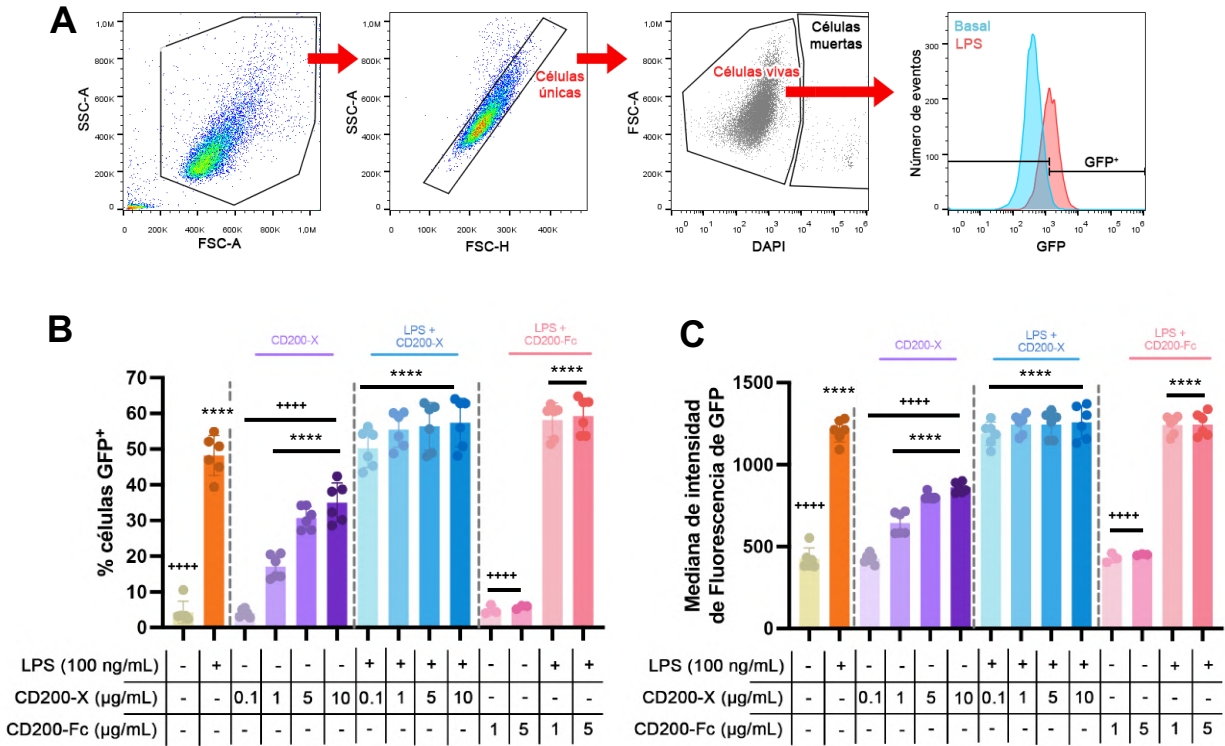


Figura 51. Efecto de CD200-X sobre la activación de la vía de NF-κB en cultivo de células de la línea BV-2. (A) Estrategia de selección de poblaciones por citometría de flujo de las células BV-2 positivas para GFP. Esta línea celular fue modificada para expresar GFP cuando se activa la vía de NF-κB. La población positiva se seleccionó a partir de la señal de las células vivas sin estimulación con LPS (basal). (B) Porcentaje de células GFP⁺ y (C) mediana de intensidad de fluorescencia para GFP, luego del tratamiento con LPS, CD200-X y/o CD200-Fc (control positivo). La primera y segunda barra corresponden a la situación basal y con estimulación con LPS (100 ng/mL), respectivamente. Las barras en violeta corresponden a la incubación de las células con concentraciones crecientes de CD200-X (0.1, 1, 5 y 10 µg/mL). Las barras azules corresponden a la co-incubación de LPS con CD200-X a concentraciones crecientes (igual a las detalladas previamente). En rosado, se muestra el resultado de la incubación de las células con CD200-Fc a 1 y 5 µg/mL sin y con LPS. El CD200-Fc fue utilizado a modo de control positivo ya que ha sido utilizado ampliamente en la literatura para activar a CD200R1. Se observa un aumento (ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Bonferroni, **p < 0.0001 vs. Basal; ****p < 0.0001 vs. LPS).**

Efecto in vitro de la proteína CD200-X sobre macrófagos derivados de la médula ósea

Luego, nos propusimos profundizar en el efecto *in vitro* de la proteína CD200-X y su efecto sobre la respuesta frente a LPS en macrófagos derivados de médula ósea. Para ello, tratamos macrófagos derivados de ratones *wt* y de ratones CD200R1-KO, con el fin de determinar si: 1) los efectos observados en las células BV2 podrían ser un artefacto de la utilización de una línea celular, y 2) si los posibles efectos de CD200-X sobre la activación de la vía de NF- κ B son a través de la interacción con CD200R1 o con otro componente celular. Evaluamos el efecto del tratamiento durante 24 horas de CD200-X a 1 y 5 μ g/mL sobre la expresión de TNF α , que es un producto de la activación de la vía NF- κ B⁴⁵¹ y su capacidad de regular la respuesta frente a LPS (Figura 52). En los ratones *wt*, el LPS generó un aumento significativo en la expresión de TNF α , mientras que el CD200-X (sin LPS) a ambas concentraciones no generó un aumento en la expresión respecto a la condición basal. A su vez, se observó que al co-incubar a los macrófagos *wt* con LPS y CD200-X, no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de TNF α con respecto a la condición con LPS únicamente. Estos resultados por un lado sugieren que CD200-X a las concentraciones de 1 y 5 μ g/mL no tiene un efecto significativo sobre la expresión de TNF α , tanto en presencia como en ausencia de un estímulo inflamatorio como es el LPS. Por otro lado, al observar la respuesta de los macrófagos provenientes de ratones *CD200R1-KO*, se observa un patrón muy similar. Interesantemente, a diferencia de lo observado con las células *wt*, al co-incubar con LPS y CD200-X a 1 y 5 μ g/mL se observó un aumento significativo en la expresión de TNF α en comparación con la condición con LPS únicamente. Estos resultados muestran un efecto contrario al esperado, ya que nuestra hipótesis era que CD200-X, al unirse a CD200R1, promovería una disminución en la expresión de TNF α . Sin embargo, estos macrófagos no expresan el receptor CD200R1, por lo que estos resultados sugieren un efecto de CD200-X independiente de CD200R1. Se deberá profundizar para determinar si estos efectos son debidos al componente X de la proteína recombinante, algún contaminante de su producción en células EXPI293F, o si se debe a la interacción de la proteína con otros receptores de la familia de CD200R o de otra familia de inmunorreceptores.

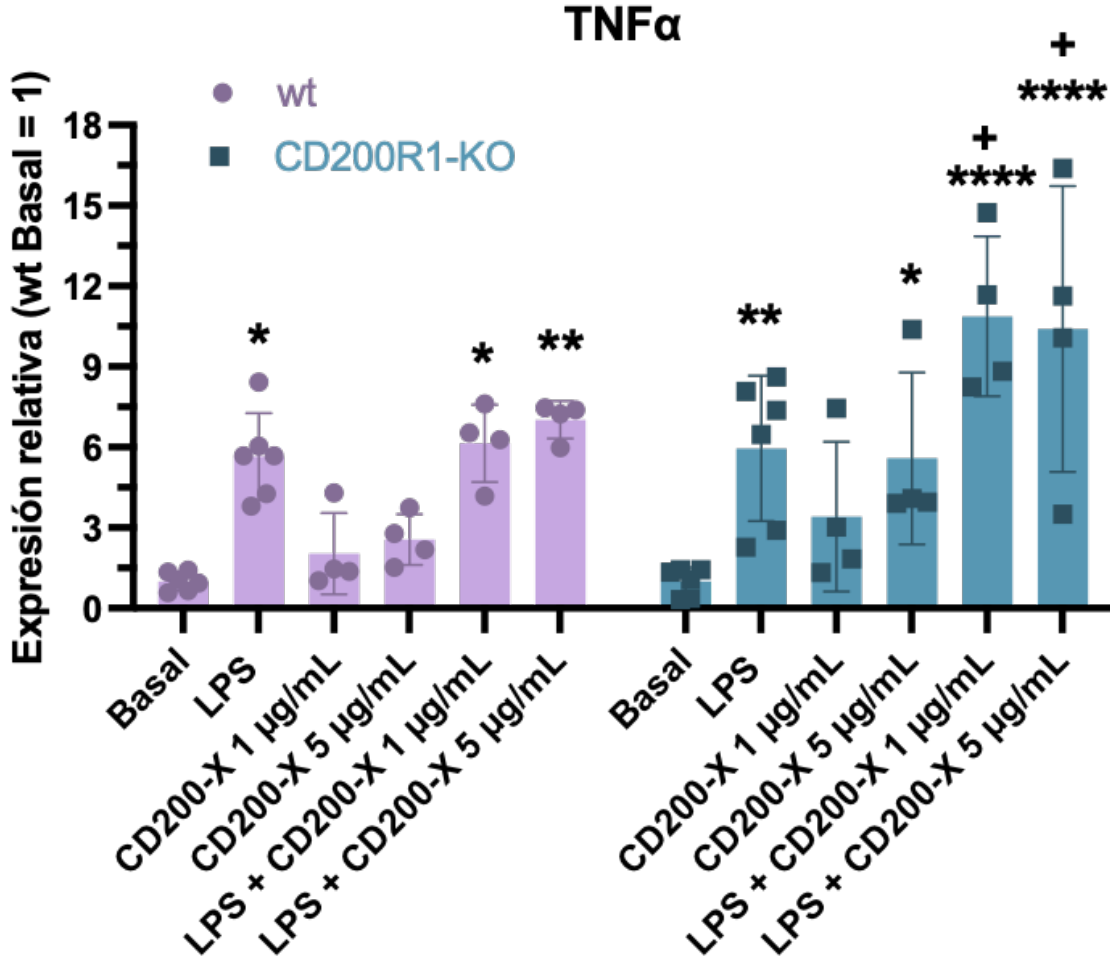


Figura 52. Expresión de TNF α en macrófagos derivados de médula ósea de ratones wt y CD200R1-KO, evaluada por PCR cuantitativa. La incubación de los macrófagos con LPS (100 ng/mL) promueve un aumento de la expresión de TNF α , tanto en las células wt como las que no expresan CD200R1. La proteína CD200-X a 1 μ g/mL (sin LPS) no promueve un aumento de la expresión de TNF α en los macrófagos wt y KO. Sin embargo, a una concentración de 5 μ g/mL se observó un aumento significativo de la expresión de TNF α en los macrófagos CD200R1-KO en ausencia de LPS, pero no en los macrófagos wt. Cuando se incubaron los macrófagos wt con LPS y CD200-X a 1 y 5 μ g/mL no se observaron diferencias en la expresión con respecto a la incubación sólo con LPS. Interesantemente, se observa un aumento significativo en la expresión de TNF α cuando se incubaron los macrófagos CD200R1-KO con LPS y CD200-X a 1 y 5 μ g/mL, en comparación con la incubación sólo con LPS (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.015$, interacción $p = 0.19$, test post-hoc de Bonferroni; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. Basal; + $p < 0.05$ vs. LPS).

Finalmente, evaluamos el impacto que genera CD200-X en la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de médula ósea, con el fin de explorar el efecto sobre esta función celular que es fundamental en el desarrollo de los procesos que ocurren luego de las lesiones al sistema nervioso. Para ello utilizamos BMDM de ratones *wt* y *CD200R1-KO* para determinar si el posible efecto a nivel de la fagocitosis de mielina-pHrodo es específico por la interacción de CD200-X con CD200R1 o si se debe por otros factores o interacciones con otros receptores (Figura 53). La incubación de los BMDM *wt* y *CD200R1 KO* con CD200-X a 5 µg/mL no tuvo un impacto en la mediana de intensidad de fluorescencia de pHrodo, lo que sugiere que en ausencia de un estímulo inflamatorio, a esta concentración no tiene un efecto significativo sobre esta función celular. Interesantemente, cuando incubamos estas células con CD200-X a 100 µg/mL en ausencia de LPS, observamos un evidente descenso en la presencia de mielina-pHrodo en los macrófagos derivados de ratones *wt* pero no en los ratones *CD200R1-KO*, lo que sugiere que a esta concentración la proteína recombinante promueve una disminución de la fagocitosis de mielina que es dependiente de la interacción con CD200R1. Al estimular las células con LPS e incubarlas con CD200-X, observamos que no tiene un efecto significativo sobre la capacidad de fagocitosis de mielina cuando comparamos con respecto a la condición donde incubamos únicamente con el estímulo de LPS, tanto en los BMDM *wt* como los *CD200R1-KO*. Sin embargo, cuando incubamos los BMDM *wt* con LPS y CD200-X a 100 µg/mL, observamos una menor presencia de pHrodo en estas células en comparación con la condición únicamente con LPS. Esto sugiere que CD200-X a esta concentración exacerba el efecto del LPS sobre la fagocitosis.

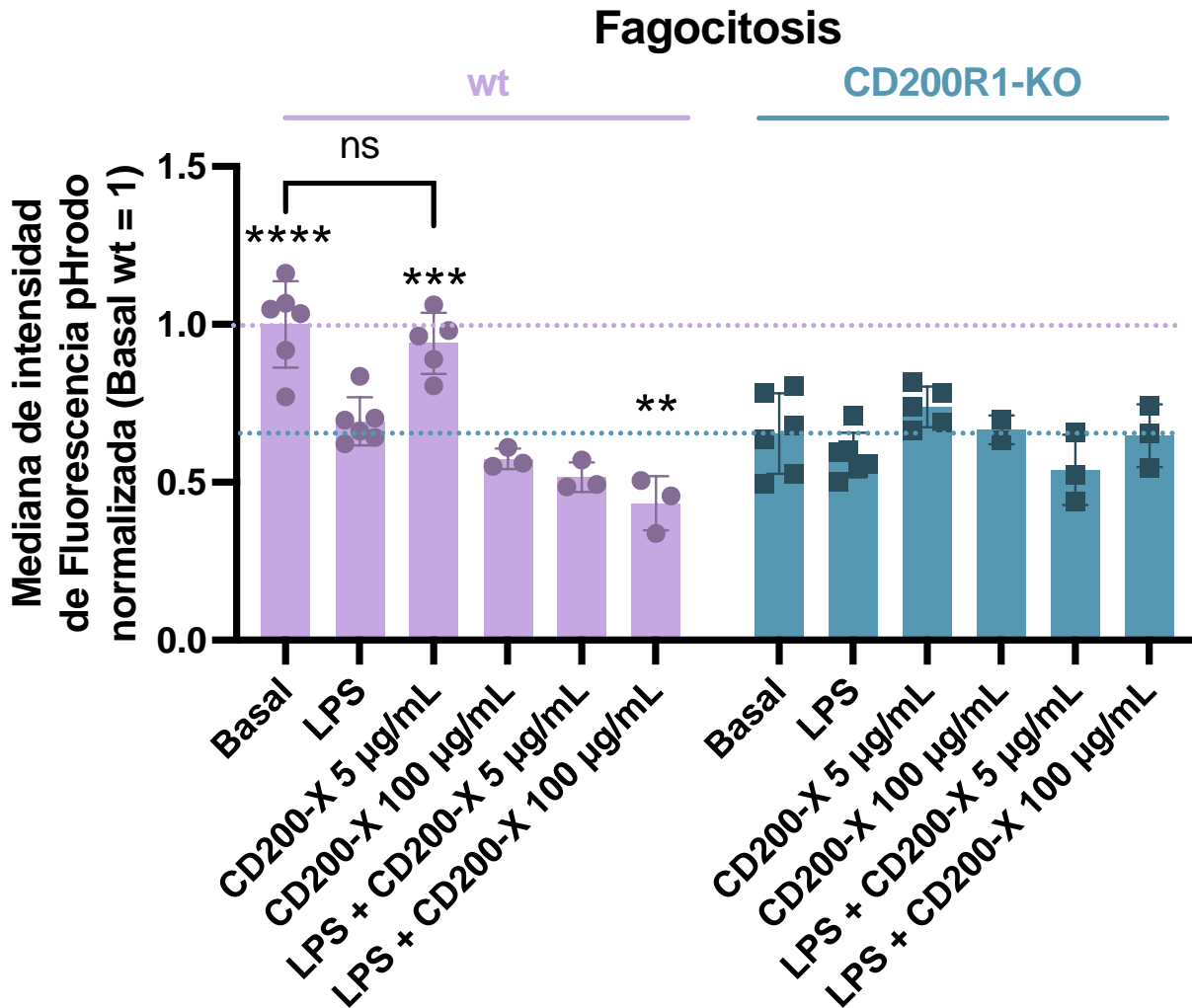


Figura 53. Impacto de CD200-X en fagocitosis de mielina-pHrodo por macrófagos derivados de médula ósea. Se comparó la fagocitosis de mielina pHrodo en macrófagos derivados de médula ósea en ratones wt y CD200R1. Las líneas punteadas violeta corresponde a los valores basales de la mediana de intensidad de fluorescencia para pHrodo en los BMDM wt (violeta) y CD200R1-KO (azul). El análisis estadístico demostró una reducción significativa de todas las condiciones en comparación con el basal wt (solo incubación con pHrodo durante 1 hora), salvo la condición de CD200-X a 5 µg/mL en los macrófagos wt (se muestra en el gráfico señalado, ns). Al comparar con la condición con LPS únicamente, se observó que en los ratones wt, el CD200-X a 100 µg/mL exacerba el efecto del LPS. (ANOVA de dos vías, genotipo $p = 0.06$, interacción $p < 0.0001$, test post-hoc de Bonferroni; ns: $p > 0.05$ vs. Basal de su genotipo; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. LPS de su genotipo).

Resumen de principales resultados del análisis de estrategias terapéuticas basadas en la activación de CD200R1

En primer lugar, evaluamos la ventana temporal sobre la cual podemos actuar administrando la proteína CD200-His, agonista de CD200R1, dentro de la médula espinal al momento de la lesión, con el fin de promover una mejora en la recuperación funcional. Sin embargo, observamos que la administración a las 24 o 48 horas después de una lesión de médula espinal no tuvo un efecto significativo en la recuperación de las funciones locomotoras, así como tampoco en la preservación de mielina y las vías motoras. Esto sugiere que la ventana temporal es bastante acotada, siendo menor a las 24 horas, aunque se debe profundizar en la posibilidad de comenzar el tratamiento en etapas más avanzadas aún, evaluando la administración a la semana, o inclusive hacia las dos semanas luego de la lesión.

Explorando vías alternativas de administración, diseñamos una proteína recombinante, CD200-X, que combina un dominio de CD200 para activar el receptor CD200R1 y un péptido de penetración celular. Sin embargo, cuando probamos CD200-X en células BV-2, observamos una activación inesperada de la vía NF- κ B en ausencia de LPS a ciertas concentraciones. Además, CD200-X no tuvo un impacto significativo en la activación de NF- κ B cuando se combinó con LPS. Debe sin embargo tenerse en cuenta que nuestro control positivo CD200-Fc tampoco indujo una disminución de la activación de la vía NF- κ B, por lo cual no podemos sacar conclusiones relacionadas con la capacidad de inhibir NF- κ B en estas condiciones y en este modelo experimental.

Luego, evaluamos CD200-X en macrófagos derivados de médula ósea y encontramos que, a altas concentraciones, provocó un aumento de la expresión de TNF α en macrófagos *CD200R1-KO* en respuesta al LPS, sugiriendo un efecto independiente de CD200R1. Además, CD200-X redujo la fagocitosis de mielina a altas concentraciones en macrófagos derivados de médula ósea de ratones wt, pero no en los *CD200R1-KO*.

DISCUSIÓN

La neuroinflamación abarca una serie de procesos complejos y dinámicos, que implican la activación de células y la liberación de moléculas inflamatorias, tanto dentro como fuera del sistema nervioso. Los procesos neuroinflamatorios ocurren tanto en el SNC como en el SNP, aunque existen algunas diferencias significativas en los mecanismos y las consecuencias de la inflamación en estos dos sistemas. En el SNC, la inflamación es iniciada principalmente por células gliales residentes, especialmente la microglía y los astrocitos, mientras que en el SNP, las principales células encargadas de desencadenar la respuesta inflamatoria son las células de Schwann, macrófagos residentes y fibroblastos. En términos de consecuencias, la inflamación en el SNC puede tener efectos más graves debido a la complejidad del sistema y su importancia crítica en la regulación de múltiples sistemas del organismo.

Aunque la neuroinflamación se ha asociado tradicionalmente con procesos patológicos, se ha demostrado que los procesos neuroinflamatorios también tienen un papel crucial en la regulación fisiológica del sistema nervioso, por lo tanto, la neuroinflamación puede tener efectos beneficiosos y perjudiciales. Por un lado, la inflamación puede ser una respuesta necesaria para reparar el tejido dañado y prevenir la propagación de infecciones. Por otro lado, una inflamación crónica puede causar daño a las células nerviosas y resultar en un deterioro cognitivo y motor.

Tanto este aspecto dual de los efectos beneficiosos y perjudiciales, así como también las diferencias y similitudes entre los procesos inflamatorios en el SNC y en el SNP, sugieren una alta complejidad de los procesos neuroinflamatorios. Esto, en conjunto con estudios previos y ensayos clínicos en los que se abordaron estrategias terapéuticas de atenuación del sistema inmune a nivel sistémico, indican que, en lugar de suprimir la respuesta inflamatoria en su totalidad, se deben buscar estrategias para modularla, manteniendo los efectos beneficiosos y reduciendo los efectos perjudiciales de ésta sobre los tejidos nerviosos. Por lo tanto, resulta relevante comprender en mayor profundidad los mecanismos que subyacen a los procesos neuroinflamatorios en diferentes contextos inflamatorios, tanto en el SNC como en el SNP, con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas de precisión.

Dentro de los mecanismos que subyacen a la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso, la interacción entre ligandos y los inmunoreceptores se han planteado como uno de los puntos

clave de la regulación. Una de estas interacciones es entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1. Ésta ha sido implicada como un importante regulador de los procesos inflamatorios en diversos contextos de inflamación, tanto en el sistema nervioso como en cáncer, infecciones virales, trasplantes, etc¹¹⁵. Por lo tanto, nos planteamos analizar los mecanismos que subyacen a la activación del receptor CD200R1 por su ligando en diferentes modelos murinos de inflamación. En primer lugar, analizamos el rol de esta interacción en un modelo de lesión traumática del sistema nervioso periférico que consiste en el aplastamiento del nervio ciático. En segundo lugar, analizamos el rol de esta interacción en el desarrollo de la respuesta inflamatoria local y periférica luego de una lesión traumática al sistema nervioso central, en particular luego de una contusión de médula espinal. Luego analizamos el impacto de esta interacción en el desarrollo de la neuroinflamación luego de una inflamación sistémica, generada por la administración intraperitoneal de lipopolisacárido, que consiste en un fuerte estimulante del sistema inmune. Finalmente, nos propusimos profundizar en el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas basadas en la activación del receptor CD200R1 que promuevan una mejora en la recuperación de las funciones luego de una lesión traumática a la médula espinal. Para ello, evaluamos la ventana terapéutica sobre la cual podemos actuar para lograr una mejora en la recuperación, así como también el desarrollo de nuevas proteínas recombinantes que permitan vías de administración poco invasivas y con relevancia clínica.

Lesión al SNP: rol de CD200-CD200R1 luego de una lesión de nervio ciático

Caracterización de la expresión de CD200 y CD200R1 en el nervio ciático sin lesionar y luego de una lesión traumática por aplastamiento

Con el fin de evidenciar en detalle los mecanismos que subyacen a la interacción entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1 en el proceso de neuroinflamación en el SNP, nos planteamos

caracterizar la expresión de ambas proteínas en el tejido nervioso en condiciones normales y la dinámica espacio-temporal luego de la lesión. Previamente, *Chang et al.* evidenciaron la presencia de CD200 en el nervio ciático de rata sin lesionar a través de inmunohistoquímica¹⁴⁷. Observaron la presencia de CD200 principalmente en el neurilema, los nodos de Ranvier y en las incisuras de Schmidt-Lanterman en las secciones longitudinales de nervio ciático de rata sin lesionar, siendo estas tres regiones diferentes dominios de la célula de Schwann. A su vez, evidenciaron una fuerte marca de CD200 en un nervio parasimpático, el cual consiste principalmente por axones amielínicos. En el presente trabajo, por medio de inmunofluorescencia evidenciamos la presencia de CD200 en las células de Schwann que forman la vaina de mielina en las fibras nerviosas del nervio ciático de ratón en condiciones normales, particularmente en los nodos de Ranvier y en las incisuras de Schmidt-Lanterman, confirmando lo observado por *Chang et al.*¹⁴⁷ en el nervio ciático de rata. La presencia de CD200 en las células de Schwann sugiere un rol importante de estas células como inmunoreguladores de la respuesta de las células mieloides en el tejido nervioso. Dado que los nodos de Ranvier son los lugares donde los axones se encuentran más expuestos, la mayor presencia de CD200 en estas regiones podría estar relacionada a la supresión de la acción de las células mieloides sobre los axones, manteniéndolos alejados de la posible acción detrimental de estas células del sistema inmune. Sin embargo, se deberá continuar con el análisis del rol de CD200 en las células de Schwann para poder dilucidar la función específica de CD200 en estos dominios celulares. Esto permitirá aportar al conocimiento de la regulación del sistema inmune por parte de las células de Schwann y por lo tanto, al entendimiento de las diferencias entre la regulación de las respuestas neuroinflamatorias entre el SNC y el SNP.

A su vez, por medio de inmunofluorescencia de secciones longitudinales de nervio ciático de ratón en condiciones normales, encontramos una intensa marca de CD200 en vasos sanguíneos. Esto coincide con lo reportado por *Cohen et al.*¹⁰⁸, en donde evidencian la presencia de CD200 en los vasos sanguíneos en el sistema nervioso central en condiciones normales, y donde sugieren su importancia en la regulación de la entrada de células del sistema inmune de la sangre hacia el tejido nervioso¹⁰⁸. Interesantemente, observamos que luego de la lesión por aplastamiento, la expresión de CD200 disminuye en el tejido, principalmente en los vasos sanguíneos, ya que se siguen observando las estructuras de los nodos de Ranvier como CD200⁺, mientras que desaparece la marca de CD200 en los vasos sanguíneos a las 24 horas post-lesión. Esta disminución de CD200 en los vasos sanguíneos puede estar relacionada con la entrada de células al tejido lesionado. Al ser considerado un receptor anti-inflamatorio, el CD200R1 al unirse

al CD200 en los vasos sanguíneos en condiciones normales podría evitar la entrada de células mieloides al tejido nervioso en ausencia de daño. Sin embargo, luego de la lesión es necesaria la entrada de células inflamatorias desde la sangre, por lo que la disminución de la expresión de CD200 por las células endoteliales sería uno de los factores permisivos para la entrada de células hacia el tejido lesionado, favoreciendo el desarrollo de la respuesta inflamatoria necesaria a nivel local. Como fue mencionado previamente, en el caso de las lesiones traumáticas al SNP, es necesario una respuesta inflamatoria rápida y eficiente, por lo que esta disminución de CD200 podría ser uno de los factores determinantes. Luego de una semana post-lesión ocurre una importante transición en la respuesta a nivel local, pasando de una respuesta pro-inflamatoria en la que se degrada y limpia el tejido, iniciando los programas de reparación del tejido¹³. La dinámica de expresión de CD200 que observamos concuerda con estos cambios importantes en la respuesta inflamatoria, ya que a los 7 dpl observamos un aumento en el tejido de vasos sanguíneos que expresan CD200. Este aumento de la presencia de CD200 en vasos sanguíneos sugiere que a partir de la semana post-lesión, el ingreso de células inflamatorias desde la sangre va disminuyendo progresivamente a medida que la respuesta inflamatoria cambia hacia una respuesta reparadora, así como también las células presentes en el tejido y las que ingresan también adquieren un fenotipo predominantemente reparador.

En este mismo contexto, analizamos la dinámica temporal de CD200R1 en las principales poblaciones de células inflamatorias en el tejido del nervio ciático de ratón luego de una lesión por aplastamiento. Hasta el momento de este estudio, no habían trabajos previos en los que se evalúe la expresión de CD200R1 en el nervio ciático y su rol luego de una lesión traumática. Contrario a lo que ocurre con CD200 y similar a los que ocurre con otros inmunoreceptores como Trem2⁴⁵² y CD300⁶⁹, la detección de CD200R1 por inmunofluorescencia en el tejido del nervio ciático presenta muchas complejidades, en parte por la baja expresión de este receptor en las células en condiciones normales. Por lo tanto, utilizamos estrategias que nos permitan evidenciar la presencia de CD200R1 a pesar de que ésta sea en muy bajos niveles. El análisis por PCR cuantitativa permitió evidenciar un rápido aumento de la expresión de CD200R1 en el tejido a las 24 horas post-lesión, que se mantiene inclusive hasta los 28 dpl. Esto se debe principalmente al ingreso de células desde la sangre que expresan CD200R1, como fue evidenciado por citometría de flujo del tejido de nervio ciático luego de la lesión. Observamos un rápido aumento en el número de macrófagos y neutrófilos en el tejido lesionado a las 24 horas, de los cuales un 60% de los macrófagos expresan CD200R1, mientras que tan solo un 10% de los neutrófilos son positivos para CD200R1. A su vez, observando el número de macrófagos y neutrófilos en el tejido

a las 24 horas se observa un número similar de estas dos poblaciones, sugiriendo en conjunto con el resultado previo de que el rápido aumento de CD200R1 en el nervio lesionado proviene principalmente de la población de macrófagos. En este estudio analizamos únicamente las poblaciones de macrófagos y neutrófilos ya que son las principales poblaciones celulares que han sido estudiadas en el contexto de la degeneración Walleriana y la respuesta inflamatoria luego de una lesión traumática en el SNP. Sin embargo, no podemos descartar el aporte de otras poblaciones celulares mieloides que pueden expresar CD200R1 y que ingresan al tejido lesionado como ser la población de mastocitos. A pesar de esto, el número de células de estas poblaciones mieloides que ingresan al nervio lesionado es mucho menor al de macrófagos y neutrófilos^{453,454}, por lo que se puede considerar que el mayor aporte de CD200R1 al tejido luego de la lesión proviene de estas dos poblaciones inflamatorias, principalmente por los macrófagos que ingresan desde la sangre. Este resultado se acentúa a medida que continúa la respuesta inflamatoria, donde podemos observar que el número de macrófagos en el nervio lesionado aumenta, alcanzando un máximo hacia los 5 dpl y disminuyendo hacia los 14 dpl, mientras que el número de neutrófilos en el nervio lesionado es muy bajo luego de las 24 horas post-lesión. Por lo tanto, considerando que el número de macrófagos en el tejido aumenta y que la proporción de macrófagos que expresan CD200R1 se mantiene relativamente constante, podemos observar un aumento neto de la presencia de CD200R1 en el nervio lesionado, como consecuencia de la entrada de macrófagos en el nervio. Resultados similares fueron reportados con otros inmunoreceptores, donde se observó un aumento del inmunoreceptor Trem2 en el nervio lesionado a partir de los 3 dpl, asociado a la entrada de macrófagos de fenotipo resolutivo al nervio hacia los estadíos más tardíos de la respuesta inflamatoria⁴⁵⁵. Análogamente, en un trabajo previo por nuestro grupo de investigación, reportamos una dinámica de expresión temporal del inmunoreceptor CD300f similar a lo observado con CD200R1⁸². En este estudio se observó un leve aumento de CD300f en el nervio a las 24 horas post-lesión, que luego alcanza un máximo hacia los 3 dpl y disminuyendo progresivamente hacia los 28 dpl. Estos trabajos en conjunto con los resultados observados para CD200R1, sugieren una acción en conjunto de los diferentes inmunoreceptores que se asocian a su vez con la entrada de células hacia el nervio lesionado. A pesar de esto, el efecto de la activación de estos inmunoreceptores es variado y cada uno de ellos cumple un rol diferente en el desarrollo de la respuesta inflamatoria asociada al proceso de degeneración Walleriana.

Estos resultados previos sugieren un rol de la interacción entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1 en el nervio luego de una lesión, principalmente por la interacción entre los macrófagos

que ingresan al tejido con los componentes en el tejido que expresan CD200, principalmente las células de Schwann y las células endoteliales en los vasos sanguíneos. Integrando los resultados sobre la dinámica temporal y espacial de CD200 y CD200R1 en el nervio lesionado, mientras que observamos un rápido descenso de la expresión del ligando CD200 a las 24 horas luego de la lesión, a la misma vez observamos un rápido aumento del receptor CD200R1 a causa del ingreso de macrófagos y neutrófilos al nervio lesionado. Interesantemente, observamos que cuando el número de macrófagos que expresan CD200R1 en el nervio lesionado es máximo (entre los 5 y 7 dpl), es cuando comienza a observarse un aumento de la expresión de CD200 en el nervio, que coincide con el cambio de la respuesta inflamatoria hacia el comienzo del proceso de reparación del tejido lesionado. Por lo tanto, este aumento de CD200 puede estar apoyando el cambio fenotípico de ese gran número de macrófagos en el tejido hacia un fenotipo reparador, así como también puede disminuir el número de células mieloides que ingresar desde la sangre para comenzar a atenuar esa respuesta pro-inflamatoria inicial necesaria para la limpieza del tejido.

Cabe destacar que esta dinámica temporal de la expresión de CD200 y CD200R1 en el tejido lesionado coincide con lo reportado por nuestro grupo luego de una lesión en el sistema nervioso central⁸⁹, en el cual observamos que luego de una contusión medular, la expresión de CD200 disminuye rápidamente en el tejido nervioso, mientras que la de CD200R1 aumenta debido a la entrada de células mieloides y de la proliferación de la microglía en el SNC. Sin embargo, luego de una lesión en el SNC, observamos que la expresión de CD200 se mantiene relativamente baja hasta tiempos más tardíos, inclusive hasta los 28 dpl, siendo mínima hacia los 14 dpl. Esto constituye una diferencia fundamental con lo observado luego de una lesión en el SNP y puede ser parte de los mecanismos que diferencian a los procesos de degeneración Walleriana entre el SNC y el SNP y que puedan aportar a una regeneración y recuperación ineficiente luego de una lesión en el SNC. El cambio fenotípico en las células hacia mecanismos reparadores es fundamental que ocurra tempranamente para evitar la muerte neuronal y favorecer el crecimiento axonal, por lo tanto, la falta de expresión de CD200 entorno a los 7 dpl puede contribuir a una falla en ese cambio fenotípico y por lo tanto, podría promover una prolongación de la respuesta pro-inflamatoria en el caso de las lesiones en el SNC. A su vez, este retraso en el aumento de expresión de CD200 en el tejido nervioso puede ocurrir debido a que en el SNC, la limpieza del tejido es ineficiente e incompleta, y por lo tanto no se promueve ese cambio en la respuesta inflamatoria hacia mecanismos de reparación. Se deberán realizar experimentos en esta línea para profundizar en la causa y en las consecuencias de estas diferencias de la expresión sobre

la respuesta inflamatoria, con el fin de dilucidar posibles estrategias que permitan lograr una limpieza y regeneración eficiente y completa en el SNC, al igual que lo que ocurre en el SNP.

Modulación de la interacción CD200-CD200R1 *in vivo* en el nervio ciático luego de una lesión

Considerando estos resultados previos, nos planteamos profundizar en el rol de esta interacción en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en el contexto de la degeneración Walleriana luego de una lesión traumática por aplastamiento en el nervio ciático de ratón. Para ello, nos planteamos modular esta interacción *in vivo*, con el fin de observar las consecuencias que ello conlleva luego de la lesión. En primer lugar, nos planteamos bloquear la interacción por medio de la administración de un anticuerpo bloqueante que se une a CD200R1 y evita la interacción con el ligando, sin provocar la activación de este receptor. Cuando observamos el efecto sobre la respuesta inflamatoria de bloquear al receptor de manera aguda al momento de la lesión, observamos que tiene un efecto principalmente en la respuesta inflamatoria aguda a las 24 horas post-lesión, ya que no observamos ningún efecto en los parámetros analizados de la respuesta inflamatoria a los 7 y 28 dpl. A pesar de que el bloqueo de CD200R1 no tuvo un efecto significativo en la expresión de las citoquinas analizadas en el nervio lesionado, se observó una tendencia hacia una menor expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IL-1 β y CCL2 luego del bloqueo de CD200R1. Al analizar las poblaciones celulares inflamatorias, las alteraciones por el bloqueo de CD200R1 se observaron principalmente en la población de macrófagos, que como ya fue evidenciado previamente, constituyen la principal población que expresa CD200R1 en el nervio lesionado. Interesantemente y contrario a lo que esperábamos, observamos un menor número de macrófagos en el nervio lesionado generado por el bloqueo de CD200R1, así como también una mayor proporción de macrófagos que expresan el marcador anti-inflamatorio CD206. A su vez, el bloqueo de CD200R1 generó una menor infiltración de neutrófilos en el tejido a las 24 horas post-lesión. En conjunto, estos resultados parecerían sugerir que el bloqueo de CD200R1 en los momentos agudos de la respuesta inflamatoria luego de una lesión traumática en el nervio ciático, podría favorecer un ambiente menos pro-inflamatorio. Se deberá profundizar en los mecanismos por los que esto ocurre, ya que en base a la estructura intracelular conocida

del receptor CD200R1 resulta difícil explicar los mecanismos por los cuales la activación del receptor pueda llevar a una señal pro-inflamatoria.

Investigaciones previas de nuestro grupo de investigación en los que se administró el anticuerpo bloqueante dentro del tejido de la médula espinal al momento de realizar una contusión, evidenciaron un efecto opuesto en la respuesta inflamatoria generada por este bloqueo de CD200R1 a nivel del SNC⁸⁹. En este trabajo observamos que el bloqueo de CD200R1 promueve un ambiente más pro-inflamatorio a nivel del SNC, a pesar de no tener un efecto en la infiltración de macrófagos y neutrófilos de manera aguda. Las diferencias con lo observado luego de una lesión en el SNP, evidencian la importancia de considerar el contexto inflamatorio y de los principales actores que llevan a cabo la respuesta inflamatoria. En el caso del bloqueo en el SNC, al administrar el anticuerpo bloqueante al momento de la lesión, probablemente se está actuando principalmente sobre la población de microglía residente y parte de la población de macrófagos y neutrófilos que ingresan rápidamente en el tejido lesionado. Por el contrario, luego de una lesión en el SNP, al estar ausente la microglía, cuando administramos el anticuerpo bloqueante al momento de la lesión, probablemente estemos actuando sobre las primeras células inflamatorias en ingresar al tejido lesionado. Esta diferencia en los tipos celulares que llevan a cabo la respuesta podría explicar, al menos en parte, los dos efectos opuestos observados por el bloqueo de CD200R1 luego de una lesión en el SNC y el SNP, lo que a su vez pone en evidencia que el rol de la interacción CD200-CD200R1 puede variar según el contexto en el cual participa.

Interesantemente, el bloqueo de CD200R1 en las etapas agudas de la respuesta inflamatoria tuvo un efecto en la recuperación funcional a partir de las 2 semanas después de la lesión. Al bloquear CD200R1 observamos una peor recuperación funcional del ciático, lo que sugiere que la activación de CD200R1, principalmente en las etapas iniciales luego de la lesión, tiene un rol fundamental en promover una respuesta inflamatoria y degeneración Walleriana normal y eficiente, que permita una recuperación completa de las funciones del nervio. A pesar de que los resultados previos observados sobre el efecto del bloqueo de CD200R1 sobre el desarrollo de la respuesta inflamatoria fueron contrarios a los esperados por la naturaleza de las señales intracelulares conocidas del receptor, permiten explicar, al menos en parte, este efecto observado sobre la recuperación funcional. Esto es debido a que como fue mencionado previamente en la introducción y a diferencia de lo que ocurre con el proceso de degeneración Walleriana en el SNC, luego de una lesión en el SNP es necesaria una respuesta inflamatoria rápida y eficiente que limpie el tejido de los restos de células muertas y dañadas para permitir

una rápida regeneración de ese tejido. Por lo tanto, como observamos una respuesta inflamatoria inicial atenuada a causa del bloqueo de CD200R1, podríamos sugerir que esta respuesta no es del todo eficiente y no permite un proceso de degeneración Walleriana normal, lo que conlleva a una peor recuperación funcional.

Sin embargo, cuando analizamos uno de los procesos fundamentales de la degeneración Walleriana, que es la limpieza de mielina en el nervio lesionado, no observamos diferencias significativas en la limpieza de mielina y acumulación de lípidos a causa del bloqueo de CD200R1, sugiriendo que son otros los mecanismos por los cuales se ve afectado el proceso de degeneración Walleriana luego del bloqueo de CD200R1. A su vez, cuando analizamos la regeneración de las fibras nerviosas, tampoco observamos un efecto significativo a causa del bloqueo de CD200R1. Por lo tanto, el deterioro en la recuperación funcional no se debería por un efecto sobre la limpieza de mielina, así como tampoco sobre la remielinización y regeneración de las fibras nerviosas. La diferencia en la recuperación funcional al bloquear CD200R1 puede deberse por lo tanto a mecanismos alternativos. Una posible explicación podría ser que estas fibras regeneradas pueden tener alteraciones funcionales en la conducción, lo cual explicaría en parte una peor recuperación funcional, a pesar de que estructural y cuantitativamente tengan la misma capacidad regenerativa. Para confirmar y profundizar en estos mecanismos, se deberá analizar la funcionalidad de estas fibras luego del bloqueo de CD200R1 con el fin de determinar si la incapacidad de una correcta conducción de estas fibras regeneradas puede explicar el deterioro en la recuperación funcional del nervio ciático luego de una lesión por aplastamiento.

Al administrar la proteína recombinante CD200-His, agonista del receptor CD200R1, dentro del nervio ciático al momento de la lesión, no observamos un efecto en la recuperación funcional evaluada hasta los 28 dpl. Utilizando el modelo experimental de lesión del nervio ciático por aplastamiento, resulta difícil observar posibles efectos positivos en la recuperación, ya que los animales de por sí solos alcanzan valores del índice funcional del ciático similares a los valores previos a la lesión, y por lo tanto esto puede ser la causa de la falta de efecto observada al administrar CD200-His. Se deberá utilizar otro modelo experimental de lesión más severo, como puede ser la lesión por corte del nervio ciático, para determinar si se puede observar un efecto de la administración del agonista. Por otro lado, resulta difícil explicarlo a través de la falta de acción de CD200-His sobre el receptor CD200R1, ya que como fue mencionado previamente, la administración de esta misma proteína en el tejido de médula espinal al momento de la lesión tuvo un efecto significativo sobre la recuperación de las funciones locomotoras, así como también

en el desarrollo de la respuesta inflamatoria⁸⁹. Por lo tanto, una posible explicación de la ausencia de efecto de CD200-His en la recuperación luego de una lesión de nervio ciático es que se requiera de una mayor concentración de la proteína para lograr un efecto significativo, ya que en el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración de una concentración única de esta proteína recombinante. Otro factor que puede estar influyendo es que a diferencia de lo que ocurre en el SNC, al administrar esta proteína al momento de la lesión en el nervio se está actuando sobre unas pocas células mieloides residentes que expresan el receptor CD200R1, a diferencia de lo que ocurre en el SNC que se está actuando sobre la población de microglía, así como también en las células que ingresan rápidamente luego de la lesión. Puede ocurrir que esta proteína esté presente por menos tiempo en el tejido, en comparación con el anticuerpo bloqueante de CD200R1 y por lo tanto, no llega a poder actuar sobre las células que ingresan al tejido. De la misma manera, puede ocurrir que el sistema CD200-CD200R1 ya esté saturado luego de la lesión de nervio ciático, es decir que ya todos los receptores CD200R1 están interactuando con el ligando CD200 de manera fisiológica, por lo que la administración de más ligando es en vano, al no poder unirse a receptores y desencadenar el efecto esperado. Se deberá evaluar la administración de diferentes concentraciones de CD200-His en la recuperación funcional, así como también profundizar en el efecto sobre la respuesta inflamatoria, la limpieza de mielina y la regeneración de las fibras nerviosas luego de una lesión.

Impacto de la ausencia de CD200R1 en la recuperación luego de una lesión de nervio ciático

Interesantemente y contrario a lo que esperábamos, no observamos una diferencia significativa en la recuperación evaluada por el índice funcional del ciático hasta los 28 dpl entre los ratones *CD200R1-KO* en comparación con los ratones que expresan normalmente CD200R1. En primer lugar, esperábamos observar una peor recuperación funcional de la misma manera que cuando bloqueamos al receptor de manera transitoria, ya que en estas condiciones experimentales, la activación de CD200R1 está ausente durante todo el transcurso de la degeneración Walleriana y la recuperación. Sin embargo, observamos que la ausencia de CD200R1 de manera constitutiva no tiene un efecto significativo en la recuperación funcional luego de una lesión de nervio ciático.

Esta diferencia entre lo observado con el bloqueo agudo de CD200R1, donde la falta de activación de CD200R1 ocurre de manera transitoria, en comparación con la ausencia de CD200R1 de manera constitutiva en el ratón *CD200R1-KO*, puede atribuirse a numerosas causas y se deberán realizar estudios en mayor profundidad para determinar en mayor detalle a qué se debe esta diferencia observada. Un efecto bien conocido con los ratones transgénicos es la compensación genética. Este mecanismo evolutivo ocurre cuando la función de un gen particular en una red se ve perturbada, alterando la expresión de otros genes dentro de la misma red con el fin de mantener el funcionamiento normal⁴⁵⁶. La compensación genética es beneficiosa para las mutaciones dañinas que ocurren naturalmente, permitiendo la supervivencia del organismo, pero es un gran obstáculo para el estudio de la función de los genes. Como es en nuestro caso, el efecto de la ausencia de CD200R1 puede verse opacada por la compensación genérica de otros inmunoreceptores u otros intermediarios en la vía de activación de CD200R1, que permitan mantener las funciones normales a pesar de la ausencia del receptor. Para confirmar esta hipótesis, se deberá analizar la expresión de otros inmunoreceptores, así como también analizar posibles efectos en la vía de señalización de CD200R1. Otra interesante alternativa es utilizar ratones transgénicos condicionales para CD200R1, permitiendo controlar el momento en el desarrollo en cual se deja de expresar el receptor. De esa manera, podemos alterar el sistema eliminando CD200R1 en la adultez y evitando los posibles mecanismos compensatorios que ocurren durante el desarrollo. En el presente trabajo, solamente analizamos uno de los factores en los que puede estar participando el receptor CD200R1, que es la recuperación de las funciones locomotoras luego de la lesión del nervio. Sin embargo, como observamos previamente, el rol de este receptor puede estar implicado en numerosos procesos de la degeneración Walleriana y la respuesta inflamatoria, que podrían estar siendo afectados sin llegar a tener un impacto en la recuperación funcional. Con este fin, se deberá analizar en mayor detalle el impacto de la ausencia de CD200R1 sobre la respuesta inflamatoria y la degeneración Walleriana, así como también en la regeneración luego de una lesión de nervio ciático.

Lesión al SNC: rol de CD200-CD200R1 luego de una lesión de médula espinal

Caracterización de la respuesta inflamatoria y fagocitosis luego de una lesión de médula espinal en ausencia de CD200R1

Estudios previos llevados a cabo por nuestro laboratorio evidenciaron un posible rol de la interacción CD200-CD200R1 en el desarrollo de los procesos fisiopatológicos que ocurren luego de una lesión traumática a la médula espinal⁸⁹. Teniendo en cuenta estos resultados, nos planteamos profundizar en los mecanismos que subyacen al rol de esta interacción en estos procesos, en particular en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, tanto a nivel local en la médula espinal, como a nivel de otros tejidos relevantes en esta respuesta. Con este fin, en primer lugar, nos planteamos evaluar la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal luego de una contusión en ratones normales y evaluar si la ausencia de expresión del receptor CD200R1 de manera constitutiva tiene un impacto sobre esta respuesta. Se analizó la dinámica temporal de las principales poblaciones celulares del sistema inmune que participan en la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal por citometría de flujo. Resulta interesante observar los patrones de cambio temporales de la presencia de las diferentes poblaciones celulares en el tejido de la médula espinal, ya que pueden brindar información acerca de sus posibles roles luego de una lesión. Al igual que lo que se ha reportado previamente^{403,457}, observamos un aumento progresivo en la población de microglía luego de la lesión, que alcanza un máximo a los 7 dpl. La población de neutrófilos alcanza el número máximo en el tejido a las 24 horas post-lesión y luego disminuye rápidamente⁴⁰³, permaneciendo una población de neutrófilos hasta los 180 dpl inclusive en el tejido, reducida en comparación con el pico de 24 horas pero mayor que en las condiciones previas a la lesión⁴⁵⁷. En cuanto a la población de macrófagos en la médula espinal lesionada, hay reportes que sugieren diferentes dinámicas temporales de esta población en el tejido por citometría de flujo, sugiriendo un pico a los 3 dpl⁴⁰³ o a los 7 dpl⁴⁵⁷. Nosotros observamos un máximo en el número de macrófagos en el tejido lesionado a los 7 dpl, coincidiendo con este último estudio. Interesantemente, en este estudio analizaron estas poblaciones durante tiempos más prolongados, llegando hasta los 180 días, donde observaron un segundo pico de macrófagos y microglía de mayor magnitud a los 60 dpl.

Esto sugiere que la complejidad de la dinámica temporal de las células del sistema inmune en la médula espinal lesionada puede ser más compleja que lo sugerido normalmente, ya que en la mayoría de los estudios, y como es el caso del presente trabajo, se analiza el desarrollo de los procesos que ocurren luego de la lesión hasta los 28 dpl.

Al analizar la población de microglía en los ratones deficientes de CD200R1, observamos que la ausencia del receptor no tiene efecto en la dinámica temporal de esta población hasta los 28 dpl en el tejido de médula espinal. Similarmente, en trabajos previos del grupo observamos que cuando administramos el anticuerpo bloqueante de CD200R1 directo en el tejido de la médula espinal al momento de la lesión, no observamos diferencias en el número de microglía en el sitio lesionado en los tiempos post-lesión analizados⁸⁹. Sin embargo, en un estudio previo realizado por *Ritzel et al.*⁴⁵⁸, observaron que en un modelo murino de isquemia cerebral, los ratones *CD200R1-KO* presentan un mayor número de microglía en el hemisferio isquémico a las 72 horas, evaluado por citometría de flujo. La dinámica espacio-temporal de la población de microglía en el sitio lesionado de la médula espinal depende de la proliferación de las células presentes localmente^{316,459}, así como también de la migración de células de la microglía de otras regiones del SNC hacia el sitio lesionado^{460,461}. Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados observados, es probable que CD200R1 tenga un rol dependiente del contexto inflamatorio, en la regulación de las diferentes funciones microgliales.

Previamente, observamos que cuando bloqueamos CD200R1 con el mismo anticuerpo luego de una lesión de médula espinal, se ve un mayor número de neutrófilos en el tejido nervioso a los 3 dpl⁸⁹. Por otro lado, observamos que los ratones *CD200R1-KO* presentan un menor número de neutrófilos en la médula espinal a los 3 dpl. Esta diferencia fundamental en los efectos sobre la población de neutrófilos cuando eliminamos de manera constitutiva la señalización por CD200R1 y cuando la bloqueamos de manera transitoria sugiere que la función del receptor en esta población es compleja y es fuertemente dependiente de la temporalidad de la señalización. Teniendo en cuenta que los neutrófilos actúan principalmente en las etapas agudas de la respuesta inflamatoria, ya que su número en el sitio lesionado disminuye rápidamente luego de las 24 horas post-lesión, el rol de los neutrófilos a partir de los 3 dpl no está del todo claro, y por lo tanto se deberá analizar en mayor detalle cuál puede ser el impacto de las diferencias observadas. La disminución en el número de neutrófilos en la médula espinal lesionada a los 3 dpl en los ratones *CD200R1-KO* sugiere que el mecanismo por el cual este receptor promueve la permanencia de los neutrófilos en el tejido lesionado puede ocurrir por tres posibles

mecanismos: 1) promueve la permanencia de los neutrófilos en el tejido por mayor tiempo, 2) favorece la sobrevivencia de los neutrófilos evitando la apoptosis de esta población o 3) promueve el reclutamiento de más neutrófilos al tejido lesionado a partir de las 24 horas post-lesión. A su vez, *Ritzel et al.*⁴⁵⁸ observaron por citometría de flujo que a los 3 días luego de un accidente cerebrovascular, no había diferencias en el número de neutrófilos entre los ratones *wt* y *CD200R1-KO* en el hemisferio cerebral isquémico luego de un accidente cerebrovascular⁴⁵⁸.

La ausencia de CD200R1 tuvo un efecto en la población de macrófagos en la médula espinal lesionada, principalmente en las etapas agudas de la respuesta inflamatoria, ya que por citometría de flujo se observaron diferencias significativas en esta población únicamente a las 24 horas post-lesión. El aumento del número de macrófagos en la médula espinal de ratones *CD200R1-KO* se vió acompañado por un aumento en la proporción de macrófagos que expresan el marcador pro-inflamatorio Ly6C, similar a lo observado por Ritzel 2019 en el modelo de isquemia cerebral sugiriendo que CD200R1 expresado en macrófagos promueve la atenuación de la respuesta inflamatoria en etapas agudas después de la lesión medular.

Un aspecto importante luego de una lesión medular es la limpieza de desechos celulares y mielina del lugar de la lesión, la cual no se da de forma tan eficiente como en el SNP, y este déficit se asocia a una peor recuperación funcional. Este proceso de limpieza es dependiente principalmente de la capacidad de fagocitosis de la microglía y los macrófagos presentes en el lugar de lesión. Hasta el momento muy pocos estudios habían analizado el rol de CD200R1 en la fagocitosis y en ninguno de los casos había sido estudiado en el contexto particular de la fagocitosis de mielina, sino que en el contexto de fagocitosis de placas de β -amiloide *in vitro*¹⁵⁶. Por lo tanto, nos planteamos analizar la fagocitosis de mielina tanto *in vitro* como *ex vivo*, en las principales poblaciones celulares encargadas de llevar a cabo este proceso luego de una lesión al SNC, es decir la microglía, los macrófagos y en menor medida los neutrófilos.

Para el análisis *in vitro*, evaluamos la fagocitosis de mielina en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Este modelo de cultivo celular presenta numerosas ventajas, entre ellas que es relativamente fácil de obtener y que se pueden extraer una gran cantidad de células a partir de un único ratón. Una de las estrategias experimentales utilizadas para evaluar la fagocitosis en los BMDM es la conjugación de diferentes componentes a fagocitar con la molécula pHrodo, la cual fluoresce en el medio ácido de los lisosomas. Esta estrategia ha sido utilizada para evaluar

la capacidad fagocítica de los BMDM de diferentes componentes, entre ellos de mielina⁴³⁹ y fragmentos de *E. coli*⁴⁶².

Observamos que los BMDM provenientes de ratones *CD200R1-KO* fagocitan menos mielina que los provenientes de ratones *wt*, lo que sugiere que la activación de CD200R1 favorece la fagocitosis de mielina. Los trabajos previos que analizaron el rol de la interacción de CD200 con CD200R1 en la fagocitosis de β -amiloide, reportaron que la microglía que se obtuvo de ratones a 1 día postnatal y que no expresan CD200, presentaron una mayor fagocitosis de β -amiloide¹⁵⁶. Sin embargo, hay varias características diferentes entre los estudios que pueden explicar las diferencias observadas. En primer lugar, este trabajo analiza la fagocitosis *in vitro* en microglía, por lo que pueden observarse diferencias importantes en esta función entre la población de microglía y de macrófagos. En segundo lugar, al realizar el cultivo celular de astrocitos y microglía que no expresan CD200, están eliminando el ligando natural para CD200R1, pero a su vez, CD200 puede unirse a otros miembros de la familia de CD200R, así como también a otros receptores como el receptor de factor de crecimiento de fibroblastos¹⁵². Por lo tanto, el efecto observado sobre la fagocitosis puede deberse a la activación de otros receptores y no de CD200R1 en particular, que fue lo que analizamos en el presente trabajo. Otra de las diferencias fundamentales en las características experimentales es el componente a fagocitar, ya sea β -amiloide o mielina, lo que puede generar que los diferentes componentes generen respuestas diferentes *in vitro*, y por lo tanto que tengan un impacto diferente sobre la fagocitosis. La ausencia de CD200R1 puede tener un impacto a nivel del fenotipo microglial diferente al generado en ausencia de CD200, pudiendo alterar varias funciones celulares, entre ellas la fagocitosis.

Luego, al analizar la fagocitosis cuando las células son co-estimuladas con LPS, observamos que los BMDM provenientes de ratones *wt* redujeron la fagocitosis de mielina, mientras que la fagocitosis de los macrófagos BMDM *CD200R1-KO* en ausencia o presencia de LPS fue la misma. Este interesante resultado, sugiere que la activación de CD200R1 podría ser un factor determinante en la regulación de la fagocitosis, frente a un estímulo inflamatorio como el LPS.

Teniendo esto en cuenta, nos propusimos analizar la fagocitosis de mielina frente a otro estímulo inflamatorio, como es el caso de una lesión de médula espinal. En estas condiciones, como fue planteado previamente en mayor detalle, los desencadenantes de la inflamación son diferentes y por lo tanto las respuestas a nivel celular también presentan sus diferencias. Nos planteamos a su vez, analizar la fagocitosis de mielina en diferentes poblaciones *in vivo* para evaluar esta

función en las células en su contexto normal dentro del organismo. Sin embargo, esto presenta numerosas dificultades y resulta difícil controlar los diferentes factores que afectan la fagocitosis, así como también su cuantificación. Basándonos en estudios anteriores⁴¹¹, nos planteamos analizar la fagocitosis *ex vivo*, por medio de la incubación de las células luego de la disgregación del tejido, con mielina-pHrodo. A pesar de que la fagocitosis ocurre fuera del organismo, las células no atraviesan el proceso de cultivo celular, por lo que presentan mayor similitud con las características que presentan dentro del organismo. Esto permite analizar la fagocitosis en las diferentes poblaciones celulares sin alterar en gran medida los fenotipos celulares. Analizamos la fagocitosis de mielina-pHrodo en las principales poblaciones del sistema inmune encargadas de llevar a cabo este proceso en el tejido de la médula espinal lesionada. Previamente se ha planteado que en las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria, la microglía es la principal encargada de fagocitar los restos del tejido dañado, mientras que hacia la semana post-lesión, esta función es asumida principalmente por los macrófagos infiltrantes³¹⁶. En nuestro caso, observamos una dinámica similar, ya que la fagocitosis de mielina por parte de la microglía disminuyó luego del día post-lesión, mientras que los macrófagos aumentan la capacidad fagocítica hacia la semana post-lesión, a pesar de que también presentaron una gran capacidad de fagocitosis a las 24 horas de la lesión. Interesantemente, no observamos cambios en la proporción de neutrófilos que fagocitan mielina en los tiempos post-lesión analizados. Se ha sugerido que los neutrófilos ingresan rápidamente al tejido dañado, donde fagocitan componentes dañados, producen citoquinas y quimioquinas para atraer células del sistema inmune al sitio de lesión y luego rápidamente disminuyen en número en el tejido lesionado, teniendo cada vez menos relevancia en los procesos que ocurren allí hacia tiempos más tardíos²⁰⁴. Por lo tanto, esperábamos observar una mayor fagocitosis de mielina por parte de los neutrófilos a las 24 horas post-lesión y luego una disminución, pero no observamos cambios hacia los 3 y 7 dpl, sugiriendo que mantienen esa capacidad fagocítica inclusive luego de las etapas agudas. Sin embargo, dado que hacia los 3 y 7 dpl se encuentran en un muy bajo número en la médula lesionada, su aporte hacia la fagocitosis de mielina dañada a esos tiempos puede ser considerada como insignificante.

Al examinar cómo la falta de CD200R1 en estas poblaciones celulares afecta la fagocitosis de mielina-pHrodo, no se apreciaron diferencias significativas en términos de microglía y neutrófilos en comparación con las poblaciones que sí lo expresan, lo que sugiere que el receptor CD200R1 no participa en la regulación de la fagocitosis de mielina en estos tipos celulares, por lo menos luego de un estímulo inflamatorio como es la lesión de médula espinal. A pesar de que no

observamos diferencias en la población de macrófagos *CD200R1-KO* y *wt* en la fagocitosis de mielina a 3 y 7 dpl, observamos que los macrófagos que no expresan CD200R1 presentan una menor fagocitosis de mielina-pHrodo a las 24 horas post-lesión. Este efecto de la ausencia de CD200R1 iría en la misma dirección que lo observado *in vitro* con los BMDM, ya que también se observó una disminución en los macrófagos *CD200R1-KO*. Sin embargo, considerando que las diferencias observadas únicamente a las 24 horas post-lesión de médula espinal, donde la fagocitosis no desempeña un papel sumamente relevante, es probable que CD200R1 no tenga un rol relevante sobre la regulación de este proceso, al menos en el contexto de la neuroinflamación asociada al daño a la médula espinal. En las etapas agudas de la lesión, el proceso de degradación de la mielina aún no ha comenzado completamente, sino que adquiere mayor importancia en los días subsiguientes. Por lo tanto, puede que el papel del receptor en este proceso sea limitado.

A pesar de lo observado previamente, estos resultados no son concluyentes en cuanto al rol de CD200R1 en el control de la fagocitosis. Esto ocurre en parte por las características de este estudio, ya que una posible explicación de la falta de efecto observada podría ser debido a que las células en el tejido ya se encuentran saturadas con mielina fagocitada hacia los tiempos más tardíos. Por lo tanto, su capacidad de fagocitar nueva mielina que estamos añadiendo artificialmente sea limitada a causa de esto, lo que no nos permite observar el efecto real de este receptor sobre la fagocitosis. Es por esto que se deberán hacer experimentos complementarios que abarquen esta problemática desde otro punto de vista, permitiendo disecar en mayor detalle el rol de CD200R1 en el control de la fagocitosis de mielina. Una posibilidad para profundizar en este aspecto es analizar la presencia de mielina directamente en las células en el tejido y de esa manera evaluar si las células están fagocitando en mayor o menor medida *in vivo* luego de la lesión.

El rol de CD200R1 en la recuperación funcional y neuroprotección luego de una lesión de médula espinal

Los trabajos previos de nuestro grupo revelaron que la modulación de la interacción CD200-CD200R1 tiene un impacto sobre la recuperación de funciones locomotoras luego de la lesión de médula espinal. Estos resultados sugirieron que la activación de CD200R1 en las células del

sistema inmune presentes en el sitio de la lesión puede constituir un mecanismo de regulación de la respuesta inflamatoria a nivel local, lo que promueve en última instancia una mejora en la recuperación funcional⁸⁹. Esto nos llevó a profundizar en mayor detalle el rol de CD200R1 en la recuperación funcional utilizando ratones que no expresan CD200R1 de manera constitutiva. Considerando las alteraciones en la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal que observamos previamente en los ratones *CD200R1-KO*, y que CD200R1 puede tener un rol en la fagocitosis de mielina, nuestra hipótesis inicial era que la ausencia del receptor iba a tener un impacto sobre la recuperación funcional luego de la lesión. Sin embargo, observamos que cuando la señalización generada por la activación del receptor se encuentra ausente de manera constitutiva, no se evidencia un efecto sobre la recuperación de las funciones locomotoras luego de la lesión de médula espinal evaluada por la escala de BMS hasta los 28 dpi. Este resultado difiere con los trabajos previos, donde observamos que al bloquear transitoriamente el receptor CD200R1 en el sitio de la lesión al momento de la lesión, la recuperación funcional se ve comprometida hasta los 28 dpi⁸⁹. En este sentido, esperábamos observar un fuerte impacto negativo en la recuperación funcional en los ratones *CD200R1-KO* ya que en lugar de ser transitoria la falta de señalización por parte del receptor, era mantenida en el tiempo, y por lo tanto que los efectos iban a ser más marcados aún.

Las razones por las cuales no vemos un efecto en los ratones *CD200R1-KO* pueden ser varias, entre ellas que el receptor no tenga un rol determinante en los procesos que determinan la severidad de la lesión, la pérdida de tejido nervioso y por lo tanto en la recuperación funcional. Sin embargo, esta posibilidad parece inviable, ya que previamente demostramos claramente como la modulación, tanto bloqueando como activando al receptor localmente, tiene un efecto en la recuperación funcional y por lo tanto evidenciando un claro rol de este receptor en los procesos que siguen a una lesión de médula espinal. Esto nos inclina a atribuir la falta de efecto a alguna de las variables del modelo experimental utilizado. En primer lugar, el dispositivo utilizado para realizar la lesión no fue el mismo en ambas condiciones. En el trabajo previo donde se administró el anticuerpo bloqueante, se utilizó un dispositivo diseñado específicamente para realizar lesiones de médula espinal, que permite controlar finamente los parámetros de la lesión como la fuerza de impacto y la distancia de desplazamiento de la médula. Las lesiones realizadas a los ratones *CD200R1-KO* fueron realizadas por un dispositivo que originalmente fue utilizado para realizar traumas encefálicos, que fue adaptado para realizar lesiones de médula espinal. Este dispositivo permite también controlar diferentes parámetros de la lesión, pero no la fuerza con la que golpea el pistón. Sin embargo, estos parámetros fueron optimizados para generar

lesiones similares a las realizadas con el otro dispositivo, que se evidencia por las curvas similares de recuperación evaluadas por el BMS. Las otras variables relacionadas con la lesión en sí misma fueron iguales, ya que el segmento de la médula espinal sobre la cual se realizó la lesión es la misma (a la altura de la 11^a vértebra torácica) y todos los tratamientos post-operatorios fueron los mismos. Por lo tanto, no podemos descartar que la falta de efecto observada por la falta de CD200R1 en la recuperación funcional sea debido a que el dispositivo utilizado genere lesiones que no nos permitan ver modificaciones a nivel de la recuperación. Para poder determinar si esta es la causa, se deberían realizar las lesiones de médula espinal en el dispositivo utilizado previamente, el cual permitiría realizar lesiones en las mismas condiciones controladas.

Otra posibilidad por la cual no vemos diferencias en la recuperación funcional entre los ratones *CD200R1-KO* y los *wt* que sí expresan CD200R1, es debido a mecanismos compensatorios que son inherentes a los modelos murinos transgénicos, los cuales tienen la expresión alterada de manera constitutiva. Las perturbaciones genéticas desempeñan un papel importante en la evolución, sin embargo, los organismos requieren sistemas amortiguadores para asegurar resultados de desarrollo similares a pesar de las diferencias menores en la composición genética o las condiciones ambientales, un proceso conocido como robustez. Esto genera mecanismos de compensación genética en respuesta a una eliminación de gen, que ha sido documentada en varias ocasiones y en diversos organismos modelo⁴⁶³. Esta compensación genética es un mecanismo a través del cual un organismo vivo puede mantener su viabilidad a pesar de las variaciones genéticas. Por lo tanto, en este caso, debido a que estos ratones no expresan CD200R1 desde el inicio, pueden estar ocurriendo mecanismos compensatorios que mitiguen el impacto de la ausencia del receptor. Contradiendo esta hipótesis se encuentran los resultados detallados previamente, donde evidenciamos alteraciones a nivel de la respuesta inflamatoria y en la fagocitosis frente a la falta de CD200R1. Sin embargo, los mecanismos compensatorios a pesar de no ser tan evidentes en procesos a menor escala, puede estar ocurriendo que esta compensación esté actuando a mayor escala, asegurando la robustez a nivel sistémico y no tanto a nivel de procesos específicos. Esto quiere decir que a pesar de que observemos diferencias a nivel de la respuesta local, los mecanismos compensatorios están asegurando que la alteración genética no tenga un efecto a nivel de los efectos globales luego de una lesión de médula espinal.

Generalmente una mejor o peor recuperación funcional luego de una lesión de médula espinal se asocia con una mayor o menor preservación del tejido nervioso, respectivamente. Para

confirmar a nivel histológico los resultados observados en cuanto a la recuperación funcional analizamos la preservación de mielina en ausencia de CD200R1. Como era de esperarse, observamos que los ratones *CD200R1-KO* no presentan diferencias en el área de mielina en comparación con los ratones que expresan el receptor. Es decir, que la ausencia de CD200R1 parece no tener un efecto sobre la neuroprotección. Sin embargo, esto también puede ser efecto de los mismos problemas que fueron detallados previamente para el análisis de la recuperación funcional.

Impacto a nivel sistémico de la ausencia de CD200R1 luego de una lesión de médula espinal

Estos resultados inesperados nos llevaron a querer profundizar en posibles alteraciones a nivel sistémico, por fuera de lo que ocurre a nivel del SNC, con el fin de explicar lo observado en cuanto a la recuperación funcional y neuroprotección. Apoyando esta noción de alteraciones a nivel sistémico a causa de la falta de CD200R1, observamos que los ratones que no expresan el receptor tienen una mayor pérdida de peso corporal luego de la lesión. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía, en donde observaron una mayor pérdida de peso en los ratones *CD200R1-KO* en un modelo murino de accidente cerebrovascular⁴⁵⁸. La pérdida de peso corporal es una consecuencia de las lesiones de médula espinal, tanto en humanos^{464,465} como en modelos murinos⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁸. Esta pérdida de peso se ha atribuido a una variedad de causas posibles, principalmente a la falta de ejercicio provocada por la parálisis, cambios en la homeostasis global, una alta demanda metabólica debido a la regeneración de los tejidos y factores psicológicos^{464,467}. Uno de los estudios demostró que los ratones con lesión de médula espinal tienen un mayor consumo calórico que los controles sin lesión, por lo que se ha planteado que la pérdida de peso no se debe a una menor ingesta de alimento⁴⁶⁷.

Siguiendo en la línea de investigar alteraciones a nivel sistémico, nos planteamos analizar diferentes parámetros sanguíneos, en particular el número de leucocitos en sangre. La gran parte de las células que ingresan a la médula lesionada ingresan desde la sangre, mientras que en menor medida desde el líquido cefalorraquídeo⁴⁶⁹. Además, la circulación sanguínea es de gran importancia en la respuesta inflamatoria en el sitio lesionado ya que transporta muchas de las señales humorales necesarias para la comunicación de las señales de inflamación y otras

señales relevantes entre los diferentes órganos involucrados. La sangre actúa como un nexo entre los órganos del sistema inmune y el SNC, teniendo un rol fundamental en el proceso. Esto despierta un interés en analizar diferentes parámetros sanguíneos con el fin de evidenciar posibles alteraciones en la comunicación entre estos órganos relevantes en la respuesta inmune y el sitio lesionado en el SNC.

Otro de los órganos que tiene gran relevancia en el desarrollo de la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal es el bazo, como fue detallado previamente. Por lo tanto, considerando que el bazo es el órgano que tiene la más alta expresión de CD200R1, resulta interesante analizar las alteraciones en este órgano luego de una lesión de médula espinal cuando el receptor está ausente. A su vez, considerando que se ha planteado que gran parte de los macrófagos que ingresan a la médula espinal en las etapas agudas de la lesión provienen del bazo³³², y teniendo en cuenta que observamos diferencias en la población de macrófagos a nivel de la médula espinal luego de la lesión, nos propusimos analizar si estas alteraciones tienen una correlación con cambios a nivel del bazo. Una de las alteraciones más evidentes fue el resultado de evaluar el peso del bazo en condiciones normales y luego de la lesión. El menor peso del bazo observado en los ratones *CD200R1-KO* en condiciones normales y luego de una laminectomía control, en comparación con los ratones *wt*, resulta sorprendente, ya que al analizar por citometría de flujo no encontramos diferencias en el número de las principales células mieloides y linfoides a nivel del bazo en condiciones naïve.

Luego de una lesión, ocurre una atrofia del bazo en los ratones *wt* y *CD200R1-KO*, principalmente a causa de la apoptosis y migración de células hacia la circulación sanguínea^{331,347,470,471}, volviendo al peso normal del bazo ya a los 14 dpl y manteniéndose hasta los 28 dpl. A diferencia de lo observado en condiciones normales y en la laminectomía control, el peso del bazo de los ratones *CD200R1* en las etapas agudas después de la lesión es similar al de los ratones *wt*. En esta misma dirección, no evidenciamos diferencias en el número de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos en las etapas iniciales de la respuesta frente a la lesión entre los ratones *CD200R1-KO* y *wt*. Sin embargo, hacia las dos semanas luego de la lesión, cuando el peso del bazo vuelve a los valores normales, sí observamos un menor número de macrófagos y neutrófilos a nivel del bazo en ausencia de *CD200R1*. A pesar de que a su vez observamos un leve aumento en el número de linfocitos B en los ratones *CD200R1-KO*, esto no nos permite explicar la diferencia observada a nivel del peso del bazo, donde vemos que hacia los 28 dpl vuelve a observarse un menor peso del bazo en los ratones *CD200R1-KO*.

Estas observaciones por un lado sugieren que hay otros factores que influyen sobre el peso del bazo además del número de células mieloides y linfoides en el tejido. Entre estos factores, el número de eritrocitos en este órgano es considerablemente alto y puede tener un fuerte impacto sobre el peso del bazo y puede ser uno de los factores que no se están analizando en este estudio y que son determinantes de las diferencias observadas. Por otro lado, estos resultados sugieren que la respuesta del bazo en los ratones *CD200R1-KO* no es normal, ya que tanto los cambios observados a nivel peso del órgano, como en el número de las poblaciones celulares luego de la lesión presentan un comportamiento diferente al de los ratones *wt*.

Una de las posibles alteraciones presentes en el bazo a causa de la ausencia de *CD200R1* podría corresponder a un desbalance en los mecanismos del reflejo colinérgico anti-inflamatorio, el cual comparte varios componentes fundamentales de la señalización intracelular sobre las células del sistema inmune. Como una primera aproximación para abordar esta posibilidad evaluamos el área ocupada por las fibras noradrenérgicas que llevan la información desde el sistema nervioso hacia el bazo, y podrían verse afectadas por la ausencia de *CD200R1*. A pesar de que no observamos diferencias significativas en la inervación noradrenérgicas a nivel del bazo en los ratones *CD200R1-KO* y *wt* a 1 y 15 dpl, no podemos descartar que este mecanismo de comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso se vea afectado por la falta del receptor. Al analizar únicamente el área ocupada por las fibras noradrenérgicas en el tejido, no estamos evaluando la funcionalidad de estas fibras y la capacidad de liberar noradrenalina, así como tampoco la presencia de receptores en los linfocitos T que responden a la activación de estas fibras. Además de estos componentes del reflejo que pueden afectar la actividad de este mecanismo, puede haber otros procesos afectados por la falta de *CD200R1* que no estamos analizando, como puede ser la respuesta de los macrófagos en este mecanismo reflejo, pudiendo tener un efecto sobre la actividad de la vía de NF- κ B a nivel de estas y otras células del sistema inmune presentes en el bazo. Por lo tanto, para poder analizar en profundidad el impacto de la ausencia de *CD200R1* en el reflejo colinérgico anti-inflamatorio, se debe profundizar en varios aspectos relacionados a este mecanismo que no fueron analizados en el presente trabajo.

Inflamación sistémica: rol de CD200-CD200R1 en la neuroinflamación luego de la administración de LPS

Alteraciones comportamentales y microgliales en ausencia de CD200R1

Una de las alteraciones más evidentes generadas por la respuesta inflamatoria sistémica a causa del LPS es el comportamiento de enfermedad, que tiene un impacto en numerosas funciones corporales y comportamentales, las cuales tienen una fuerte base en los procesos neuroinflamatorios que ocurren a nivel del SNC. Dentro de las alteraciones comportamentales más notorias se encuentra una disminución en la exploración y locomoción espontánea, que puede deberse a la redistribución de los recursos que ocurre en el curso de la inflamación para lograr combatir al patógeno y restaurar la homeostasis^{443,444}. Considerando que observamos que luego de la administración de LPS los ratones CD200R1 recorren una distancia menor en el test de campo abierto, podemos sugerir que la ausencia del receptor exacerba esta respuesta fisiológica.

Esta exacerbación puede tener una base en una neuroinflamación a nivel del SNC, por lo que posteriormente exploramos esta posibilidad, analizando la respuesta al LPS en la principal población celular encargada de desarrollar esta respuesta en el SNC: la microglía. La corteza cerebral es una de las regiones del SNC que presenta cambios en el número de microglía frente a la administración de LPS, y esta alteración resulta relevante en determinar el comportamiento de enfermedad⁴⁴⁵. Al analizar el número de microglía en la corteza cerebral en condiciones normales, observamos que el número de células es similar entre los ratones *CD200R1-KO* y *wt*. Esto concuerda con lo reportado previamente, donde se observó que en condiciones normales, la ausencia de CD200R1 no tiene un impacto sobre el número de microglía a nivel del cerebro⁴⁵⁸.

Luego de la administración de LPS, observamos un aumento significativo en el número de microglía en los ratones *CD200R1-KO* en comparación con el número de estas células en la corteza cerebral de los ratones *wt*. En esta misma dirección, el trabajo de *Ritzel et al.*⁴⁵⁸, utilizando

un modelo de accidente cerebrovascular, reportaron un aumento en el número de microglía luego del evento isquémico, lo cual también concuerda con lo observado en nuestro modelo de inflamación sistémica. En el modelo de accidente cerebrovascular ocurre una importante infiltración de células inmunes hacia el tejido nervioso, por lo que representa una diferencia fundamental entre los dos contextos de inflamación entre ambos trabajos. En conjunto, estas observaciones sugieren un relevante rol de CD200R1 en el control de la población microglial, que en principio sería independiente de la influencia de células del sistema inmune, al menos de manera directa como ocurre en luego de un accidente cerebrovascular. Este rol regulador de la microgliosis de CD200R1 también se ha evidenciado en otros modelos experimentales de neuroinflamación, como es el caso de la encefalomiелitis autoinmune experimental, donde se observó una microgliosis exacerbada en ausencia de CD200¹¹⁹.

Análisis transcripcional del cerebro de ratones *CD200R1-KO* y *wt*

A pesar de que el análisis de la secuenciación de ARN obtenido de cerebro de ratones *CD200R1-KO* y *wt* aún sigue en curso y todavía queda mucho por profundizar, se mostraron los resultados preliminares de este análisis, donde evidenciamos que la ausencia de CD200R1 promueve un perfil de expresión a nivel del cerebro diferente al de los ratones *wt*. Observamos la separación de los perfiles de expresión con el análisis de componentes principales tanto si se consideran los genotipos *wt* y *CD200R1-KO*, como los diferentes tratamientos (LPS o vehículo control) apuntando a la buena calidad de los datos obtenidos. Cabe destacar que existe una mayor dispersión de las muestras tratadas con LPS, pero este fenómeno lo hemos encontrado en otros trabajos previos con otros inmunorreceptores⁶⁸.

Las pruebas estadísticas indicaron que la ausencia de CD200R1 genera cambios de expresión en más de 250 genes. Dentro de los genes con cambios significativos se destacan: *Myo7a*, *Ccl21b*, *Ccl21d*, *Ccl21a*, *Trim12a*, *Or10ad1*, *Zfp990*, *Eno1b*, *Slc5a5* y *Tnfrsf8*. Algunos de estos genes se asocian con la respuesta inflamatoria, mientras que otros están relacionados con otros procesos biológicos. Cuando realizamos los análisis de sobrerrepresentación, tanto de términos de GO como de KEGG, observamos que, como era de esperarse, la expresión de los genes de regulación de la vía de NF-κB se ven alterados en ausencia de CD200R1. Esto concuerda con lo reportado extensamente en la bibliografía en cuanto al rol de CD200R1 en el control de esta vía celular como uno de los mecanismos por los cuales el receptor tiene su actividad atenuadora

de la inflamación. A la vez, se evidenciaron otras vías alteradas debido a la ausencia de CD200R1, relacionadas al control de la migración de leucocitos y de la actividad de citoquinas y quimioquinas a nivel intracelular. Se deberá profundizar en cuáles son los genes de estas vías que se ven alterados a causa de la ausencia del receptor, con el fin de disecar en mayor detalle los mecanismos por los cuales CD200R1 participa en la regulación de la inflamación en el SNC. A su vez, debido a que se evidenciaron otras vías alteradas relacionadas con otros procesos biológicos, como la extravasación y migración de leucocitos, el posterior análisis sobre estos otros procesos puede brindar información fundamental sobre el rol de CD200R1 en la regulación de múltiples funciones biológicas. Este análisis nos facilitará plantearnos nuevas líneas de investigación que exploren el potencial de CD200R1 como regulador de múltiples procesos biológicos a nivel del SNC y posiblemente a nivel de todo el organismo.

Este estudio continúa en proceso, en el que estamos avanzando en el efecto de la ausencia de CD200R1 en la expresión de genes de otros inmunorreceptores, lo que nos permitirá explorar sobre posibles mecanismos compensatorios de otros receptores frente a la ausencia de CD200R1. A su vez, se realizará el análisis de genes asociados a los fenotipos microgliales (por ejemplo de la "*Disease Associated Microglia*" o *DAM*²⁸⁰), con el fin de determinar si la ausencia del receptor promueve un cambio, ya sea en condiciones normales como luego de un estímulo inflamatorio, que puedan ayudar a la comprensión de los posibles efectos sobre la neuroinflamación de la ausencia de CD200R1.

La respuesta del bazo y de las células de la sangre frente a LPS se ve alterada en ausencia de CD200R1

Considerando que la neuroinflamación luego de la administración sistémica de LPS es el producto de la comunicación entre el sistema inmune a nivel periférico con el SNC, nos planteamos analizar algunos de los actores relevantes en el desarrollo de la respuesta frente a LPS a nivel del organismo, para evaluar si las alteraciones a nivel central tienen una asociación con las alteraciones a nivel periférico. El bazo es uno de los principales actores en la respuesta a LPS debido a su rol en el filtrado de la sangre y en la coordinación de las respuestas inmunes frente a patógenos y señales de daño tisular. Se ha descrito un aumento del tamaño y peso del bazo luego de la estimulación con LPS, principalmente a causa de un aumento el número de células por proliferación o migración desde otros órganos y también por la acumulación de eritrocitos^{398,401}. En los ratones que sí expresan CD200R1 (*wt*), observamos una esplenomegalia muy tempranamente a las 16 horas luego de la administración, que se mantuvo hasta las 24 horas, tanto en machos como en hembras. Interesantemente, el peso del bazo de los ratones que no expresan CD200R1 se mantuvo inalterado luego de la estimulación con LPS. Este sorprendente resultado evidencia claramente un rol de CD200R1 en el desarrollo de la respuesta inflamatoria a nivel del bazo frente al LPS, ya que al estar ausente el receptor, no responde de la misma manera.

Nos propusimos profundizar en la causa de esta alteración a nivel del bazo, evaluando si el peso reducido del bazo luego de la administración con LPS se asocia con un menor número de células inmunes en el órgano. Sorprendentemente, a las 24 horas luego de la administración de LPS, los ratones CD200R1 presentaron un mayor número de macrófagos, neutrófilos y eosinófilos en el bazo en comparación con los ratones *wt*, lo cual tendería a un aumento en el peso del bazo debido a un mayor número de células. Esta mayor presencia de estas poblaciones celulares, que tienen un rol fundamental en el desarrollo de las respuestas inflamatorias, podría estar indicando una exacerbación de la respuesta a nivel del bazo, que podría ser la base de alteraciones a nivel sistémico. Tampoco se observó alteraciones a nivel del número de linfocitos B o T. Estos resultados no nos permiten explicar la ausencia de esplenomegalia en los ratones *CD200R1-KO* frente al LPS, por lo que estas se deben alteraciones podrían estar relacionada a otros factores, por ejemplo a una menor acumulación de eritrocitos. Se debe profundizar en mayor detalle los mecanismos que subyacen a estas interesantes alteraciones observadas en el bazo en ausencia

de CD200R1, ya que pueden proporcionar información valiosa sobre la interacción entre el ligando CD200 y el receptor CD200R1 en el contexto de la regulación de las respuestas inmunitarias. Además, es crucial explorar cómo estos cambios en el número y tipo de células inmunes podrían influir en la dinámica de la respuesta inflamatoria y en la homeostasis del bazo. Un enfoque integral en la identificación de los factores específicos que contribuyen a las alteraciones de este órgano en ausencia de CD200R1 permitirá un mejor entendimiento de la complejidad de la comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso, que potencialmente abrirá nuevas perspectivas en la modulación de estas respuestas para abordar diversas condiciones neuroinflamatorias patológicas.

La circulación sanguínea es uno de los principales componentes que actúan como nexo entre los órganos donde se coordinan las respuestas inflamatorias a nivel periférico y el SNC. Por lo tanto, es uno de los actores principales en la comunicación entre el sistema nervioso y el sistema inmune. Nos planteamos analizar diferentes parámetros sanguíneos para vincular lo observado a nivel del SNC con las alteraciones observadas a nivel del bazo. El número de leucocitos en sangre se vió aumentado en los ratones CD200R1 a las 24 horas luego de la administración de LPS, principalmente debido a un aumento de monocitos y neutrófilos. Esto concuerda con el aumento en macrófagos y neutrófilos a nivel del bazo en los ratones *CD200R1-KO* a las 24 horas de la administración de LPS. Inclusive, a pesar de no generar cambios grandes en los niveles de citoquinas en sangre, en ausencia de CD200R1 se detectó una disminución de la citoquina anti-inflamatoria IL-10.

En su conjunto, estos resultados muestran una conexión entre la neuroinflamación y la respuesta originada por el sistema inmune a nivel periférico, que se propaga hacia el SNC. Esta comunicación se ve fuertemente alterada a causa de la ausencia de CD200R1, evidenciando un rol fundamental de este receptor en la regulación de la neuroinflamación y sus efectos sobre el tejido nervioso y el comportamiento. En ausencia de esta señal reguladora generada por la activación de CD200R1, se muestra una respuesta inflamatoria exacerbada en los principales sitios donde ésta es coordinada, entre ellos el bazo y el SNC. El efecto de la ausencia de CD200R1 en las células inmunes del bazo y otros importantes actores de la respuesta, alcanza también a las células que se encuentran en la sangre y otros tejidos, impactando luego sobre el SNC.

Estos resultados evidencian la importancia crucial de CD200R1 en la modulación de la neuroinflamación y su interacción con el sistema inmunológico periférico. La ausencia de esta señal reguladora desencadena una cascada de respuestas inflamatorias exacerbadas, que afectan no solo al tejido nervioso, sino también al comportamiento del individuo. Por lo tanto, la activación de CD200R1 emerge como un mecanismo fundamental para mantener un equilibrio adecuado y prevenir la excesiva activación de las células inmunes. Estos hallazgos ofrecen nuevas perspectivas para comprender las bases fisiopatológicas con un fuerte componente neuroinflamatorio y para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas dirigidas a modular la función reguladora de CD200R1 y mitigar los efectos perjudiciales de la neuroinflamación en el organismo. Además, estas observaciones sugieren la prometedora perspectiva de desarrollar enfoques terapéuticos que apunten a modular la neuroinflamación mediante la intervención en el sistema inmunológico periférico. Este enfoque tiene la ventaja de evitar la necesidad de intervenir directamente en el SNC, lo que podría reducir los riesgos asociados con tratamientos invasivos sobre el tejido nervioso. Al dirigirse a los mecanismos de regulación inmunológica a nivel periférico, se podría lograr un control más preciso y específico de la neuroinflamación, abriendo nuevas puertas para el desarrollo de terapias efectivas y seguras.

Desarrollo de estrategias terapéuticas para la modulación de la neuroinflamación basadas en la activación de CD200R1

Análisis de la ventana temporal terapéutica utilizando CD200-His luego de una lesión de médula espinal

Durante los últimos años, en nuestro equipo de investigación hemos estado dedicados al desarrollo y análisis de enfoques terapéuticos destinados a la modulación de la neuroinflamación, basados principalmente en la utilización de proteínas recombinantes y terapia génica. Una de las estrategias más prometedoras que describimos previamente⁸⁹, fue la utilización de la proteína recombinante CD200-His, la cual se une y activa al CD200R1. Al administrar esta proteína directamente sobre el parénquima medular al momento de la lesión, observamos una importante mejora en la recuperación funcional, asociada a una respuesta inflamatoria a nivel local atenuada y una mayor neuroprotección. Una de las preguntas que nos hicimos una vez que observamos este efecto, fue si existe una ventana temporal luego de la lesión sobre la cual podemos actuar, administrando esta proteína de manera retrasada en el tiempo. Este enfoque se basa en el desarrollo de una herramienta clínicamente relevante, ya que busca tener en cuenta el factor del tiempo desde que una persona que sufre una lesión de médula espinal hasta que puede recibir un tratamiento médico adecuado, considerando tiempo de traslado y de análisis y diagnóstico, entre los principales determinantes de este tiempo. Por lo tanto, teniendo en cuenta que resulta prácticamente imposible en la práctica comenzar esta estrategia terapéutica al momento de la lesión, nos planteamos analizar el impacto de la administración de la proteína recombinante sobre el tejido medular lesionado a las 24 y 48 horas post-lesión. Para nuestra sorpresa, tanto la administración en el parénquima medular lesionado a las 24 como a las 48 horas post-lesión no tuvo un efecto significativo sobre la recuperación de las funciones locomotoras evaluada hasta los 28 dpl. Inclusive al analizar el efecto de la administración retrasada sobre la neuroprotección, tampoco observamos una modificación en la preservación de mielina a nivel histológico, así como

tampoco en la preservación de vías motoras a nivel funcional. Basándonos en estos resultados, podemos extraer varias apreciaciones, siendo la más significativa que las etapas más agudas de la respuesta inflamatoria luego de la lesión son fundamentales en determinar la magnitud de la respuesta a tiempos más tardíos. Durante las etapas iniciales, se activan procesos irreversibles que generan una secuencia de acciones difíciles de alterar una vez desencadenadas, lo que evidencia un importante problema para el desarrollo de estrategias terapéuticas. A su vez, estas etapas iniciales son fundamentales en la propagación del área de tejido dañado, lo que enfatiza aún más la necesidad de actuar rápidamente luego de la lesión. A pesar de esto, debido a que en este estudio evaluamos la administración única de la proteína CD200-His a una concentración dada, no es suficiente para inferir que el retraso del tratamiento con esta proteína es totalmente inefectivo para la recuperación funcional. Se debe profundizar en la administración de esta proteína a otros tiempos post-lesión intermedios, entre las 6 y 24 horas luego de la lesión para determinar en mayor detalle la ventana temporal de acción. A su vez, se podría evaluar la administración de dosis más altas de CD200-His, así como también realizar más de una administración a diferentes tiempos para promover una acción más importante de la proteína sobre el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

Una perspectiva interesante que no hemos profundizado aún es iniciar el tratamiento inclusive más tardíamente, así como también evaluar la recuperación funcional por tiempos más prolongados que 28 dpl. Debido que a las 24 y 48 horas luego de la lesión está ocurriendo una fuerte respuesta pro-inflamatoria, que implica la producción de citoquinas, quimioquinas y el reclutamiento de células, que es necesaria para la correcta limpieza del tejido y permitir la recuperación, puede que el tratamiento con una estrategia que busque la activación de CD200R1 en estas etapas no sea beneficiosa, ya que podría obstaculizar el correcto desarrollo de estos procesos que son necesarios. Por lo tanto, una estrategia que podría resultar interesante en profundizar es en actuar luego de la semana de la lesión, donde ocurre el cambio en la respuesta hacia una mayormente reparadora y regenerativa. Al actuar en esta etapa, la activación de CD200R1 podría promover el cambio hacia este tipo de respuesta y mejorar la recuperación funcional. Inclusive, esta hipótesis también se ve apoyada por lo que han planteado numerosos estudios sobre un cambio incompleto en el tipo de la respuesta en el caso de una lesión de médula espinal, que difiere con respecto a las lesiones al SNP y que pueden estar en la base de las diferencias en la capacidad de recuperación luego de ambas lesiones^{279,307,472}.

Desarrollo de nuevas proteínas recombinantes agonistas de CD200R1

Siguiendo en la línea del desarrollo de estrategias terapéuticas clínicamente relevantes para la modulación de la neuroinflamación, consideramos analizar vías de administración alternativas, ya que la inyección dentro de parénquima medular constituye un procedimiento invasivo, que puede generar complicaciones para el uso en humanos. Dentro de estas vías alternativas para la administración de componentes que alcancen el tejido del SNC lesionado, se encuentra la vía intravenosa, extradural o intratecal. Sin embargo, estas vías presentan dificultades la hora de lograr que los componentes ingresen al tejido nervioso, ya sea por el impedimento de la barrera hematoencefálica, como por la penetración del componente en el tejido.

A pesar de que los resultados presentados anteriormente sugieren la posibilidad de actuar a nivel periférico con el fin de modular la neuroinflamación a nivel del SNC lesionado, en primer lugar, nos planteamos continuar con la investigación de estrategias que busquen modular la neuroinflamación a nivel del tejido nervioso directamente, siguiendo en línea con los estudios de CD200-His en la lesión de médula espinal. El estudio de estas estrategias alternativas que tengan como blanco principal la modulación de la respuesta inflamatoria a nivel de los principales órganos del sistema inmune periféricos debe ser analizada en profundidad, ya que representa una importante oportunidad de generar estrategias efectivas y poco invasivas para la modulación de la neuroinflamación. Previamente, en nuestro grupo de investigación analizamos el efecto sobre la recuperación funcional de la administración por vía intravenosa de la administración CD200-His y de otra proteína recombinante, con un dominio de activación de CD200R1 y un dominio que permite atravesar la barrera hematoencefálica. Al ser administradas por vía intravenosa, estas proteínas van a alcanzar el tejido nervioso lesionado, pero también van a propagarse por todo el organismo, teniendo actividad a nivel sistémico. Sin embargo, no observamos un efecto significativo sobre la recuperación funcional con ninguna de estas proteínas analizadas. A pesar de esto, se debe profundizar en mayor detalle esta posibilidad, analizando diferentes dosis administradas, así como también variaciones en la cantidad y tiempos de administración luego de la lesión. La vía de administración intravenosa presenta la dificultad de necesitar la administración de una mayor cantidad de las proteínas a causa de que son difundidas por todo el organismo, lo que genera una baja concentración en los tejidos, en comparación con la administración dentro del parénquima que permite generar una alta

concentración de la proteína en el tejido administrando una cantidad pequeña de la proteína. Debido a que la producción de estas proteínas es costosa, esto representa una dificultad para el desarrollo de estas estrategias.

Las vías de administración intratecal y extradural representan una oportunidad para continuar con el desarrollo de estas estrategias terapéuticas basadas en la activación de CD200R1, ya que no requieren la administración de concentraciones tan altas de la proteína como es el caso de la vía intravenosa, así como también generan mayor especificidad en la entrega del componente al tejido lesionado sin la necesidad de intervenir sobre el tejido nervioso directamente. De todas maneras, la administración de estas proteínas recombinantes por estas vías presenta la dificultad de una limitada penetración y difusión en el tejido, que limita la acción de la proteína al disminuir la interacción con la mayor cantidad de células posible en el tejido. Por lo tanto, en primer lugar, nos planteamos diseñar y producir una proteína recombinante que contenga un dominio de unión y activación del receptor CD200R1, y un dominio que permita a la proteína permear fácilmente en los tejidos.

Previo a evaluar el efecto de esta proteína sobre la neuroinflamación *in vivo*, nos planteamos analizar *in vitro* si esta nueva construcción se une y activa al receptor CD200R1. Considerando que tras la activación del receptor se activa una cascada de señalización que finaliza en una disminución de la vía de NF- κ B¹¹⁶⁻¹¹⁸, nos planteamos analizar el efecto de la proteína CD200-X sobre esta vía de señalización. Para ello, utilizamos células BV2 que es una línea celular derivada de la microglía, que a su vez corroboramos que expresan CD200R1 por medio de PCR cuantitativa en tiempo real (datos no se muestran). Sorprendentemente, observamos que la proteína en lugar de disminuir la activación de la vía NF- κ B como era esperado, causó la activación de esta vía, a la vez que observamos que no tuvo efecto en atenuar la activación de esta vía en respuesta al LPS. Sin embargo, también decidimos analizar el efecto de la proteína CD200-Fc, la cual se encuentra disponible comercialmente y es utilizada por un gran número de trabajos para la activación de CD200R1^{99,110,144,145,155,442,473,474}, y no observamos un claro efecto en la disminución de la activación de NF- κ B frente a LPS. Ha sido demostrado por investigaciones anteriores que la incubación de CD200-Fc es efectiva en disminuir la activación de la vía NF- κ B en un cultivo primario de microglía, evidenciando una disminución de la producción de mediadores pro-inflamatorios resultado de la activación de esta vía, así como también por una menor proporción de la proteína NF- κ B-P65 en la fracción nuclear, que es utilizado como una medida de actividad de la vía⁴⁴². Sin embargo, las condiciones empleadas en este estudio

muestran diferencias significativas en comparación con las condiciones que empleamos en nuestro trabajo para analizar el efecto de esta proteína sobre la activación de NF- κ B. En primer lugar, las células sobre las cuales se evaluaron presentan diferencias relevantes, ya que una corresponde a una línea celular que implica cambios fundamentales en los procesos celulares normales, mientras que el otro trabajo utilizó un cultivo primario de células microgliales provenientes de la retina, las cuales presentan características similares a su estado normal en el organismo. Más relevante aún es la diferencia de concentración de la proteína CD200-Fc utilizada en ambos trabajos. Mientras que nosotros evaluamos el efecto de la proteína a una concentración de 5 μ g/mL, el trabajo de *Jiang et al.*⁴⁴² utiliza una concentración de 100 μ g/mL, la cual es varios órdenes de magnitud mayor a la utilizada por nosotros, lo que podría explicar en gran parte la falta de efecto observada por nosotros.

En su conjunto, estos resultados no son concluyentes en cuanto a la capacidad de CD200-X de activar al receptor CD200R1 y modular la actividad de la vía NF- κ B, principalmente debido a que en este sistema experimental y con las condiciones utilizadas no nos permitieron confirmar si los resultados observados se deben al diseño experimental en sí mismo o al efecto de las proteínas analizadas sobre la actividad de NF- κ B. Inclusive, este paradigma experimental no nos permitió concluir si los efectos observados de CD200-X sobre la vía NF- κ B son producto de la interacción de la proteína con el receptor CD200R1, o si es por medio de la interacción con otros receptores y/o componentes celulares. Por lo tanto, nos propusimos profundizar en el posible efecto de CD200-X utilizando otro modelo experimental *in vitro*. Utilizando macrófagos *wt* y *CD200R1-KO* derivados de médula ósea, evaluamos en mayor detalle la interacción entre la proteína CD200-X y el receptor CD200R1, considerando los efectos cuando el receptor es expresado por estas células o no. En los BMDM *wt*, no observamos un efecto significativo en la expresión de TNF α a causa de CD200-X, tanto en presencia como en ausencia de LPS. Comparando con lo observado con las células BV-2, a pesar de que en ambos no observamos una atenuación de la respuesta frente al LPS por la proteína CD200-X, en los BMDM *wt* de por sí sola esta proteína no tuvo efecto. Esto puede deberse a que el aumento de la expresión de TNF α no es la única consecuencia de la activación de la vía de NF- κ B y puede ocurrir que la activación de esta vía promueva la producción de otros mediadores pro-inflamatorios en presencia de CD200-X. Interesantemente, cuando evaluamos el efecto de CD200-X en los macrófagos que no expresan CD200R1, observamos una exacerbación de la respuesta frente al LPS a causa de la proteína CD200-X, lo que sugiere que esta proteína recombinante puede estar interactuando con otros componentes además de CD200R1. Una posibilidad es que esta proteína esté interactuando con

alguno de los otros miembros de la familia de CD200R que son activadores, promoviendo la expresión de TNF α . Se debe explorar la capacidad de interacción que tiene CD200-X con los diferentes miembros, para determinar si existe interacción con los otros miembros de CD200R y la afinidad de esas interacciones. Esta diferencia con lo observado con los macrófagos *wt* puede deberse a que esta proteína se una con mayor afinidad a CD200R1 que a los otros miembros, pero debido a que en los macrófagos *CD200R1-KO* no está presente el receptor, la proteína queda disponible para interactuar con los otros receptores. Otra posibilidad es que los otros dominios de la proteína diferentes al dominio de CD200 tengan un efecto de por sí en la expresión de TNF α , o que contaminantes del proceso de producción activen esta vía. Finalmente, debemos tener en cuenta la posibilidad de que el plegamiento de la proteína CD200-X recombinante sea diferente al del CD200 y que de esta forma se una al receptor CD200R1 pero actúe como bloqueante, sin activar sus vías de señalización. A su vez, CD200-Fc puede dimerizarse por medio de los dominios Fc, generando un mayor efecto de la activación de CD200R1^{102,475}. Se ha demostrado que la dimerización de CD200R1, inclusive por anticuerpos bloqueantes, promueve la activación de la vía y la inhibición de mediadores pro-inflamatorios⁴⁰⁶. Por lo tanto, una de las diferencias fundamentales con la proteína CD200-X puede ser la falta de dimerización, que permitiría explicar los resultados observados. Se debe profundizar en la causa de esta observación en los macrófagos *CD200R1-KO* para comprender en mayor detalle los efectos de esta proteína sobre las células en respuesta a estímulos inflamatorios.

Contrario a lo observado en cuanto al efecto en la expresión de TNF α , la proteína CD200-X tuvo un impacto en la fagocitosis de mielina por parte de los BMDM *wt* pero no en los *CD200R1-KO*. Cuando utilizamos la proteína a una concentración alta (100 μ g/mL) observamos una disminución en la fagocitosis de mielina por parte de los macrófagos *wt*, similar a los valores en presencia de LPS. Esta disminución puede deberse a que CD200-X afecta directamente la capacidad de fagocitosis por parte de estas células o también puede ocurrir que esta proteína esté generando un cambio en el fenotipo de los macrófagos hacia uno más pro-inflamatorio, de la misma manera que lo hace el LPS. Este efecto sí parece ser específico de la interacción de esta proteína con el receptor, ya que no se observa efecto en los macrófagos que no lo expresan. Sin embargo, otra posibilidad puede ser que los macrófagos *CD200R1-KO* ya se encuentren en un estado más pro-inflamatorio a causa de la ausencia del receptor, ya que en condiciones basales se observa la misma capacidad de fagocitosis que frente al estímulo con LPS.

Considerando los efectos observados por la proteína CD200-X, tanto en la activación de la vía de NF- κ B como en la fagocitosis, parece no tener el efecto anti-inflamatorio esperado por la activación de CD200R1. Se deberá profundizar en el efecto de esta proteína, tanto *in vitro* como *in vivo*, con el fin de determinar si interactúa con CD200R1 de la manera esperada, así como también la posible interacción con otros miembros de la familia de CD200R y/o con otros receptores. También se deberán realizar experimentos para determinar los efectos de los diferentes dominios de la proteína, lo cual puede ayudar al diseño y perfeccionamiento de proteínas recombinantes que puedan ser utilizadas con fines terapéuticos para la modulación de la inflamación dentro y fuera del sistema nervioso.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo analizamos la relación entre CD200 y CD200R1 en diferentes contextos de neuroinflamación, evaluando su rol en el desarrollo de las respuestas inflamatorias tanto a nivel local en el sistema nervioso central y periférico, como en otros sitios relevantes de generación y coordinación de esta respuesta, entre ellos el bazo y la sangre. Este análisis del rol de CD200-CD200R1 en diferentes contextos de inflamación, y de los mecanismos subyacentes nos permitió evidenciar la compleja interacción entre el sistema inmune y el sistema nervioso, sugiriendo un rol de esta interacción que es fuertemente dependiente del contexto sobre el cual se desarrolla la respuesta inflamatoria. En todos los modelos de neuroinflamación utilizados encontramos alteraciones importantes cuando modulamos la interacción CD200-CD200R1, sugiriendo un rol importante en el control y regulación fina de los procesos de inflamación en el sistema nervioso y a nivel sistémico en general de esta interacción, a pesar de que no siempre participa de la misma manera. En el modelo de lesión al SNP observamos que el bloqueo de CD200R1 altera la recuperación funcional a través de una modulación de la respuesta inflamatoria local, promoviendo un ambiente menos pro-inflamatorio en las etapas más agudas de la inflamación, que es fundamental en los procesos que ocurren en el tejido nervioso luego de la lesión y que posteriormente influyen sobre la capacidad regenerativa del tejido.

Otra de las observaciones que revelan la complejidad de estos mecanismos es el hecho de que a pesar de que observamos un efecto sobre la recuperación funcional luego de una lesión de nervio ciático al bloquear transitoriamente CD200R1, la ausencia de CD200R1 en los ratones knock-out no tuvo un impacto en la recuperación funcional. Interesantemente, se observó el mismo patrón luego de la lesión de médula espinal, donde previamente hemos reportado una recuperación funcional deficiente al bloquear CD200R1 de manera transitoria al momento de la lesión y sin embargo tampoco observamos un efecto en la recuperación en los ratones *CD200R1-KO*. Como se discutió previamente, las razones por las cuales no vemos efecto cuando CD200R1 está ausente pueden ser variadas, probablemente sea debido a mecanismos compensatorios, que permiten la robustez de los sistemas cuando hay alteraciones a nivel genético durante el desarrollo. Por ejemplo, en el cerebro de los animales tratados con LPS en forma intraperitoneal observamos en nuestro análisis transcripcional que los animales *CD200R1-KO* poseen una expresión mucho menor de CD200R4 y levemente menor de CD200. Al impedir transitoriamente la interacción de CD200 con CD200R1 con el anticuerpo bloqueante, estamos desestabilizando

al sistema en el momento de la lesión, mientras que en el modelo transgénico, esas alteraciones ya están presentes previamente. También podría deberse a la extensión en el organismo de la ausencia de señal de CD200R1, ya que, al administrar el anticuerpo, estamos actuando solamente sobre las células que ingresan al tejido dañado, mientras que en el modelo transgénico la activación de CD200R1 está ausente a nivel sistémico. Como observamos en este trabajo, CD200R1 tiene un rol en el desarrollo de las respuestas en estos modelos de neuroinflamación en órganos fuera del sistema nervioso. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria en el tejido nervioso dañado puede resultar diferente cuando bloqueamos CD200R1 transitoriamente y cuando está ausente a nivel sistémico. Es más, las alteraciones en la respuesta inflamatoria a nivel de la médula espinal luego de la lesión en los ratones *CD200R1-KO* fue diferente a la reportada previamente con el bloqueo transitorio del receptor. Esto resalta la necesidad de tomar en cuenta a todo el organismo a la hora de analizar la respuesta inflamatoria local, ya que es la acción coordinada de órganos y tejidos distribuidos en el organismo.

Esta importancia se vio reflejada al analizar el rol de CD200R1 en la neuroinflamación provocada por una inflamación sistémica con LPS. La correlación de las alteraciones observadas a nivel del bazo y la sangre, con la neuroinflamación exacerbada en el SNC, permitieron comprender posibles mecanismos por los cuales el sistema inmune a nivel periférico influye sobre el sistema nervioso. Este trabajo apoya la hipótesis del bazo como un posible factor determinante de los procesos neuroinflamatorios, tanto en el contexto de una inflamación sistémica como en una lesión traumática al SNC, lo que resalta la necesidad de analizar las respuestas en estos órganos donde se coordinan las respuestas inflamatorias para comprender que ocurre a nivel del sistema nervioso.

Al analizar el rol de CD200-CD200R1 en diferentes modelos neuroinflamatorios, evaluando las vías por las cuales esta interacción participa en la regulación de la inflamación en el sistema nervioso, pero también vinculándolo con la respuesta a nivel sistémico, pudimos establecer algunos mecanismos que permiten comprender en mayor detalle los procesos perjudiciales de la neuroinflamación. Se desprende de estas observaciones, la relevancia del estudio y del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que tengan como blanco los órganos donde se originan y coordinan las respuestas inflamatorias, en lugar de actuar sobre el tejido nervioso directamente, con el fin de modular de manera precisa la neuroinflamación, reduciendo los efectos perjudiciales asociado a estos procesos y aumentando los efectos beneficiosos. Estos

posibles enfoques terapéuticos que busquen atacar la respuesta inflamatoria en una etapa previa al desarrollo de los procesos neuroinflamatorios, presentan numerosas ventajas. La mayor facilidad de acceso y el poder evitar la intervención sobre el tejido nervioso, disminuye la probabilidad de complicaciones asociadas al tratamiento. También, por medio de estos tratamientos se puede actuar no solo sobre la neuroinflamación, sino que también sobre otros procesos patológicos dañinos asociados con estas respuestas a nivel sistémico.

Debemos continuar con el perfeccionamiento de las estrategias basadas en proteínas recombinantes que tengan como blanco a CD200R1 para la modulación de la neuroinflamación. El estudio en mayor detalle sobre el momento óptimo sobre el cual podemos actuar para promover mejoras en la recuperación funcional luego de una lesión de médula espinal es fundamental para perfeccionar los paradigmas de tratamiento luego de estas lesiones, así como también nos pueden ayudar comprender en mayor detalle los mecanismos subyacentes a las patologías neuroinflamatorias. Una parte del perfeccionamiento de estas estrategias es el diseño de nuevas proteínas recombinantes que busquen mantener los efectos beneficiosos observados hasta el momento con las herramientas disponibles, pero a la vez, mejorar los aspectos que limitan su efectividad. Para ello resulta relevante profundizar en el efecto de la proteína CD200-X, tanto *in vitro* como *in vivo* y evaluar su potencial como promotor de la recuperación funcional luego de una lesión de médula espinal, así como también como modulador de los procesos neuroinflamatorios en general. Esto abre la puerta a la exploración de vías alternativas de administración y sienta las bases para impulsar la optimización de estas proteínas, fomentando la creación de estrategias terapéuticas exitosas con potenciales aplicaciones en humanos. Estas estrategias pueden no solo potenciar la recuperación funcional después de una lesión en la médula espinal, sino también ser beneficiosas para el tratamiento de otros problemas caracterizados por un marcado componente neuroinflamatorio, como la depresión, el Alzheimer y el envejecimiento.

ABREVIACIONES

BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea
BMS	Escala de Basso para ratón
CD200R1-KO	Ratones transgénicos que no expresan CD200R1 de manera constitutiva
dpl	Días post-lesión
IL	Interleuquina
LFB	Luxol Fast Blue
LPS	Lipopolisacárido
Naïve	Animales en condiciones normales sin tratamiento
ORO	Oil Red O
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
Sham	Ratones a los que se les realizó una laminectomía pero no se lesionó la médula espinal
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TH	Tirosina hidroxilasa
wt	Genotipo salvaje

BIBLIOGRAFÍA

1. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* vol. 454 428–435 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature07201> (2008).
2. Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. *Robbins Basic Pathology*. Elsevier Health Sciences (2017).
3. Barton, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* **118**, 413 (2008).
4. Hansen, M. K., O'Connor, K. A., Goehler, L. E., Watkins, L. R. & Maier, S. F. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1beta-induced fever is dependent on dose. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, (2001).
5. Laflamme, N., Lacroix, S. & Rivest, S. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J Neurosci* **19**, 10923–10930 (1999).
6. Lacroix, S., Feinstein, D. & Rivest, S. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. *Brain Pathol* **8**, 625–640 (1998).
7. Ching, S. *et al.* Endothelial-specific knockdown of interleukin-1 (IL-1) type 1 receptor differentially alters CNS responses to IL-1 depending on its route of administration. *J Neurosci* **27**, 10476–10486 (2007).
8. Berg, B. M., Godbout, J. P., Kelley, K. W. & Johnson, R. W. α -Tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. *Brain Behav Immun* **18**, 149–157 (2004).
9. Bluthé, R.-M. *et al.* Role of interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *European Journal of Neuroscience* **12**, 4447–4456 (2000).
10. Corona, A. W. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition attenuates lipopolysaccharide induced persistent microglial activation and depressive-like complications in fractalkine receptor (CX(3)CR1)-deficient mice. *Brain Behav Immun* **31**, 134–142 (2013).
11. Hawkins, B. T. & Davis, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173–185 (2005).

12. Michael, B. D. *et al.* The Interleukin-1 Balance During Encephalitis Is Associated With Clinical Severity, Blood-Brain Barrier Permeability, Neuroimaging Changes, and Disease Outcome. *J Infect Dis* **213**, 1651–1660 (2016).
13. David, S., López-Vales, R. & Wee Yong, V. Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury. potential therapeutic implications. *Handb Clin Neurol* **109**, 485–502 (2012).
14. Sokolova, A. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **19**, 392–398 (2009).
15. Walter, S. *et al.* Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem* **20**, 947–956 (2007).
16. Wang, T. *et al.* Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Triggers, Mechanisms, and Immunotherapies. *Neuroscientist* vol. 28 364–381 Preprint at <https://doi.org/10.1177/1073858421991066> (2022).
17. Amin, M. & Hersh, C. M. Updates and advances in multiple sclerosis neurotherapeutics. *Neurodegener Dis Manag* **13**, 47–70 (2023).
18. Abbadessa, G., Lavorgna, L., Treaba, C. A., Bonavita, S. & Mainero, C. Hemostatic factors in the pathogenesis of neuroinflammation in multiple sclerosis. *Mult Scler* **28**, 1834–1842 (2022).
19. McCauley, M. E. & Baloh, R. H. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis. *Acta Neuropathol* **137**, 715–730 (2019).
20. Andronie-Cioara, F. L. *et al.* Molecular Mechanisms of Neuroinflammation in Aging and Alzheimer's Disease Progression. *Int J Mol Sci* **24**, (2023).
21. Mou, Y. *et al.* Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging. *Front Immunol* **13**, (2022).
22. DiSabato, D. J., Quan, N. & Godbout, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem* **139**, 136–153 (2016).
23. Yirmiya, R., Rimmerman, N. & Reshef, R. Depression as a Microglial Disease. *Trends Neurosci* **38**, 637–658 (2015).
24. Troubat, R. *et al.* Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci* **53**, 151–171 (2021).
25. Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L. & Crack, P. J. The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain Behav Immun* **79**, 75–90 (2019).

26. Liao, X., Yang, J., Wang, H. & Li, Y. Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. *J Psychiatr Res* **130**, 167–176 (2020).
27. Baum, A. & Fleming, I. Implications of psychological research on stress and technological accidents. *American Psychologist* **48**, 665–672 (1993).
28. McEwen, B. S. The Brain on Stress: Toward an Integrative Approach to Brain, Body and Behavior. *Perspect Psychol Sci* **8**, 673 (2013).
29. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D. & Huber, T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* **7**, 1–14 (2013).
30. Li, Q. & Barres, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* **18**, 225–242 (2018).
31. Streit, W. J., Graeber, M. B. & Kreutzberg, G. W. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* **1**, 301–307 (1988).
32. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (1979)* **308**, 1314–1318 (2005).
33. Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience 2005 8:6* **8**, 752–758 (2005).
34. Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S. S. & Ransohoff, R. M. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **14**, 1227–1235 (2011).
35. Ransohoff, R. M. & Perry, V. H. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu Rev Immunol* **27**, 119–145 (2009).
36. Schafer, D. P. & Stevens, B. Phagocytic glial cells: Sculpting synaptic circuits in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **23**, 1034–1040 (2013).
37. Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155**, 1596–1609 (2013).
38. David, S., Greenhalgh, A. D. & Kroner, A. Macrophage and microglial plasticity in the injured spinal cord. *Neuroscience* **307**, 311–318 (2015).
39. Crotti, A. & Ransohoff, R. M. Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity* **44**, 505–515 (2016).
40. David, S., Kroner, A., Greenhalgh, A. D., Zarruk, J. G. & López-Vales, R. Myeloid cell responses after spinal cord injury. *J Neuroimmunol* **321**, 97–108 (2018).
41. Ito, D. *et al.* Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research* **57**, 1–9 (1998).
42. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* **164**, 6166–6173 (2000).

43. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23–35 (2003).
44. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969 (2008).
45. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* **6**, 13 (2014).
46. Simon, D. W. *et al.* The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* (2017) doi:10.1038/nrneurol.2017.13.
47. Ransohoff, R. M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* **19**, 987–991 (2016).
48. Paolicelli, R. C. *et al.* Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* vol. 110 3458–3483 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.020> (2022).
49. Keren-shaul, H. *et al.* Article A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer ' s Disease Article A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer ' s Disease. *Cell* **169**, 1276-1290.e17 (2017).
50. Krasemann, S. *et al.* The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* **47**, 566-581.e9 (2017).
51. Marschallinger, J. *et al.* Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature Neuroscience* **23**:2 **23**, 194–208 (2020).
52. De Andrade Costa, A. *et al.* RNA sequence analysis reveals ITGAL/CD11A as a stromal regulator of murine low-grade glioma growth. *Neuro Oncol* **24**, 14–26 (2022).
53. Hammond, T. R. *et al.* Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity* **50**, 253-271.e6 (2019).
54. Li, Q. *et al.* Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing In Brief. *Neuron* **101**, 207–223 (2019).
55. Kracht, L. *et al.* Human fetal microglia acquire homeostatic immune-sensing properties early in development. *Science* (1979) **369**, 530–537 (2020).
56. Bartholdi, D. & Schwab, M. E. Methylprednisolone inhibits early inflammatory processes but not ischemic cell death after experimental spinal cord lesion in the rat. *Brain Res* **672**, 177–186 (1995).
57. Fu, E. S. & Saporta, S. Methylprednisolone inhibits production of interleukin-1beta and interleukin-6 in the spinal cord following compression injury in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* **17**, 82–5 (2005).

58. Hurlbert, R. J. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care. *J Neurosurg* **93**, 1–7 (2000).
59. Fehlings, M. G. *et al.* A Clinical Practice Guideline for the Management of Patients With Acute Spinal Cord Injury: Recommendation on the Use of Methylprednisolone Sodium Succinate. *Global Spine J* **7**, 2035–2115 (2017).
60. Deczkowska, A., Amit, I. & Schwartz, M. Microglial immune checkpoint mechanisms. *Nat Neurosci* **21**, 779–786 (2018).
61. Cardona, A. E. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* **9**, 917–924 (2006).
62. Harrison, J. K. *et al.* Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10896–10901 (1998).
63. Mott, R. T. *et al.* Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia* **46**, 369–379 (2004).
64. Junker, A. *et al.* MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain* **132**, 3342–3352 (2009).
65. Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G. & Brown, M. H. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* **23**, 285–290 (2002).
66. Neumann, H. & Takahashi, K. Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *J Neuroimmunol* **184**, 92–99 (2007).
67. Linnartz-Gerlach, B., Kopatz, J. & Neumann, H. Siglec functions of microglia. *Glycobiology* **24**, 794–799 (2014).
68. Lago, N. *et al.* CD300f immunoreceptor is associated with major depressive disorder and decreased microglial metabolic fitness. (2020) doi:10.1073/pnas.1911816117/-/DCSupplemental.
69. Peluffo, H. *et al.* Overexpression of the immunoreceptor CD300f has a neuroprotective role in a model of acute brain injury. *Brain Pathol* **22**, 318–28 (2012).
70. Kong, X. N. *et al.* LPS-induced down-regulation of signal regulatory protein {alpha} contributes to innate immune activation in macrophages. *J Exp Med* **204**, 2719–2731 (2007).
71. Latour, S. *et al.* Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12

- responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol* **167**, 2547–2554 (2001).
72. Liu, S. Q. *et al.* Negative regulation of monocyte adhesion to arterial elastic laminae by signal regulatory protein alpha and Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase-1. *J Biol Chem* **280**, 39294–39301 (2005).
 73. Ide, K. *et al.* Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5062–5066 (2007).
 74. Janssen, W. J. *et al.* Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 158–167 (2008).
 75. Oldenborg, P. A. *et al.* Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* **288**, 2051–2054 (2000).
 76. Gitik, M., Liraz-Zaltsman, S., Oldenborg, P. A., Reichert, F. & Rotshenker, S. Myelin down-regulates myelin phagocytosis by microglia and macrophages through interactions between CD47 on myelin and SIRP α (signal regulatory protein- α) on phagocytes. *J Neuroinflammation* **8**, 1–11 (2011).
 77. Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* vol. 468 253–262 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature09615> (2010).
 78. Qin, Q. *et al.* TREM2, microglia, and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* **195**, (2021).
 79. Carmona, S. *et al.* The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* **17**, 721–730 (2018).
 80. Nugent, A. A. *et al.* TREM2 Regulates Microglial Cholesterol Metabolism upon Chronic Phagocytic Challenge. *Neuron* **105**, 837-854.e9 (2020).
 81. Kleinberger, G. *et al.* TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med* **6**, (2014).
 82. Peluffo, H. *et al.* CD300f immunoreceptor contributes to peripheral nerve regeneration by the modulation of macrophage inflammatory phenotype. *J Neuroinflammation* **12**, 145 (2015).
 83. Kaufmann, F. N. *et al.* Sex-dependent role of CD300f immune receptor in generalized anxiety disorder. *Brain Behav Immun Health* **11**, (2021).
 84. Lima, T. Z., Sardinha, L. R., Sayos, J., Mello, L. E. & Peluffo, H. Astrocytic Expression of the Immunoreceptor CD300f Protects Hippocampal Neurons from Amyloid- β Oligomer Toxicity In Vitro. *Curr Alzheimer Res* **14**, (2017).

85. Tian, L. *et al.* p85 α recruitment by the CD300f phosphatidylserine receptor mediates apoptotic cell clearance required for autoimmunity suppression. *Nature Communications* 2014 5:1 **5**, 1–15 (2014).
86. Izawa, K. *et al.* The receptor LMIR3 negatively regulates mast cell activation and allergic responses by binding to extracellular ceramide. *Immunity* **37**, 827–839 (2012).
87. Manich, G. *et al.* Role of the CD200-CD200R axis during homeostasis and neuroinflammation. *Neuroscience* (2018) doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.10.030.
88. Singh, A., Falk, M. K., Hviid, T. V. F. & Sørensen, T. L. Increased Expression of CD200 on Circulating CD11b+ Monocytes in Patients with Neovascular Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* **120**, 1029–1037 (2013).
89. Lago, N., Pannunzio, B., Amo-Aparicio, J., López-Vales, R. & Peluffo, H. CD200 modulates spinal cord injury neuroinflammation and outcome through CD200R1. *Brain Behav Immun* **73**, 416–426 (2018).
90. Meuth, S. G. *et al.* CNS inflammation and neuronal degeneration is aggravated by impaired CD200-CD200R-mediated macrophage silencing. *J Neuroimmunol* **194**, 62–69 (2008).
91. Koning, N., Swaab, D. F., Hoek, R. M. & Huitinga, I. Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 159–167 (2009).
92. Webb, M. & Barclay, A. N. Localisation of the MRC OX-2 Glycoprotein on the Surfaces of Neurones. *J Neurochem* **43**, 1061–1067 (1984).
93. Wright, G. J. *et al.* Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* **13**, 233–242 (2000).
94. Chitnis, T. *et al.* Elevated Neuronal Expression of CD200 Protects Wilds Mice from Inflammation-Mediated Neurodegeneration. *Am J Pathol* **170**, 1695–1712 (2007).
95. Valente, T., Serratosa, J., Perpiñá, U., Saura, J. & Solà, C. Alterations in CD200-CD200R1 System during EAE Already Manifest at Presymptomatic Stages. *Front Cell Neurosci* **11**, 1–15 (2017).
96. Barclay, A. N., Clark, M. J. & McCaughan, G. W. Neuronal/lymphoid membrane glycoprotein MRC OX-2 is a member of the immunoglobulin superfamily with a light-chain-like structure. *Biochem Soc Symp* **51**, 149–57 (1986).
97. Wright, G. J. *et al.* Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol* **171**, 3034–3046 (2003).

98. Rijkers, E. S. K. *et al.* The inhibitory CD200R is differentially expressed on human and mouse T and B lymphocytes. *Mol Immunol* **45**, 1126–35 (2008).
99. Hernangómez, M. *et al.* CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation. *Glia* **60**, 1437–1450 (2012).
100. Shrivastava, K., Gonzalez, P. & Acarin, L. The immune inhibitory complex CD200/CD200R is developmentally regulated in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* **520**, 2657–2675 (2012).
101. Akkaya, M. & Barclay, A. N. Heterogeneity in the CD200R paired receptor family. *Immunogenetics* **62**, 15–22 (2010).
102. Hatherley, D., Cherwinski, H. M., Moshref, M. & Barclay, A. N. Recombinant CD200 Protein Does Not Bind Activating Proteins Closely Related to CD200 Receptor. *The Journal of Immunology* **175**, 2469–2474 (2005).
103. Hatherley, D., Lea, S. M., Johnson, S. & Barclay, A. N. Structures of CD200/CD200 receptor family and implications for topology, regulation, and evolution. *Structure* **21**, 820–832 (2013).
104. Rosenblum, M. D., Yancey, K. B., Olasz, E. B. & Truitt, R. L. CD200, a ‘no danger’ signal for hair follicles. *Journal of Dermatological Science* vol. 41 165–174 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.11.003> (2006).
105. Gorczynski, R., Boudakov, I. & Khatri, I. Peptides of CD200 Modulate LPS-Induced TNF- α Induction and Mortality In Vivo. *Journal of Surgical Research* **145**, 87–96 (2008).
106. Barclay, A. N. & Ward, H. A. Purification and Chemical Characterisation of Membrane Glycoproteins from Rat Thymocytes and Brain, Recognised by Monoclonal Antibody MRC OX 2. *Eur J Biochem* **129**, 447–458 (1982).
107. Deckert, M., Sedgwick, J. D., Fischer, E. & Schlüter, D. Regulation of microglial cell responses in murine Toxoplasma encephalitis by CD200/CD200 receptor interaction. *Acta Neuropathol* **111**, 548–558 (2006).
108. Cohen, M. *et al.* Newly formed endothelial cells regulate myeloid cell activity following spinal cord injury via expression of CD200 ligand. *Journal of Neuroscience* **37**, 972–985 (2017).
109. Barclay, A. N. Different reticular elements in rat lymphoid tissue identified by localization of Ia, Thy-1 and MRC OX 2 antigens. *Immunology* **44**, 727–36 (1981).
110. Cox, F. F., Carney, D., Miller, A. M. & Lynch, M. A. CD200 fusion protein decreases microglial activation in the hippocampus of aged rats. *Brain Behav Immun* **26**, 789–796 (2012).

111. Ojo, B. *et al.* Age-related changes in the hippocampus (loss of synaptophysin and glial-synaptic interaction) are modified by systemic treatment with an NCAM-derived peptide, FGL. *Brain Behav Immun* **26**, 778–788 (2012).
112. Loh, K. H. *et al.* Proteomic Analysis of Unbounded Cellular Compartments: Synaptic Clefts. *Cell* **166**, 1295-1307.e21 (2016).
113. Ragheb, R. *et al.* Preparation and functional properties of monoclonal antibodies to human, mouse and rat OX-2. *Immunol Lett* **68**, 311–315 (1999).
114. Chen, Z. *et al.* Identification of an expressed truncated form of CD200, CD200tr, which is a physiologic antagonist of CD200-induced suppression. *Transplantation* **86**, 1116–24 (2008).
115. Kotwica-Mojzych, K., Jodłowska-Jędrych, B. & Mojzych, M. Cd200: Cd200r interactions and their importance in immunoregulation. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 1–21 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms22041602> (2021).
116. Mahrshahi, R. & Brown, M. H. Downstream of tyrosine kinase 1 and 2 play opposing roles in CD200 receptor signaling. *J Immunol* **185**, 7216–22 (2010).
117. Mahrshahi, R., Barclay, A. N. & Brown, M. H. Essential roles for Dok2 and RasGAP in CD200 receptor-mediated regulation of human myeloid cells. *Journal of immunology* **183**, 4879–86 (2009).
118. Zhang, S., Cherwinski, H., Sedgwick, J. D. & Phillips, J. H. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *J Immunol* **173**, 6786–93 (2004).
119. Hoek, R. M. Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science (1979)* **290**, 1768–1771 (2000).
120. Xiong, Z. *et al.* CD200 Checkpoint Reversal: A Novel Approach to Immunotherapy. *Clin Cancer Res* **26**, 232–241 (2020).
121. Moreaux, J., Veyrone, J. L., Reme, T., De Vos, J. & Klein, B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 117–122 (2008).
122. Petermann, K. B. *et al.* CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest* **117**, 3922–3929 (2007).
123. Love, J. E. *et al.* CD200 Expression in Neuroendocrine Neoplasms. *Am J Clin Pathol* **148**, 236–242 (2017).
124. Foster-Cuevas, M., Wright, G. J., Puklavec, M. J., Brown, M. H. & Barclay, A. N. Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J Virol* **78**, 7667–7676 (2004).

125. Foster-Cuevas, M. *et al.* Cytomegalovirus e127 protein interacts with the inhibitory CD200 receptor. *J Virol* **85**, 6055–6059 (2011).
126. Snelgrove, R. J. *et al.* A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol* **9**, 1074–83 (2008).
127. Rygiel, T. P. *et al.* Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *J Immunol* **183**, 1990–6 (2009).
128. Soberman, R. J. *et al.* CD200R1 Supports HSV-1 Viral Replication and Licenses Pro-Inflammatory Signaling Functions of TLR2. *PLoS One* **7**, (2012).
129. Casulli, J. *et al.* CD200R deletion promotes a neutrophil niche for *Francisella tularensis* and increases infectious burden and mortality. *Nat Commun* **10**, 1–9 (2019).
130. Chakera, A. *et al.* The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin Dev Immunol* **2012**, (2012).
131. Halmannová, D. *et al.* CD200 / CD200R Paired Potent Inhibitory Molecules Regulating Immune and Inflammatory Responses: Part I: CD200/CD200R Structure, Activation, and Function. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **55**, 12–17 (2012).
132. Gorczynski, R. M. CD200 and its receptors as targets for immunoregulation. *Curr Opin Investig Drugs* **6**, 483–8 (2005).
133. Gorczynski, R. M., Chen, Z., Yu, K. & Hu, J. CD200 immunoadhesin suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Clin Immunol* **101**, 328–334 (2001).
134. Gorczynski, R. M., Chen, Z., Lee, L., Yu, K. & Hu, J. Anti-CD200R ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Clinical Immunology* **104**, 256–264 (2002).
135. Walker, D. G., Dalsing-hernandez, J. E., Campbell, N. A. & Lue, L. Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: A potential mechanism leading to chronic inflammation Douglas. *Exp Neurol* **215**, 5–19 (2009).
136. Varnum, M. M., Kiyota, T., Ingraham, K. L., Ikezu, S. & Ikezu, T. The anti-inflammatory glycoprotein, CD200, restores neurogenesis and enhances amyloid phagocytosis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **36**, 2995–3007 (2015).
137. Wang, X. J., Ye, M., Zhang, Y. H. & Chen, S. Di. CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2**, 259–264 (2007).
138. Ren, Y., Ye, M., Chen, S. & Ding, J. CD200 Inhibits Inflammatory Response by Promoting KATP Channel Opening in Microglia Cells in Parkinson's Disease. *Medical Science Monitor* **22**, 1733–1741 (2016).

139. Zhang, S. *et al.* CD200-CD200R dysfunction exacerbates microglial activation and dopaminergic neurodegeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **8**, 154 (2011).
140. Wang, X. J. *et al.* Impaired CD200-CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: Roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med* **50**, 1094–1106 (2011).
141. Rabaneda-Lombarte, N. *et al.* Altered expression of the immunoregulatory ligand-receptor pair CD200-CD200R1 in the brain of Parkinson's disease patients. *NPJ Parkinsons Dis* **8**, (2022).
142. Matsumoto, S. *et al.* CD200⁺ and CD200⁻ macrophages accumulated in ischemic lesions of rat brain: The two populations cannot be classified as either M1 or M2 macrophages. *J Neuroimmunol* **282**, 7–20 (2015).
143. Zhao, S. cai *et al.* CD200-CD200R1 signaling pathway regulates neuroinflammation after stroke. *Brain Behav* **10**, (2020).
144. Liu, Y. *et al.* CD200R1 Agonist Attenuates Mechanisms of Chronic Disease in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroscience* **30**, 2025–2038 (2010).
145. Hernangómez, M. *et al.* CD200R1 agonist attenuates glial activation, inflammatory reactions, and hypersensitivity immediately after its intrathecal application in a rat neuropathic pain model. *J Neuroinflammation* **13**, 43 (2016).
146. Yue, N. *et al.* Activation of P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome assembly in hippocampal glial cells mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors. *J Neuroinflammation* **14**, 102 (2017).
147. Chang, C. Y. *et al.* Novel distribution of cluster of differentiation 200 adhesion molecule in glial cells of the peripheral nervous system of rats and its modulation after nerve injury. *Neuroscience* **183**, 32–46 (2011).
148. Pannunzio, B. *et al.* CD200R1 Contributes to Successful Functional Reinnervation after a Sciatic Nerve Injury. *Cells* **11**, (2022).
149. Yi, M.-H. *et al.* Expression of CD200 in alternative activation of microglia following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Brain Res* **1481**, 90–6 (2012).
150. Griffiths, M. R., Gasque, P. & Neal, J. W. The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**, 217–226 (2009).
151. Walker, F. R., Nilsson, M. & Jones, K. Acute and Chronic Stress-Induced Disturbances of Microglial Plasticity, Phenotype and Function. *Curr Drug Targets* **14**, 1262–1276 (2013).

152. Pankratova, S. *et al.* Immunomodulator CD200 Promotes Neurotrophic Activity by Interacting with and Activating the Fibroblast Growth Factor Receptor. *Mol Neurobiol* **53**, 584–594 (2016).
153. Broderick, C. *et al.* Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *Am J Pathol* **161**, 1669–1677 (2002).
154. Denieffe, S., Kelly, R. J., McDonald, C., Lyons, A. & Lynch, M. A. Classical activation of microglia in CD200-deficient mice is a consequence of blood brain barrier permeability and infiltration of peripheral cells. *Brain Behav Immun* **34**, 86–97 (2013).
155. Lyons, A., Downer, E. J., Costello, D. A., Murphy, N. & Lynch, M. A. Dok2 mediates the CD200Fc attenuation of A β -induced changes in glia. *J Neuroinflammation* **9**, 1 (2012).
156. Lyons, A. *et al.* Analysis of the Impact of CD200 on Phagocytosis. *Mol Neurobiol* **54**, 5730–5739 (2017).
157. Topp, K. S. & Boyd, B. S. *Structure and Biomechanics of Peripheral Nerves: Nerve Responses to Physical Stresses and Implications for Physical Therapist Practice. Physical Therapy* vol. 86 <https://academic.oup.com/ptj/article/86/1/92/2805155> (2006).
158. He, Q. R. *et al.* Peripheral nerve fibroblasts secrete neurotrophic factors to promote axon growth of motoneurons. *Neural Regen Res* **17**, 1833 (2022).
159. Ydens, E. *et al.* Profiling peripheral nerve macrophages reveals two macrophage subsets with distinct localization, transcriptome and response to injury. *Nature Neuroscience* **23**:5 **23**, 676–689 (2020).
160. Kiefer, R., Kieseier, B. C., Stoll, G. & Hartung, H. P. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* **64**, 109–127 (2001).
161. Sardella-Silva, G., Mietto, B. S. & Ribeiro-Resende, V. T. Four Seasons for Schwann Cell Biology, Revisiting Key Periods: Development, Homeostasis, Repair, and Aging. *Biomolecules* **11**, (2021).
162. Jessen, K. R. *et al.* The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* **12**, 509–527 (1994).
163. Joseph, N. M. *et al.* Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* **131**, 5599–5612 (2004).
164. Mukouyama, Y. S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M. & Anderson, D. J. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* **109**, 693–705 (2002).

165. Mukoyama, Y. S., Gerber, H. P., Ferrara, N., Gu, C. & Anderson, D. J. Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Development* **132**, 941–952 (2005).
166. Parmantier, E. *et al.* Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* **23**, 713–724 (1999).
167. Webster, H. de F., Martin, J. R. & O'Connell, M. F. The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. *Dev Biol* **32**, 401–416 (1973).
168. Yuan, Y. M., Wang, Y., Wu, S. H. & Zhao, M. Y. Review: Myelin clearance is critical for regeneration after peripheral nerve injury. *Front Neurol* **13**, (2022).
169. Salzer, J. L. Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, (2015).
170. Salzer, J. L. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron* **40**, 297–318 (2003).
171. Pereira, J. A., Lebrun-Julien, F. & Suter, U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci* **35**, 123–134 (2012).
172. Court, F. A. *et al.* Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature* **431**, 191–195 (2004).
173. Gould, R. M. & Mattingly, G. Regional localization of RNA and protein metabolism in Schwann cells in vivo. *J Neurocytol* **19**, 285–301 (1990).
174. Terada, N., Saitoh, Y., Kamijo, A., Ohno, S. & Ohno, N. Involvement of membrane skeletal molecules in the Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells. *Med Mol Morphol* **49**, 5–10 (2016).
175. Balice-Gordon, R. J., Bone, L. J. & Scherer, S. S. Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* **142**, 1095–1104 (1998).
176. Terada, N. *et al.* Structures and Molecular Composition of Schmidt–Lanterman Incisures. *Adv Exp Med Biol* **1190**, 181–198 (2019).
177. Nocera, G. & Jacob, C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2020 77:20 77**, 3977–3989 (2020).
178. Noble, J., Munro, C. A., Prasad, V. S. S. V. & Midha, R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* **45**, 116–122 (1998).
179. Atkins, S. *et al.* Scarring impedes regeneration at sites of peripheral nerve repair. *Neuroreport* **17**, 1245–1249 (2006).
180. Aman, M. *et al.* An Epidemiological and Etiological Analysis of 5026 Peripheral Nerve Lesions from a European Level I Trauma Center. *J Pers Med* **12**, (2022).

181. Campbell, W. W. Evaluation and management of peripheral nerve injury. (2008) doi:10.1016/j.clinph.2008.03.018.
182. Seddon, H. J. THREE TYPES OF NERVE INJURY. *Brain* **66**, 237–288 (1943).
183. Sunderland, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* **74**, 491–516 (1951).
184. Menorca, R. M. G., Fussell, T. S. & Elfar, J. C. Nerve physiology. Mechanisms of injury and recovery. *Hand Clinics* vol. 29 317–330 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.002> (2013).
185. Lopes, B. *et al.* Peripheral Nerve Injury Treatments and Advances: One Health Perspective. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
186. Moon, L. D. F. Chromatolysis: Do injured axons regenerate poorly when ribonucleases attack rough endoplasmic reticulum, ribosomes and RNA? *Dev Neurobiol* **78**, 1011 (2018).
187. Ellis, A. & Bennett, D. L. H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *Br J Anaesth* **111**, 26–37 (2013).
188. Waller, A. Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philos Trans R Soc Lond* **140**, 423–429 (1850).
189. Adalbert, R. *et al.* Intra-axonal calcium changes after axotomy in wild-type and slow Wallerian degeneration axons. *Neuroscience* **225**, 44–54 (2012).
190. Villegas, R. *et al.* Calcium Release from Intra-Axonal Endoplasmic Reticulum Leads to Axon Degeneration through Mitochondrial Dysfunction. *The Journal of Neuroscience* **34**, 7179 (2014).
191. George, E. B., Glass, J. D. & Griffin, J. W. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci* **15**, 6445–6452 (1995).
192. Avery, M. A. *et al.* WldS prevents axon degeneration through increased mitochondrial flux and enhanced mitochondrial Ca²⁺ buffering. *Curr Biol* **22**, 596–600 (2012).
193. Park, J. Y. *et al.* Mitochondrial swelling and microtubule depolymerization are associated with energy depletion in axon degeneration. *Neuroscience* **238**, 258–269 (2013).
194. Barrientos, S. A. *et al.* Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J Neurosci* **31**, 966–978 (2011).
195. Bernardi, P. *et al.* The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* **273**, 2077–2099 (2006).

196. Martin, S. M., O'Brien, G. S., Portera-Cailliau, C. & Sagasti, A. Wallerian degeneration of zebrafish trigeminal axons in the skin is required for regeneration and developmental pruning. *Development* **137**, 3985–3994 (2010).
197. Zhai, Q. *et al.* Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of Wallerian degeneration. *Neuron* **39**, 217–225 (2003).
198. Shen, H., Hyrc, K. L. & Goldberg, M. P. Maintaining energy homeostasis is an essential component of WldS-mediated axon protection. *Neurobiol Dis* **59**, 69 (2013).
199. Yang, J. *et al.* Regulation of axon degeneration after injury and in development by the endogenous calpain inhibitor calpastatin. *Neuron* **80**, 1175–1189 (2013).
200. Villegas, R. *et al.* Dynamics of degeneration and regeneration in developing zebrafish peripheral axons reveals a requirement for extrinsic cell types. *Neural Dev* **7**, (2012).
201. Vaquié, A. *et al.* Injured Axons Instruct Schwann Cells to Build Constricting Actin Spheres to Accelerate Axonal Disintegration. *Cell Rep* **27**, 3152-3166.e7 (2019).
202. Tetzlaff, W. Tight junction contact events and temporary gap junctions in the sciatic nerve fibres of the chicken during Wallerian degeneration and subsequent regeneration. *J Neurocytol* **11**, 839–858 (1982).
203. Gaudet, A. D., Popovich, P. G. & Ramer, M. S. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* **8**, 110 (2011).
204. Lindborg, J. A., Mack, M. & Zigmond, R. E. Neutrophils are critical for myelin removal in a peripheral nerve injury model of wallerian degeneration. *Journal of Neuroscience* **37**, 10258–10277 (2017).
205. Kennedy, A. D. & DeLeo, F. R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* **43**, 25–61 (2009).
206. Segal, A. W. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **23**, 197–223 (2005).
207. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 519–531 (2011).
208. Taskinen, H. S. & Røyttä, M. The dynamics of macrophage recruitment after nerve transection. *Acta Neuropathol* **93**, 252–259 (1997).
209. Rotshenker, S. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci* **21**, 65–72 (2003).
210. Baichwal, R. R., Bigbee, J. W. & DeVries, G. H. Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1701 (1988).

211. Weinberg, H. J. & Spencer, P. S. The fate of Schwann cells isolated from axonal contact. *J Neurocytol* **7**, 555–569 (1978).
212. Kuhlmann, T., Bitsch, A., Stadelmann, C., Siebert, H. & Brück, W. Macrophages are eliminated from the injured peripheral nerve via local apoptosis and circulation to regional lymph nodes and the spleen. *J Neurosci* **21**, 3401–3408 (2001).
213. Martini, R., Fischer, S., López-Vales, R. & David, S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. *Glia* **56**, 1566–1577 (2008).
214. Brosius, A. *et al.* Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2017) doi:10.1073/pnas.1710566114.
215. Be'eri, H., Reichert, F., Saada, A. & Rotshenker, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: IL-10 and GM-CSF. *European Journal of Neuroscience* **10**, 2707–2713 (1998).
216. La Fleur, M., Underwood, J. L., Rappolee, D. A. & Werb, Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Exp Med* **184**, 2311–2326 (1996).
217. Stoll, G., Jander, S. & Myers, R. R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* **7**, 13–27 (2002).
218. Ransohoff, R. M. Chemokines in neurological disease models: correlation between chemokine expression patterns and inflammatory pathology. *J Leukoc Biol* **62**, 645–652 (1997).
219. Goethals, S., Ydens, E., Timmerman, V. & Janssens, S. Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. *Glia* **58**, 1701–1709 (2010).
220. Tieu, B. C. *et al.* An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest* **119**, 3637–3651 (2009).
221. Chui, R. & Dorovini-Zis, K. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* **7**, 1–12 (2010).
222. Maurer, M. & Von Stebut, E. Macrophage inflammatory protein-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **36**, 1882–1886 (2004).

223. Chen, Z. L., Yu, W. M. & Strickland, S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* **30**, 209–233 (2007).
224. Namgung, U. The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs* **200**, 6–12 (2014).
225. Vargas, M. E. & Barres, B. A. Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* **30**, 153–179 (2007).
226. McKerracher, L. *et al.* Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* **13**, 805–811 (1994).
227. Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R. & Filbin, M. T. A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* **13**, 757–767 (1994).
228. Bähr, M. & Przyrembel, C. Myelin from Peripheral and Central Nervous System Is a Nonpermissive Substrate for Retinal Ganglion Cell Axons. *Exp Neurol* **134**, 87–93 (1995).
229. Schäfer, M., Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M. & Martini, R. Disruption of the gene for the myelin-associated glycoprotein improves axonal regrowth along myelin in C57BL/Wlds mice. *Neuron* **16**, 1107–1113 (1996).
230. Shen, Y. J., DeBellard, M. E., Salzer, J. L., Roder, J. & Filbin, M. T. Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol Cell Neurosci* **12**, 79–91 (1998).
231. Mead, R. J., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Lassmann, H. & Morgan, B. P. The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* **168**, 458–465 (2002).
232. Brück, W., Brück, Y., Diederich, U. & Piddlesden, S. J. The membrane attack complex of complement mediates peripheral nervous system demyelination in vitro. *Acta Neuropathol* **90**, 601–607 (1995).
233. Ramaglia, V. *et al.* The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. *J Neurosci* **27**, 7663–7672 (2007).
234. Brück, W. & Friede, R. L. The role of complement in myelin phagocytosis during PNS wallerian degeneration. *J Neurol Sci* **103**, 182–187 (1991).
235. Vargas, M. E., Watanabe, J., Singh, S. J., Robinson, W. H. & Barres, B. A. Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11993–11998 (2010).

236. Shamash, S., Reichert, F. & Rotshenker, S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* **22**, 3052–3060 (2002).
237. Aguayo, A. J., Peyronnard, J. M. & Bray, G. M. A quantitative ultrastructural study of regeneration from isolated proximal stumps of transected unmyelinated nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* **32**, 256–270 (1973).
238. Miller, R. G. AAEE minimonograph #28: injury to peripheral motor nerves. *Muscle Nerve* **10**, 698–710 (1987).
239. Geraldo, S. & Gordon-Weeks, P. R. Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci* **122**, 3595–3604 (2009).
240. Tuttle, R. & O’Leary, D. D. M. Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol Cell Neurosci* **11**, 1–8 (1998).
241. Goodman, C. S. Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* **19**, 341–377 (1996).
242. Terenghi, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* **194**, 1–14 (1999).
243. Heumann, R. *et al.* Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8735–8739 (1987).
244. Heumann, R., Korsching, S., Bandtlow, C. & Thoenen, H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* **104**, 1623 (1987).
245. Hattori, A. *et al.* Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *FEBS Lett* **340**, 177–180 (1994).
246. Dowsing, B. J. *et al.* Leukemia inhibitory factor is an autocrine survival factor for Schwann cells. *J Neurochem* **73**, 96–104 (1999).
247. HALL, S. Axonal regeneration through acellular muscle grafts. *J Anat* **190**, 57 (1997).
248. Burnett, M. & Zanger, E. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus* **16**, (2004).
249. Guénard, V., Dinarello, C. A., Weston, P. J. & Aebischer, P. Peripheral nerve regeneration is impeded by interleukin-1 receptor antagonist released from a polymeric guidance channel. *J Neurosci Res* **29**, 396–400 (1991).

250. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135–145 (2001).
251. Vabulas, R. M. *et al.* Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* **276**, 31332–31339 (2001).
252. Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* **279**, 12542–12550 (2004).
253. Brunn, G. J., Bungum, M. K., Johnson, G. B. & Platt, J. L. Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *FASEB J* **19**, 1–16 (2005).
254. Karanth, S., Yang, G., Yeh, J. & Richardson, P. M. Nature of signals that initiate the immune response during Wallerian degeneration of peripheral nerves. *Exp Neurol* **202**, 161–166 (2006).
255. Boivin, A. *et al.* Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci* **27**, 12565–12576 (2007).
256. Barclay, A. N. Signal regulatory protein alpha (SIRP α) / CD47 interaction and function. *Curr Opin Immunol* **21**, 47 (2009).
257. Isenberg, J. S., Roberts, D. D. & Frazier, W. A. CD47: A New Target in Cardiovascular Therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 615 (2008).
258. Sarfati, M., Fortin, G., Raymond, M. & Susin, S. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. *Curr Drug Targets* **9**, 842–850 (2008).
259. Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H. & Ohnishi, H. Functions and molecular mechanisms of the CD47–SIRP α signalling pathway. *Trends Cell Biol* **19**, 72–80 (2009).
260. Wood, M. D., Kemp, S. W. P., Weber, C., Borschel, G. H. & Gordon, T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Ann Anat* **193**, 321–333 (2011).
261. Höke, A. & Brushart, T. Introduction to special issue: Challenges and opportunities for regeneration in the peripheral nervous system. *Exp Neurol* **223**, 1–4 (2010).
262. Höke, A. Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans? *Nat Clin Pract Neurol* **2**, 448–454 (2006).
263. Elberg, G. *et al.* Deletion of SIRP α (signal regulatory protein- α) promotes phagocytic clearance of myelin debris in Wallerian degeneration, axon regeneration, and recovery from nerve injury. *J Neuroinflammation* **16**, 1–14 (2019).
264. Chiu, W.-T. *et al.* Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury: Comparisons Between Developed and Developing Countries. *Asia Pac J Public Health* **22**, 9–18 (2010).

265. Thuret, S., Moon, L. D. F. & Gage, F. H. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci* **7**, 628–643 (2006).
266. James, S. L. *et al.* Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* **18**, 56–87 (2019).
267. Cheriyan, T. *et al.* Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord* **52**, 588–595 (2014).
268. Kjell, J. & Olson, L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. (2016) doi:10.1242/dmm.025833.
269. Lilley, E. *et al.* Refining rodent models of spinal cord injury. *Experimental Neurology* vol. 328 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113273> (2020).
270. Kang, Y. *et al.* Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *Journal of Neurorestoration* **6**, 1–9 (2018).
271. Fan, B., Wei, Z. & Feng, S. Progression in translational research on spinal cord injury based on microenvironment imbalance. doi:10.1038/s41413-022-00199-9.
272. Rosenzweig, E. S. & McDonald, J. W. Rodent models for treatment of spinal cord injury: research trends and progress toward useful repair. *Curr Opin Neurol* **17**, 121–131 (2004).
273. Gruner, J. A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma* **9**, 123–128 (1992).
274. Scheff, S. W., Rabchevsky, A. G., Fugaccia, I., Main, J. A. & Lumppp, J. E. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *J Neurotrauma* **20**, 179–193 (2003).
275. Kayalioglu, G. Projections from the Spinal Cord to the Brain. *The Spinal Cord* 148–167 (2009) doi:10.1016/B978-0-12-374247-6.50014-6.
276. Scholpa, N. E. & Schnellmann, R. G. Mitochondrial-based therapeutics for the treatment of spinal cord injury: Mitochondrial biogenesis as a potential pharmacological target. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol. 363 303–313 Preprint at <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244806> (2017).
277. Cregg, J. M. *et al.* Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp Neurol* **253**, 197–207 (2014).
278. Gaudet, A. D. & Fonken, L. K. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* **15**, 554–577 (2018).
279. Bowes, A. L. & Yip, P. K. Modulating inflammatory cell responses to spinal cord injury: all in good time. *J Neurotrauma* **31**, 1753–1766 (2014).

280. Deczkowska, A. *et al.* Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell* **173**, 1073–1081 (2018).
281. Grabert, K. *et al.* Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* **19**, 504–516 (2016).
282. Sousa, C. *et al.* Single-cell transcriptomics reveals distinct inflammation-induced microglia signatures. *EMBO Rep* **19**, (2018).
283. Brennan, F. H. *et al.* Microglia coordinate cellular interactions during spinal cord repair in mice. *Nature Communications* **2022 13:1 13**, 1–20 (2022).
284. Poulen, G. *et al.* Inhibiting microglia proliferation after spinal cord injury improves recovery in mice and nonhuman primates. *Theranostics* **11**, 8640 (2021).
285. Hu, X. *et al.* TAZ Induces Migration of Microglia and Promotes Neurological Recovery After Spinal Cord Injury. *Front Pharmacol* **13**, 938416 (2022).
286. Neirinckx, V. *et al.* Neutrophil contribution to spinal cord injury and repair. *J Neuroinflammation* **11**, 1–9 (2014).
287. Donnelly, D. J. & Popovich, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* **209**, 378–388 (2008).
288. Mei, J. *et al.* Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest* **122**, 974–986 (2012).
289. Ritzman, A. M. *et al.* The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. *Infect Immun* **78**, 4593–4600 (2010).
290. Kolaczowska, E. & Kuberski, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* **13**, 159–175 (2013).
291. Nguyen, G. T., Green, E. R. & Meccas, J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, (2017).
292. Dinkel, K., Dhabhar, F. S. & Sapolsky, R. M. Neurotoxic effects of polymorphonuclear granulocytes on hippocampal primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 331–336 (2004).
293. Bao, Y. & Cao, X. Revisiting the protective and pathogenic roles of neutrophils: Ly-6G is key! *Eur J Immunol* **41**, 2535–2538 (2011).
294. De Castro, R. *et al.* Evidence that infiltrating neutrophils do not release reactive oxygen species in the site of spinal cord injury. *Exp Neurol* **190**, 414–424 (2004).

295. Stirling, D. P., Liu, S., Kubes, P. & Yong, V. W. Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome. *J Neurosci* **29**, 753–764 (2009).
296. Schreiber, A. & Kettritz, R. The neutrophil in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *J Leukoc Biol* **94**, 623–631 (2013).
297. Beck, K. D. *et al.* Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain* **133**, 433–447 (2010).
298. Ankeny, D. P., Lucin, K. M., Sanders, V. M., McGaughy, V. M. & Popovich, P. G. Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis. *J Neurochem* **99**, 1073–1087 (2006).
299. Sroga, J. M., Jones, T. B., Kigerl, K. A., McGaughy, V. M. & Popovich, P. G. Rats and mice exhibit distinct inflammatory reactions after spinal cord injury. *J Comp Neurol* **462**, 223–240 (2003).
300. Luchetti, S. *et al.* Comparison of immunopathology and locomotor recovery in C57BL/6, BUB/BnJ, and NOD-SCID mice after contusion spinal cord injury. *J Neurotrauma* **27**, 411–421 (2010).
301. Wu, L. S., Cheng, W. C. & Shen, C. K. J. Targeted depletion of TDP-43 expression in the spinal cord motor neurons leads to the development of amyotrophic lateral sclerosis-like phenotypes in mice. *J Biol Chem* **287**, 27335–27344 (2012).
302. Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E. & Burakoff, S. J. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3686–3690 (1992).
303. Madsen, J. R. *et al.* Tacrolimus (FK506) Increases Neuronal Expression of GAP-43 and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Rats. *Exp Neurol* **154**, 673–683 (1998).
304. López-Vales, R. *et al.* FK506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* **81**, 827–836 (2005).
305. Ibarra, A. *et al.* Effects of cyclosporin-A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury. *Brain Res* **979**, 165–178 (2003).
306. McMahon, S. S. *et al.* Effect of cyclosporin A on functional recovery in the spinal cord following contusion injury. *J Anat* **215**, 267–279 (2009).
307. Popovich, P. G. & Jones, T. B. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 13–17 (2003).

308. Popovich, P. G., Stokes, B. T. & Whitacre, C. C. *Concept of Autoimmunity Following Spinal Cord Injury: Possible Roles for T Lymphocytes in the Traumatized Central Nervous System. Journal of Neuroscience Research* (1996).
309. Kil, K. *et al.* T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **98**, 201–207 (1999).
310. Zajarias-Fainsod, D. *et al.* Autoreactivity against myelin basic protein in patients with chronic paraplegia. *Eur Spine J* **21**, 964–970 (2012).
311. Meinl, E. *et al.* *Myelin Basic Protein-specific T Lymphocyte Repertoire in Multiple Sclerosis Complexity of the Response and Dominance of Nested Epitopes Due to Recruitment of Multiple T Cell Clones.* (1993).
312. Davies, A. L., Hayes, K. C. & Dekaban, G. A. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* **88**, 1384–1393 (2007).
313. Hayes, K. C. *et al.* Elevated serum titers of proinflammatory cytokines and CNS autoantibodies in patients with chronic spinal cord injury. *J Neurotrauma* **19**, 753–761 (2002).
314. Jones, T. B. *et al.* Passive or active immunization with myelin basic protein impairs neurological function and exacerbates neuropathology after spinal cord injury in rats. *J Neurosci* **24**, 3752–3761 (2004).
315. Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K. & Hickey, W. F. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* **7**, 19–24 (1993).
316. Greenhalgh, A. D. & David, S. Differences in the phagocytic response of microglia and peripheral macrophages after spinal cord injury and its effects on cell death. *J Neurosci* **34**, 6316–6322 (2014).
317. Kroner, A. *et al.* TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron* **83**, 1098–1116 (2014).
318. Giulian, D. & Robertson, C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol* **27**, 33–42 (1990).
319. Blight, A. R. Effects of silica on the outcome from experimental spinal cord injury: implication of macrophages in secondary tissue damage. *Neuroscience* **60**, 263–273 (1994).
320. Rapalino, O. *et al.* Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* **4**, 814–821 (1998).

321. Popovich, P. G. *et al.* Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* **158**, 351–365 (1999).
322. Kigerl, K. A. *et al.* Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *Journal of Neuroscience* **29**, 13435–13444 (2009).
323. Horn, K. P., Busch, S. A., Hawthorne, A. L., Van Rooijen, N. & Silver, J. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J Neurosci* **28**, 9330–9341 (2008).
324. Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **8**, 57–69 (2007).
325. Nauta, A. J. *et al.* Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol* **33**, 2853–2863 (2003).
326. Fleming, J. C. *et al.* The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* **129**, 3249–3269 (2006).
327. van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **128**, 415–435 (1968).
328. Cugurra, A. *et al.* Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma. *Science* (1979) **373**, (2021).
329. Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612–616 (2009).
330. Leuschner, F. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circ Res* **107**, 1364–1373 (2010).
331. Seifert, H. A. *et al.* A transient decrease in spleen size following stroke corresponds to splenocyte release into systemic circulation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **7**, 1017–1024 (2012).
332. Blomster, L. V. *et al.* Mobilisation of the splenic monocyte reservoir and peripheral CX3CR1 deficiency adversely affects recovery from spinal cord injury. *Exp Neurol* **247**, 226–240 (2013).
333. Bronte, V. & Pittet, M. J. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* **39**, 806–818 (2013).
334. Goverman, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **9**, 393–407 (2009).

335. DeVivo, M. J., Kartus, P. L., Stover, S. L., Rutt, R. D. & Fine, P. R. Cause of Death for Patients With Spinal Cord Injuries. *Arch Intern Med* **149**, 1761–1766 (1989).
336. Lucin, K. M., Sanders, V. M., Jones, T. B., Malarkey, W. B. & Popovich, P. G. Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation. *Exp Neurol* **207**, 75–84 (2007).
337. Lucin, K. M., Sanders, V. M. & Popovich, P. G. Stress hormones collaborate to induce lymphocyte apoptosis after high level spinal cord injury. *J Neurochem* **110**, 1409–1421 (2009).
338. Pavlov, V. A., Wang, H., Czura, C. J., Friedman, S. G. & Tracey, K. J. *The Cholinergic Anti-inflammatory Pathway: A Missing Link in Neuroimmunomodulation*. (2003).
339. Ramos-Martínez, I. E., Rodríguez, M. C., Cerbón, M., Ramos-Martínez, J. C. & Ramos-Martínez, E. G. Role of the cholinergic anti-inflammatory reflex in central nervous system diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms222413427> (2021).
340. Fernandez, R. *et al.* Neural reflex regulation of systemic inflammation: potential new targets for sepsis therapy. *Front Physiol* **5**, (2014).
341. Nance, D. M. & Sanders, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* **21**, 736–745 (2007).
342. Berthoud, H. R. & Powley, T. L. Characterization of vagal innervation to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia. *J Auton Nerv Syst* **42**, 153–169 (1993).
343. Rosas-Ballina, M. *et al.* Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science* **334**, 98–101 (2011).
344. Meltzer, J. C. *et al.* Stress-induced suppression of in vivo splenic cytokine production in the rat by neural and hormonal mechanisms. *Brain Behav Immun* **18**, 262–273 (2004).
345. Noble, B. T., Brennan, F. H. & Popovich, P. G. The spleen as a neuroimmune interface after spinal cord injury. *J Neuroimmunol* **321**, 1–11 (2018).
346. Carnevale, D. *et al.* A cholinergic-sympathetic pathway primes immunity in hypertension and mediates brain-to-spleen communication. *Nat Commun* **7**, (2016).
347. Huston, J. M. *et al.* Cholinergic Neural Signals to the Spleen Down-Regulate Leukocyte Trafficking via CD11b. *The Journal of Immunology* **183**, 552–559 (2009).
348. Serhan, C. N., Chiang, N. & Dalli, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol* **27**, 200–215 (2015).
349. Reale, M. & Costantini, E. Cholinergic Modulation of the Immune System in Neuroinflammatory Diseases. *Diseases 2021, Vol. 9, Page 29* **9**, 29 (2021).

350. Nizri, E. *et al.* Novel approaches to treatment of autoimmune neuroinflammation and lessons for drug development. *Pharmacology* **79**, 42–49 (2007).
351. Di Pinto, G. *et al.* Comparative study of the expression of cholinergic system components in the CNS of experimental autoimmune encephalomyelitis mice: Acute vs remitting phase. *Eur J Neurosci* **48**, 2165–2181 (2018).
352. Reale, M. *et al.* Expression Profiling of Cytokine, Cholinergic Markers, and Amyloid- β Deposition in the APPSWE/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease Pathology. *J Alzheimers Dis* **62**, 467–476 (2018).
353. Liu, C. Targeting the cholinergic system in Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin* **41**, 453–463 (2020).
354. Athar, T., Al Balushi, K. & Khan, S. A. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Mol Biol Rep* **48**, 5629–5645 (2021).
355. Deture, M. A. & Dickson, D. W. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **14**, (2019).
356. Merrill, C. A. *et al.* Vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: Additional follow-up results of a pilot study through 1 year. *J Clin Psychiatry* **67**, 1171–1178 (2006).
357. Sharma, S. *et al.* Treatment initiation decisions in newly diagnosed epilepsy-A longitudinal cohort study. *Epilepsia* **61**, 445–454 (2020).
358. Mineur, Y. S. *et al.* Interaction between noradrenergic and cholinergic signaling in amygdala regulates anxiety- and depression-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* **43**, 2118–2125 (2018).
359. Cristancho, P., Cristancho, M. A., Baltuch, G. H., Thase, M. E. & O'Reardon, J. P. Effectiveness and safety of vagus nerve stimulation for severe treatment-resistant major depression in clinical practice after FDA approval: outcomes at 1 year. *J Clin Psychiatry* **72**, 1376–1382 (2011).
360. Terry, A. V. & Callahan, P. M. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors as therapeutic targets in schizophrenia: update on animal and clinical studies and strategies for the future. *Neuropharmacology* **170**, 108053 (2020).
361. Tregellas, J. R. & Wylie, K. P. Alpha7 Nicotinic Receptors as Therapeutic Targets in Schizophrenia. *Nicotine Tob Res* **21**, 349–356 (2019).
362. Iversen, P. O. *et al.* Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood* **96**, 2081–2083 (2000).
363. GTEx Portal. <https://gtexportal.org/home/>.

364. Nava Catorce, M. & Gevorkian, G. *LPS-induced Murine Neuroinflammation Model: Main Features and Suitability for Pre-clinical Assessment of Nutraceuticals*. (2016).
365. Gioannini, T. L. & Weiss, J. P. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* **39**, 249–260 (2007).
366. Miyake, K. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin Immunol* **19**, 3–10 (2007).
367. Tobias, P. S., Soldau, K. & Ulevitch, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* **164**, 777–793 (1986).
368. Wright, S. D., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Ramos, R. A. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* **170**, 1231–1241 (1989).
369. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431–1433 (1990).
370. Cavaillon, J. -M, Fitting, C. & Haeffner-Cavaillon, N. Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *Eur J Immunol* **20**, 253–257 (1990).
371. Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* vol. 42 145–151 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006> (2008).
372. Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M. & Godbout, J. P. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun* **23**, 309–317 (2009).
373. Chen, Z. *et al.* Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci* **32**, 11706–11715 (2012).
374. Banks, W. A. & Robinson, S. M. Minimal Penetration of Lipopolysaccharide Across the Murine Blood-brain Barrier. doi:10.1016/j.bbi.2009.09.001.
375. Elmquist, J. K., Scammell, T. E. & Saper, C. B. Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci* **20**, 565–570 (1997).
376. Serrats, J. *et al.* Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron* **65**, 94–106 (2010).

377. Norden, D. M., Fenn, A. M., Dugan, A. & Godbout, J. P. TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia* **62**, 881–895 (2014).
378. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* **9**, 46–56 (2008).
379. Qin, L. *et al.* Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. *Glia* **55**, 453 (2007).
380. Sy, M. *et al.* Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *American Journal of Pathology* **178**, 2811–2822 (2011).
381. Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T. R., Green, K. N. & LaFerla, F. M. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* **25**, 8843–8853 (2005).
382. Jin, M., Jang, E. & Suk, K. Lipocalin-2 Acts as a Neuroinflammation in Lipopolysaccharide-injected Mice. *Exp Neurol* **23**, 155–162 (2014).
383. Ifuku, M. *et al.* Anti-inflammatory/anti-amyloidogenic effects of plasmalogens in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in adult mice. <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/197> (2012).
384. Sheng, J. G. *et al.* Lipopolysaccharide-induced-neuroinflammation increases intracellular accumulation of amyloid precursor protein and amyloid β peptide in APP^{swe} transgenic mice. *Neurobiol Dis* **14**, 133–145 (2003).
385. Okuyama, S. *et al.* Oenothien B suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in the mouse brain. *Int J Mol Sci* **14**, 9767–9778 (2013).
386. Gabellec, M. M., Griffais, R., Fillion, G. & Haour, F. Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Brain Res Mol Brain Res* **31**, 122–130 (1995).
387. Layé, S., Parnet, P., Goujon, E. & Dantzer, R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* **27**, 157–162 (1994).
388. Norden, D. M., Trojanowski, P. J., Villanueva, E., Navarro, E. & Godbout, J. P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* **64**, 300–316 (2016).

389. Liu, B. & Hong, J. S. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **304**, 1–7 (2003).
390. Wojtera, M., Sikorska, B. & Sobow, T. Microglial cells in neurodegenerative disorders. *Folia Neuropathol* **43**, 311–321 (2006).
391. Masocha, W. Systemic lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation results in different temporal reduction of CD200 and CD200 receptor gene expression in the brain. *J Neuroimmunol* **214**, 78–82 (2009).
392. Lyons, A. *et al.* Decreased neuronal CD200 expression in IL-4-deficient mice results in increased neuroinflammation in response to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* **23**, 1020–1027 (2009).
393. Miller, A.-M. *et al.* Analysis of the Impact of CD200 on Neurodegenerative Diseases. in *Neurodegenerative Diseases - Processes, Prevention, Protection and Monitoring* (InTech, 2011). doi:10.5772/32003.
394. Kern, K. *et al.* CD200 selectively upregulates prostaglandin E2 and D2 synthesis in LPS-treated bone marrow-derived macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **133**, 53–59 (2017).
395. Liu, C., Shen, Y., Tang, Y. & Gu, Y. The role of N-glycosylation of CD200-CD200R1 interaction in classical microglial activation. *Journal of Inflammation (United Kingdom)* **15**, (2018).
396. Jenmalm, M. C., Cherwinski, H., Bowman, E. P., Phillips, J. H. & Sedgwick, J. D. Regulation of Myeloid Cell Function through the CD200 Receptor. *The Journal of Immunology* (2006) doi:10.4049/jimmunol.176.1.191.
397. Zanoni, I. *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868–880 (2011).
398. Kesteman, N., Vansanten, G., Pajak, B., Goyert, S. M. & Moser, M. Injection of lipopolysaccharide induces the migration of splenic neutrophils to the T cell area of the white pulp: role of CD14 and CXC chemokines. *J Leukoc Biol* **83**, 640–647 (2008).
399. Groeneveld, P. H. P. & van Rooijen, N. Localization of intravenously injected lipopolysaccharide (LPS) in the spleen of the mouse. An immunoperoxidase and histochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **48**, 237–245 (1985).
400. Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J. C. & Kuiper, J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* **16**, 379–414 (2003).

401. Seemann, S., Zohles, F. & Lupp, A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *J Biomed Sci* **24**, 1–17 (2017).
402. Liverani, E. *et al.* LPS-induced systemic inflammation is more severe in P2Y12 null mice. *J Leukoc Biol* **95**, 313 (2014).
403. Amo-Aparicio, J., Martínez-Muriana, A., Sánchez-Fernández, A. & López-Vales, R. Neuroinflammation Quantification for Spinal Cord Injury. *Curr Protoc Immunol* 1–15 (2018) doi:10.1002/cpim.57.
404. Harrison, M. *et al.* Vertebral landmarks for the identification of spinal cord segments in the mouse. *Neuroimage* **68**, 22–29 (2013).
405. Bauder, A. R. & Ferguson, T. A. Reproducible Mouse Sciatic Nerve Crush and Subsequent Assessment of Regeneration by Whole Mount Muscle Analysis. *J Vis Exp* (2012) doi:10.3791/3606.
406. Akkaya, M., Akin, M. L., Akkaya, B. & Barclay, A. N. Dissection of Agonistic and Blocking Effects of CD200 Receptor Antibodies. *PLoS One* **8**, (2013).
407. Inserra, M. M., Bloch, D. A. & Terris, D. J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery* **18**, 119–124 (1998).
408. Basso, D. M. *et al.* Basso Mouse Scale for Locomotion Detects Differences in Recovery after Spinal Cord Injury in Five Common Mouse Strains. *J Neurotrauma* **23**, 635–659 (2006).
409. Mancuso, R., Santos-Nogueira, E., Osta, R. & Navarro, X. Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clinical Neurophysiology* **122**, 1660–1670 (2011).
410. Rose, S., Misharin, A. & Perlman, H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry Part A* **81A**, 343–350 (2012).
411. Gómez-López, A. R. *et al.* Evaluation of Myelin Phagocytosis by Microglia/Macrophages in Nervous Tissue Using Flow Cytometry. *Curr Protoc* **1**, e73 (2021).
412. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76–85 (1985).
413. Monteiro, S. *et al.* Splenic sympathetic signaling contributes to acute neutrophil infiltration of the injured spinal cord. *J Neuroinflammation* **17**, 1–14 (2020).
414. Bushnell, B. BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner. <https://www.osti.gov/biblio/1241166> (2014).
415. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. (2010).

416. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Källér, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **32**, 3047–3048 (2016).
417. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
418. Dobin, A. & Gingeras, T. R. Optimizing RNA-Seq Mapping with STAR. *Methods Mol Biol* **1415**, 245–262 (2016).
419. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**, 923–930 (2014).
420. Lê, S., Josse, J. & Husson, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Softw* **25**, 1–18 (2008).
421. Zhu, A., Ibrahim, J. G. & Love, M. I. Heavy-tailed prior distributions for sequence count data: removing the noise and preserving large differences. *Bioinformatics* **35**, 2084–2092 (2019).
422. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27 (2000).
423. Ashburner, M. *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* **25**, 25 (2000).
424. Catenaccio, A. & Court, F. A. Teased Fiber Preparation of Myelinated Nerve Fibers from Peripheral Nerves for Vital Dye Staining and Immunofluorescence Analysis. *Methods Mol Biol* **1739**, 329–337 (2018).
425. Sciatic Nerve Atlas. <https://snat.ethz.ch/>.
426. Griffin, J. W. *et al.* Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *Journal of Neuroimmunology* vol. 40 (1992).
427. Rotshenker, S. Wallerian degeneration : the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* **8**, 109 (2011).
428. Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T. & Muragaki, Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: From inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* **2012**, (2012).
429. Li, Y. H. *et al.* Occurrences and Functions of Ly6Chi and Ly6Clo Macrophages in Health and Disease. *Front Immunol* **13**, (2022).
430. Liu, C. *et al.* Targeting the Shift from M1 to M2 Macrophages in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice Treated with Fasudil. *PLoS One* **8**, 54841 (2013).

431. Zhang, J. *et al.* Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/ TLR4/ NF- κ B pathways in BV2 cells. *Mol Immunol* **116**, 29–37 (2019).
432. Koopman, R., Schaart, G. & Hesselink, M. K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* **116**, 63–68 (2001).
433. Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U. & Falkevall, A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc* **8**, 1149–1154 (2013).
434. de Medinaceli, L., Freed, W. J. & Wyatt, R. J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* **77**, 634–643 (1982).
435. Wu, S., Romero-Ramírez, L. & Mey, J. Retinoic acid increases phagocytosis of myelin by macrophages. *J Cell Physiol* **236**, 3929 (2021).
436. Bogie, J. F. J. *et al.* Stearoyl-CoA desaturase-1 impairs the reparative properties of macrophages and microglia in the brain. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2020).
437. Groeneveld, P. H. P., Erich, T. & Kraal, G. In vivo effects of LPS on B lymphocyte subpopulations. Migration of marginal zone-lymphocytes and IgD-blast formation in the mouse spleen. *Immunobiology* **170**, 402–411 (1985).
438. Hey, Y. Y., Tan, J. K. H. & O’Neill, H. C. Redefining myeloid cell subsets in murine spleen. *Front Immunol* **6**, 1–12 (2016).
439. Wu, F. *et al.* Correlation between elevated inflammatory cytokines of spleen and spleen index in acute spinal cord injury. *J Neuroimmunol* **344**, 577264 (2020).
440. Von Euler, U. S. Adrenergic neurotransmitter functions. *Science* **173**, 202–206 (1971).
441. Brumovsky, P. R. Dorsal root ganglion neurons and tyrosine hydroxylase – An intriguing association with implications for sensation and pain. *Pain* **157**, 314 (2016).
442. Jiang, L. *et al.* CD200Fc reduces TLR4-mediated inflammatory responses in LPS-induced rat primary microglial cells via inhibition of the NF- κ B pathway. *Inflammation Research* **65**, 521–532 (2016).
443. Engeland, C. G., Nielsen, D. V., Kavaliers, M. & Ossenkopp, K. P. Locomotor activity changes following lipopolysaccharide treatment in mice: a multivariate assessment of behavioral tolerance. *Physiol Behav* **72**, 481–491 (2001).

444. Swiergiel, A. H. & Dunn, A. J. Effects of Interleukin-1 β and Lipopolysaccharide on Behavior of Mice in the Elevated Plus-Maze and Open Field Tests. *Pharmacol Biochem Behav* **86**, 651 (2007).
445. Vichaya, E. G. *et al.* Microglia depletion fails to abrogate inflammation-induced sickness in mice and rats. *J Neuroinflammation* **17**, 1–14 (2020).
446. Henn, A. *et al.* The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX* **26**, 83–94 (2009).
447. Li, C., Zhao, B., Lin, C., Gong, Z. & An, X. TREM2 inhibits inflammatory responses in mouse microglia by suppressing the PI3K/NF- κ B signaling. *Cell Biol Int* **43**, 360–372 (2019).
448. Sharif, O., Bolshakov, V. N., Raines, S., Newham, P. & Perkins, N. D. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunol* **8**, 1–17 (2007).
449. Sakai, J. *et al.* Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88. *Sci Rep* **7**, (2017).
450. Šimelyte, E. *et al.* CD200-Fc, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **58**, 1038–1043 (2008).
451. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2017 2:1** **2**, 1–9 (2017).
452. Jay, T. R. *et al.* TREM2 deficiency eliminates TREM2⁺ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* **212**, 287–295 (2015).
453. Vanganswinkel, T. *et al.* Mast cells promote scar remodeling and functional recovery after spinal cord injury via mouse mast cell protease 6. *FASEB J* **30**, 2040–2057 (2016).
454. Nelissen, S. *et al.* Mast cells protect from post-traumatic spinal cord damage in mice by degrading inflammation-associated cytokines via mouse mast cell protease 4. *Neurobiol Dis* **62**, 260–272 (2014).
455. Liu, C. *et al.* DAP12 deletion causes age-related motor function impairment but promotes functional recovery after sciatic nerve crush injury. *Exp Neurol* **360**, 114296 (2023).
456. Barabási, A.-L. & Oltvai, Z. N. NETWORK BIOLOGY: UNDERSTANDING THE CELL'S FUNCTIONAL ORGANIZATION. *Nat Rev Genet* **5**, 0–1 (2004).

457. Nguyen, H. X., Beck, K. D. & Anderson, A. J. Quantitative assessment of immune cells in the injured spinal cord tissue by flow cytometry: A novel use for a cell purification method. *Journal of Visualized Experiments* (2011) doi:10.3791/2698.
458. Ritzel, R. M. *et al.* CD200-CD200R1 inhibitory signaling prevents spontaneous bacterial infection and promotes resolution of neuroinflammation and recovery after stroke. *J Neuroinflammation* **16**, 1–16 (2019).
459. Poulen, G. *et al.* Inhibiting microglia proliferation after spinal cord injury improves recovery in mice and nonhuman primates. *Theranostics* **11**, 8640 (2021).
460. Bellver-Landete, V. *et al.* Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat Commun* **10**, (2019).
461. Hu, X. *et al.* TAZ Induces Migration of Microglia and Promotes Neurological Recovery After Spinal Cord Injury. *Front Pharmacol* **13**, (2022).
462. Kapellos, T. S. *et al.* A novel real time imaging platform to quantify macrophage phagocytosis. *Biochem Pharmacol* **116**, 107–119 (2016).
463. El-Brolosy, M. A. & Stainier, D. Y. R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* **13**, (2017).
464. Powell, D., Affuso, O. & Chen, Y. Weight change after spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* **40**, 130 (2017).
465. Gater, D. R. Weight after SCI: the good, the bad and the ugly. *J Spinal Cord Med* **40**, 138 (2017).
466. Landry, E., Frenette, J. & Guertin, P. A. Body weight, limb size, and muscular properties of early paraplegic mice. *J Neurotrauma* **21**, 1008–1016 (2004).
467. Primeaux, S. D., Tong, M. & Holmes, G. M. Effects of chronic spinal cord injury on body weight and body composition in rats fed a standard chow diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, 1102–1109 (2007).
468. Zeraatpisheh, Z. *et al.* A New and Simple Method for Spinal Cord Injury Induction in Mice. *Basic Clin Neurosci* **13**, 47 (2022).
469. Shechter, R. *et al.* Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus. *Immunity* **38**, 555–569 (2013).
470. Brommer, B. *et al.* Spinal cord injury-induced immune deficiency syndrome enhances infection susceptibility dependent on lesion level. *Brain* **139**, 692–707 (2016).
471. Prüss, H. *et al.* Spinal cord injury-induced immunodeficiency is mediated by a sympathetic-neuroendocrine adrenal reflex. *Nat Neurosci* **20**, 1549–1559 (2017).

472. Saghazadeh, A. & Rezaei, N. The role of timing in the treatment of spinal cord injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **92**, 128–139 (2017).
473. Le, C. S. *et al.* CD200Fc Improves Neurological Function by Protecting the Blood–brain Barrier after Intracerebral Hemorrhage. *Cell Transplant* **28**, 1321–1328 (2019).
474. Huang, R. *et al.* CD200Fc Attenuates Retinal Glial Responses and RGCs Apoptosis After Optic Nerve Crush by Modulating CD200/CD200R1 Interaction. *J Mol Neurosci* **64**, 200–210 (2018).
475. Voulgaraki, D. *et al.* Multivalent recombinant proteins for probing functions of leucocyte surface proteins such as the CD200 receptor. *Immunology* **115**, 337 (2005).