

“La sobreexpresión del
inmunoreceptor CD300f tiene
un rol neuroprotector frente a
una lesión cerebral
excitotóxica.”

Tutor: Hugo Peluffo Zavala

Tesis de grado de Licenciatura en Bioquímica Daniela Alí Ruiz

Departamento de Histología y Embriología. Facultad de Medicina, UDELAR, *Montevideo, Uruguay.*

Laboratorio de Neurodegeneración. Institut Pasteur de Montevideo, *Montevideo, Uruguay.*

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Receptores leucocitarios en el Sistema Inmune, y en el cerebro.....	6
1.1 Receptores inhibitorios.....	8
1.2 Receptores activadores.....	9
2. Familias de Receptores inmunes en células mieloides.....	12
2.1 Familia IREM/CD300.....	12
2.1.1 IREM-1/CD300f.....	14
OBJETIVOS.....	17
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Producción de hCD300f-IgG2a y rCD300f-IgG2a.....	20
Cultivos celulares Primarios.....	20
Animales, lesiones excitotóxicas y sobreexpresión transgénica.....	21
PCR en tiempo real.....	22
Procedimientos histológicos, inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos.....	22
Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	24
Expresión de él o de los ligandos de hCD300f in vitro e in vivo.....	25
Expresión de él o de los ligandos de rCD300f in vitro e in vivo.....	28
Expresión del receptor rCD300f en las células del SNC.....	31
La sobreexpresión de hCD300f es neuroprotectora después de una lesión cerebral aguda.....	33
La sobreexpresión de rCD300f es neuroprotectora después de una lesión cerebral aguda.....	35
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	41
REFERENCIAS.....	44

Resumen

Es bien sabido que algunos receptores inmunes en la superficie celular juegan un rol crítico en regular las respuestas inmunes y el proceso inflamatorio en el Sistema Nervioso Central (SNC). Nosotros hemos analizado la función del recientemente descrito inmunoreceptor CD300f en un modelo de daño cerebral agudo en rata. Primero, para explorar la presencia de el o los ligandos endógenos para este receptor utilizamos una proteína soluble humana (CD300f-Ig) y microscopía confocal. Lo que se observó fue un marcaje específico principalmente en la sustancia blanca del SNC y en la superficie de oligodendrocitos y ciertos astrocitos (solo observado in vitro).

Luego se demostró en un modelo in vivo de daño cerebral excitotóxico en rata, que la sobreexpresión del CD300f humano (hCD300f), induce una reducción significativa en el volumen de lesión. De modo de validar estos resultados, el grupo de Joan Sayos de Inmunología que trabaja en España (grupo con el cual trabajamos en colaboración), clonó el ortólogo de CD300f de rata (rCD300f). La sobreexpresión del receptor rCD300f en rata después de un daño cerebral agudo, tiene un efecto neuroprotector comparable al de hCD300f. Los resultados obtenidos por medio de la microscopía confocal, utilizando la proteína de fusión soluble de rata, (rCD300f-Ig) fueron similares a los patrones de marcaje que se obtuvieron con la proteína de fusión soluble hCD300f-Ig.

Se analizó el patrón de expresión del receptor CD300f en células cerebrales por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e inmunohistoquímica. Lo que se detectó fue la expresión del receptor CD300f en microglia tal cual se esperaba, pero también en oligodendrocitos y en neuronas. Todos estos datos sugieren que el rol neuroprotector de CD300f podría ser el resultado de una compleja red de interacciones celulares.

1. RECEPTORES LEUCOCITARIOS EN EL SISTEMA INMUNE, Y EN EL CEREBRO

El sistema inmune ha surgido de manera de poder discriminar entre lo propio y lo extraño. En los vertebrados es el sistema más complejo a lo largo de todos los organismos y está organizado en distintas capas de defensa que van aumentando su especificidad. Sin embargo algunos organismos unicelulares como las bacterias, poseen sistemas enzimáticos que los protegen de agentes patógenos como ser los virus.

La primer capa de defensa está constituida por barreras físicas y químicas que previenen la entrada de los patógenos al organismo. Cuando un patógeno rompe estas barreras, el sistema inmune innato genera una respuesta no duradera y no específica pero si inmediata, constituida por mecanismos humorales y celulares. Los mecanismos humorales incluyen la secreción de mediadores inflamatorios y proteínas que pertenecen al sistema del complemento[1, 2]. Contrariamente los mecanismos celulares requieren la activación de células efectoras, principalmente granulocitos, macrófagos y células Natural Killer. Estas células inician una respuesta rápida de manera de controlar la dispersión del patógeno y la proliferación antes de generar una respuesta específica. Las células del sistema inmune innato eliminan patógenos, células tumorales o células infectadas, a través de fagocitosis, de liberación enzimática, o por procesos de lisis celular. Este tipo de respuestas suceden por los receptores de las células mieloides que reconocen determinados patrones. Estos receptores no clonales reconocen componentes que están conservados a lo largo de grandes grupos de patógenos y son los llamados pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Estos receptores también tienen la capacidad de reconocer señales de alarma generadas por células dañadas, lesionadas o estresadas [3, 4]. Las células Natural Killer (NK), a pesar de su origen linfóide, también participan en la inmunidad innata, teniendo especial importancia en la defensa contra virus y células tumorales[5]. Las células del sistema inmune innato también son mediadores importantes en la activación de la respuesta inmune adaptativa que representa la tercer y más sofisticada capa de defensa en los vertebrados[6]. Esta respuesta está basada en la selección y expansión de linfocitos T y B que expresan receptores clonales en su superficie celular [7]. La gran diversidad de estos receptores garantiza el reconocimiento de antígenos extraños o no-propios. Consecuentemente, el sistema inmune adaptativo es capaz de generar respuestas adaptadas a patógenos específicos o a células anormales. La habilidad de llevar a cabo esta respuesta es mantenida por medio del hospedero que tiene la capacidad de generar memoria que es mantenida luego de la exposición del patógeno y de su eliminación. Esto permite al sistema inmune adaptativo generar una respuesta más rápida y fuerte cada vez que se vuelve a encontrar con el mismo antígeno.

Una respuesta inmune apropiada involucra un balance óptimo entre la participación de todos los componentes mencionados anteriormente. Cuando uno o más de los componentes del sistema inmune están inactivados o no llegan al umbral de la activación ocurre la inmunodeficiencia. Consecuentemente tumores malignos y/o patógenos están peligrosamente dispersados en el

organismo conduciendo enfermedades específicas. Pero por otro lado; cuando la respuesta inmune es exacerbada o bien una vez que se encuentra activada no puede volver a la situación normal, genera desordenes autoinmunes, hipersensibilidades o aparecen alergias [7].

La inmunidad es conducida por señales positivas y negativas enviadas por receptores activadores o inhibidores de las superficies de todas las células del sistema inmune. Estos receptores son responsables de la correcta transducción de información del entorno que los rodea, al interior de la célula. El balance de la señal generada por receptores individuales en una célula es lo que define este estado de activación el cual va de un rango de anergia a hiperactivación.

En la interacción con sus ligandos, alguno de estos receptores actúan reclutando tirosinas quinasas citoplasmáticas activando la fosforilación, de modo de conducir a la diferenciación celular, crecimiento y supervivencia, adhesión, migración, fagocitosis, producción de citoquinas, y/o citotoxicidad. En contraste otros receptores regulan negativamente las señales de activación reduciendo la duración y/o la intensidad a través de mecanismos complejos y altamente controlados. Los receptores inhibidores no solo son importantes para la terminación de la respuesta inmune. Ellos son cruciales en las señales “off” que garantizan la tolerancia a lo propio y previenen la excesiva activación de las células inmunes inclusive cuando la activación tiende a prevalecer. Esto es de especial importancia en las células involucradas en la respuesta de la inmunidad innata, dado que las NK, las células mieloides, y otras células efectoras que reconocen lo propio no se someten a un proceso de eliminación durante la maduración [8].

Cada célula expresa simultáneamente diferentes receptores activadores e inhibidores, lo que le confiere complementariedad y mecanismos alternativos para controlar la activación en respuesta a diferentes ligandos. Generalmente los receptores activadores e inhibidores reconocen diferentes ligandos, pero en algunos casos los receptores activadores e inhibidores con alta homología en sus regiones extracelulares pueden reconocer el mismo ligando aunque con distinta afinidad [9].

Tanto los receptores activadores como inhibidores están compuestos por un número variable de dominios extracelulares, una región transmembrana y una cola citoplasmática. Características estructurales basadas en la región extracelular determinan la clasificación de estos receptores en dos superfamilias morfológicamente diferentes: la superfamilia tipo-inmunoglobulinas y la superfamilia de Lectina tipo C [10, 11].

Los receptores de los leucocitos y muchas de las moléculas involucradas en los pasos tempranos de su traducción de señales están presentes en células de origen mieloide, pero que se encuentran en distintos tejidos; ese es el caso de la microglia y los osteoclastos.

Las células microgliales son los macrófagos del sistema nervioso central, pero no solo se encargan de la respuesta inmune sino que también participan en la preservación de la homeostasis del cerebro. Las células microgliales derivan de las células hematopoyéticas de la médula ósea las

cuales luego adquieren la etapa de monocitos y migran al cerebro, donde finalmente se diferencian en microglia [12]. Las células de la microglia están a cargo de la eliminación de neuronas dañadas, plaquetas amiloides y agentes infecciosos. Como los macrófagos, la microglia utiliza la fagocitosis para llevar a cabo su objetivo. Sin embargo estas células también tienen la capacidad de llevar a cabo las respuestas por medio de efectos citotóxicos de dos maneras diferentes. Primero secretando aspartato y glutamato que específicamente eliminan las neuronas lesionadas a través de procesos mediados por los receptores N-metil D-ácido aspártico (NMDA), y segundo liberando gran cantidad de proteasas y especies reactivas de oxígeno en un proceso conocido como respiración forzada. También contribuyen con la respuesta inmune comportándose como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T que migran hacia el cerebro durante el proceso inflamatorio. El efecto homeostático de la microglia, tiene funciones como ser la inducción de la apoptosis en subpoblaciones de neuronas específicas, el control de la sinaptogenesis, la síntesis de factores neurotróficos, la regulación de la transmisión sináptica, y la promoción de la proliferación de las células endoteliales para el mantenimiento vascular. Además, para una correcta función del sistema nervioso las células microgliales necesitan establecer finas comunicaciones con otras células de la glia como ser los oligodendrocitos y astrocitos[13, 14].

1.1 RECEPTORES INHIBITORIOS

Los receptores inhibidores se distribuyen a lo largo de las regiones citoplasmáticas con motivos basados en tirosina que sirven como sitios de unión para las moléculas de señalización. Dentro de estos receptores se encuentran los motivos ITIM (Immune Receptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), cuya secuencia canónica es V/I/LxYxxL/V, donde x representa cualquier aminoácido [15, 16]. La función inhibitoria de algunos receptores ha sido deducida en base a la presencia de ITIMs citoplasmáticos en su secuencia.

Los ITIMs originalmente fueron definidos como secuencias que contienen tirosina en la cola citoplasmática de los FcGR11b, los cuales causan la inhibición de la activación de las células B, debido a la relación con el BcR (receptores de células B) [17]. Luego la caracterización funcional de un receptor inhibidor KIR (Killer Ig-Receptor), demostró que las fosfotirosinas de los ITIMs tenían la capacidad de unirse a fosfatasa que eran responsables de los efectos inhibitorios observados [18]. Actualmente se ha establecido que luego de la unión del receptor con su ligando, los residuos de las tirosinas de los ITIMs se fosforilan, a menudo por la familia Src tirosina quinasa lo que genera un sitio de anclaje para la SHP-1, SHP-2 y SHIP [19]. Una vez reclutada la tirosina fosfatasa se transforma en activa y desfosforila los mediadores de señalización en una señal en cascada.

Los receptores inhibitorios y el proceso de inhibición no son tan fáciles de evidenciar dado que la función de SHP y/o SHIP en los receptores que contienen ITIM se desconoce en la mayoría de los casos. Un gran número de receptores inhibitorios, presentan múltiples motivos ITIM en su región

citoplasmática, lo cual genera un aumento en el número y en las posibles combinaciones de moléculas que se pueden unir simultáneamente al receptor, y en algunos casos ITIM coexiste con motivos activadores [20, 21]. Además el estado de fosforilación de ITIM es variable y no siempre se lleva a cabo la fosforilación de todos los residuos de tirosina contenidos en estos motivos. Se ha encontrado que algunos receptores tipo PIR-B o LAIR-1/CD305 se encuentran constitutivamente fosforilados y asociados a las fosfatasas [22, 23]. Algunos receptores con función inhibitoria reclutan fosfatasas a través de las tirosinas fosforiladas que no poseen los motivos ITIM característicos.

Invariably las fosfatasas reclutadas por medio de los receptores inhibidores bloquean las señales activadoras interfiriendo en los pasos iniciales de la respuesta activadora de modo de evitar los pasos subsecuentes. Sin embargo, la inhibición mediada por ITIM es local y transitoria.

La regulación negativa de la función inmune es principalmente mediada por fosfatasas de tirosinas, pero además puede ser mediada por otras moléculas como ser las Csk (c-Src Tirosin Quinasa), Cbl (Casitas B-Linfoma Linaje) o DOK (Downstream of Kinase), las cuales proveen maneras complementarias de interferir con la activación celular.

1.2 RECEPTORES ACTIVADORES

La activación en el sistema inmune tiene lugar a través de complejos oligoméricos en la superficie celular. Estos complejos comparten una arquitectura similar a la de los receptores de antígeno, los anticuerpos. Los receptores activadores, los cuales constituyen estructuras de reconocimiento de ligandos en el oligómero, muestran pequeñas colas citoplasmáticas, las cuales carecen de motivos de señalización; presentan dominios extracelulares mínimos y no se piensa que tengan la capacidad de unirse a los ligandos por sí mismos. La asociación entre los receptores y las moléculas adaptadoras ocurre a través de puentes salinos que integran las membranas afectando los residuos básicos en el receptor (lisina o arginina) y los residuos ácidos en la proteína adaptadora (ácido aspártico). Los adaptadores tienen la capacidad de mediar la traducción de señales mediante módulos basados en tirosina presentes en las colas citoplasmáticas. Dos tipos de proteínas transmembrana adaptadoras han sido descritas: las proteínas adaptadoras de ITAM y el adaptador PI3K asociado a DAP-10 (adaptador de proteínas DNAX de 10kDa) [5, 24].

En la agregación de los receptores activadores de la superficie celular, las tirosinas quinasas pertenecientes a la familia Src, se activan permitiendo la fosforilación de ITAM. Esto permite al tándem de proteínas SH2 tirosinas quinasas de la familia de las Syk (Syk y ZAP-70), ser reclutadas por la membrana celular y transformarse en activas [24]. Syk y ZAP-70 juegan roles principales en los eventos tempranos de señalización por fosforilación crucial incluyendo proteínas adaptadoras LAT (linker for activation T cells), SLP-76 (SH2-containing leukocyte proteins of 76 kDa) y BLNK (B-cell linker protein). La principal función de estos adaptadores reside en la capacidad de

promover los sitios de anclaje para las moléculas de señalización intracelular tipo Grb-2, PLC γ , PI3K, Cbl, 3BP2 y Vav [25]. La señalización a través de DAP-10 requiere la fosforilación de las tirosinas de los motivos YxNM por medio de las quinasas Src, pero eventos subsecuentes son independientes de la familia de las quinasas SyK [26]. Las vías de señalización de DAP-10 incluyen PI3K, Grb-2, la familia de Rho de las GTPasas y las moléculas PLC γ [24]. Tanto la señalización dependiente de ITAM como la dependiente de DAP-10 convergen en una vía común que involucra la activación de Rac, la cual subsecuentemente conduce a la activación de las vías de MAPK constituidas por PAK (quinasa activadora de p-21), MEK (activadora de mitogen o proteína quinasa de regulación de la señal extracelular), y las quinasas ERK (quinasa reguladora de señalización extracelular) (Fig. I). Ambas vías de señalización de activación a menudo conducen a la activación de factores de transcripción, incluyendo los ELK-1 (Ets tipo gen-1), AP1 (proteína activadora 1), NFAT (Factor nuclear de células T activadas) y NF-kB, los cuales transcriben genes que codifican para moléculas pro-inflamatorias tipo citoquinas y moléculas de la superficie celular [27].

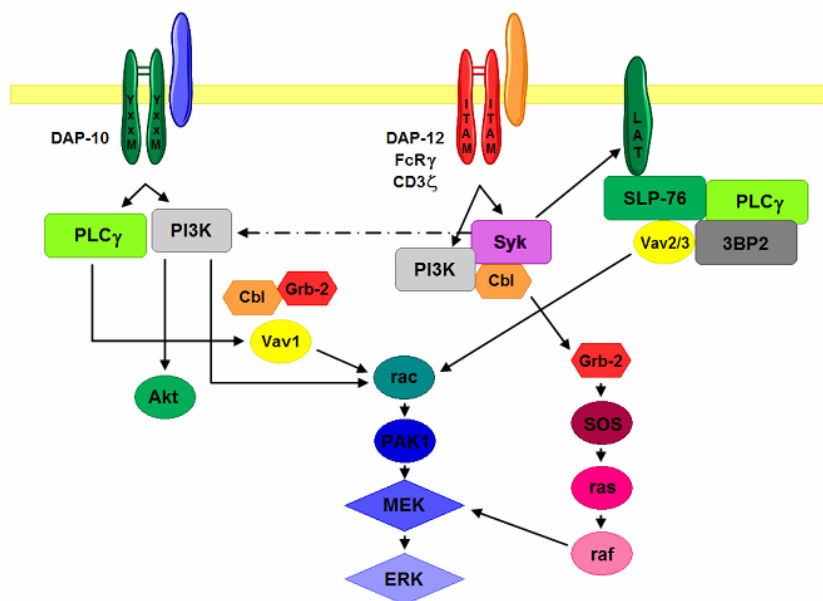


Figura I: Vías de señalización provocadas por la activación de los receptores inmunes. Representación esquemática de la traducción de señales sobre la participación de los receptores oligoméricos activadores junto a los polipéptidos de unión a ITAM (DAP-12, FcR γ , y CD3 ζ) y DAP-10 (Figura obtenida de la Tesis de Doctorado de Águeda Martínez Barriocanal, UPF, Barcelona).

Los receptores activadores inmunes pertenecen evolutivamente a dos superfamilias de proteínas, las inmunoglobulinas y las Lectinas de tipo C, las cuales no solo difieren en la secuencia primaria y su estructura terciaria sino también en la orientación y en los dominios transmembrana. El extremo N-terminal está localizado en el espacio extracelular de la familia de los receptores de las inmunoglobulinas (proteínas de membrana de tipo I), mientras que el mismo se localiza en el citoplasma para los receptores de Lectinas de tipo C (proteínas de membrana de tipo II). A pesar de esta diferencia los dominios transmembrana de todos estos receptores poseen un residuo básico (lisina o arginina), el cual sorprendentemente se posicionan a la misma distancia de la superficie externa de la célula. Este residuo básico permite que los receptores activadores se asocien con los polipéptidos de señalización que poseen un residuo ácido transmembrana, el cual invariablemente corresponde a ácido aspártico. Curiosamente la proteína adaptadora DAP-12 posee una gran preferencia a la arginina sobre la lisina y consistentemente, todos los receptores se combinan con proteínas adaptadoras transmembrana que poseen arginina en su dominio transmembrana.

El residuo cargado en los polipéptidos de señalización está localizado cerca del centro (DAP-10 o DAP-12) o en el tercio superior del dominio transmembrana uniéndose a los residuos transmembrana básicos en los receptores activadores [28, 29]. Los polipéptidos adaptadores son todos dímeros vinculados por puentes disulfuro. La dimerización de estas moléculas se cree que ocurre de modo de amplificar la señal activadora dado que el cluster de los motivos basados en tirosina constituye un eficiente modo de aumentar las concentraciones locales de moléculas de señalización intracelular [30].

2. FAMILIAS DE RECEPTORES INMUNES EN CÉLULAS MIELOIDES

Las células mieloides cuentan con receptores con objetivos funcionales diferentes: receptores con patrones de reconocimiento de patógenos y con respuestas que estimulan la inmunidad innata; receptores para la fagocitosis; receptores para la migración dentro de los tejidos; receptores de citoquinas y quimioquinas para la respuesta humoral; moléculas accesorias para la activación de las células T; receptores Fc y del complemento para actuar contra los patógenos y antígenos externos y receptores que modulan la función de las células mieloides [31, 32].

La mayoría de los receptores inmunes pertenecen a familias multigénicas incluyendo miembros activadores e inhibidores, organizados en clusters en el genoma. Los receptores inhibidores y activadores son similares en la región extracelular, pero difieren en la región transmembrana y los dominios citoplasmáticos que le confieren propiedades de señalización opuestas. Como hemos dicho, con respecto a la región extracelular, los receptores pueden ser clasificados en dos grupos diferentes: la superfamilia tipo Ig y la superfamilia Lectina tipo C. Describiré alguna de las familias de los receptores que regulan la función en las células mieloides y pertenecen a la superfamilia tipo Ig.

2.1 FAMILIA IREM/CD300

Los receptores inmunes IREM/CD300 pertenecen a la superfamilia tipo Ig de receptores descrita más recientemente, y sus genes están en clusters en el genoma como se observa para otros receptores inmunes. El termino IREM proviene de Immune Receptor Expressed by Myeloid cells (receptor inmune expresado por células mieloides), y fue asignado a la expresión restringida de patrones observados en los receptores de la familia.

El cluster humano de los receptores está localizado en el cromosoma 17 (17q25.1) y se expande aproximadamente 250 kb (Fig. II). El locus está compuesto por dos genes que codifican para receptores inhibidores (IRp60/CD300a e IREM-1/CD300f), dos genes que codifican para los receptores activadores (IREM-2/CD300e e IREM-3/CD300b) y dos genes que codifican para receptores con características que hacen que su clasificación sea incierta (CMRF-35/CD300c e IREM-4/CD300d). Si se observa en detalle dos sets de genes pueden ser establecidos basados en la estructura de las proteínas codificadas. Lo que sugiere que la familia ha evolucionado por medio de la duplicación génica y la inversión.

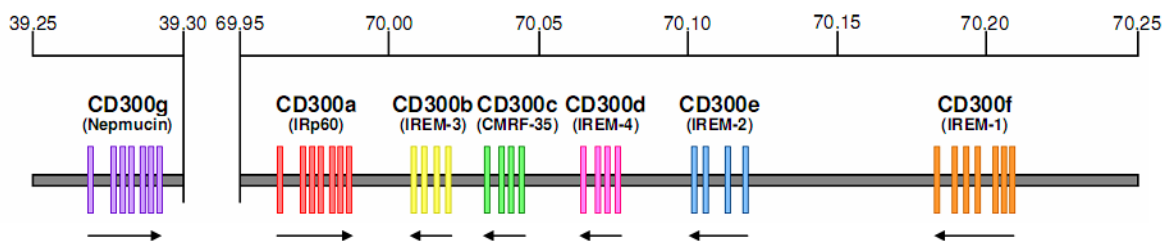


Figura II: Organización genómica del locus de IREM/CD300 en la región cromosómica humana 17q25.1. Las distancias a lo largo del cromosoma están representadas en Mb. La orientación de los genes está indicada con flechas. Cada uno de los exones de los genes está representado por colores diferentes (Figura obtenida de la Tesis de Doctorado de Águeda Martínez Barriocanal, UPF, Barcelona).

El receptor Humano IREM/CD300 tiene su homólogo murino en el cluster CLM/CD300L. Contiene nueve miembros y está localizado en el cromosoma 11 de ratón (11E2), el cual es sintético al cromosoma 17 [20, 21]. (Fig. III). El cluster de CLM/CD300 es mucho más complejo y diverso que el locus humano, sugiriendo que las etapas evolutivas han sido diferentes entre ambas especies.

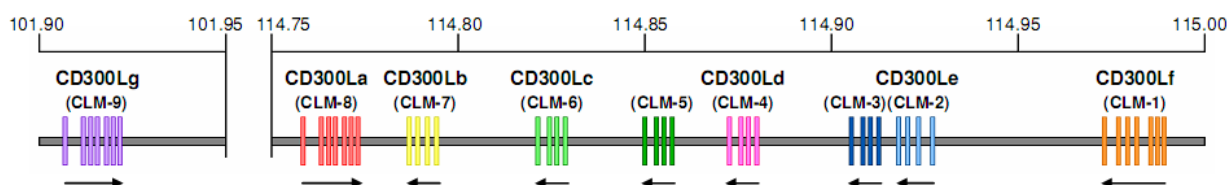


Figura III: Organización genómica del locus de CLM/CD300 en la región cromosómica de ratón 11E2. Las distancias a lo largo del cromosoma están representadas en Mb. La orientación de los genes está indicada con flechas. Cada uno de los exones de los genes está representado por colores diferentes (Figura obtenida de la Tesis de Doctorado de Águeda Martínez Barriocanal, UPF, Barcelona).

Todos los miembros en la familia humana y murina son proteínas transmembrana de tipo I compartiendo el mismo dominio arquitectónico (desde el extremo N-terminal al C-terminal): el cual es un péptido señal, un dominio simple de inmunoglobulina, una región próxima a membrana, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática.

La mayoría de los receptores de la superfamilia tipo Ig son estructuras relativamente complejas por la presencia de dominios extracelulares múltiples. Sin embargo hay un pequeño grupo de estructuras más simples en las cuales los receptores IREM/CD300 están incluidos.

El dominio de inmunoglobulina de los receptores IREM/CD300 es del tipo V, dado que está determinado por la larga distancia entre los dos residuos de cisteína conservados (el cual es

suficiente para acomodar las nueve cadenas β antiparalelas); y los residuos de arginina y de ácido aspártico forman los puentes salinos entre las cadenas β D y F (involucrados en la estabilización de Ig). Los miembros de IREM/CD300 presentan un segundo par de residuos de cisteína, los que también se encuentran presentes en los receptores TREM2 y NKp44, los cuales han sido propuestos como un grupo discreto de receptores que evolucionan de un ancestro en común, el dominio tipo-V [33]. La mayoría de los receptores IREM/CD300 comparten uno o dos sitios de N-glicosilación en el dominio Ig. Solo IREM-3/CD300b en el receptor humano y CLM-1/CD300Lf, CLM-3, CLM-5 y CLM-9/CD300Lg en los ratones, carecen del sitio aceptor N-glicosilación.

A lo largo de los receptores IREM/CD300, las regiones transmembrana y citoplasmáticas varían. Miembros inhibitorios presentan regiones transmembrana neutrales pero presentan largas colas citoplasmáticas con motivos de señalización basados en tirosina, mientras que los receptores activadores presentan un residuo aminoacídico cargado positivamente en el dominio transmembrana en combinación con una cola citoplasmática corta. Como se ha mencionado la presencia de cargas positivas en los receptores predice la asociación con proteínas adaptadoras transmembrana de unión a ITAM o las proteínas adaptadoras a DAP 10 asociadas a PI3K. Pero el significado funcional de las cargas negativas en el dominio transmembrana de los receptores no se conoce, dado que no se han descrito proteínas adaptadoras con carga electrostática opuesta.

2.1.1 IREM-1/CD300f

IREM-1/CD300f es un receptor transmembrana, glucoprotéico de tipo I compuesto por un dominio Ig de simple V, una región próxima a la membrana, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático con cinco residuos de tirosina. Y 205 y 249 están en el contexto de los motivos ITIMs, mientras que Y236 e Y263 constituyen sitios de acoplamiento para p85 α , la subunidad reguladora PI3K. Y236 es de hecho un motivo mixto, dado que es también el consenso del reclutamiento de Grb-2 [19, 34].

El gen se expande 19kb y está compuesto por nueve exones que dan lugar a cuatro variantes de splicing pero solo una proteína madura ha sido detectada.

Estructuralmente IREM1/CD300f se asemeja a receptores inhibitorios pero tiene las características funcionales de un receptor dual. Tiene la capacidad tanto de transducir señales activadoras como inhibitoras (Fig. IV). La inhibición ocurre a través del reclutamiento de la fosfatasa SHP-1. La Tirosina 205 es esencial para la unión de SHP-1, pero Y249 e Y284 también se necesitan para la función inhibitoria de IREM-1. La activación ha sido observada cuando los motivos ITIM, y los motivos distales de tirosina no están. Tanto Y236 e Y263 tiene la capacidad de unir individualmente p85 α , pero la primera tiene un mayor efecto en el reclutamiento. Además el receptor IREM1/CD300f tiene la capacidad de interactuar con Grb-2, se cree que a través de Y263. En las células mieloides, la cola citoplasmática de IREM1/CD300f tiene la capacidad de

unirse a SHP-1 y p85 α , pero no a SHP-2 y/o SHIP. En este escenario, se ha encontrado que la fosforilación de p85 α es regulada por el reclutamiento de SHP-1 [19, 34].

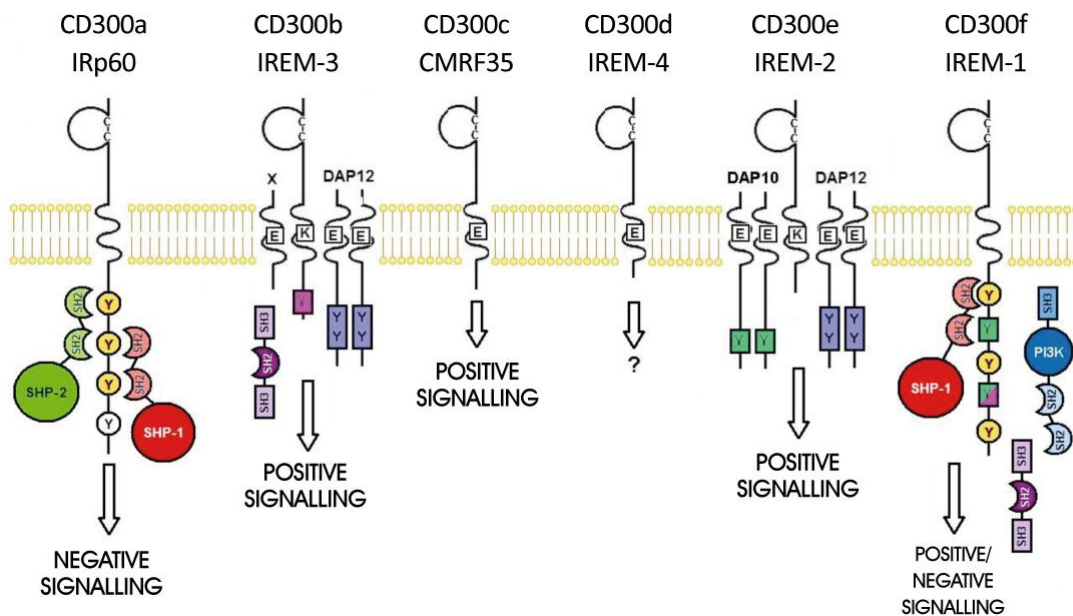


Figura IV: Distintos miembros de receptores inmunes CD300 y sus cascadas de señalización.

Con respecto a las funciones de los receptores, el tipo de proceso de inflamación y la duración de la misma van a estar determinados por el balance entre las señales de activación y de inhibición producidas por los receptores inmunes de la superficie celular. A nivel del Sistema Nervioso Central las reacciones inmunes e inflamatorias están involucradas en la iniciación, la propagación y la terminación de diferentes tipos de lesiones crónicas y agudas. Se ha descrito que muchos receptores inmunes juegan un rol en el mantenimiento de la homeostasis, y también participan en las lesiones del SNC. Por ejemplo, CD200 y CD200R se expresan en neuronas y en la microglia, respectivamente; e inducen señales de “inactivación” en las células de la microglia. Otro ejemplo es el receptor activador que se expresa en células mieloides de tipo 2 (TREM2), el cual posee un rol neuroprotector en el SNC. Se han utilizado ratones con encefalitis autoinmune experimental (EAE), los cuales se utilizan como modelo de inflamación cerebral, en el cual aparecen focos de desmielinización esparcidos en el SNC, causados por el ataque del sistema inmunitario contra la vaina de mielina. El uso de anticuerpos antibloqueantes contra TREM2 en dichos ratones, genera una mejora en la enfermedad; mientras que la presencia de células mieloides expresando TREM2 reducen la inflamación.

Acerca del receptor de nuestro interés el IREM1/CD300f, hay poca información con respecto al rol que cumple en humanos. Muy recientemente se ha demostrado que en ratones knock-out para el CD300f (mCD300f/CLM1), en los cuales se induce EAE; presentan una respuesta en la cual hay un aumento neuropatológico. Concordantemente, se nota un fenotipo desmejorado cuando estos

misimos autores, administran una proteína de fusión soluble mCD300f-IgG a animales wild type con EAE [35]. En nuestro trabajo nos centramos en caracterizar la presencia de los ligandos desconocidos de CD300f en el SNC, la expresión de CD300f en las células del SNC, y el posible rol neuroprotector de CD300f después de un daño cerebral agudo.

Objetivo General

Llevar a cabo el estudio del receptor inmune CD300f/IREM1 a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), de manera de determinar que células lo expresan, que células expresan su ligando y que sucede cuando se sobreexpresa dicho receptor en una lesión cerebral excitotóxica aguda.

Objetivos específicos

- Caracterizar la presencia del/los ligando/s IREM1/CD300f in vivo e in vitro en el SNC.
- Caracterizar la presencia del propio receptor in vivo e in vitro en el SNC.
- Estudio del efecto de la sobre-expresión de IREM1/CD300f en una lesión cerebral excitotóxica.

Producción de hCD300f-IgG2a y rCD300f-IgG2a.

Se realizó la producción de una proteína soluble fusionada con un dominio extracelular de IREM1 o rCD300f unida a una región IgG2a de anticuerpo de ratón.

Para la producción de dicha proteína; partimos de células CHO (Chinese Hamster Ovary), las cuales son células establemente transfectadas con pSecTag/mIgG2a, y las células positivas fueron seleccionadas con 250 g/ml de Zeocina (dado que las células transfectadas adquieren resistencia a la Zeocina).

Estas células se cultivan en un medio especial EX Cell CHO Medium; el cual no posee suero y permite que las células crezcan en suspensión. Una vez que las células estaban confluentes, se extrajo el sobrenadante el cual contiene la proteína de interés. La proteína, de ahora en más proteína de fusión fue purificada del sobrenadante utilizando una columna proteica de ASepharose (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) como se ha descrito antes [20, 21]. La proteína de fusión va a ser utilizada para ensayos inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos.

Cultivos celulares Primarios.

Se llevó a cabo la realización de cultivos primarios, partiendo de glía mixta de médula espinal y corteza; los cuales fueron hechos en crías de rata Wistar (de ambos sexos) de uno o dos días de vida según el protocolo de Saneto y De Vellis, [36] con las modificaciones de Martínez-Palma y colaboradores [37]. De dicho cultivo se obtuvieron astrocitos, microglia y oligodendrocitos. También se llevó a cabo la diferenciación de algunos oligodendrocitos, de modo de poder comparar los dos estados; para lo cual, para la diferenciación se procedió: pasadas las 48 horas de plasmados se cambió el medio por un medio DMEM con poco suero (contiene 3.6 g/l HEPES, 100 IU/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina) suplementado con conalbúmina (0.1 mg/ml), putrescina (0.1 mM), insulina (5 µg/ml), selenito de sodio (31 nM), progesterona (21 nM), 25 mg/ml transferrina, 30 nM triyodotironina y 2% de suero de caballo.

También se realizaron cultivos de neuronas de hipocampo y corteza los cuales fueron preparados a partir de embriones de ratones Wistar E18 según Peluffo y colaboradores [38].

Animales, lesiones excitotóxicas y sobreexpresión transgénica.

Todo el trabajo experimental fue aprobado por la comisión ética universitaria UDELAR y realizado de acuerdo a las directivas de la Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Se utilizaron ratones adultos (8-10 semanas) heterocigotos YFP-H (B6.Cg-Tg (Thy1-YFPH) 2Jrs/Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA)[39] de ambos sexos los cuales fueron utilizados para estudios de colocalización. En estos ratones, un pequeño porcentaje de neuronas expresan YFP, por lo cual se ven marcadas (se ven de color verde fluorescente), de modo que son un excelente modelo de moléculas de colocalización con las neuronas.

Por otro lado se utilizaron ratas Wistar masculinas adultas (280-300g) las cuales fueron sometidas a lesiones excitotóxicas por medio de la inyección de 120 nmol N-methyl-D-aspartato (NMDA, Sigma-Aldrich) en 1 µl de solución salina (0.9% NaCl) en la región del estriado (coordenadas A: +0.5; L: -3.5; V: -4.0) utilizando un estereotáxico, bajo anestesia de isoflurano (Abbott, Abbott Park, IL, USA) y un nano inyector (0.2 µl/min; Quintessential Stereotaxic Nanoinjector, Stoelting CO. Wood Dale, IL, USA). Cuatro horas después de la inyección se realizaron diferentes tratamientos; uno de los cuales fue: la inyección de 5 µl del vector NLScT que posee un plásmido de expresión (0.8 µg/µl NLScT + 0.024 µg/µl plásmido) el cual fue inyectado a 0.5 µl/min (2.5 µl en las mismas coordenadas de la lesión y 2.5 µl 2mm por encima del punto de la lesión), como se describió previamente. El vector NLScT es un vector de proteína modular, no viral, que posee cuatro regiones proteicas necesarias para la transferencia de ADN al núcleo celular de manera exitosa. Aunque muchos de esos prototipos pueden transfectar células en cultivos, su eficiencia in vivo es muy limitada. De todos modos se ha comprobado que la expresión de transgenes luego de una lesión excitotóxica es mucho más eficiente. La eficiencia puede deberse a la endocitosis mediada por integrinas y por la mejora en la localización del compartimento nuclear mediada por la secuencia SV40 de localización viral nuclear [40]. La aguja se dejó en el lugar unos 10 minutos más de modo de permitir la difusión de este vector en el parénquima cerebral. La expresión de los plásmidos utilizada fue pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA, USA), el pDisplay hCD30of o el pDisplay-rCD30of. Otro de los tratamientos fue la inyección de 5 µl de solución salina (NaCl 0.9%) de modo de ser utilizado como control.

In vivo los estudios fueron diseñados para inyectar 6 animales y dos tratamientos diferentes de cada procedimiento quirúrgico. Los tratamientos fueron distribuidos al azar (17 animales NLScT/GFP, 17 animales NLScT/hCD30of y 12 animales NLScT/rCD30of). Después de tres días de la lesión, las ratas fueron anestesiadas y perfundidas intracardialmente con paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0.1M (PH 7.4). Los cerebros fueron post-fijados (2 horas) y luego crioprotectados en sacarosa al 30%, finalmente fueron congelados con CO₂ seco. En el criostato se realizaron cortes seriados, coronales, paralelos, de los cerebros enteros, de un espesor de 32 µm.

Se llevo a cabo la cuantificación del hemisferio lesionado. Se hizo un Nissl de los cortes obtenidos para cada uno de los cerebros y bajo un microscopio y con la utilización del programa Image J 44 se midió el volumen de lesión como se ha descrito [41]. El mecanismo por medio del cual se mide el volumen de lesión es el siguiente: Por medio del programa Image J 44, se delimita el área de lesión en cada uno de los cortes correspondientes a un cerebro (se puede determinar bien dicha área gracias a la tinción de Nissl) y se mide la misma con el programa Image J 44. Luego se mide el área del hemisferio lesionado y el área del hemisferio contralateral. Eso se repite con todos los cerebros de cada experimento. El área de lesión y el total del hemisferio lesionado fue medido de modo ciego (es decir no se sabía el tratamiento al que fue sometido el animal a la hora de medir).

PCR en tiempo real.

El ARN de las células proveniente de los cultivos primarios nombrados anteriormente; fue extraído con el reactivo de TRIZOL (Invitrogen, San Diego, CA, USA), tratado con ADNasa 1 (Invitrogen, San Diego, CA, USA) y retrotranscripto utilizando un kit altamente capacitado de Transcripción Reversa de ADNc (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones de manufactura. La PCR en tiempo real fue realizada utilizando un ensayo de expresión génica con TaqMan para rCD300f (Rn01752052_m1) y un control de amplificación de 18S para la normalización de los ciclos en un detector de secuencia de ABI-Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los datos fueron analizados con el Software 7500 SDS v1.2. Todas las reacciones de Q-PCR fueron seteadas en triplicado.

Procedimientos histológicos, inmunocitoquímicos e inmunohistoquímicos.

Tanto cultivos celulares (provenientes de los cultivos primarios) como secciones de cerebros de rata y de ratón (secciones de cerebros de rata y ratones YFP nombrados anteriormente), fueron procesados para tinciones astrogliales, microgliales, oligodendrogliales o neuronas. Los anticuerpos que se utilizaron para llevar a cabo estos ensayos fueron: anti-GFAP de rata (1:1,800; Dakopatts-ZO334; Dakopatts, Glostrup, Denmark) antirat CD11b de ratón (1:50, MCA275G, AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), anti-Iba1 de cabra (1:200, ab5076, abcam, Cambridge, MA, USA), anti-CNPase (1:50, HPA023266, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-GalC (1:150, G9152, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-GalC (1:150, G9152, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), anti-MBP de ratón (1:300, Oncogene, Cambridge, MA, USA), anti-APC de ratón (1:200, OP80 CC-1, EMD4Bioscience-Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA), o anti- β -3-tubulina de ratón (1:3000, Promega-G7121, Madison, WI, USA). Para la detección de la expresión de CD300f utilizamos los siguientes anticuerpos primarios: anti-CD300f de rata (1:50, 132701, BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-ratón MAIRV/CLM1 de ratón (1:20, MAB27881 R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

El anticuerpo de rata anti-mCD300b/CLM7 (MAB2580) fue de R&D Systems, Minneapolis, MN, USA. Anticuerpos secundarios Alexa biotinilados o anticuerpos secundarios apropiados (Invitrogen, San Diego, CA, USA) se utilizaron para detectar el marcaje específico del anticuerpo primario y de la proteína de fusión. Se han realizado controles, de modo de evitar los falsos positivos. Para lo cual en el caso de ensayos con la proteína de fusión, se utilizó un anticuerpo IgG2a con la misma concentración y el mismo tiempo de incubación que la proteína de fusión; y para control de anticuerpos secundarios se incubó con la misma concentración de anticuerpo secundario, sin la presencia del primario. Microglia, macrófagos y vasos sanguíneos fueron también revelados utilizando Lectina de *Lycopersicon esculentum* (tomate) (6 µg/ml; L9389; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Los ensayos inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento. En primer instancia se dejó incubando con el anticuerpo para la detección de la expresión de CD300f overnight a 4°C. Al día siguiente se incubó una hora con el anticuerpo secundario correspondiente y luego se incubó con el marcador celular que corresponda, según el ensayo, overnight a 4°C. Finalmente se revela el marcador celular con el anticuerpo secundario.

Procesamiento de datos y análisis estadístico. Todos los resultados son expresados como $\pm$ el error estándar de la media (SEM standard error of the mean). El test T-student fue utilizado para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dos grupos experimentales después de la determinación de la distribución normal de las muestras y del análisis de varianza.

Expresión de él o de los ligandos de hCD300f in vitro e in vivo.

La descripción del rol protector de CLM1, que es el homólogo de ratón del receptor hCD300f o IREM1, en respuesta a la inducción de EAE, sugiere la presencia de los ligandos naturales de este receptor en el Sistema Nervioso Central. Debido a la elevada homología entre el dominio extracelular humano de CD300f y el de ratón y el de rata, nuestra hipótesis fue que hCD300f iba a ser capaz de reconocer el ligando de ratón y de rata. Para explorar esta posibilidad se hicieron estudios inmunocitoquímicos utilizando una proteína de fusión soluble que contiene el dominio extracelular de hCD300f fusionado a la región Fc de la cadena pesada de ratón IgG2a. Hemos analizado tanto cultivos primarios de glia como cerebros de rata y ratón.

En cultivo encontramos que los oligodendrocitos y un tipo de astrocitos fibrosos, los cuales son GFAP positivos, muestran en su superficie un patrón punteado positivo para la proteína de fusión CD300f-IgG2a (Figura 1A-D). Ese patrón de punteado no se ve en el control (el cual es incubado con una concentración de ratón de IgG2a control idéntica).

En cuanto a los oligodendrocitos, tanto los no diferenciados (GalC+/MBP-, Figura 1A) como los oligodendrocitos que pasaron por el proceso de diferenciación (los cuales son células grandes y altamente ramificadas y GalC+/MBP+, Figura 1B-C) fueron positivos para este marcaje.

Curiosamente los astrocitos poligonales positivos para GFAP fueron siempre negativos para el marcaje específico y característico de la proteína de fusión (Figura 1D), mientras que poblaciones de astrocitos GFAP positivos estrellados fueron positivos para el ligando(s).

Las células microgliales fueron negativas para el marcaje con hCD300f-IgG2a (Figura 1E).

In vivo los cerebros de rata y de ratón también mostraron un patrón de punteado característico cuando fueron incubados con hCD300f-IgG2a, el cual principalmente se encuentra presente en la sustancia blanca (Figura 1F-G). Estudios de colocalización utilizando microscopía confocal demostraron que el patrón de punteado característico no colocalizaba con marcadores de mielina como ser CNPasa (2'-3'-nucleotido cíclico 3'-fosfodiesterasa) (Figura 1F). Por otro lado se observa que la señal sí colocaliza con el marcador de oligodendrocitos APC (Figura 1G-I), el cual tiñe exclusivamente el soma celular y las proyecciones proximales pero no la mielina.

Considerando la presencia del ligando(s) de CD300f tanto en los cultivos como en el cerebro de rata y de ratón, nos preguntamos si la marca aumenta luego de una lesión aguda. Para responder a esta pregunta se utilizó un modelo bien establecido de lesión excitotóxica por medio de la inyección de NMDA en la zona del estriado del cerebro de rata (ver más adelante). Lo que se observó en este caso fue que tres días después de la lesión, la tinción con hCD300f-IgG2a fue más intensa en el área lesionada que en el resto del cerebro (Figura 2). De modo que este resultado sugiere que CD300f podría estar involucrado en los procesos inflamatorios del SNC.

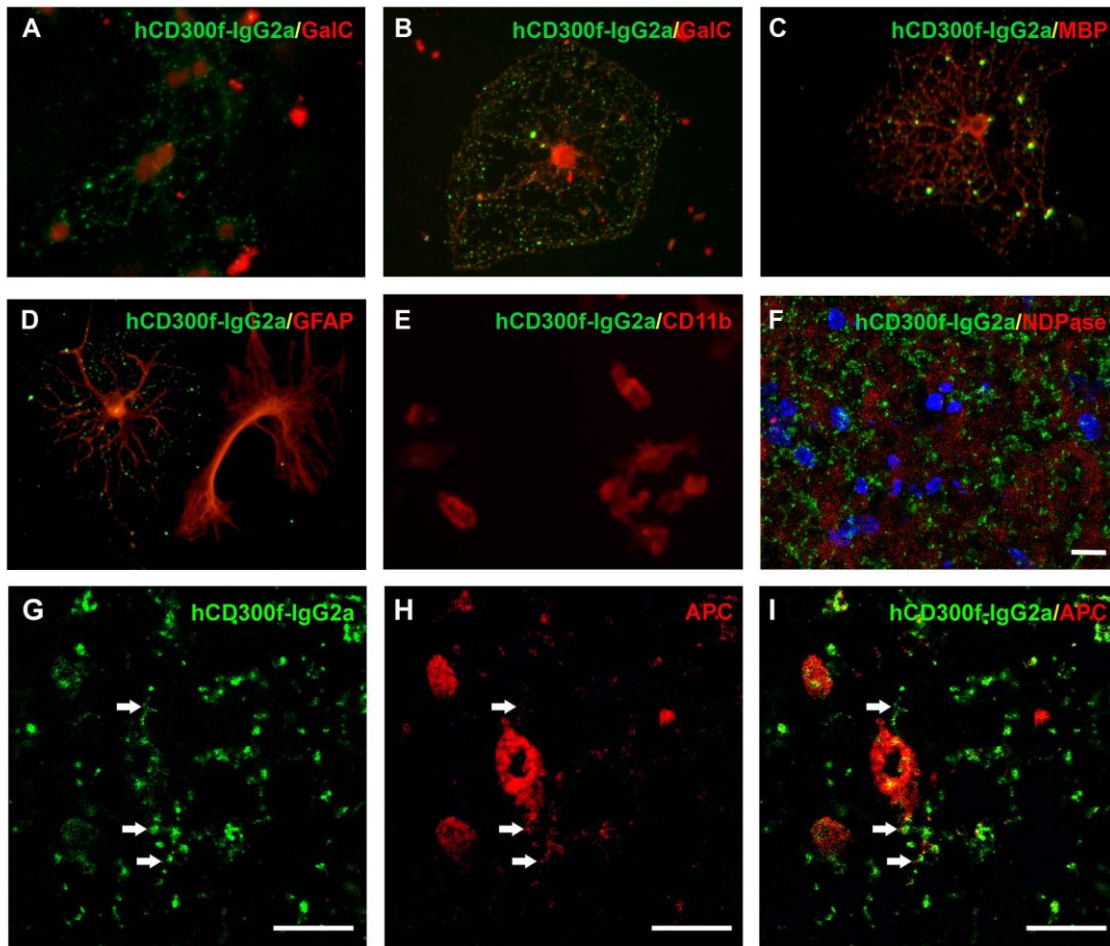


Figura 1: Localización de los posibles ligandos de hCD300f in vitro e in vivo.

Cultivos primarios de diferentes tipos de células gliales del SNC (A-E) o secciones de cerebro de rata y de ratón (cerebro de ratón, F-I) fueron utilizadas para estudios de colocalización de la proteína de fusión hCD300f-IgG2a (10μg/ml) y diferentes marcadores celulares específicos. Pequeños oligodendrocitos indiferenciados con pocas ramificaciones (A, GalC) y oligodendrocitos diferenciados con largas ramificaciones (B, GalC; C, MBP) muestran un marcaje específico con la proteína de fusión. Los astrocitos protoplasmáticos GFAP positivos no muestran un marcaje específico con la proteína de fusión (D), sin embargo los astrocitos GFAP positivos, fibrosos y ramificados, si muestran un marcaje específico con la proteína de fusión. Las células de la microglia fueron negativas para el marcaje de la proteína de fusión (E). Un patrón de marcaje punteado similar al de los cultivos; se observó en la sustancia blanca de los cerebros teñidos con la proteína de fusión, el cual no colocaliza con los marcadores de mielina (teñidos con CNPasa, F, cuerpo calloso), pero si colocaliza con el soma de los oligodendrocitos y las proyecciones proximales (teñidas con APC, flechas en G-I).

Escala de la barra: F-I 10μm.

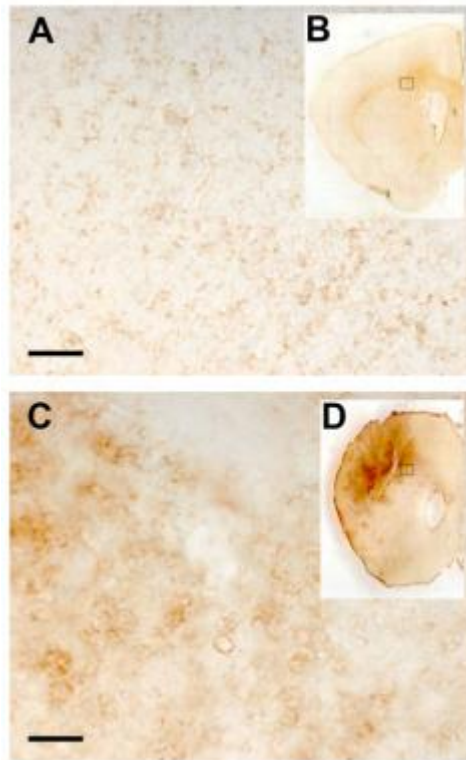


Figura 2: Aumento de la tinción para el ligando(s) de CD300f en cerebro de rata lesionada.

Cerebros sometidos a una inyección en la región estriada de NMDA muestran un aumento en la tinción con hCD300F-IgG2a en el núcleo de la lesión (C, D) en comparación con los cerebros no inyectados (A, B). Las secciones B y D se representan en mayor magnificación en A y C respectivamente (revelado con diaminobencidina DAB).

Escala de la barra: 10µm.

Expresión de él o de los ligandos de rCD300f in vitro e in vivo.

Generando la proteína de fusión de rata, la rCD300f-IgG2a, se investigó in vivo e in vitro la presencia de él o de los ligandos de rCD300f en el SNC. Se observó un patrón de marcaje similar entre el rCD300f-IgG2a y el hCD300f-IgG2a tanto in vitro como in vivo, en cerebros de rata y de ratón (Figura 3A, B). En cultivo, además de los oligodendrocitos y de los astrocitos estrellados GFAP positivos, neuronas de hipocampo y corticales fueron también positivas para el marcaje con rCD300f-IgG2a (Figura 3H). In vivo, el marcaje con rCD300f-IgG2a colocaliza con el marcador de oligodendrocitos APC (Figura 3C-E), pero no colocaliza con GFAP, ni con la microglia ni con los vasos sanguíneos positivos para la Lectina de tomate (Figura 3G). Finalmente de modo de estudiar la presencia de él o de los ligandos para rCD300f y para hCD300f in vivo se utilizaron secciones de cerebro y medula espinal de los ratones Thy-1-YFP-H. Estos ratones presentan un modelo excelente de colocalización con las neuronas, dado que expresan constitutivamente YFP en una pequeña población neuronal, permitiendo la visualización del soma neuronal, así como las prolongaciones. Sorpresivamente, se observó la no colocalización entre las neuronas y la proteína de fusión rCD300f-IgG2a (Figura 3I-K).

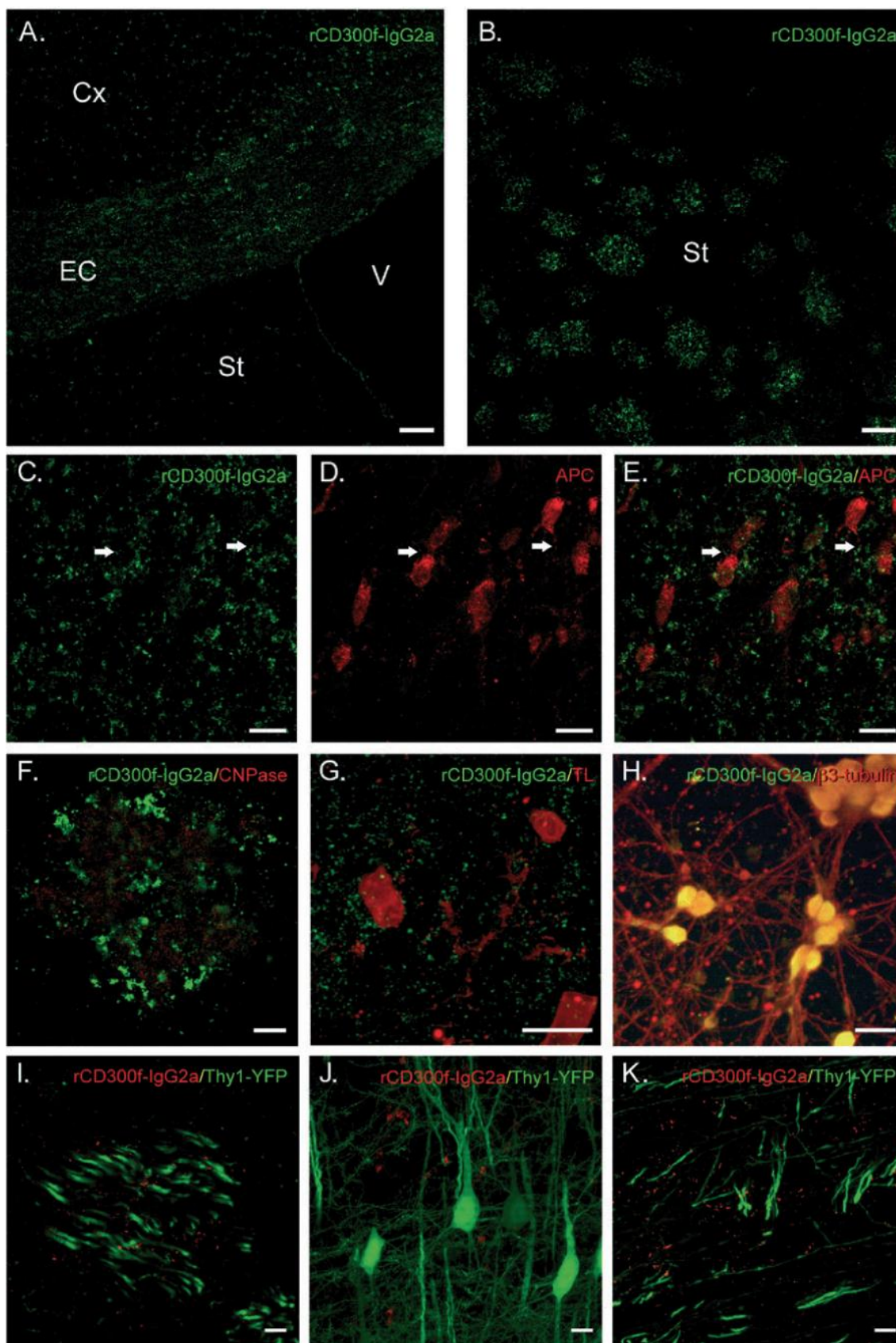


Figura 3: Localización de él o de los posibles ligandos de rCD300f in vitro e in vivo.

Secciones de cerebro de ratón y de rata fueron incubados con la proteína de fusión rCD300f-IgG2a para la localización de él o de los posibles ligandos de CD300f, y se llevaron a cabo estudios de colocalización con marcadores celulares específicos (C-H), o con los ratones Thy-1-YFP-H (I-K). La tinción con la proteína de fusión fue principalmente observada en la sustancia blanca y en la cápsula externa (A, CE: Capsula externa; Cx: Neocortex, St: Estriado, V: Ventrículo) o en tractos de fibras del cuerpo estriado (B, St). El patrón de marcaje colocaliza con el soma de los oligodendrocitos y sus prolongaciones (los oligodendrocitos están teñidos con APC, está señalado con flechas el cuerpo calloso de C-E) pero no colocaliza con la mielina en sí (marcada con CNPasa, F, estriado). En el caso de microglia y vasos sanguíneos no se observa colocalización (tinción de la microglia con TL, G). Cultivos de neuronas corticales fueron positivos para la tinción con rCD300f-IgG2a (las neuronas teñidas con β 3-tubulina, H). Para un marcaje extensivo de neuronas in vivo se usan los ratones Thy1-YFP, y no se detecto colocalización ni en los somas neuronales, ni en las prolongaciones dendríticas, ni en las espinas dendríticas y tampoco en los axones neuronales de los ratones YFP con la proteína de fusión (I: estriado; J: neocortex, la tinción en rojo no es específica y se corresponde a los capilares; K: cuerpo calloso).

La escala de la barra: A-B: 50 μ m, C-K: 10 μ m.

Expresión del receptor rCD30of en las células del SNC.

Recientemente se ha reportado que el CLM1 está ausente en la médula espinal de ratón [35]. Nosotros analizamos la expresión de la molécula homóloga en la rata, en el SNC. Cultivos altamente purificados de microglia, astrocitos, oligodendrocitos o neuronas fueron sometidos a una Q-PCR. El transcripto para rCD30of fue detectado en microglia, en oligodendrocitos inmaduros, en oligodendrocitos diferenciados, e inesperadamente en un nivel bajo, en neuronas; pero no se encontró en astrocitos (Figura 4A). Curiosamente el ARNm para rCD30of aumenta en la microglia cuando esta se encuentra activada de modo de simular un proceso inflamatorio (IL1 β +LPS).

La expresión del receptor de CD30of también fue confirmada por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo anti-CLM1. Partimos de dos tipos de cultivos primarios, cultivos mixtos y cultivos altamente enriquecidos. Fueron inmunoreactivos con anti CLM1: cultivos de microglia (Figura 4C-D), de oligodendrocitos no diferenciados y de oligodendrocitos diferenciados (Figura 4E-F), y cultivos de neuronas de hipocampo (Figura 4G). Los astrocitos fueron negativos (Figura 4C marcados con flechas). In vivo, no se detectó la inmunoreactividad en el SNC a pesar de que se utilizaron dos tipos diferentes de anticuerpos monoclonales comerciales.

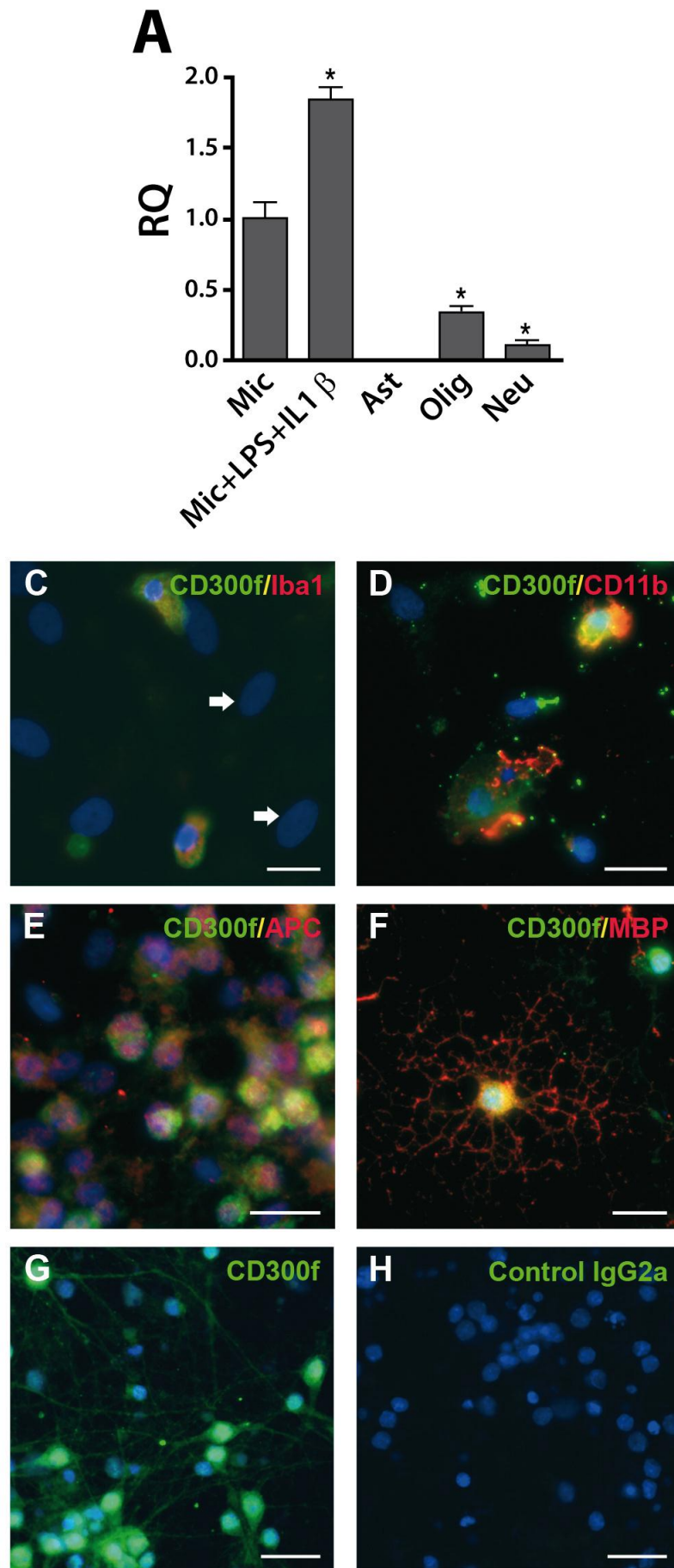


Figura 4: Expresión del receptor rCD300f en cultivos primarios de células del SNC.

Para analizar la expresión del receptor rCD30of se realizó una PCR en tiempo real (A) e inmunocitoquímica (C-H) de diferentes cultivos primarios del SNC. Células microgliales (Mic), oligodendrocitos indiferenciados (Olig) y neuronas de hipocampo (Neu), expresan ARNm para rCD30of, mientras que los astrocitos (Ast) no. Al tratar la microglia con LPS (1µg/ml) e IL1 (10ng/ml), se genera un aumento en el mensajero de rCD30of. En el análisis inmunocitoquímico, se observó que la microglia (teñida con C: Iba1 y en D: CD11b), los oligodendrocitos diferenciados (teñidos con E: Gal C o con F: MBP) y las neuronas de hipocampo (G); fueron positivos para el anti-CLM1. Los astrocitos fueron negativos (se observa el núcleo grande y ovoide señalado con las flechas en C). Como control se utilizó un anticuerpo IgG2a (H) en el cual no se observó tinción, en ausencia del anticuerpo primario.

Escala de la barra: 20µm.

La sobreexpresión de hCD30of es neuroprotectora después de una lesión cerebral aguda.

Con el fin de abordar in vivo la función de hCD30of, inducimos una lesión aguda en cerebro de ratas inyectándoles NMDA en el estriado y en la corteza. Cuatro horas después, inyectamos en el mismo sitio un vector de terapia génica modular recombinante unido a un plásmido que codifica para hCD30of o GFP. El vector que elegimos es NLSct, se ha probado que la terapia génica utilizando este vector es segura in vivo, dado que no genera inflamación o respuesta inmunológica en el cerebro normal [41]. El vector NLSct es muy eficiente en conducir una expresión generalizada después de un daño excitotóxico, transfectando tanto neuronas como células gliales en la zona de la lesión [40]. La inyección de NMDA genera una lesión bien delimitada tanto en el estriado como en la corteza dorsal que lo rodea.

Tres días después de la intervención se lleva a cabo la perfusión de las ratas de modo de obtener los cerebros. Los cerebros son post fijados y crioprotectados. Luego son congelados y finalmente cortados en el criostato con cortes coronales paralelos de 32µm. Cada experimento consta de dos tratamientos diferentes, uno en el que se sobreexpresa hCD30of y otro en el que se sobreexpresa el transgen EGFP. A los cortes se les realiza la técnica de Nissl de modo de poder observar el área de la lesión. Por medio del programa Image J 44 y acompañados de un microscopio se lleva a cabo la medida del área lesionada de los diferentes cortes (área pálida, para dicho procedimiento se tapa la etiqueta de cada porta en la cual se identifica el tratamiento, de modo que la medida se hizo a ciegas).

Lo que se observó fue que la sobreexpresión de hCD30of causa una reducción significativa del volumen de lesión ($\cong 40\%$), cuando se compara con el transgen EGFP 3 días post-intervención (Figura 5).

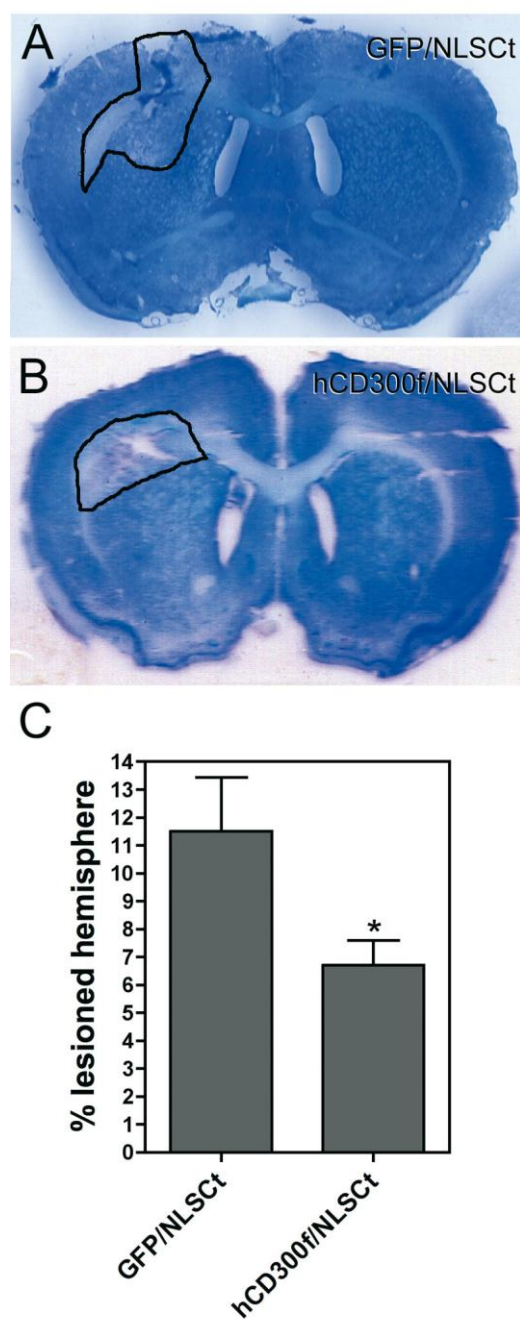


Figura 5: La sobreexpresión de hCD300f es neuroprotectora después d una lesión cerebral aguda.

La inyección de NMDA en el cerebro induce una lesión bien delimitada en el estriado y en la corteza que lo rodea, cuando se observa con la tinción de Nissl 3 días post-intervención (A-B). En este punto el promedio del porcentaje del hemisferio lesionado (C, las áreas se ven delimitadas con amarillo en A y en B) muestra que la sobreexpresión de hCD300f utilizando el vector NLSCt induce una significativa neuroprotección ($P < 0,05$) cuando se compara con la sobreexpresión de un transgen control (EGFP).

La sobreexpresión de rCD300f es neuroprotectora después de una lesión cerebral aguda.

Se realizó un estudio comparativo de modo de evidenciar el efecto del homólogo en rata del CD300f después de una lesión excitotóxica. Utilizando el mismo diseño experimental, descrito anteriormente, se observó que la sobreexpresión de rCD300f después de una lesión cerebral excitotóxica induce una significativa reducción en el volumen de lesión ($\approx 35\%$) comparado con el transgen GFP, en la figura se incluyen los resultados anteriores con la sobreexpresión de hCD300f (IREM1) (Figura 6).

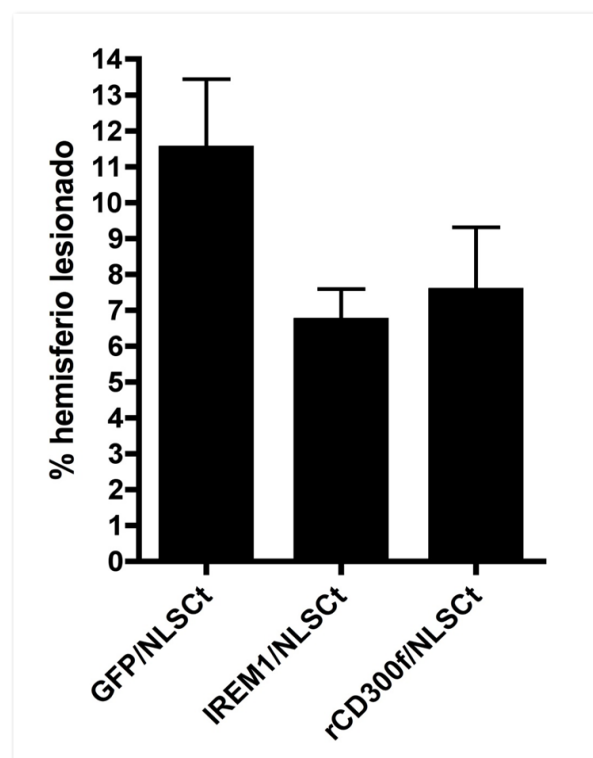


Figura 6: La sobreexpresión de hCD300f y de rCD300f es neuroprotectora después de una lesión cerebral aguda.

Esta figura muestra los datos de los volúmenes de lesión obtenidos luego de una lesión cerebral excitotóxica realizada con NMDA, con Nissl 3 días post intervención. En este punto el promedio del porcentaje del hemisferio lesionado muestra que cuando se sobreexpresó rCD300f utilizando el vector NLScT se induce una neuroprotección significativa ($p < 0.05$) comparándolo con GFP. La gráfica también incluye los resultados del experimento anterior (se sobreexpresa hCD300f utilizando el vector NLScT) de modo de poder comparar el efecto de la sobreexpresión de hCD300f y de rCD300f.

Analizando los resultados obtenidos, hemos identificado los tipos celulares que expresan el ligando de CD300f. Según los distintos ensayos inmunohistoquímicos y citoquímicos que se realizaron podemos suponer que los ligandos serían los mismos para hCD300f y para rCD300f dado que, en ambos casos, para las células que dan positivas para la proteína de fusión se observa el mismo patrón de punteado característico. Las células que poseen el ligando in vitro según nuestros ensayos son: oligodendrocitos y astrocitos fibrosos. Por otro lado en todos los ensayos realizados con distintos anticuerpos que marcan microglia el resultado fue el mismo, la microglia no expresa el ligando para CD300f. En el caso de las neuronas sucede algo particular, dado que in vitro en cultivos de neuronas de hipocampo se observa colocalización con el marcador neuronal y la proteína de fusión, sin embargo en el caso de los cortes de cerebro de ratones YFP no se ve la colocalización con ninguna de las neuronas marcadas. Una de las hipótesis que puede explicar esta situación es que teniendo en cuenta las condiciones en las cuales se encuentran las células en cultivo, podría considerarse que están “estresadas” o “dañadas” con respecto a las células in vivo. Por lo tanto podría suceder que las neuronas expresen el ligando en esas condiciones y no normalmente in vivo. Esto se correlaciona con los datos que obtuvimos por medio del estudio inmunohistoquímico de la presencia de ligandos en el cerebro de rata lesionado, en el cual vemos un aumento en la señal en el área del cerebro lesionado en comparación con el cerebro de rata sin lesionar. Esto indicaría que en presencia de la lesión el ligando se exprese más. De todos modos se necesita realizar más estudios después de la lesión para con marcadores específicos de neuronas poder sacar conclusiones.

Otro de los objetivos era llevar a cabo la caracterización de la expresión propio receptor, para lo cual se llevaron a cabo estudios por citometría de flujo que comprobaron que el anticuerpo anti-CLM1 que reconoce el CD300f de ratón también reconoce al receptor de rata (no se han mostrado esos resultados). De modo que se utilizó dicho anticuerpo tanto en rata como en ratón para los estudios inmunocitoquímicos. Por medio de PCR en tiempo real como por medio de estudios inmunocitoquímicos se obtuvo el mismo resultado en el cual se determina que el receptor se expresa en cultivo en oligodendrocitos, en neuronas y en microglia. En el caso de la microglia; para llevar a cabo la PCR en tiempo real se utilizó microglia+LPS+IL-1, lo que generaría la activación de la microglia y eso se refleja en un aumento del mensajero para CD300f, eso habría que comprobarlo por medio de inmunocitoquímica de modo de ver si hay una señal amplificada en ese caso. En el caso de las neuronas, es raro que expresen receptores inmunes, de todos modos hay receptores de la inmunidad innata expresados por neuronas como el CD200 [42] o TLR3 [43] por lo cual no se puede descartar la capacidad de las neuronas de expresar el CD300f en alguna circunstancia. Otra de las hipótesis que tampoco se puede descartar es que la expresión se encuentre asociada al desarrollo, dado que los cultivos de neuronas de hipocampo y corteza, provienen de embriones de rata de 18 días y se ha demostrado que las neuronas durante el desarrollo expresan el receptor TLR8 el cual deja de expresarse en el cerebro adulto [44]; por lo cual podría suceder lo mismo en éste caso con CD300f.

Por otro lado teníamos planteada la hipótesis de que la sobreexpresión del receptor inmune CD300f es neuroprotectora frente a una lesión cerebral excitotóxica aguda. Para llevar a cabo la lesión se utilizó NMDA el cual actúa como análogo de glutamato. Como se describió anteriormente se genera una lesión bien delimitada en la cual se pueden determinar dos regiones: el núcleo y la zona de penumbra. El núcleo es una zona donde la degeneración y la muerte celular ocurren muy rápidamente por lo cual es muy difícil intentar “salvarlo”, de modo que la zona de penumbra es la zona en la que basamos nuestro estudio. En dicha zona, el proceso inflamatorio que lleva a la muerte celular es más lento de manera que puede ser regulado o modulado. Es sobre esa lesión que cuatro horas después inyectamos conjuntamente con el vector modular recombinante NLSCt diversos transgenes dependiendo del tratamiento: rCD300f, hCD300f o GFP. Tres días después analizamos los cerebros de manera de comparar qué sucede con las áreas de lesión. Se realiza el estudio tres días después dado que a esa altura hay un balance entre el volumen que alcanza la lesión y el tiempo en el cual comienza a cicatrizar la herida, si lo dejáramos más tiempo se generaría una cicatriz glial de modo que no se podría estudiar adecuadamente el volumen de lesión. Analizando la última figura queda demostrado por un lado, que la sobreexpresión de hCD300f es neuroprotectora comparada con el GFP, al igual que la sobreexpresión de rCD300f comparada también con GFP; y por otro lado muestra la poca diferencia que hay entre los volúmenes de lesión cuando se sobreexpresa hCD300f y rCD300f. Uniendo todos los resultados podríamos decir que posiblemente tanto las células gliales como las neuronas están involucradas en la acción neuroprotectora de CD300f, modulando el volumen de lesión en la zona de penumbra.

Finalmente habría que determinar el mecanismo de acción de CD300f el cual nos es desconocido. Una de las incógnitas para la determinación del mecanismo, es la localización del ligando dentro de las células. Según nuestros datos el ligando podría estar formando parte de la membrana celular, ya que en células no permeabilizadas con Tritón X100 se observa marca. In vivo, también podría estar formando parte de la matriz extracelular (lo cual es más improbable porque hay poco espacio extracelular a nivel del SNC, pero no se puede descartar) o bien podría tener la capacidad de ser un receptor de membrana (receptor transmembrana o bien formar parte de una de las dos capas que componen la bicapa lipídica). Por otro lado hay que tener en cuenta que en el caso de receptores inmunes, muchas veces sucede la activación de un receptor por contacto con un receptor vecino que se encuentra en la misma célula. Tampoco sabemos cuáles son las señales que se dan una vez que el receptor se une a su ligando, y tampoco sabemos si las señales son solo hacia el interior celular o también generan señales en las células vecinas, mediadas por el ligando. En fin, el mecanismo de acción es muy complejo y futuros trabajos estarán encaminados a determinarlo.

Por medio de este trabajo logramos determinar que in vitro el ligando se encuentra presente en oligodendrocitos (tanto diferenciados, como no diferenciados); en astrocitos fibrosos y en neuronas. In vivo el ligando se encuentra presente en oligodendrocitos, pero no se ve colocalización con neuronas. Con respecto al receptor in vitro vimos que lo expresa la microglia; los oligodendrocitos (tanto diferenciados, como no diferenciados); y un bajo nivel de neuronas.

Teniendo en cuenta el tratamiento neuroprotector que involucra a la molécula de CD300f y al vector de terapia génica NLSCt, éstos podrían constituir un gran componente para la formulación de drogas neuroprotectora. Dichas drogas pueden ser utilizadas para tratar traumas agudos localizados o para isquemias en humanos en los cuales solo bastaría con la inyección del vector NLSCt conteniendo el transgen hCD300f en el momento en que se realizan las intervenciones de descompresión craneana.

REFERENCIAS

1. Kawai, T., and Akira, S. (2006). *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol. **7**: p. 131-137.
2. Rus, H., Cudrici, C., and Niculescu F.(2005), *The role of the complement system in innate immunity*. Immunol Res, (33): p. 103-112.
3. Medzhitov, R., *Recognition of microorganism and activation of the immune respons*. Nature. **449**: p. 819-826.
4. Jeannin, P., Jaillon, S. and Delneste, Y. (2008). *Pattern recognition receptors in the immune respons against dying cells*. Curr Opin Immunol. **20**: p. 530-537.
5. Diefenbach, A., and Raulet, D. (2003), *Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors*. Curr Opin Immunol, (15): p. 37-44.
6. Palm, N.W., and Medzhitov, R. (2009). *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev. **227**: p. 221-233.
7. Janeway C.A., T., P., Walport, M. and Sholmchik, M. (2001). *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science.
8. Colonna, M., *Inhibitory receptors: friend or foe?* Lancet. **361**(1067-1068).
9. Vilches, C.a.P., P. (2002). *KIR: diverse, rapidly, evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol. **20**: p. 217-251.
10. Barclay, A.N., *Membrane proteins with immunoglobulin-like domains a master superfamily of interactions molecules*. Semin Immunol. **15**: p. 215-223.
11. Zelensky, A.N.a.G., J.E. (2005), *The C-type lectin-like domain superfamily*. Febs J. **272**: p. 6179-6217.
12. Davoust, N., Vualliat, C., Androdias, G. and Nataf, S. (2008). *From bone marrow to microglia: barriers and avenues*. Trends Immunol. **29**: p. 227-234.
13. Aloisi, F., *Immune function of microglia*. Glia. **36**: p. 165-179.
14. Hanisch, U.K., H. (2007). *Microglia: active sensor and versatile eceptor cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci. **10**: p. 1387-1394.
15. Ravetch, J., and Lanier, L. (2000), *Immune inhibitory receptors*. Science. **290**: p. 84-89.
16. Long, E., *Regulation of immune responses trough inhibitory receptors*. Annu Rev

Immunol. **17**: p. 875-904.

17. Choquet, D., Partiseti, M., Amigorena, S., Bonnerot, C., Fridman, W. and Korn H. (1993), *Cross-linking of IgG receptors inhibits membrane immunoglobulin-stimulated calcium influx in B lymphocytes*. J Cell Biol. **121**: p. 355-363.
18. Burshtyn, D., Scharenberg, A., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J., and Long, E. (1996). *Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor*. Immunity. **4**: p. 77-85.
19. Veillette, A., Latour, S., and Davidson, D. (2002). *Negative regulation of immunoreceptors signaling*. Annu Rev Immunol. **20**: p. 669-707.
20. Chung, D., Humphrey, M., Nakamura, M., Ginzinger, D., Seaman, W., and Daws, M. (2003). *CMRF-35-like molecule-1, a novel mouse myeloid receptor, can inhibit osteoclast formation*. J Immunol. **171**: p. 6541-6548.
21. Alvarez-Errico D, S.J., Lopez-Botet M. (2007). *The IREM-1 (CD300f) inhibitory receptor associates with the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase*. J Immunol. **178**: p. 808-816.
22. Ho, L., Uehara, C., Chen, C., Kubagawa, H. and Cooper, M. (1999). *Constitutive tyrosine phosphorylation of the inhibitory paired Ig-like receptor PIR-B*. Proc Natl Acad Sci U S A. **96**: p. 15086-15090.
23. Sathish, J., Johnson, G., Fuller, K., LeRoy, F., Meygaard, L., Sims, M., and Matthews. (2001). *Constitutive association of SHP-1 with leukocyte-associated Ig-like receptor-1 in human T cells*. J Immunol. **166**: p. 1763-1770.
24. Vivier, E., Nunes, J. and Vely F. (2004). *Natural killer cell signaling pathway*. Science. **306**: p. 1517-1519.
25. Tomasello, E., Blery, M., Vely, F. and Viver, E. (2000). *Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells*. Semin Immunol. **12**: p. 139-147.
26. Billadeau, D., Upshaw, J., Schoon, R., Dick, C., and Leibson, P. (2003). *NKG2D-DAP10 triggers human NK cells-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway*. Nat Immunol. **4**: p. 557-564.
27. Colonna, M., *TREMs in the immune system and beyond*. Nat Rev Immunol. **3**: p. 445-453.

28. Feng, J., Call, M., and Wucherpfenning, K. (2006). *The assembly of diverse immune receptors is focused on a plasmal membrane-embedded interaction site.* PLoS Biol. **4**: p. e142.
29. Lanier, L., *DAP-10 and DAP12-associated receptors in innate immunity.* Immunol Rev. **227**: p. 150-160.
30. Underhill, D.a.G., H. (2007). *The many Faces of ITAMs.* Trends Immunol. **28**: p. 66-73.
31. Barclay, A., Wright, G., Brooke, G. and Brown, M. (2002). *CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells.* . Trends Immunol. **23**: p. 285-290.
32. Taylor, P., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H., Brown, G. and Gordon, S. (2005). *Macrophage receptors and immune recognition.* Annu Rev Immunol. **23**: p. 901-944.
33. Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M. and Bordo, D. (2003). *The three- dimensional structure of the human NK cell receptor NKp44, a triggering partner in natural cytotoxicity.* Structure. **11**: p. 725-734.
34. Alvarez-Errico, D., Aguilar, H., Kitzing. F., Brckalo, T., Sayos, J. and Lopez-Botet, M. (2004). , *IREM-1 is an inhibitory receptor expressed by myeloid cells.* Eur J Immunol. **34**: p. 3690-3701.
35. Xi, H., Katschke, KJ. Jr, Helmy, KY., Wark PA., Kljavin, N., Clark, H. et al. (2010), *Negative regulation of autoimmune demyelination by the inhibitory receptor CLM-1.* J Exp Med. **207**: p. 7-16.
36. Saneto, R.a.D., J. (1987) *Neuronal and glial cells: cell culture of the central nervous system.* In: *Neurochemistry: A Practical Approach.* AJ Turner, HS Brachelard (eds). p. 27-63.
37. Martinez-Palma, L., Pehar, M., Cassina, P., Peluffo, H., Castellanos, R., Anesetti, G. et al (2003), *Involvement of nitric oxide on kainate-induced toxicity in oligodendrocyte precursors.* Neurotox Res. **5**: p. 399-406.
38. Peluffo, H., González, P., Arís, A., Acarin, L., Villaverde, A., Castellano, B. and González, B. (2007). *RGD domains neuroprotect the immature brain by a glial dependent mechanism.* Ann Neurol **62**: p. 251-256.

39. Feng, G., Mellor, RH., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, QT., Wallace, M. et al (2000). , *Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP*. . Neuron **28**: p. 41-51.
40. Peluffo, H., Aris, A., Acarin, L., Gonzalez, B., Villaverde, A. and Castellano, B. (2003) *Nonviral gene delivery to the central nervous system based on a novel integrin-targeting multifunctional protein*. Hum Gene Ther. **14**: p. 1215-1223.
41. Peluffo, H., Acarin, L., Aris, A., Gonzalez, P., Villaverde, A., Castellano, B. and Gonzalez, B. (2006) *Neuroprotection from NMDA excitotoxic lesion by Cu/Zn superoxide dismutase gene delivery to the postnatal rat brain by a modular protein vector*. . BMC Neurosci. **7**: p. 35.
42. Webb. M. and Barclay, A., *Localisation of the MRC OX-2 glycoprotein on the surfaces of neurones*. J Neurochem. **43**: p. 1061-1067.
43. Cameron, J., Alexopoulou, L., Sloane, JA., DiBernardo, AB., Ma, Y., Kosaras, B. et al (2007). *Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals*. J Neurosci **27**: p. 13033-13041.
44. Ma, Y., Li, J., Chiu, I., Wang, Y., Sloane, JA., Lu, J. et al (2006). *Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis*. J Cell Biol. **175**: p. 209-215.