



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas - Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET-UNC

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA
NEUROINFLAMATORIA POR CITOCINAS TIPO I

Lic. en Bioquímica Clínica

EMILIA ANDREA GAVIGLIO

Director de Tesis: Prof. Dr. Pablo Iribarren

Córdoba, Argentina

- 2015 -

Comisión Asesora:

Prof. Dra. Susana Gea

Prof. Dr. Mario Guido

Prof. Dr. Alfredo Lorenzo

Evaluador Externo:

Prof. Dr. Oscar Bottasso

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (Secyt- UNC) y Fogarty International Center, National Institutes of Health (NIH), EEUU, #1R01TW007621.

*A mis padres, por ser
el pilar fundamental en todo
lo que soy, por su amor y su
apoyo incondicional.*

AGRADECIMIENTOS

Durante el doctorado, muchas personas estuvieron a mi lado colaborando con la realización de este proyecto, brindando sus conocimientos, trabajo, experiencia y contención. Sin su aporte esta tarea hubiese sido mucho más complicada, por ello cada uno se merece un agradecimiento especial.

A Cecilia Sánchez, por confiar en que era una persona capaz de hacer un doctorado y recomendarme con el Doctor Iribarren.

A Pablo, por haberme permitido realizar una Tesis doctoral en su grupo de trabajo, por los conocimientos, reflexiones y discusiones científicas transmitidas durante estos años.

A los miembros de mi comisión de tesis, La Dra. Susana Gea y los Dres. Alfredo Lorenzo y Mario Guido por sus aportes realizados en cada reunión anual y durante la revisión de este trabajo.

A Ceci Rodríguez-Galán (co-directora), muchas gracias por enseñarme generosamente todo sobre la hidrodinámica, por las horas dedicadas a mi formación con buena predisposición y ayuda paciente.

A mis amigos del laboratorio 9. Gracias por su contención, compañía y cariño durante todos los días de este doctorado, tanto dentro como fuera del laboratorio. ¡Muchas gracias por estos años, los quiero un montón! A Dani, por estrecharme tu amistad desde el primer día que empecé hasta hoy, por toda la paciencia y el tiempo que dedicaste desinteresadamente en mi entrenamiento, especialmente en esta última etapa. A Javi, por ser un compañero de equipo genial en los interminables experimentos *in vivo* y por aguantar mis catarsis. A Nati, porque sos la persona más eficiente y buena que conozco, porque siempre estás dispuesta a ayudar. A cande, porque con tu alegría y energía contagiosa y sobre todo con tu amistad leal haces que el laboratorio sea mucho más que un lugar de trabajo. A Claudio, por el buen humor, la templanza y sencillez que te caracterizan y a Viki, porque sos una linda persona y en este año que compartimos ya te hiciste querer.

A mis amigos clase 86, Magui, Ceci, Lucas y Nico. Gracias por su ayuda sincera y desinteresada desde la facultad, por enseñarme muchas cosas y por ser

grandes personas...aunque las chicas lo expresen con mayor dulzura y los chicos con un poco más de acidez, los cuatro reúnen cualidades difíciles de encontrar, son buenos, sencillos, amables, respetuosos y justos ¡Los quiero mucho!

A mis amigos cosechados durante estos años: Nico Nuñez, Alfre, Luisi, Gera, Lucho, Lupe, Ana Racca, Ale García, Nati Baez, David, Augusto, APP, las chicas del 108, los chicos “nuevos” del 103 y 104...gracias por la buena predisposición a ayudarme con cualquier problema experimental, por dejarme aprender de ustedes, por las charlas y risas compartidas y por su incansable buena onda. Para Leo va un gracias adicional, porque además de brindarme tu amistad fuiste un gran y optimista compañero en esta carrera de obstáculos que fue el doctorado.

A los profes de Química Clínica II, (Ana Caro, Moni G, Ana Belén, Nati, Clau, Dani, Moni R, Ceci, Hugo, Ana, Pablo) gracias por sus valiosos aportes y compañía durante la actividad docente. Realmente disfruté de la tarea de enseñar y aprendí mucho de ustedes.

A Martin, Adri, Ale, Laura, Paulas, Pilar, Diego, Fabricio y al resto del personal de apoyo... gracias por su amable asistencia durante estos años.

Al resto de los integrantes del CIBICI, por su colaboración y asesoramiento.

A mis amigas de la facu (Diana, Caro, Viki, Cele y Vicky) por haber compartido conmigo los años de formación de grado y por seguir presentes aún hoy. Porque con su compañía y complicidad permitieron que Córdoba se convierta en un lugar más lindo donde vivir.

A mis amigas de San Francisco (Jime, Ceci, Gise, Juli, Anto, Vir, Mile y Carli) simplemente porque siempre están presentes en mi vida, tanto en las buenas como en las malas, a pesar de las distancias y las distintas obligaciones que cada una tiene.

Aquiles, gracias por tu cariño, tu paciencia y comprensión, por ser mi cable a tierra, por aceptar los tiempos postergados, por aguantar y acompañarme a la distancia estos años. Imagino que no debió ser fácil tener una novia que hace un doctorado y menos, una que tenía que escribir y rendir una tesis. Por todo eso y mucho más, te amo.

A toda mi hermosa familia...especialmente a mis padres Cintya y Sergio, por ayudarme siempre, por criarme con cariño y amor, por ser un ejemplo de trabajo y dedicación, por no permitir que muchas veces me diera por vencida y por confiar en mí. A mis hermanos, Julia y Bruno, porque son incondicionales...porque siempre, siempre están para ayudarme. Por último y no por eso menos importante quiero agradecer a mi sobrina Josefina, porque inexplicablemente llena mi vida de alegría desde que nació. La familia es donde empieza la vida, y donde el amor nunca termina.

De corazón... ¡Muchas Gracias!

ÍNDICE

RESUMEN.....	ix
ABREVIATURAS	xiv
LISTADO DE ILUSTRACIONES Y TABLAS.....	xviii
INTRODUCCIÓN.....	21
El sistema inmune	22
Sistema Inmune en el SNC	24
Anatomía del SNC	25
Barreras del SNC.....	27
Privilegio inmune	29
Mecanismos aferentes y eferentes de vigilancia inmune en el SNC	30
Rutas de migración leucocitaria hacia el SNC	31
Células del SNC	32
Células microgliales.....	33
Origen de las CM.....	34
Fisiología y activación de las CM	35
Influencia del microambiente nervioso sobre la activación microglial	36
Activación microglial: Inducción de una respuesta especializada	38
Respuesta neuroinflamatoria.....	39
Inflamación sistémica	40
Comunicación entre el sistema inmune y el SNC	41
Rol de la inflamación sistémica sobre la neurodegeneración	43
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	45
RESULTADOS	48
1.El efecto de las citocinas sobre la activación microglial	49
Conclusiones I	56

2.El rol de la inflamación sistémica en la respuesta neuroinflamatoria	57
Conclusiones II	81
3. Respuesta neuroinflamatoria <i>in vivo</i> en ausencia de IL-4	82
3. Evaluación de la respuesta neuroinflamatoria en ratones deficientes en TNF α o IFN γ	85
Conclusiones III	91
DISCUSIÓN.....	92
CONCLUSIÓN GENERAL	103
MATERIALES Y MÉTODOS	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	132

RESUMEN

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA POR CITOCINAS TIPO I

Las células microgliales (CM) desempeñan un rol inmune clave en el sistema nervioso central (SNC). Éstas se encuentran en estado de reposo y se activan rápidamente cuando contactan con señales endógenas y exógenas (patógenos). Una vez activas, dirigen la respuesta inflamatoria con fines de reparación y restauración del parénquima cerebral. Sin embargo, si esta activación es persistente puede ser perjudicial para el tejido.

Numerosos reportes asocian actualmente el desarrollo de inflamación sistémica con neuroinflamación y con la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

A lo largo de este trabajo de tesis, utilizando estrategias experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*, se planteó como objetivo general desarrollar un modelo experimental de neuroinflamación sin la utilización de endotoxina para evaluar como las citocinas tipo I, reconocidas por sus características pro-inflamatorias, influían sobre la respuesta neuroinflamatoria.

Los resultados obtenidos a partir de la utilización de una línea celular de microglía, demostraron que las CM al activarse con $IFN\gamma$, presentaron un tipo de activación similar a M1 también conocida como activación clásica, aumentando la secreción de citocinas pro-inflamatorias y disminuyendo la producción de factores neurotróficos como IGF-1.

Se desarrolló un nuevo modelo experimental de neuroinflamación utilizando la inyección hidrodinámica de vectores de expresión que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 en ratones C57BL/6 y se evaluó como el aumento de las citocinas tipo I sistémicas, en ausencia de endotoxina, podrían inducir una respuesta neuroinflamatoria. Este tratamiento indujo niveles sistémicos y persistentes de citocinas pro-inflamatorias como $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ y esplenomegalia. En cerebro, los distintos experimentos realizados permitieron identificar un aumento en la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias, sumado a la activación de las CM residentes del tejido y el reclutamiento de distintas poblaciones de leucocitos hacia el cerebro, principalmente de monocitos y linfocitos T y la identificación de muerte de neuronas con características de apoptosis. A su vez, los datos demostraron que la citocina

IFN γ sería importante en la respuesta neuroinflamatoria ya que su ausencia sistémica afectó el reclutamiento leucocitario al SNC y la activación de las CM residentes.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten aportar nuevos elementos que enfatizan la importancia de estudiar las interacciones entre el sistema inmune periférico y el SNC, demostrando que las citocinas inflamatorias sistémicas se comunican con el SNC generando un impacto en el mismo, detectado a partir de la inducción de neuroinflamación. Este vínculo entre el sistema inmune y el SNC podría contribuir, junto con las predisposiciones genéticas, al desarrollo de patologías cerebrales, ya que la inflamación sistémica podría pre-activar a las CM, aumentando su reactividad ante la exposición a nuevos estímulos nocivos, tornándose perjudiciales para el individuo.

Palabras claves:

Inflamación sistémica, Citocinas tipo I, Neuroinflamación, Células microgliales, Reclutamiento leucocitario.

REGULATION OF THE NEUROINFLAMMATORY RESPONSE BY TYPE I CYTOKINES

Microglial cells (MC) play an important immune role in the central nervous system (CNS). They typically stay in a resting state but become quickly activated in response to endogenous and exogenous signals (pathogens). These activated MC direct the inflammatory response for repair purposes and restoration of brain parenchyma. However, if this activation is persistent can be harmful to the tissue.

Currently, an increasing number of reports link the systemic inflammation development with neuroinflammation and progression of neurodegenerative diseases.

Throughout this thesis work, using both *in vitro* and *in vivo* experimental strategies, our main goal was to develop an experimental model of neuroinflammation, under endotoxin free conditions, to assess how the type I cytokines, known for their pro-inflammatory properties, can influence the neuroinflammatory response.

Results obtained from the use of a cell line of microglia showed that MC, when were stimulated with $\text{IFN}\gamma$, presented a M1 like activation (also known as classical activation), increased secretion of pro-inflammatory cytokines and decreased production neurotrophic factors such as IGF-1.

A new experimental model of neuroinflammation was developed using hydrodynamic injection of expression vectors encoding IL-12 and IL-18 cytokines in C57BL/6 mice. We evaluated if increased systemic type I cytokines, in the absence of endotoxin, could induce a neuroinflammatory response. This treatment generated systemic and persistent levels of pro-inflammatory cytokines such as $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IFN}\gamma$ and splenomegaly. In the brain, we identified an increased gene expression of proinflammatory cytokines, in addition to the activation of MC and the recruitment of different populations of leukocytes to this tissue, primarily monocytes and T cells, and neuronal death with morphological *signs of apoptosis*. In turn, the data demonstrated that $\text{IFN}\gamma$ could be important in neuroinflammatory response because systemic absence of this cytokine affected the CNS leukocyte recruitment and MC activation.

The results obtained in this thesis provide new elements that allow emphasizing the importance of studying the interactions between the peripheral

immune system and the CNS, demonstrating that systemic inflammatory cytokines communicate with the CNS making an impact on it. This link between the immune system and CNS could contribute along with genetic predisposition to the development of brain pathologies, because the systemic inflammation could drive priming of microglia. Priming makes the microglia susceptible to a secondary stimulus, which can then trigger an exaggerated inflammatory response harmful to the patient.

Keywords:

Systemic inflammation, Type I cytokines, Neuroinflammation, Microglial cells, Leukocyte recruitment.

ABREVIATURAS

A β 42: Péptido amiloide beta de 42 aminoácidos
Ac(s) Anticuerpo(s)
A-Cu-Ag: Amino- Cupro- Argéntica
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
ANOVA: Análisis de la varianza
APC: Aloficocianina
APC-Cy7: Aloficocianina -cianina 7
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BHE: Barrera hematoencefálica
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés: *brain derived neurotrophic factor*)
BV2: Línea celular de microglía inmortalizada de ratón.
CDs: Células dendríticas
CE(s): Célula(s) endotelial(es)
CM: Células microgliales
CMH II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
col. : Colaboradores
CPA: Célula presentadora de antígeno
CVOs: Órganos circumventriculares
CX3CL1: Fractalquina
CX3CR1: Receptor de fractalquina
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés: *damage-associated molecular pattern molecules*)
EA: Enfermedad de Alzheimer
EAE: Encefalitis autoinmune experimental
EDTA: Ácido etieldiaminotetraacético
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*)
EM: Esclerosis múltiple
EN: Enfermedad neurodegenerativa
EP: Enfermedad de Parkinson

FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FJ-B: del inglés: *Fluor Jade B*
GDNF: Factor de crecimiento derivado de la glía (del inglés: *glial derived neurotrophic factor*)
H(s): Hora(s)
H-E: Hematoxilina – Eosina
HPRT-1: del inglés: *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
IFM: Intensidad media de fluorescencia
IFN γ : Interferón gama (del inglés: *interferon- gamma*)
IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo I (del inglés: *insulin growth factor I*)
IL: Interleucina
i.p: Intraperitoneal
KO: del inglés: *Knock out mice*
LCR: Líquido ceforraquídeo
LPS: Lipopolisacárido
mAc: Anticuerpo monoclonal
M-CSF: Factor estimulante de colonias macrofágicas
M1: Macrófagos activados clásicamente
M2: Macrófagos activados alternativamente
mFPR2: Receptor de péptidos formilados tipo 2 (del inglés: *formil peptide receptor2*)
NGF: Factor de crecimiento nervioso (del inglés: *nerve growth factor*)
NK: Células asesinas naturales (del inglés: *natural killers*)
NT-3: Neurotrofina 3 (del inglés: *neurotrophin 3*)
ON: Óxido nítrico
ORF: Marco de lectura abierto (del inglés: *open reading frame*)
PAMP(s): Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS: Solución salina de buffer fosfato
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PE: Ficoeritrina (del inglés: *phycoerithrin*).
PE-Cy5: Ficoeritrina-cianina 5
PE-Cy7: Ficoeritrina-cianina 7
PerCP: Proteína peridina clorofila.
PerCP-Cy5: Proteína peridina clorofila-cianina 5

PP2A: Fosfatasa proteica 2A (del inglés: *protein phosphatase 2*)
PRR(s): Receptores de reconocimiento de patógenos
RNIs: Reguladores neuroinmunes
ROS: Especies reactivas del oxígeno (del inglés: *reactive oxygen species*)
SEM: Error estándar de la media (del inglés: *standard error mean*)
SFB: Suero fetal bovino
SNC: Sistema nervioso central
Th: Linfocitos T CD4+ cooperadores (del inglés: *T helper lymphocytes*)
TJ: Unión intercelular estrecha (del inglés: *tight junction*)
TLR: Receptores semejantes a toll (del inglés: *toll like receptors*)
TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: *tumor necrosis factor alpha*)
NGF: Factor de crecimiento neuronal (del inglés: *nerve growth factor*)
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés: *vascular endothelial growth factor*)
WT: Ratón salvaje (del inglés: *wild type*)

LISTADO DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

Introducción:

Fig. 1: Anatomía del SNC.....	26
Fig. 2: Conexión entre el sistema glinfático y el sistema linfático meníngeo.....	27
Fig. 3: Barreras del SNC	29
Fig. 4: Regulación neuroinmune.	37

Resultados:

Fig. 5: IFN γ induce cambios morfológicos en las CM	50
Fig. 6: IFN γ e IL-4 afectan de manera diferencial la producción de citocinas en CM	51
Fig. 7: IFN γ e IL-4 regulan de manera diferencial la expresión génica de IGF-1	52
Fig. 8: IFN γ e IL-4 regulan de manera diferencial los niveles secretados de IGF-1.....	53
Fig. 9: IFN γ atenúa el aumento de ARNm de IGF-1 en CM estimuladas con IL-4.....	54
Fig. 10: IFN γ e IL-4 disminuyen los niveles del transcripto CX3CR1.....	55
Fig. 11: Sistema venoso de ratón.....	58
Fig. 12: Modelo experimental de inflamación sistémica.....	59
Fig. 13: El tratamiento con 12 + 18 aumenta los niveles de citocinas circulantes.....	61
Fig. 14: El tratamiento con 12 + 18 induce esplenomegalia.	62
Fig. 15: Aumento en la expresión génica de TNF α , IFN γ y CCR2 en cerebro	63
Fig. 16: Aumento del reclutamiento leucocitario en animales tratados con 12 + 18.....	65
Fig. 17: Identificación de poblaciones celulares reclutadas al cerebro luego del aumento sistémico de citocinas.	66
Fig. 18: Aumento en la frecuencia de células reclutadas que expresan CMH II.	68
Fig. 19: Aumento en la expresión de CMH II en CM luego de inflamación sistémica.	69
Fig. 20: La inyección hidrodinámica de 12 + 18 activa a las CM.....	71
Fig. 21: Aumento de infiltración leucocitaria en cerebro luego de inflamación sistémica.....	73
Fig. 22: Aumento de infiltración leucocitaria luego de inflamación sistémica.....	75

Fig. 23: ADNc de IL-12 + IL-18 no presenta contaminación con LPS.	76
Fig. 24: Evaluación de muerte neuronal por apoptosis luego de inflamación sistémica.	80
Fig. 25: IL-4 no interviene en la modulación de la inflamación sistémica.	83
Fig. 26: La ausencia de IL-4 no modifica la respuesta neuroinflamatoria inducida por el tratamiento con 12 + 18.	84
Fig. 27: Producción de citocinas después de la inyección hidrodinámica en ratones TNF α R KO e IFN γ KO.	86
Fig. 28. Ratones INF γ KO no presentan esplenomegalia luego de la inyección hidrodinámica de 12 + 18	87
Fig. 29. La ausencia de IFN γ afecta el reclutamiento leucocitario.....	88
Fig. 30. Expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad....	90

Conclusión general:

Fig. 31. Regulación de la respuesta neuroinflamatoria por citocinas tipo I	105
--	-----

Materiales y Métodos:

Tabla 1: Ac utilizados para el análisis de citometría de flujo	112
Tabla 2: Ac para el análisis por inmunofluorescencia.....	115
Tabla 3: Secuencias de primers utilizados para PCR en tiempo real.....	119

INTRODUCCIÓN

EL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune protege al organismo por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos, incluyendo microorganismos y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos. También, participa en la inmunidad antitumoral.

El sistema inmune está constituido por diferentes poblaciones celulares, tales como linfocitos asesinos naturales o Natural killers (NK), linfocitos T y B, células fagocíticas, células presentadoras de antígenos (CPA) entre otras y moléculas, dentro de ellas anticuerpos, citocinas y complemento. Tanto el componente celular como el soluble, participan en conjunto para llevar a cabo la respuesta inmunitaria.

Esta respuesta integra mecanismos involucrados tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, los cuales difieren en varios aspectos. La inmunidad innata es una respuesta rápida que actúa desde la llegada del microorganismo al hospedador, mientras que la inmunidad adaptativa requiere de aproximadamente una semana, luego de una infección primaria, para generar sus mecanismos efectores. La inmunidad innata y adaptativa no son considerados mecanismos secuenciales y complementarios de resistencia a patógenos, sino que se regulan entre sí, a través de contactos celulares y la secreción de mediadores solubles.

La primera respuesta de un organismo a los agentes patógenos o a daños tisulares es una reacción inflamatoria, que se caracteriza por la migración de células con funciones defensivas, alteraciones en la permeabilidad vascular y la secreción de mediadores solubles, tales como citocinas, quimiocinas e interferones (IFNs). Las células inflamatorias y los mediadores solubles tienen una potente actividad y juntos representan a la fase efectora de la resistencia innata.

Las células de la inmunidad innata (neutrófilos, macrófagos/monocitos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células dendríticas (CDs) y NK), reconocen específicamente estructuras que son comunes entre grupos de microorganismos relacionados, pero no pueden distinguir diferencias sutiles entre sustancias extrañas. Por lo tanto, la activación de la respuesta no es específica del patógeno, pero es dependiente de la unión del ligando a receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (patterns recognition receptors, PRRs) que reconocen patrones moleculares que son compartidos y conservados

entre diferentes clases de microbios (PAMPs). También son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) tisular. Los DAMPs son secretados activamente por las células inmunes innatas y / o liberados en forma pasiva por las células lesionadas o dañadas en respuesta a una infección o lesión, incluyen a moléculas derivadas de células tales como proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP), proteínas del grupo de alta movilidad Box1 (high mobility group box - HMGB), moléculas de la matriz extracelular como la fibronectina y otras sustancias como lipoproteínas oxidadas de baja densidad, ácidos grasos libres, ATP, entre otras ¹.

Entre los receptores de la inmunidad innata se encuentran, la familia de receptores semejantes a Toll (TLRs), la familia de receptores Nod (NLR), los receptores ácido retinoico inducibles (RIG-1), entre otros, que se distribuyen diferencialmente entre las células inflamatorias. Estos receptores reconocen diferentes clases de patógenos e inducen la producción de patrones de mediadores pro-inflamatorios similares, pero no idénticos. La distribución de los receptores sobre los tipos de células inflamatorias determina, en parte, los patrones de citocinas, quimiocinas e IFNs que son inducidos por diferentes agentes patógenos y que son en gran medida responsables de las reacciones inflamatorias celulares y vasculares, así como la activación de la resistencia innata.

Aunque la resistencia innata es eficiente, ya sea en la prevención de una infección o en reducir en gran medida la carga de patógenos, el control de una infección se logra cuando se induce la inmunidad adaptativa.

La inducción de la respuesta inmune adaptativa se inicia con la captura de los antígenos microbianos por CPA, como las CD, en los tejidos periféricos, en la piel y en las superficies mucosas. Las CPA capturan, procesan el antígeno y luego migran hacia los nódulos linfáticos secundarios. Allí, estas células exponen el antígeno a los linfocitos T CD4+ y T CD8+, induciendo una respuesta inmune adaptativa específica para patógenos, ya que epítopes antigénicos son reconocidos mediante receptores específicos distribuidos clonalmente en células T y B. La activación de la inmunidad adaptativa conduce a la expansión de los clones reactivos y al desarrollo de la memoria inmunitaria, procesos que no se observan en la inmunidad innata.

Según las señales que reciben las CD4 en la periferia, pueden activar a los linfocitos generando perfiles funcionales diferentes, que serían aptos para combatir patógenos de características diversas, como por ejemplo, extracelulares o intracelulares. Las citocinas que se producen durante la respuesta innata dirigen la polarización de las células T CD4+ colaboradoras (Th) hacia uno u otro tipo de respuesta efectora adaptativa². La interleucina-4 (IL-4) se identificó por primera vez como una citocina clave en la generación de una respuesta Th2, y más tarde, la interleucina-12 (IL-12) fue descubierta y reconocida por tener un papel central en la polarización hacia una respuesta Th1³. Se ha clasificado en la literatura a las citocinas como tipo I o II dependiendo de la subpoblación de linfocitos T que las producen mayoritariamente.

SISTEMA INMUNE EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La piel y los epitelios de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario presentan elementos propios de la inmunidad innata que impiden la penetración de los patógenos en el organismo, mientras que, la barrera hematoencefálica (BHE) impide la llegada de dichos agentes patógenos al sistema nervioso central (SNC). Clásicamente, en la periferia la respuesta inmune contra microorganismos se inicia luego de la disrupción del epitelio, con la consecuente entrada del patógeno, inmediatamente se desencadena la activación de células del sistema inmune innato y la inducción de una respuesta inflamatoria con el objetivo de erradicar al microorganismo. Si la respuesta inmune innata local no es capaz de eliminar el agente infeccioso, se induciría la activación de una respuesta inmune adaptativa que favorecería la eliminación del mismo.

El SNC, al igual que otros sitios del organismo como las gónadas y la interfase materno-fetal, exhibe una respuesta inmunológica limitada con el fin de proteger sus funciones vitales. Para cumplir dicho objetivo este sistema ha evolucionado anatómicamente y funcionalmente.

Anatomía del SNC

El SNC está organizado en diferentes compartimentos: cerebro, médula espinal, nervios ópticos y retina.

El cerebro está formado por el parénquima y los ventrículos que contienen a los plexos coroideos. Este órgano vital está ubicado en el interior del cráneo y se encuentra cubierto por las meninges ricas en vascularización que presentan tres capas membranosas, siendo la más externa la Duramadre, seguida de la Aracnoides y de la Piamadre que es la capa más interna en contacto con el parénquima. Se reconoce como parénquima al tejido cerebral propiamente dicho, excluyendo espacios con vasos sanguíneos o líquido cefalorraquídeo (LCR) como ventrículos y meninges ⁴.

El LCR se produce en los plexos coroideos dentro de los ventrículos y desde allí circula hacia el espacio subaracnoideo localizado entre la Aracnoides y la Piamadre. El LCR provee de nutrientes, remueve metabolitos tóxicos y actúa como una barrera mecánica que previene de traumas o daños al cerebro y a la médula espinal. Además funciona de manera semejante a una vía de drenaje linfático en el SNC.

El plexo coroideo, se compone de redes de capilares fenestrados que están situados dentro de un estroma. El estroma del plexo coroideo está, a su vez, cubierto por una monocapa de células epiteliales que presentan uniones estrechas formando la barrera sangre-LCR. Estas células epiteliales generan el LCR a través de difusión y transporte activo desde la sangre arterial. Además, una pequeña porción del LCR se forma por difusión desde el fluido intersticial del SNC. El LCR circula desde los ventrículos, impulsado por pulsaciones del plexo coroideo y por la acción de los cilios de las células endoceliales que recubren estos espacios, a través de los puertos de salida del tronco cerebral para cubrir las superficies exteriores de la médula espinal, tronco cerebral, cerebelo y la corteza cerebral ⁵.

Se creía que el SNC carecía de vías linfáticas, por lo que la reabsorción de LCR se realizaba exclusivamente en las vellosidades aracnoideas, que son evaginaciones de la membrana aracnoides a través de la duramadre en los senos venosos, donde el LCR era drenado hacia la sangre venosa. Además de ser reabsorbido en sangre, se ha propuesto que los constituyentes del LCR drenan a los ganglios linfáticos cervicales a través de los vasos linfáticos de la mucosa nasal

llevando de ese modo antígenos solubles a los ganglios linfáticos de drenaje (Figura 1).

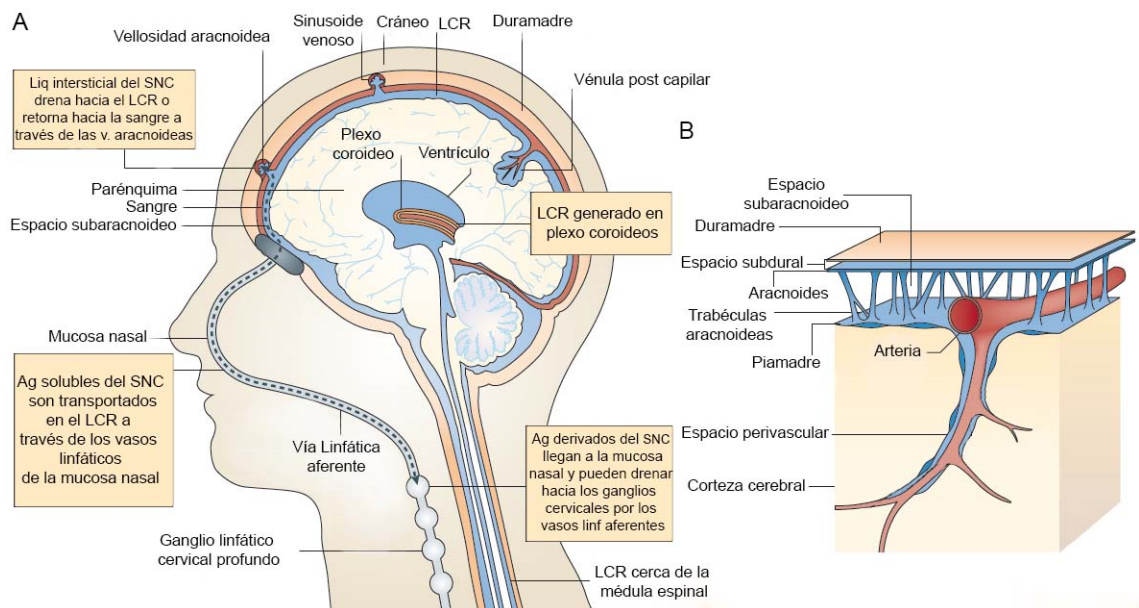


Figura 1. Anatomía del SNC.

Representación esquemática de los componentes del SNC. **(A)** Sección sagital de una cabeza humana, que muestra las estructuras anatómicas relevantes (es decir, el ventrículo, plexo coroideo, el sistema nervioso (SNC) parénquima central, vasos linfáticos y ganglios linfáticos cervicales profundos) en forma esquemática. **(B)** Vasculatura subpial en relación con el espacio subaracnoideo y parénquima cerebral. (Adaptado del Ransohoff RM, Nature reviews immunology, 2012)

Sin embargo, recientemente Louveau y col. describieron la existencia de vasos linfáticos funcionales en el SNC, que corren paralelos a los senos duros de las meninges. Estas vías linfáticas, en lugar de los vasos linfáticos nasales, serían la vía principal a través de la cual el LCR drena hacia los ganglios linfáticos cervicales profundos, y además representan un camino más convencional para la salida de células del SNC ^{6 7} (Figura 2).

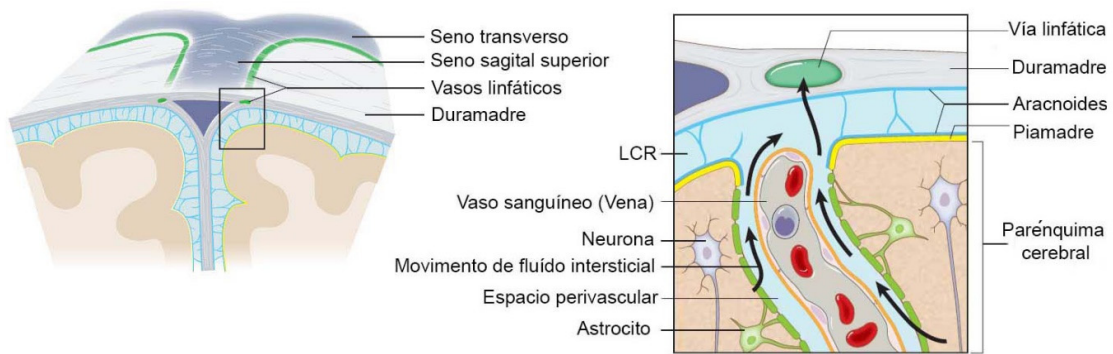


Figura 2. Conexión entre el sistema glinfático y el sistema linfático meníngeo.

Representación esquemática de una conexión entre el sistema glinfático, responsable de recoger los fluidos intersticiales del parénquima hacia el LCR, y posteriormente hacia los vasos linfáticos meníngeos identificados recientemente. (Adaptado de Louveau A y col, Nature, 2015)

Barreras del SNC

El privilegio inmune en el SNC es mantenido por dos tipos de barreras: la BHE que separa la sangre del cerebro y la barrera presente en los plexos coroideos que separa la sangre del LCR⁸. Estas barreras tienen la función de controlar el flujo de iones y moléculas, nutrientes y oxígeno que son entregados según las necesidades neuronales, protegen al cerebro de toxinas, agentes patógenos y limitan el ingreso de componentes del sistema inmune periférico y otras sustancias hacia el SNC. Esto garantiza la presencia de un ambiente que permite que las neuronas funcionen correctamente^{9 10 11}.

La BHE es una estructura vascular multicelular que separa al SNC de la circulación de sangre periférica, que fue originalmente definida alrededor de los años 1900 en distintos trabajos de Ehrlich¹², Lewandowski¹³ y Goldman¹⁴. El elemento central de la BHE es el vaso sanguíneo cerebral formado por las células endoteliales (CEs). A diferencia de las CEs de diferentes tejidos, las de la BHE tienen uniones continuas intercelulares muy estrechas (TJ, del inglés tight junctions), carecen de fenestraciones y llevan a cabo muy bajos niveles de transcitosis, lo que limita en gran medida tanto el movimiento paracelular como transcelular de moléculas¹⁵. Esto significa que el paso de moléculas está regulado por una serie de transportadores específicos. Además, las CEs tienen una expresión baja de moléculas de adhesión celular, impidiendo la infiltración de células inmunes al SNC sano.

Anatómicamente, la BHE incluye elementos celulares (pericitos y astrocitos) y no celulares (matriz extracelular) que interactúan con las CEs ofreciendo un soporte estructural y funcional a la BHE. Los pericitos, son células contráctiles que rodean la superficie abluminal de las CEs. Los procesos astrocíticos rodean a los capilares cerebrales y forman el complejo gliovascular interactuando con los pericitos y el endotelio. Estos procesos astrocíticos también rodean a las vasos pre- y post-capilares y junto con algunos procesos microgliales separan al parénquima del espacio perivascular. La matriz extracelular está constituida por las membranas basales y la matriz intersticial que se forma principalmente por proteínas estructurales secretadas por las CEs, pericitos y astrocitos.

La BHE existe en todos los niveles del árbol vascular del SNC, incluyendo arterias y arteriolas penetrantes, el lecho capilar denso, vénulas post-capilares y vénulas y venas drenantes ¹⁶. La superficie abluminal de los capilares cerebrales está cubierta por una membrana basal que separa CEs a partir de los pericitos y a los pericitos de astrocitos. En cambio, en la vénula post-capilar, las dos membranas basales son distintas (endotelial y parenquimal) y definen las fronteras interiores y exteriores de un espacio perivascular, denominado espacio de Virchow-Robin, donde se encuentra el fluido intersticial proveniente de la materia gris en equilibrio con el LCR y las células perivasculares derivadas de médula ósea que tienen funciones inmunorreguladoras. En condiciones inflamatorias, otras poblaciones leucocitarias pueden ingresar a este espacio ⁹. (Figura 3 a y b)

La barrera presente en los plexos coroideos separa a la sangre del LCR y está formada por células epiteliales que presentan TJ limitando el movimiento paracelular de moléculas. Como se describió anteriormente, el plexo coroideo se compone de redes de capilares fenestrados que están situados dentro de un estroma. Las CEs carecen de TJ, permitiendo una comunicación libre entre la sangre y el estroma. El estroma del plexo coroideo está, a su vez, cubierto por una monocapa de células epiteliales que presentan TJ y forman la barrera sangre-LCR ¹⁷ (Figura 3 c).

Se considera que esta barrera es más permisiva que la BHE, ya que permite en condiciones fisiológicas el tráfico selectivo de células hacia el LCR y proporciona mecanismos de regulación inmune para sesgar a las células inmunes hacia respuestas efectoras específicas ¹⁷.

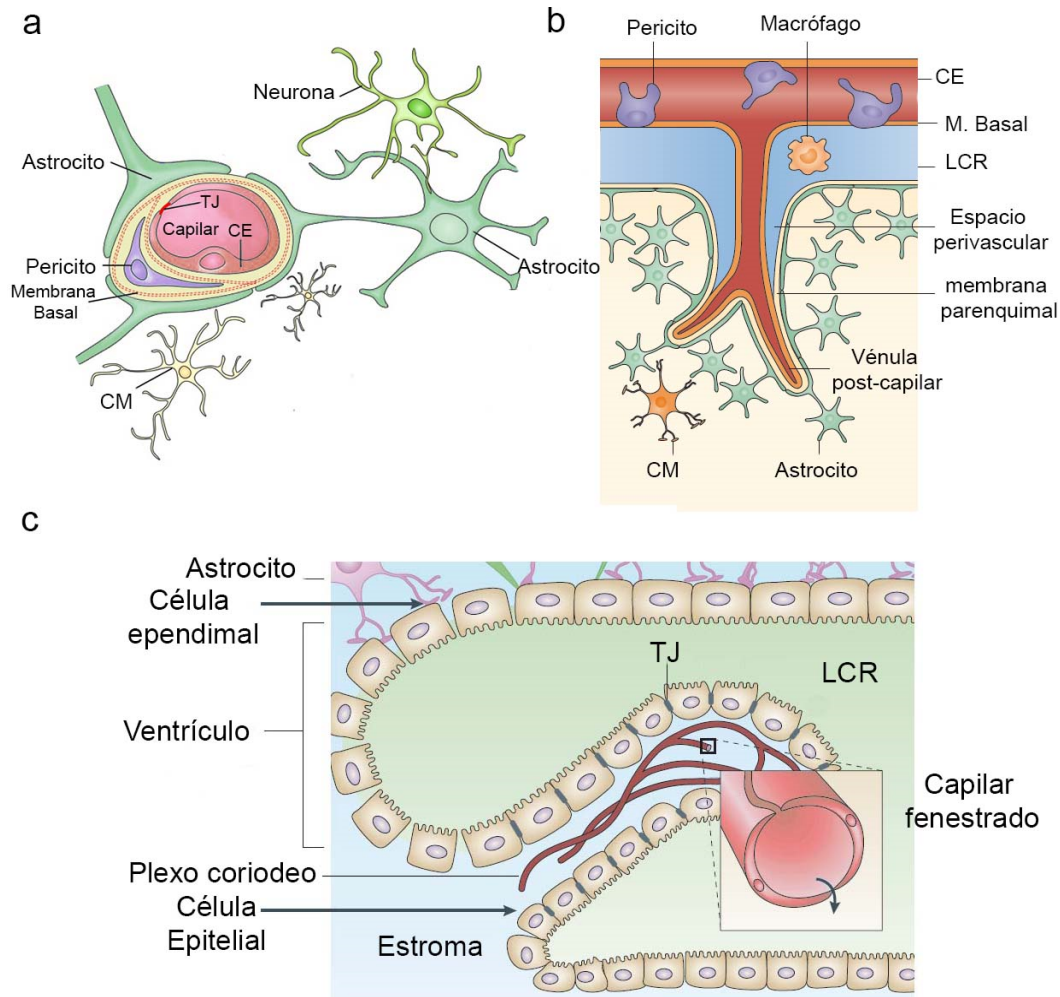


Figura 3. Barreras del SNC.

Representación esquemática de la BHE en **(A)** Capilar (Adaptado de Abbot NJ, Nat rev Neuroscience, 2006) **(B)** Vénula post capilar (Adaptado de Ransohoff RM, Nat rev immunology, 2012) **(C)** Representación esquemática de la barrera presente en plexos corioideos (Adaptado de Abbot NJ, Nat rev Neuroscience, 2006)

Privilegio inmune

El “privilegio inmune” del SNC hace mención a la ausencia de una respuesta inmune intensa en este sitio, y es indispensable para controlar el daño generado frente a un estado inflamatorio en el cerebro, debido a que este órgano presenta una baja capacidad regenerativa. De esta forma, se logra mantener la homeostasis requerida para la función neuronal y la defensa del huésped.

El concepto de privilegio inmune puede reducirse a dos observaciones: (a) inmunógenos tales como xenoinjertos, virus o lisados bacterianos no provocan una

respuestas inmunitarias adaptativas luego de micro-inyectarse de una forma no traumática en el parénquima del SNC y (b) la inmunización periférica con el mismo inmunógeno conduce a una respuesta inmune enérgica hacia el antígeno depositado en el SNC ^{18 5}. Debido a que este privilegio es relativo y solo se encuentra confinado al parénquima, sería más apropiado utilizar el término de sitio “inmunológicamente especializado”, ya que el resto de los compartimentos (ventrículos, meninges, plexos coroideos y órganos circumventriculares (CVOs)) son capaces de llevar a cabo una respuesta inmune similar a la observada en la periferia ¹⁹.

El privilegio inmune es mantenido activamente como resultado de características inmunoregulatorias de las células residentes y su microambiente, controlando la respuesta inmune innata e impidiendo que ésta pueda iniciar la inmunidad adaptativa, ya que el parénquima cerebral carece de CD u otra célula que realice las funciones operativas de una CD (captación de antígenos, la migración a ganglios linfáticos de drenaje y la presentación a células T vírgenes) ^{18 20}.

Sin embargo, en condiciones inflamatorias el privilegio inmune no es preservado, ya sea por efectos inmunoestimuladores locales de citocinas y quimiocinas, presencia de CDs en el parénquima, desarrollo de tejido linfoide terciario en las meninges o por ruptura de la BHE ¹⁹.

Mecanismos aferentes y eferentes de vigilancia inmune en el SNC

Dentro de los mecanismos de vigilancia presentes en el SNC, la rama aferente de la respuesta inmune se caracteriza por el tránsito de material antigénico desde el parénquima cerebral hacia el LCR y posteriormente a los ganglios linfáticos cervicales profundos para realizar la presentación antigénica a células T vírgenes o de memoria. En condiciones de ausencia de inflamación no se encuentran CDs en el parénquima cerebral, por lo tanto, en este caso, la rama aferente carece de una vía de transporte celular para llevar a cabo la presentación antigénica a células T. Sin embargo, en condiciones patológicas CDs pueden llegar al parénquima ^{10 19}.

Por otro lado, la rama eferente, está definida por la respuesta inmune efectora de leucocitos y/o anticuerpos contra antígenos del SNC. Esta fase se inicia

en órganos linfáticos secundarios y se promueve localmente por re-estimulación a través de la interacción entre células T de memoria y CPA. En este sentido, se ha propuesto que células T de memoria podrían migrar desde la sangre hacia el espacio subaracnoideo y allí encontrarse con células mieloides capaces de realizar la presentación antigénica en ciertos sitios del SNC, tales como los plexos coroideos, el estroma asociado al epéndimo (membrana epitelial fina que recubre los ventrículos del cerebro y la médula espinal), las meninges y el espacio perivascular. Esta teoría se sostiene en base a estudios realizados en el LCR de individuos saludables, en los cuales se observó la presencia de leucocitos con un fenotipo principalmente de células T de memoria ¹⁰. Sin embargo, esta fase presenta numerosas adaptaciones en el parénquima cerebral para evitar el daño inmunológico en este sitio. Se ha descrito que neuronas, astrocitos y células microgliales, producen una serie de factores que controlarían la respuesta inmune mediada por células T.

En base a lo desarrollado, se puede mencionar que la respuesta inmune en el SNC difiere de la de la periferia en parte por la anatomía de este sistema. En este aspecto, presenta tres características anatómicas particulares tales como la carencia relativa de drenaje linfático del parénquima cerebral, la ausencia de CPA en el parénquima y la presencia de barreras, que limitan el intercambio de células inmunes y mediadores con el sistema periférico.

Rutas de migración leucocitaria hacia el SNC

Como se mencionó anteriormente, en condiciones de ausencia de inflamación en el SNC, no se encuentra un gran número de leucocitos, por lo tanto para poder investigar las posibles rutas de llegada de leucocitos infiltrantes, se han realizado estudios utilizando modelos experimentales de daño o enfermedad. A partir de los resultados obtenidos se han definido tres rutas de migración leucocitaria hacia el SNC.

La primera vía ocurre durante la formación del LCR, donde los leucocitos se extravasan a través de las fenestraciones del endotelio de los plexos coroideos, migran a través del estroma e interactúan con las células epiteliales de dichos plexos para finalmente ingresar en el LCR. Esta ruta es un mecanismo de ingreso en condiciones fisiológicas, ya que el LCR de individuos saludables contiene

aproximadamente tres mil leucocitos por mililitro. Sin embargo, las poblaciones leucocitarias presentes en el LCR, se encuentran en proporciones diferentes a las observadas en la circulación sistémica, siendo el 80% células T, con una relación incrementada de linfocitos TCD4+ respecto a TCD8+, con un perfil de expresión principalmente de células T de memoria central (CD27 y CD45RO). Además los monocitos constituyen aproximadamente un 5%, los linfocitos B menos del 1% y los neutrófilos raramente son encontrados ^{5 17}. Sin embargo, estos leucocitos presentes en el LCR en condiciones fisiológicas no invaden el parénquima ²¹.

La segunda vía de migración leucocitaria, es a través de la arteria carótida interna a partir de la cual, los leucocitos se extravasan hacia las vénulas postcapilares en la superficie de la Piamadre y llegan al espacio subaracnoideo y al espacio perivascular. En estos sitios podrían encontrarse con células de linaje mieloide capaces de realizar la presentación antigénica. En ensayos realizados en ratones, se demostró que ambas vías mencionadas requieren de P-selectina para la migración leucocitaria al SNC ¹⁰.

En la tercera vía de migración, los leucocitos ingresan al parénquima cerebral, pasando desde las carótidas internas, a través del árbol vascular de arteriolas y capilares, para finalmente extravasarse hacia las vénulas postcapilares. Esta ruta de ingreso requiere que los leucocitos atraviesen la BHE y la lámina basal endotelial. Para poder dilucidar la eficiencia de esta vía, se realizó un estudio de microscopía intravital en un modelo experimental murino de encefalitis autoinmune experimental (EAE), y los resultados obtenidos contribuyeron a la teoría de que la migración de linfocitos activados a través de una BHE íntegra, es un evento de muy baja eficiencia ^{10 21}.

CÉLULAS DEL SNC

En el parénquima existen diversas poblaciones celulares, tales como las neuronas y células gliales o glía. La glía es el componente mayoritario en el cerebro de individuos adultos sanos y está conformada por: astrocitos, oligodendrocitos y células microgliales (CM). Todas estas poblaciones celulares llevan a cabo un rango dinámico de funciones esenciales que permiten el desarrollo y el funcionamiento normal del SNC. Los astrocitos y los oligodendrocitos son de origen neuroectodermal, mientras que la microglía es de origen mesodermal/ mieloide.

Los astrocitos constituyen la población más abundante del cerebro y cumplen diferentes funciones: actúan como soporte metabólico de neuronas, participan en etapas claves de la formación de sinapsis y de plasticidad neuronal. También contribuyen al mantenimiento de la BHE y se los ha vinculado en los mecanismos de inducción de la respuesta inmune innata en el SNC ^{22 23}.

Por otro lado, los oligodendrocitos son los responsables de la formación de la capa de mielina que cubre las fibras nerviosas y axones, y que incrementa la velocidad de conducción de los potenciales de acción ²⁴.

Las CM, fueron descritas por primera vez por Del Rio-Hortega en 1932 ²⁵. Son las únicas células residentes de origen mieloide presentes en el parénquima cerebral. Estas células median la respuesta inmune local, desde el desarrollo y durante toda la vida de individuos saludables, como así también en procesos neurodegenerativos. Por lo tanto, son consideradas efectores críticos y reguladores de la inflamación y de la respuesta inmune innata en el SNC.

En regiones discretas del SNC (incluyendo el cerebro y la médula espinal, así como las meninges, espacios subaracnoideos y perivasculares y el plexo coroideo) pueden hallarse otras células mononucleares de origen mieloide. Se localizan distintas poblaciones de macrófagos, que se denominan en función del sitio donde se encuentran: macrófagos perivasculares; meningeales o de los plexos coroideos ^{20 26}. Estos macrófagos tienen diferentes fenotipos cuando se comparan con la microglía ²⁷. También se ha demostrado la presencia de CD en las meninges y en el estroma de plexos coroideos. Además, en ciertas condiciones inflamatorias del SNC, se produce un rápido reclutamiento de leucocitos hacia los sitios de inflamación.

CÉLULAS MICROGLIALES

En el cerebro de individuos sanos, las CM se encuentran distribuidas a lo largo de todo el parénquima. Estas células tienen la característica especial de ser tanto células gliales del SNC como un único tipo de fagocito mononuclear. Constituyen más del 10% de todas las células en el SNC adulto, varían aproximadamente de 5% a casi el 20%, dependiendo del sitio, siendo localizadas en mayor medida en la materia gris con respecto a la materia blanca ²⁸. En el SNC sano, las CM tienen una distribución distintiva, con los procesos radiales que no se

superponen, un pequeño soma celular y cada una parece ocupar su propio territorio²⁰.

Origen de las CM

La controversia sobre los posibles orígenes de la microglía persistió hasta finales de 1990. Tal vez los datos más convincentes que favorecen el origen mielode de la microglía llegaron con la demostración de que ratones que carecen del factor de transcripción PU.1 (ratones PU.1^{-/-}) fallan en la diferenciación de células de linaje mielode, incluyendo macrófagos y neutrófilos y que en estos ratones no se detectan CM²⁹.

Un informe utilizando rastreo del linaje demuestra de manera concluyente que la microglía de un ratón adulto deriva de precursores mieloides primitivos que surgen en el saco vitelino extraembrionario en un marco de tiempo muy restringido, justo antes del día embrionario 8.0 (E8.0), e invaden el embrión acercándose al neuroepitelio en un momento antes de la aparición de la vascularización del SNC en desarrollo E9.0, después de que se forman los vasos sanguíneos, las células se identifican dentro del parénquima E10.5³⁰. Por otro lado, se observa que no parece haber ninguna contribución de los precursores mieloides derivados de sangre al pool de microglía en el embrión o el adulto. En contraste, el resto de las células de origen mielode presentes en el SNC, pueden migrar y ser renovadas constantemente desde la médula ósea^{31 32}.

Los progenitores eritro-mieloides que dan lugar a las células que migran desde el saco vitelino se han identificado como células con baja expresión de CD45 y alta expresión de c-kit³³. Durante el trayecto al SNC las células progenitoras adquieren la expresión de genes específicos de linaje y, finalmente, se diferencian en CM maduras. Sin embargo, conservan la expresión baja de CD45. Las CM derivadas del saco vitelino permanecen durante toda la vida, la población se mantiene por auto-renovación. Debido a estas diferencias en la ontogenia, la microglía se distingue de otros macrófagos por sus propiedades de auto-renovación, la resistencia local a la radiación ionizante²⁶ y la expresión menor de CD45.

Fisiología y activación de las CM

Las CM son altamente especializadas y desempeñan funciones inmunes en el SNC, participando activamente en los procesos neuroinflamatorios.

Estudios experimentales apoyan la idea de que la microglía puede desarrollar otras funciones además de inmunológicas. Se cree que las CM tienen un papel en el mantenimiento de la integridad sináptica tanto en desarrollo como en la adultez, siendo capaces de eliminar terminales no funcionales de los axones, ayudando así a que las conexiones neuronales permanezcan intactas ^{34 35 36}.

También se las ha asociado con funciones neuroprotectoras, asociadas con la producción de factores anti-inflamatorios y de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y diversos factores neurotróficos tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF), Neurotrofina 3 (NT-3), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), entre otros ^{37 38}. Además se cree que la producción de estos factores podría afectarse dependiendo del tipo de polarización que reciban las CM en distintas patologías o daños que se desarrollan en el SNC.

En condiciones fisiológicas, las CM presentan una morfología ramificada, conocido como estado de “reposo”. A pesar de la apariencia de estar en estado de reposo, las CM se encuentran permanentemente sensando el microambiente a través de la proyección de procesos finos celulares (ramificaciones), que están en continuo movimiento contactando con neuronas y células gliales, mientras que el soma celular permanece inmóvil. Esta morfología característica es desarrollada debido a la fuerte influencia del ambiente nervioso sobre la maduración de los precursores microgliales, de manera de generar una red de procesos celulares finos y largos que vigilan todo el parénquima cerebral ³⁹. Las CM generalmente no presentan motilidad en el tejido del SNC saludable. La literatura sugiere que cuando estas células se tornan móviles se ha producido un daño considerable al tejido, lo que requiere reparación estructural y funcional ³⁴.

Las CM pueden activarse frente a diferentes estímulos, produciendo un cambio en su morfología y fenotipo que les permite adquirir capacidad fagocítica y liberar mediadores inflamatorios tales como citocinas y quimiocinas ²⁸. Los cambios morfológicos que acompañan generalmente a la activación microglial se caracterizan por hipertrofia del cuerpo celular y acortamiento y engrosamiento de

sus procesos. La microglía también puede ser identificada como activada por el aumento en la expresión o la síntesis de novo de una variedad de moléculas de superficie y citoplasmáticas ³⁹.

Influencia del microambiente nervioso sobre la activación microglial

En términos generales, las CM en reposo, poseen un fenotipo caracterizado por expresar bajos niveles del antígeno leucocitario común (CD45), y de moléculas de superficie que son esenciales para inducir o mediar las funciones típicas de los macrófagos, tales como, el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II), CD80, CD86 y CD40. El microambiente local desempeña un papel crítico en la regulación del fenotipo microglial. Este fenotipo, es inducido a través de la interacción con mediadores solubles o unidos a membrana de neuronas, CEs, astrocitos y además es mantenido por las barreras, que restringen el ingreso de componentes del plasma ^{20 40 27}.

Las neuronas liberan neurotrofinas tales como NGF, BDNF y NT-3 que inhiben la expresión de CMH II y de moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40. Por otro lado, liberan neuropéptidos tales como, el péptido intestinal vasoactivo, la hormona estimulante de α -melanocitos, el péptido relacionado al gen de calcitonina y la norepinefrina que inhiben la producción de moléculas pro-inflamatorias en CM activadas con LPS (Lipopolisacárido). De manera similar, los astrocitos regulan la activación microglial mediante la liberación de mediadores solubles y de Prostaglandina E2 ¹⁹.

Algunos reguladores neuroinmunes proteicos que controlan la activación de las células gliales a través de contacto celular son: CD200, CD47, CD22, CX3CL1 (Fractalquina) y FasL ^{41 42}.

En estudios realizados en ratones deficientes en CD200, molécula expresada en neuronas y CE, se observó que la microglía, la cual expresa el receptor de CD200, presentó un perfil de activación caracterizado por el cambio en su morfología y el incremento de la expresión de CMH II en su superficie.

Otra molécula expresada por neuronas es CD47, la cual interacciona con CD127/SIRP 1- α expresado en CM y suprime la fagocitosis y producción de TNF α inducida por LPS. Un efecto similar es inducido por la interacción de la molécula CD22 secretada por neuronas, con CD45 expresado en la microglía ¹⁹.

La relevancia de la regulación mediante CX3CR1 se demostró *in vivo* mediante el estudio de la lesión de neuronas inducida por LPS y modelos genéticos de neurodegeneración. En estos modelos, ratones CX3CR1^{-/-} mostraron una pérdida de neuronas exacerbada en comparación con los CX3CR1^{+ / +}. Este resultado podría atribuirse a la activación desmedida de CM, porque son las únicas células del SNC que lo expresan ⁴. Por otro lado, dependiendo del daño al SNC la falta de CX3CR1 podría prevenir la muerte neuronal ⁴³, como en el modelo experimental de enfermedad de Alzheimer, o bien no presentar un rol asociado ⁴⁴.

Una hipótesis interesante que surge a partir del conocimiento del efecto inhibitorio que ejerce el microambiente del SNC sobre las CM, es que la activación de estas células, podría deberse en parte a la pérdida de regulación del microambiente local sobre la Microglía. Esto explicaría la respuesta abrupta de la microglía frente a una lesión neuronal ²⁰. Por lo que el estudio y profundización de estos mecanismos resultarían relevantes para alterar la activación de las CM.

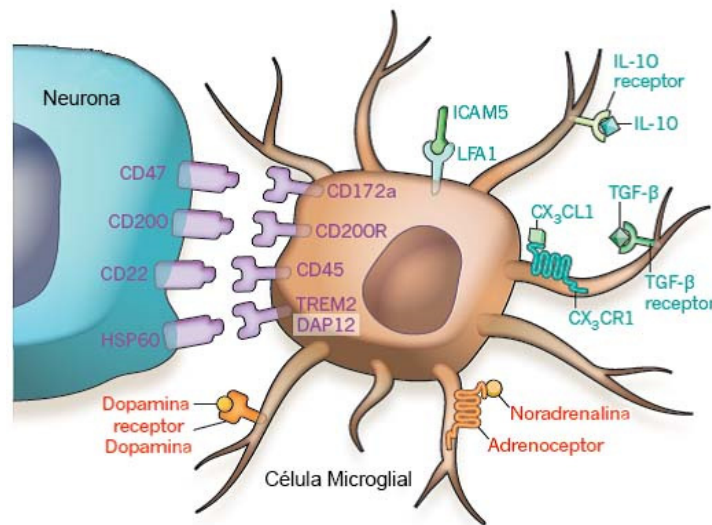


Figura 4. Regulación neuroinmune.

Representación esquemática de los factores inhibitorios solubles y dependientes de contacto que controlan la activación microglial (Adaptado de Ransohoff R M, 2010, nature).

Activación microglial: Inducción de una respuesta especializada

Las citocinas producidas por las células inmunes en respuesta a un estímulo, pueden dar lugar a un espectro de perfiles de activación en macrófagos. La activación en macrófagos ha sido descrita y se sabe que dependiendo del estímulo que las active, estas células pueden llevar a cabo funciones diversas. Los distintos estados de activación de macrófagos han sido clasificados como M1 y M2.

En esta clasificación, la designación M1 esta reservada para la activación clásica de macrófagos que surge en respuesta a LPS, al factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) que es producido por CPA o a interferón- γ (IFN γ). IFN γ y TNF α son consideradas citocinas tipo I, pro-inflamatorias que se pueden producir durante una respuesta inmune adaptativa por células T CD4+ activadas y polarizadas hacia una respuesta colaboradora tipo 1 (Th1) o células T CD8 + o citotóxicas (Tc) o durante la respuesta inmune innata por células NK. Estos macrófagos M1 desempeñan actividades microbicidas con producción de mediadores proinflamatorios tales como TNF α , IL-1 β , IL-6 y especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (ON).

La clasificación M2 se ha expandido rápidamente para incluir a otros estados de activación (M2a, M2b y M2c). El término activación alternativa o M2a se reserva a la activación de macrófagos luego de la estimulación con IL-4 o IL-13 ^{45 46} consideradas citocinas anti-inflamatorias tipo II, éstas puede producirse durante una respuesta inmune adaptativa por las células Th2 o durante una respuesta inmune innata por granulocitos. La activación alternativa se caracteriza por la inducción de genes y proteínas involucrados en tareas de reparación tisular y reconstrucción ^{45 47}. Los macrófagos regulatorios (M2b) y deactivados (M2c) responden a estímulos como IL-10, glucocorticoides, prostaglandinas, células apoptóticas o complejos inmunes.

Varios estudios *in vivo* sugieren que el estado de activación de una población de macrófagos puede cambiar con el tiempo. No es claro si esta alteración fenotípica es el resultado de la desdiferenciación de los macrófagos originales hacia al estado de reposo o de la migración de una nueva población de macrófagos en el sitio del tejido, donde reemplazan a las células originales. Independientemente del mecanismo, hay casos en que los macrófagos cambian de un fenotipo funcional a otro en respuesta a las señales ambientales. Este cambio fenotípico se asocia con

diversas patologías, tal es el caso de obesidad, aterosclerosis y cáncer, entre otras ^{47 48}.

Si bien la microglía es un macrófago residente de tejido en el SNC, presenta funciones adicionales y algunas características que la distinguen de los macrófagos periféricos, influenciadas principalmente por el microambiente tisular, por lo cual probablemente los mecanismos y perfiles de activación en esta población puedan diferir de los identificados para los macrófagos periféricos. Existen publicaciones relacionadas a estos perfiles de activación en CM, la mayoría de los trabajos son *in vitro* y los autores concuerdan en que la activación de la microglía es un proceso específico dado por la amplia gama de patrones de respuesta y la gran maleabilidad de su fenotipo, que dan como resultado una gran capacidad de estas células para responder de una manera muy gradual a los cambios en su entorno ^{34 49}. Por esta razón se prefiriere la denominación de CM activadas de forma similar a M1 o similar a M2.

Debido a la gran plasticidad de la microglía para activarse ante estímulos distintos, como patógenos, señales de daño o citocinas, resultaría importante profundizar el conocimiento sobre como la activación por estos estímulos afecta sus funciones inmunes, neuroprotectivas y de mantenimiento de integridad sináptica.

Además, un número creciente de estudios confirman las contribuciones diferenciales de macrófagos y CM a la reparación del SNC ^{50 51}. Por lo que la profundización del estudio y la identificación de las señales extracelulares que disparan cambios fenotípicos y los interruptores moleculares que controlan los cambios en la polarización de activación de ambos linajes sería muy importante y podría dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas.

RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA

Se considera que la neuroinflamación es un mecanismo homeostático temprano y generalmente ventajoso ante cambios ocurridos en el SNC. Esta respuesta aísla el tejido cerebral dañado del área libre de injuria, en este sitio las células que fueron afectadas son destruidas y se repara la matriz extracelular. Sin embargo, si la respuesta neuroinflamatoria es persistente en el tiempo o es desmedida puede tornarse perjudicial para el tejido ⁵².

Todas las células del SNC pueden estar involucradas en este proceso, sin embargo, es ampliamente reconocido que las CM cumplen un rol clave en el desarrollo de inflamación. La microglía es capaz de activarse frente a diversos estímulos que pueden ser reconocidos por una variedad amplia de receptores presentes en su membrana celular que participan en la respuesta inmune innata. De este modo, cuando las CM contactan con estímulos presentes en su entorno, tales como PAMPs, DAMPs o citocinas, se activan e inducen un fenómeno denominado microgliosis reactiva que genera una respuesta inflamatoria caracterizada por la adquisición de una morfología ameboide con capacidad fagocítica y un aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , TNF α e IL-6, así como ON y aniones superóxido, o la activación de mecanismos de reparación tisular⁵³. Esta respuesta es frecuentemente auto-limitada, ya que cuando se resuelve la infección o se repara el tejido dañado, las CM pueden revertir su estado activado. Sin embargo, si el estímulo que generó la respuesta inflamatoria persiste, ya sea por la presencia de factores endógenos o exógenos, o por una falla en los mecanismos normales de resolución causada por la inflamación sostenida, esta respuesta puede ser neurotóxica y resultar en la amplificación del estado patológico subyacente. Generalmente, durante esta activación las CM adoptan una morfología ameboide similar a la de los macrófagos periféricos y no son capaces de revertir su estado activado^{54 17}.

A su vez, en ciertos tipos de daños del SNC se observan disturbios a nivel de las barreras, con la pérdida de sus funciones restrictivas, facilitando el reclutamiento leucocitario a través del aumento en la expresión de selectinas e integrinas, junto con quimiocinas y aumento en la liberación de mediadores pro-inflamatorios por parte de las CEs. Las células inmunes reclutadas pueden tener diferentes roles en condiciones patológicas, contribuyendo al desarrollo de la respuesta neuroinflamatoria o promoviendo la reparación del tejido²¹.

Junto con los leucocitos reclutados, las CM participan en respuestas del SNC contra infecciones, daños isquémicos, injuria y neurodegeneración.

INFLAMACIÓN SISTÉMICA

La inflamación es una respuesta rápida generada por el organismo hospedador frente a reacciones autoinmunes, daño tisular y a diversos

microorganismos patógenos. En el tejido periférico, los signos clásicos de inflamación son: enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y pérdida de las funciones. Los eventos claves que generan inflamación incluyen migración e invasión de leucocitos (neutrófilos, linfocitos y macrófagos) y liberación de mediadores solubles, tales como, quininas, prostaglandinas, citocinas y quimiocinas. Varios de estos mediadores producidos en el sitio de inflamación generan efectos locales y sistémicos, por lo tanto son claves para la intervención terapéutica en muchas enfermedades ^{55 17}.

Una respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) es una respuesta inmune periférica generalizada que conduce a la disfunción de órganos y puede, en algunos casos ocasionar la muerte. SIRS es un concepto amplio, debido a que está implicado en numerosas enfermedades ya sean infecciones inducidas por microorganismos o inflamaciones asépticas ¹⁷.

Comunicación entre el sistema inmune y el SNC

Aunque los estudios de fenotipo y función de CM se han centrado principalmente en el rol que desempeñan estas células en el SNC y sus interacciones locales, se cree que las CM juegan un papel muy importante en la comunicación entre el sistema inmune periférico y el cerebro. Existen numerosos mediadores inflamatorios sistémicos que podrían repercutir en las células inmunes innatas del SNC. A su vez, la regulación del fenotipo microglial dado por el microambiente parece ser muy importante para mantener la fisiología inmune ⁵⁶.

Se ha propuesto que la respuesta sistémica que surge como consecuencia de una lesión o enfermedad conduciría a la activación de las CM, que a su vez, darían señales a las neuronas para inducir cambios metabólicos, de adaptación y de comportamiento. Estos cambios tienen el objetivo de conservar la energía, proteger al organismo para superar la infección y promover su recuperación ⁵⁷.

Durante una infección sistémica se generan respuestas fisiopatológicas y estados en el paciente que incluyen fiebre, malestar, letargo, anorexia y en casos severos depresión y ansiedad ⁵⁸. En consecuencia, se manifiestan cambios en su comportamiento que comúnmente se denominan “conductas asociadas a la enfermedad”. Estos cambios se desarrollan con el objetivo de protegernos de la infección, mantener la homeostasis y no causa ningún daño a las neuronas.

Sin embargo, en los animales y en pacientes con enfermedades neurodegenerativas crónicas, esclerosis múltiple (EM), apoplejía e incluso durante el envejecimiento normal, la inflamación sistémica en vez de generar una respuesta homeostática protectora, conduce a respuestas inflamatorias en el cerebro y una exageración de los síntomas clínicos^{57 59}. En estos casos se propone que las CM se hallan “pre activadas” y cambian su fenotipo para producir moléculas neurotóxicas cuando responden a señales inflamatorias sistémicas. Por estas razones, además de la vinculación de la inflamación sistémica con el desarrollo de una respuesta neuroinflamatoria, está empezando a ser reconocida su contribución en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas crónicas^{17 49}.

Las rutas a través de las cuales la inflamación sistémica se comunica con el cerebro no han sido definidas detalladamente, pero se considera que incluyen la respuesta hacia mediadores inflamatorios de las fibras aferentes del nervio vago o de los macrófagos presentes en áreas CVOs (regiones del SNC que carecen de una BHE típica). Otra ruta posible de comunicación implica la señalización de mediadores presentes en la sangre a las CE cerebrales, que activan a los macrófagos perivasculares y que a su vez se comunican con la microglía⁵⁶.

Una gran variedad de modelos experimentales se han desarrollado para investigar la comunicación entre el sistema inmune periférico y el SNC. Sin embargo, LPS es el estímulo más utilizado para imitar la inflamación sistémica debido a su respuesta robusta. Se ha demostrado que una única inyección i.p de LPS induce activación microglial, pérdida de barrera y reclutamiento leucocitario. También se utilizaron inyecciones con enterotoxina B de *staphylococcus aureus* o con la bacteria *Escherichia coli* y además se investigó como inflamaciones periféricas crónicas pueden afectar al SNC a través de inyecciones múltiples con LPS⁶⁰.

Si bien la mayoría de los modelos experimentales están asociados a infecciones bacterianas o virales agudas o estímulos periféricos con LPS, estudios recientes muestran evidencias indirectas de que la inflamación sistémica podría afectar al SNC durante las enfermedades inflamatorias asépticas, como artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis y trastornos metabólicos como diabetes, obesidad, etc⁵⁸. A nuestro entender, no se han realizado hasta el momento estudios que evalúen directamente el impacto de la

tormenta sistémica de citocinas tipo I generada en condiciones libres de microorganismo, sobre la respuesta neuroinflamatoria en el SNC.

Rol de la inflamación sistémica sobre la neurodegeneración

Se denomina neurodegeneración a la pérdida de estructura, función o muerte neuronal y es la principal causa de disfunción motora y cognitiva.

Se consideran enfermedades neurodegenerativas (EN) a aquellas patologías que afectan primariamente a neuronas y que cursan con pérdida progresiva de éstas. La etiología de las EN incluyen eventos genéticos, epigenéticos y ambientales. Algunos de los mecanismos patogénicos reconocidos en las EN son: estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, acumulación y agregación de proteínas, alteración en la homeostasis de metales e inflamación, entre otras.

Algunas de las EN que afectan a la sociedad dada a su alta y creciente prevalencia son: la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), la demencia frontotemporal, la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades por priones, entre otras ⁵⁶.

A pesar de no considerarse EN, eventos de degeneración neuronal también se observan en infecciones neurotrópicas, traumas cerebrales y lesiones de la médula espinal, apoplejías, trastornos neoplásicos, EM, así como los trastornos neuropsiquiátricos y genéticos. Un enlace común entre estas enfermedades es la activación crónica de la respuesta inmune innata incluyendo aquellas mediadas por las CM y los macrófagos residentes del SNC. Tal activación puede desencadenar vías neurotóxicas que conducen a la degeneración progresiva. Sin embargo, las CM también son cruciales para el control de procesos inflamatorios, la reparación y regeneración. La respuesta inmune adaptativa que está implicada en enfermedades neurodegenerativas no solo contribuyen a daños en los tejidos, sino que también desempeña un papel importante en la resolución de la inflamación y la mediación de la neuroprotección y reparación. La conciencia creciente de que el sistema inmune está implicado tanto en la mediación de daños, así como en la regeneración y reparación en los trastornos neurodegenerativos, ha llevado al desarrollo de nuevos enfoques para modular el sistema inmune ⁶¹.

Recientemente se sumaron dos factores predisponentes de neurodegeneración. Estos son el envejecimiento y la exposición a factores

ambientales externos e internos, tales como infecciones sistémicas o enfermedades inflamatorias sistémicas respectivamente.

El envejecimiento es el factor de riesgo más importante para las formas esporádicas de estas enfermedades, y la prolongación en la expectativa de vida de la población deja claro que la prevalencia de estas enfermedades aumenta cada vez más ⁵⁶. El envejecimiento se caracteriza por una disminución en la función del sistema inmunitario adaptativo, dando como resultado un estado pro-inflamatorio crónico de bajo grado. Este aumento del medio ambiente pro-inflamatorio en los tejidos periférico puede repercutir en el cerebro por la activación de las CEs, así como en las células inmunes innatas en el SNC. En el cerebro envejecido, las CM presentan un cambio en el repertorio antigénico de su superficie celular, asociado con un fenotipo de microglía pre-activada ⁵⁶. Luego de una inyección sistémica con LPS, los ratones adultos presentan conductas asociadas a la enfermedad, síntesis de citocinas IL-1 e IL-10 y expresión de TLR2, CMH II exagerados comparados con ratones más jóvenes ⁶². Sumado a esto, la acumulación de mutaciones y daños en el ADN se evidencian con el envejecimiento.

A lo largo de la vida, los episodios de inflamación sistémica pueden precipitar así como exacerbar la neurodegeneración en curso, influir sobre la microglía y aumentar su reactividad. Este mecanismo de exposición a múltiples estímulos nocivos haría más susceptible a las CM a la activación ⁴⁹ tornándose perjudiciales para el individuo ⁶³. La evidencia de esto proviene de estudios en modelos experimentales en los que principalmente infecciones periféricas se asocian con la exacerbación de la EA experimental, EM, EP, enfermedad priónica y accidente cerebrovascular ⁶¹. Las infecciones sistémicas de bajo nivel se asocian también con una presentación anticipada de los síntomas clínicos, por ejemplo están asociados con un deterioro cognitivo más rápido en pacientes con EA ⁶⁴.

Estas observaciones implicarían que, con el envejecimiento de la población el número de personas con trastornos del SNC aumenta, entonces las infecciones sistémicas y la inflamación se convertirán en factores de riesgo significativos para el inicio de EN o su progresión ⁵⁷.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Debido a que el cerebro es un órgano vital y presenta una baja capacidad regenerativa, el rol del sistema inmune es considerado crítico para controlar el daño tisular generado por infecciones, injurias e inflamación crónica. En este contexto, las CM tienen una función de suma importancia en la respuesta inmune innata y en la iniciación de una respuesta inmune adaptativa.

Las citocinas contribuyen a la activación de dichas células. En este sentido, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se demostró que CM murinas activadas por TNF α , incrementan los niveles del receptor quimiotáctico mFPR2^{65, 66}. Este receptor reconoce A β 42 (agente patogénico clave en la EA). Este aumento de expresión de mFPR2 podría amplificar la respuesta inflamatoria, con consecuencias negativas en la EA. En nuestro laboratorio se demostró que IL-4 fue capaz de inhibir la expresión de mFPR2 inducida por LPS o TNF α y por lo tanto la respuesta microglial hacia A β 42^{67, 68}. Por otro lado, existen numerosos reportes que asocian el desarrollo de inflamación sistémica con neuroinflamación y con la progresión de enfermedades neurodegenerativas^{60, 69, 70}. Recientemente, hemos demostrado que la administración intraperitoneal (i.p) de LPS induce neuroinflamación con reclutamiento de leucocitos de origen mieloide al cerebro, además, IL-4 participa en el control de la neuroinflamación inducida por este ligando.

Debido a la fuerte vinculación del sistema inmune periférico con el SNC y a la gran plasticidad de las CM para activarse ante diversos estímulos, resulta interesante profundizar el conocimiento sobre los efectos de las citocinas sobre la activación de CM. En este contexto y basándonos en resultados de nuestro grupo de trabajo surgieron distintas incógnitas. ¿Puede el ambiente de citocinas pro-inflamatorio influir en la capacidad de la microglía de secretar citocinas y factores neurotróficos y/o neuroprotectivos? ¿Puede el ambiente de citocinas regular la migración de leucocitos en el SNC y la respuesta neuroinflamatoria?

En ese sentido los cambios en la activación de las CM afectarían la secreción de citocinas, la liberación de factores neurotróficos y la capacidad endocítica, lo que repercutiría en la degradación de las moléculas endocitadas tales como proteínas agregadas. Además, se especula que estos cambios inducidos por citocinas podrían modular el reclutamiento leucocitario al SNC, lo que a su vez impactaría en la regulación de la respuesta inflamatoria. Obtener esta información ayudaría en la

selección de las condiciones óptimas de inmunización que no generen efectos adversos, y a su vez favorezcan una acción terapéutica eficiente modulando la respuesta neuroinflamatoria.

En base a los antecedentes descritos y a las incógnitas planteadas, se desarrolló la siguiente **hipótesis**: El perfil pro-inflamatorio sistémico inducido por la respuesta inmune modula la activación de las CM, la capacidad migratoria de leucocitos al SNC y en consecuencia la respuesta neuroinflamatoria.

Si bien la mayoría de los modelos experimentales que estudiaron el efecto de la inflamación sistémica sobre el SNC utilizan moléculas derivadas de microorganismos asociados a infecciones, estudios recientes sugieren que este tipo de comunicación también se observaría durante las enfermedades inflamatorias asépticas. Por lo tanto, surge la necesidad de utilizar un modelo experimental que se caracterice por generar un aumento sistémico y sostenido de citocinas pro-inflamatorias, en ausencia de endotoxina. En este contexto se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo general: Desarrollar un modelo experimental que permita estudiar los efectos que ejercen las citocinas pro-inflamatorias sobre la activación de CM/fagocitos y la capacidad migratoria de leucocitos en el SNC, en ausencia de endotoxina.

Para alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Evaluar *in vitro* el efecto de las citocinas pro-inflamatorias sobre la producción de citocinas y de factores neurotróficos en CM.
- II. Determinar *in vivo* el impacto de la liberación sistémica de citocinas pro-inflamatorias sobre la migración de leucocitos al SNC y la respuesta neuroinflamatoria.
- III. Evaluar la participación de TNF α o IFN γ en la inducción de la respuesta neuroinflamatoria luego de la liberación sistémica de citocinas pro-inflamatorias.

RESULTADOS

RESULTADOS I

EL EFECTO DE LAS CITOCINAS SOBRE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL

Las CM representan aproximadamente 10 a 15% del número total de células del SNC y desempeñan un rol inmune clave. Esta población se encuentra en estado de reposo cumpliendo funciones de vigilancia y es capaz de activarse rápidamente cuando contacta con señales endógenas o exógenas (patógenos). Una vez activadas, las CM dirigen la respuesta inflamatoria con fines de reparación y restauración del parénquima cerebral. Sin embargo, si esta activación es persistente puede ser perjudicial para el tejido.

El Lipopolisacárido bacteriano (LPS), o las citocinas inflamatorias $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ inducen “activación clásica” de macrófagos periféricos, asociada a defensa tisular. Por otro lado, las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-13 son capaces de inducir “activación alternativa” de macrófagos, caracterizada por la inducción de genes y proteínas involucrados en tareas de reparación tisular y reconstrucción. A pesar de que las CM tienen un origen mieloide, esto no garantiza que cumplan las funciones típicas de los fagocitos del resto del organismo, ya que su capacidad de respuesta está controlada en el SNC por las características y funciones del órgano.

En trabajos previos de nuestro grupo colaborador se había demostrado que CM murinas activadas por LPS o $TNF\alpha$, incrementan los niveles del receptor quimiotáctico mFPR2^{65, 66}. En nuestro laboratorio se demostró que IL-4 fue capaz de inhibir la expresión de mFPR2 inducida por LPS o $TNF\alpha$ y por lo tanto la respuesta Microglial^{67, 68}. Debido a la gran plasticidad de las CM para activarse ante diversos estímulos, consideramos relevante profundizar el conocimiento sobre los efectos de las citocinas inflamatorias sobre la secreción de citocinas, la liberación de factores neurotróficos y la expresión del receptor de fractalquina (CX3CR1).

Para llevar a cabo los experimentos de esta sección, se utilizó una línea celular de microglía murina inmortalizada denominada BV2⁷¹. Las células fueron estimuladas con las citocinas tipo I $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ y con la citocina tipo II IL-4 como control de activación alternativa.

Evaluación *in vitro* de la modulación de la producción de citocinas

En una primera etapa, se determinó la presencia de alteraciones morfológicas en CM luego de la estimulación con IFN γ o con IL-4. Cuando las CM fueron observadas mediante microscopía óptica, se detectó que aquellas estimuladas con IFN γ presentaron un tamaño mayor y un aspecto elongado comparadas con las células control cuyo aspecto era más pequeño y redondeado. En cambio, no se registraron diferencias morfológicas entre las CM control y las estimuladas con IL-4 (Figura 5A). Se obtuvieron resultados similares cuando las células fueron analizadas teniendo en cuenta su tamaño y complejidad citoplasmática mediante citometría de flujo a distintos tiempos luego de la estimulación (Figura 5B).

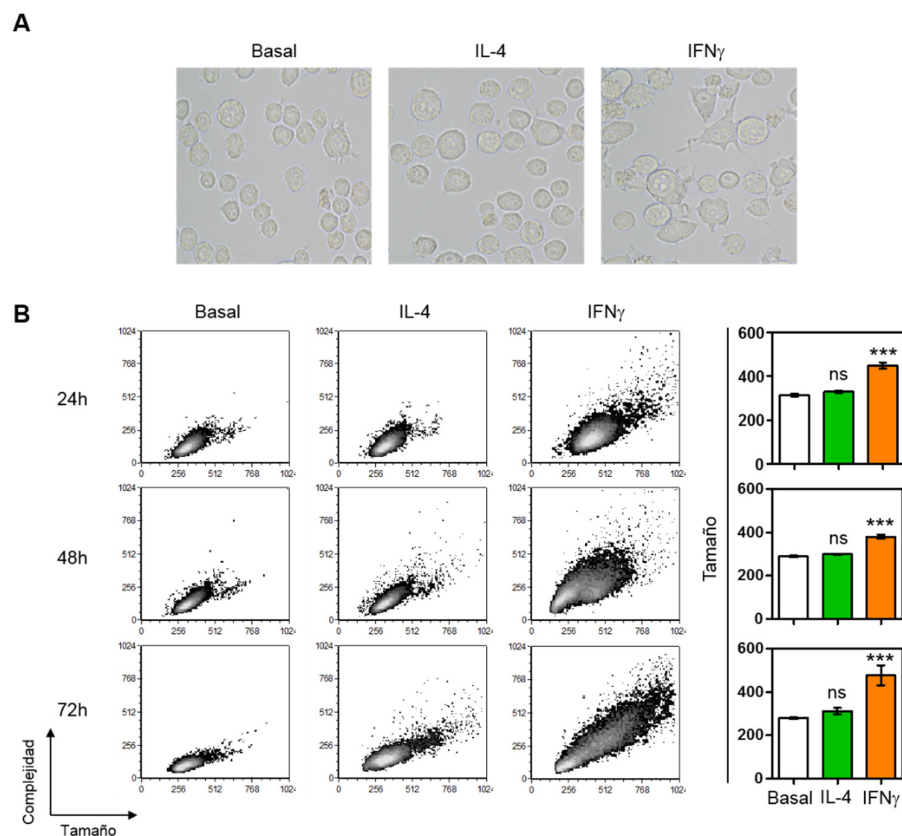


Figura 5. IFN γ induce cambios morfológicos en las CM

Células BV2 fueron estimuladas con IL-4 (20ng/ml), IFN γ (20ng/ml) o no estimuladas (Basal) (**A**) Fotografías representativas de cultivos estimulados durante 24 horas (**B**) Dot plots representativos que muestran a las CM distribuidas según tamaño y complejidad citoplasmática, luego de 24, 48 y 72 horas de estimulación (izquierda) cuantificación del tamaño celular (derecha). *** estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

En los sobrenadantes obtenidos de estos cultivos, se determinó la cinética de producción de $TNF\alpha$ e IL-10 por ELISA luego de determinados tiempos de estimulación. Se observó que las células tratadas con $IFN\gamma$ aumentaron los niveles de $TNF\alpha$ e IL-10, mientras que IL-4 no alteró la secreción de $TNF\alpha$. Sin embargo IL-4, a las 12 y 24hs de estimulación, indujo un leve aumento en la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10, molécula importante en la resolución de la inflamación. La estimulación con LPS fue utilizada como control positivo de producción de ambas citocinas (Figura 6 A).

Por otro lado, se evaluó si los estímulos con IL-4 o IL-13, citocinas anti-inflamatorias con funciones similares, eran capaces de modular el aumento en la producción de citocinas inducido por moléculas pro-inflamatorias. Encontramos que tanto IL-4 como IL-13 fueron capaces de atenuar el aumento en la producción de $TNF\alpha$, cuando las CM estaban estimuladas con $IFN\gamma$. Sin embargo, las citocinas no fueron capaces de modificar los niveles de IL-10 (Figura 6 B).

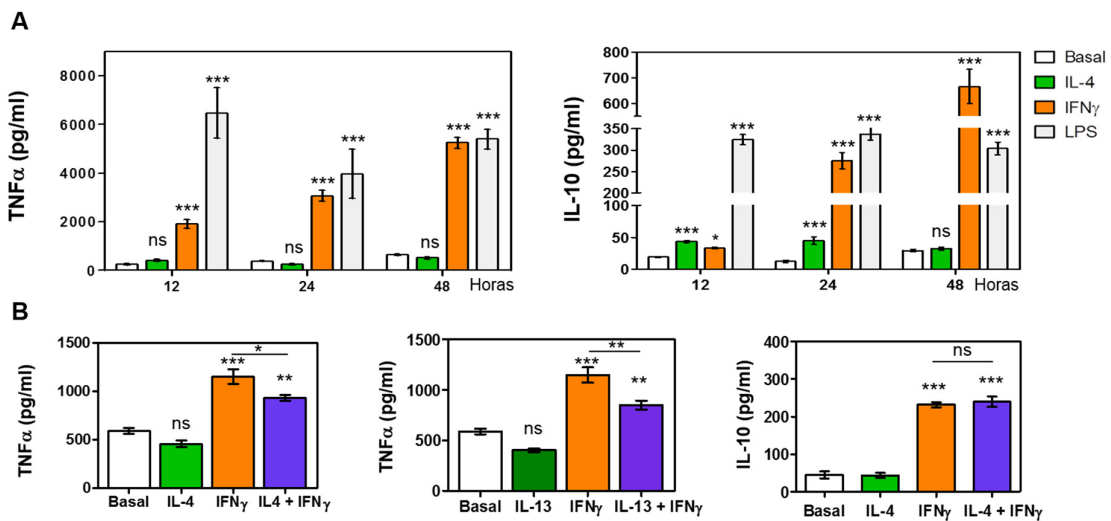


Figura 6. $IFN\gamma$ e IL-4 afectan de manera diferencial la producción de citocinas en CM

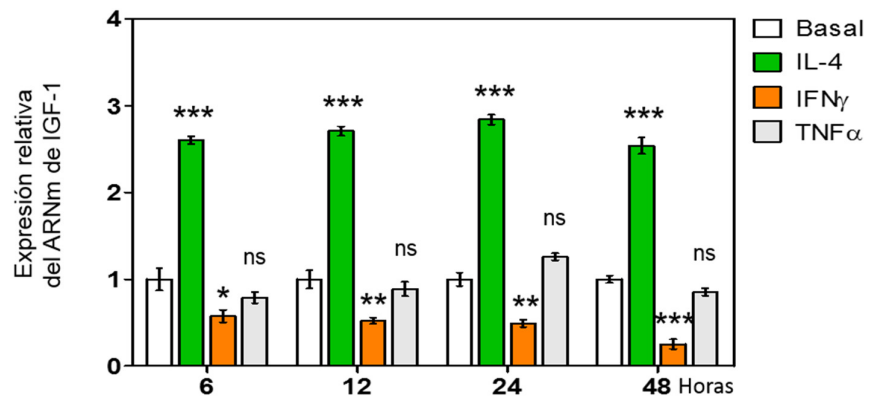
(A) Células BV2 fueron estimuladas con IL-4 (20ng/ml), $IFN\gamma$ (20ng/ml) o LPS (500ng/ml) durante 12, 24 y 48 horas. (B) CM fueron incubadas con IL-4 (20ng/ml) o IL-13 (20ng/ml) por 30 minutos previos a la estimulación con $IFN\gamma$ (20ng/ml) durante 48hs. Luego de la incubación, se recogieron los sobrenadantes y se determinaron los niveles de $TNF\alpha$ e IL-10 por ELISA. Los resultados son expresados en pg/ml basados en una curva estándar. *** estadísticamente significativo ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$), ns: no significativo. Basal: células sin estímulo.

Modulación de la producción de factores neurotróficos

El Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) es considerado un factor neurotrófico, ya que participa en la regulación del crecimiento y en la diferenciación tisular en varios órganos, incluyendo el cerebro. Es sintetizado por células hepáticas y liberado al torrente sanguíneo o en es producido localmente en el cerebro por todas las células. En el SNC, IGF-1 es asociado a funciones neuroprotectoras y es uno de los factores neurotróficos más importantes involucrados en la supervivencia, proliferación y diferenciación de neuronas ⁷².

Con objeto de estudiar la capacidad de las citocinas pro-inflamatorias para regular la producción de factores neurotróficos en CM, se evaluó mediante PCR en tiempo real la cinética de expresión génica de IGF-1 en cultivos celulares de BV2 estimulados con IL-4, IFN γ o TNF α . Luego de la extracción de ARN y del procesamiento de las muestras, se observó que la estimulación con IL-4 provoca un incremento en la expresión génica de IGF-1 desde las 6hs manteniéndose hasta las 48hs (Figura 7A). Este efecto fue dosis dependiente, observándose un aumento en la expresión del ARNm de IGF-1 a partir de 10 ng/ml (Figura 7B). Por otro lado, la estimulación con IFN γ disminuyó la expresión génica de IGF-1 de manera dependiente del tiempo y de su concentración (Figura 7A y C). No se observaron alteraciones en la expresión del ARNm de IGF-1 en las CM estimuladas con TNF α .

A



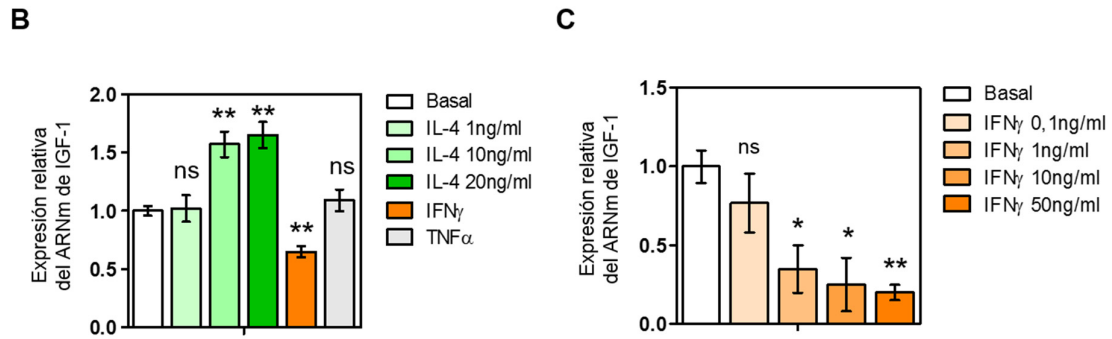


Figura 7. IFN γ e IL-4 regulan de manera diferencial la expresión génica de IGF-1.

(A) Expresión relativa del ARNm de IGF-1, determinado mediante PCR en tiempo real en células BV2 estimuladas con IL-4 (20ng/ml), IFN γ (50ng/ml), TNF α (100ng/ml) durante 6,12, 24 y 48 horas. (B) Curva de dosis respuesta de niveles de expresión relativa del ARNm de IGF-1 en células BV2 estimuladas con diversas concentraciones de IL-4 durante 24 horas. (C) Curva de dosis respuesta de niveles de expresión relativa de IGF-1 en células BV2 estimuladas con diversas concentraciones IFN γ durante 24 horas. *** (p<0,001), ** (p<0,01), * (p<0,05), ns: no significativo. Basal: células sin estímulo.

También, se evaluaron los niveles proteicos de IGF-1 mediante ELISA. Para ello, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las células BV2 estimuladas con IL-4 o IFN γ durante 6 a 72 hs. Se detectó el aumento de la concentración de IGF-1 a las 24 y 48 hs cuando las CM fueron activadas con IL-4 y una disminución a partir de las 48 hs cuando fueron estimuladas con IFN γ (Figura 8).

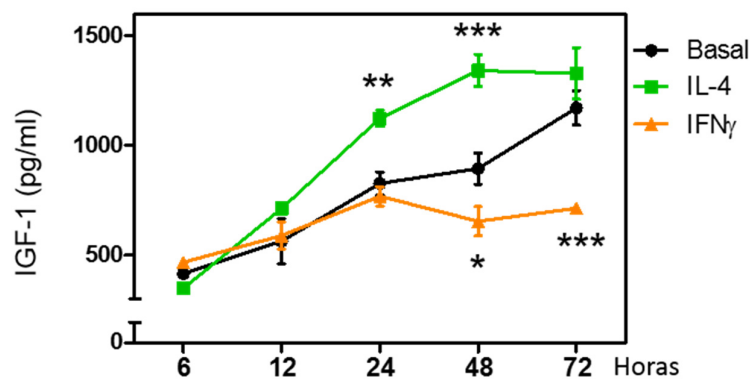


Figura 8. IFN γ e IL-4 regulan de manera diferencial los niveles secretados de IGF-1.

Niveles proteicos de IGF-1 fueron cuantificados por ELISA en sobrenadantes de células BV2 estimuladas durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas con IL-4 (20ng/ml), IFN γ (50ng/ml). Los resultados se expresan en pg/ml. *** (p<0,001), ** (p<0,01), * (p<0,05), Basal: células sin estímulo.

Además, evaluamos si $\text{IFN}\gamma$ era capaz de modular el aumento en la expresión del ARNm de IGF-1 inducido por IL-4. Cuando las células fueron estimuladas simultáneamente, se observó que $\text{IFN}\gamma$ fue capaz de atenuar el aumento del ARNm de IGF-1. Mas aún, la estimulación con $\text{IFN}\gamma$ 24 hs previas al tratamiento con IL-4 redujo la expresión del ARNm de IGF-1 (Figura 9).

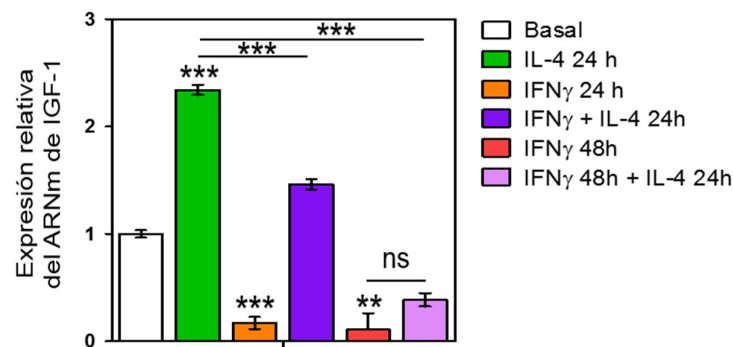


Figura 9. $\text{IFN}\gamma$ atenúa el aumento de ARNm de IGF-1 en CM estimuladas con IL-4.

Niveles de transcritto IGF-1 fueron determinados mediante PCR en tiempo real en células BV2 estimuladas con IL-4 (20ng/ml), $\text{IFN}\gamma$ (50ng/ml), o ambas citocinas. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), ns: no significativo. Basal: células sin estímulo.

Regulación de la expresión del receptor quimiotáctico CX3CR1

El receptor quimiotáctico CX3CR1 es importante en la regulación de la activación de las CM y la neuroinflamación. Éste tiene afinidad por un único ligando endógeno específico llamado CX3CL1 o fractalquina. Esta quimiocina se expresa como una proteína transmembrana, que puede ser secretada luego del clivaje por proteasas. Cuando esto ocurre adquiere propiedades quimiotácticas, mientras que en su forma transmembrana interviene mediando la adhesión celular.

En cerebro, CX3CL1 se expresa solamente en neuronas, y su receptor CX3CR1 en la superficie microglial. En casos de ausencia de la interacción ligando-receptor, que ocurre cuando hay daño o muerte neuronal, la microglía se transforma en hiperactiva empeorando la neurodegeneración y falla neurológica ⁴. Además, la acumulación en los sitios de lesión cerebral de otros tipos de células que expresan CX3CR1, como cél NK, monocitos, CD y linfocitos T ⁷³, indicaría que CX3CL1 también podría desempeñar un papel importante en controlar la invasión de leucocitos periféricos en el cerebro.

Mediante PCR en tiempo real se evaluó si la expresión del transcrito de CX3CR1 variaba en las CM activadas por citocinas pro o anti-inflamatorias. Interesantemente se observó que ambos estímulos disminuyen la expresión del receptor. IFN γ provocó una disminución sostenida desde las 6 hasta las 48hs de estímulo, mientras que IL-4 indujo la disminución de la expresión del gen de CX3CR1 a partir de las 12hs. Finalmente, ni TNF α ni CX3CL1 modifican los niveles ARNm de CX3CR1 hasta las 24 horas post-estimulación, observándose una atenuación parcial de los niveles recién a las 48hs (Figura 10).

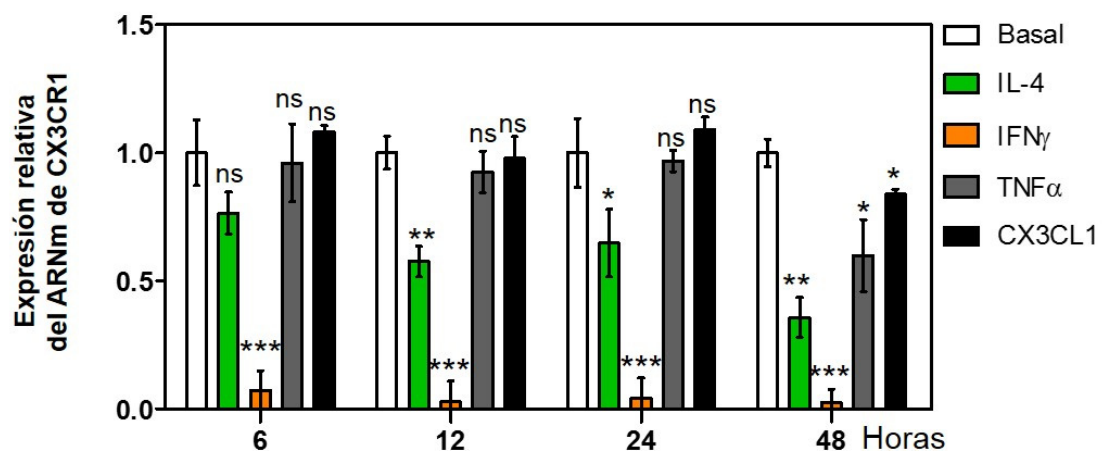


Figura 10. IFN γ e IL-4 disminuyen los niveles del transcrito CX3CR1.

Los niveles de expresión relativa de CX3CR1 fueron determinados mediante PCR en tiempo real en células BV2 estimuladas con IL-4 (20ng/ml), IFN γ (50ng/ml), TNF α (100ng/ml) o CX3CL1 (100ng/ml) durante 6, 12, 24 y 48 horas. Los niveles de CX3CR1 fueron normalizados con HPRT-1 y expresados de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando como calibrador el nivel de expresión basal a cada tiempo de estimulación. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$), ns: no significativo. Basal: células sin estímulo.

CONCLUSIONES I

En esta sección de resultados, mediante el empleo de la línea celular microglial BV2, se determinó que:

- La estimulación con IFN γ , pero no la estimulación con IL-4, inducen cambios morfológicos asociados con activación celular.
- IL-4 e IFN γ modulan de manera diferencial la producción de IL-10 y TNF α en las células microgliales.
- IL-4 aumenta los niveles del factor neurotrófico IGF-1 en CM, en cambio, IFN γ los disminuye.
- Tanto IL-4 como IFN γ disminuyen la expresión del receptor quimiotáctico CX3CR1.

En conjunto los datos sugieren que el perfil de citocinas, determinado por el tipo de respuesta inmune, modularía a las CM de manera diferencial en la producción de citocinas y de factores neuroprotectivos, como el factor neurotrófico IGF-1.

RESULTADOS II

EL ROL DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA

Tal como fue mencionado en la introducción de esta tesis, existen numerosos reportes que asocian el desarrollo de inflamación sistémica con neuroinflamación y con la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

Una gran variedad de modelos experimentales principalmente asociados a infecciones bacterianas o virales se han desarrollado para investigar la comunicación entre el sistema inmune periférico y el SNC. Sin embargo, LPS es el estímulo más utilizado para imitar la inflamación sistémica dado a su respuesta robusta.

En trabajos previos de nuestro laboratorio, se utilizó el modelo experimental adaptado de Cardona y col ⁴ para evaluar la respuesta neuroinmune *in vivo*. Este modelo se caracteriza por inyecciones periféricas seriadas de LPS. En este trabajo se concluyó que la administración i.p de LPS generó una tormenta sistémica de citocinas pro-inflamatorias, además, indujo neuroinflamación y el reclutamiento de leucocitos de origen mieloide al cerebro ⁷⁴.

Teniendo en cuenta estos resultados y que estudios recientes sugieren que este tipo de comunicación también se observa durante inflamaciones asépticas, se consideró relevante en este trabajo, evaluar si la liberación sistémica de las citocinas pro-inflamatorias, en ausencia de LPS, era capaz de generar también una respuesta neuroinflamatoria.

Modelo experimental de inflamación sistémica libre de endotoxina

La inyección hidrodinámica utiliza la fuerza hidrostática generada por la inyección endovenosa rápida, de un gran volumen en un corto período de tiempo. De este modo, se logra superar la barrera física del endotelio y la membrana celular, que previenen que compuestos grandes e impermeables entren a la célula parenquimal. La inyección hidrodinámica puede facilitar la entrada de múltiples compuestos como polímeros, proteínas, ADN y ARN, entre otros ⁷⁵.

El modelo de inyección hidrodinámica para la entrega de ADN, se estableció cuando Liu y col. (1999) ⁷⁶ y Zhang y col (1999) ⁷⁷ demostraron la transfección de

genes altamente eficiente en ratones mediante una inyección rápida, a través de la vena de la cola, de soluciones de ADN en volúmenes equivalentes a 8-10% del peso corporal del animal. Se ha demostrado que, entre los órganos internos (corazón, pulmón, hígado, riñones, bazo) que exhibieron niveles significativos de expresión del transgén, el hígado es el más sensible a este procedimiento. Aproximadamente el 40% de los hepatocitos se transfectan en la administración de dosis tan bajas como 10 μg de plásmido por ratón ⁷⁵.

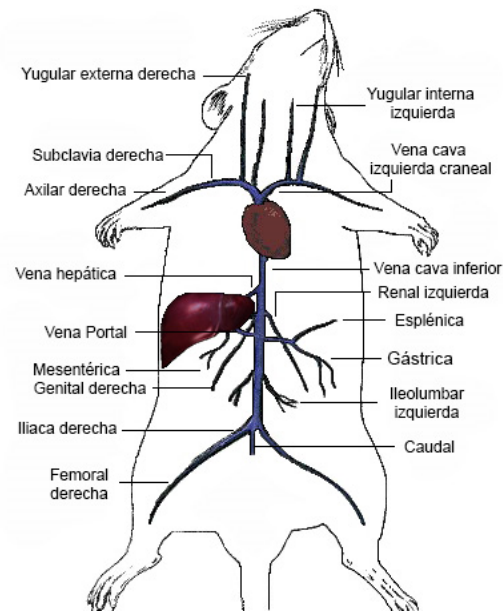


Figura 11: Sistema venoso de ratón. Dibujo adaptado de Biologycorner. com

Anatómicamente, la inyección de solución de ADN en la vena de la cola induce una congestión cardíaca inmediata, provocando la acumulación de la solución inyectada en la vena cava inferior y la elevación de la presión intravascular en esta sección venosa. En consecuencia, la solución de ADN es dirigida hacia el hígado a través de la vena hepática, empujando la sangre existente en el hígado, hacia la vena porta, evitando así la mezcla inmediata del ADN con las nucleasas presentes en la sangre. La presión hidrodinámica generada expande los sinusoides, principalmente los capilares hepáticos ya que son fenestrados, y permeabiliza la membrana plasmática de los hepatocitos generando poros transitorios para permitir que el ADN entre en las células. En un corto periodo estos poros se cierran, reteniendo el ADN dentro de la célula (Figura 11). Cuando se normaliza la actividad cardíaca el cuerpo se adapta a la carga de volumen y con el tiempo, se restablece la homeostasis ⁷⁸⁻⁸¹.

Es importante destacar que este procedimiento es tolerado por los animales. Tanto el análisis histológico como el estudio bioquímico a través de análisis séricos, no revelan daño tisular. Sólo se observa un aumento transitorio de las enzimas hepáticas que retorna al intervalo normal en 3 días ^{76, 80}.

Previamente Rodríguez-Galán y col. habían reportado que la inyección hidrodinámica de vectores de expresión (ADNc desnudo) que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 inducía niveles sistémicos altos y persistentes de IL-12, IL-18, TNF α e IFN γ ⁸². Por lo tanto, se decidió utilizar este modelo *in vivo* para evaluar si un aumento sostenido en los niveles sistémicos de citocinas tipo I es suficiente para inducir la activación de CM y el reclutamiento leucocitario a nivel central. Para ello, en este trabajo ratones WT fueron inyectados hidrodinámicamente con plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 (12 + 18) o con plásmido control (Control). Siete días posteriores a la inyección endovenosa, los ratones de ambos grupos se anestesiaron y perfundieron intracardiácamente con PBS. Los bazo se extrajeron para su evaluación macroscópica y los cerebros para realizar citometría de flujo, microscopía confocal o para extraer ARN. Previamente, se obtuvieron muestras de sangre en los distintos días post-inyección para evaluar los niveles de citocinas por ELISA (Figura 12).

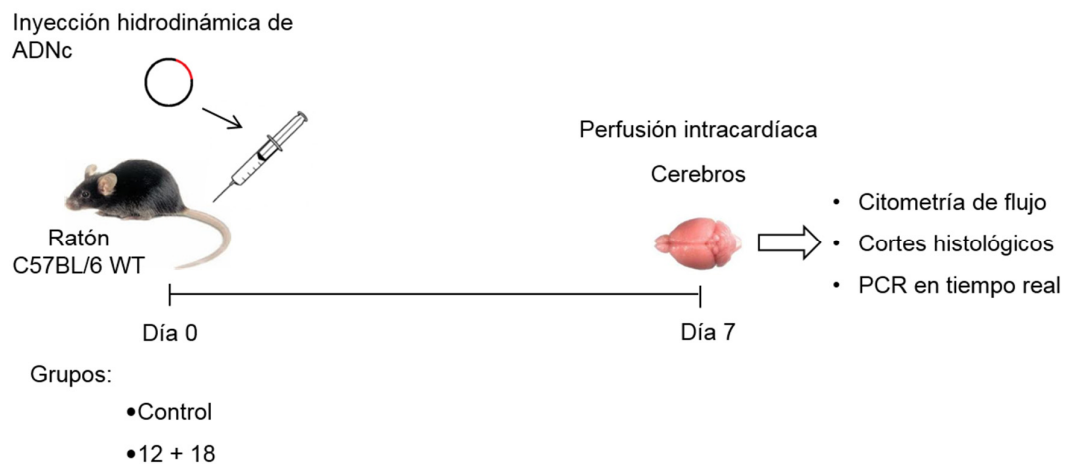


Figura 12: Modelo experimental de inflamación sistémica.

Ratones WT fueron inyectados hidrodinámicamente con plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 (12 + 18) o plásmido control (Control). Luego de 7 días, cada animal fue anestesiado con ketamina/xilacina y se perfundieron intracardiácamente con 60 ml de PBS frío. Finalmente, los cerebros se colectaron y procesaron para evaluar neuroinflamación.

IL-12 e IL-18 aumentan los niveles de citocinas circulantes

IL-12 es una citocina heterodimérica pro-inflamatoria que induce a las células NK y a las células T (tanto CD8 como NKT) a producir varias citocinas, como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), $TNF\alpha$ y es particularmente eficaz en la inducción de la producción de $IFN\gamma$. Además aumenta la capacidad citotóxica de células NK y Linfocitos T citotóxicos y favorece la diferenciación de linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1), vinculando la respuesta inmune innata con la adaptativa. La importancia de IL-12 no sólo radica en su alta eficiencia para producir $IFN\gamma$ a bajas concentraciones, sino también en su sinergia con otros estímulos de activación, en este caso, con IL-18.

IL-18 es una citocina pro-inflamatoria, miembro de la familia de IL-1, es producida por las mismas poblaciones de células y en condiciones de activación que se solapan con las de IL-12. En 1989, se describe por primera vez, como otro factor que induce $IFN\gamma$ (IGIF o IL-18), y que tal como IL-12 se requiere durante el shock endotóxico para la producción de $IFN\gamma$ ⁸³.

IL-18, por si sola es incapaz de inducir $IFN\gamma$ y su actividad pro-inflamatoria se relaciona con las de las citocinas que forman parte de la familia de IL-1, tales como síntesis de óxido nítrico (ON), la producción de quimiocinas y el incremento en la expresión de moléculas de adhesión. IL-18 sólo puede inducir $IFN\gamma$ si actúa sinérgicamente con IL-12 influyendo principalmente sobre la producción de $IFN\gamma$ en las células NK. Un componente que explica la sinergia entre IL-12 e IL-18 es la capacidad de IL-12 para regular positivamente la expresión de las dos cadenas del receptor de IL-18. Y de la misma forma, la capacidad de IL-18 de aumentar la expresión de una de las cadenas del receptor de IL-12 (IL-12R β 2) en células T^{3, 83}.

Para comenzar esta sección de resultados, con el objetivo de corroborar que el modelo experimental induce sistémicamente un aumento de citocinas, se tomaron muestras de sangre de los ratones de ambos grupos, tanto control como 12 + 18, a los distintos días post-tratamiento. Las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias ($TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-1 β) y anti-inflamatorias (IL-10) se determinaron en los plasmas por ELISA.

Observamos que la inyección de 12 + 18 aumentó la producción de $TNF\alpha$ a partir del día 2 y los niveles se mantuvieron elevados hasta el día del sacrificio. La

producción de $\text{IFN}\gamma$ se elevó a partir del primer día manteniéndose hasta el día 3 y posteriormente comenzó a disminuir, sin embargo, los niveles se mantuvieron elevados hasta el día 6 comparado con los ratones del grupo control. No se observó producción de $\text{IL-1}\beta$ luego del tratamiento (dato no incluido). Con respecto a la citocina anti-inflamatoria IL-10 , se detectó un incremento en la concentración a partir del día 2 y luego los niveles comenzaron a disminuir (Figura 13). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez-Galán y col. y Barrios y col 82, 84.

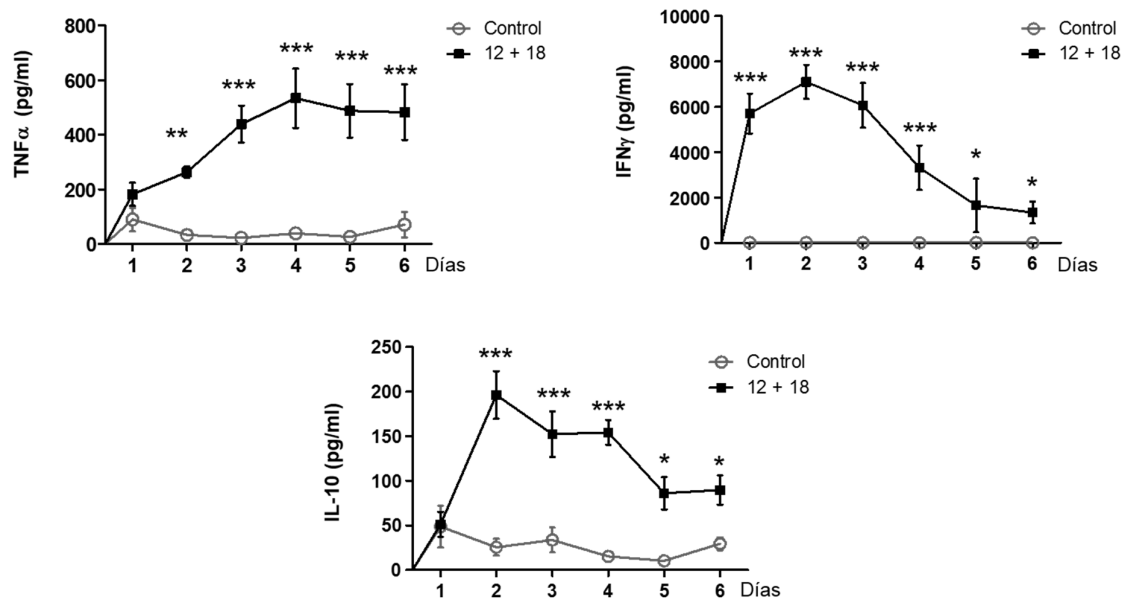


Figura 13: El tratamiento con 12 + 18 aumenta los niveles de citocinas circulantes.

En los distintos días post-inyección hidrodinámica se extrajeron muestras de sangre de ambos grupos de animales. Los niveles plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ e IL-10 fueron determinados por ELISA. Los resultados se expresaron en pg/ml basados en una curva estándar. Los asteriscos (*) indican el aumento estadísticamente significativo de la concentración plasmática de animales tratados con 12 + 18 comparado con la concentración plasmática de animales controles * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica, la inspección macroscópica de los órganos de estos animales reveló que los ratones C57BL/6 del grupo 12 + 18 presentaban esplenomegalia, este efecto no ocurrió en los ratones control. Por lo que se adjudicó el aumento de tamaño del órgano al aumento de la producción de IL-12 e IL-18 (Figura 14 A). La presencia de esplenomegalia en los ratones

tratados fue utilizada en los sucesivos experimentos realizados en este trabajo de tesis como un control de éxito de producción de citocinas. Por otra parte, los ratones no presentaron variaciones de peso comparados con el control en los distintos días post-inyección (Figura 14 B).

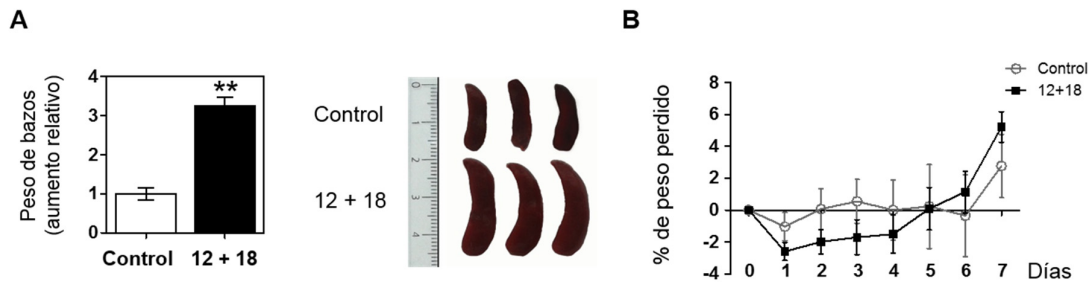


Figura 14. El tratamiento con 12 + 18 induce esplenomegalia.

(A) Aumento relativo del peso de bazos de ratones C57BL/6 WT inyectados hidrodinámicamente con plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 con respecto al control a los 7 días post tratamiento (izquierda). Imagen del tamaño de los bazos (derecha) (B) Porcentaje de peso perdido en los distintos días post inyección ** ($p < 0,01$).

Estudio de la expresión de ARNm de citocinas en tejido cerebral

Los niveles elevados de citocinas y quimiocinas en el SNC pueden ser sostenidos mediante una producción intrínseca o periférica. La activación del componente glial contribuye a la producción intrínseca; sin embargo, también se ha reportado que mediadores inflamatorios, como LPS, pueden actuar directamente sobre las CEs cerebrales para inducir la liberación de citocinas⁸⁵. Por otro lado, la fuente de producción extrínseca puede deberse a la disrupción de la BHE que posibilitaría el ingreso de citocinas desde la periferia o la síntesis por parte de las células inmunes reclutadas al órgano.

Teniendo en cuenta esta información, se planteó como objetivo determinar la expresión de ARNm de citocinas en muestras de cerebro, con el fin de obtener un panorama global sobre la respuesta inducida por las citocinas pro-inflamatorias sistémicas en el cerebro.

Los niveles de ARNm de las citocinas pro-inflamatorias $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ y del receptor de quimiocinas CCR2 fueron evaluados luego de 7 días de la inyección hidrodinámica. Como control, también se determinó la expresión génica de estas

citocinas y del receptor de quimiocina utilizando un modelo experimental de inflamación sistémica inducido por inyecciones i.p de LPS durante 4 días. Mediante PCR en tiempo real de muestras de cerebro, se observó que los niveles de los transcritos se incrementaron luego de la inyección hidrodinámica en el grupo 12 + 18. Como era de esperar, la expresión de estas citocinas también está aumentada en el modelo de endotoxemia. De manera notable, se observa que 12 + 18 es capaz de inducir el aumento en la expresión del gen de $IFN\gamma$ de manera más potente que LPS (Figura 15).

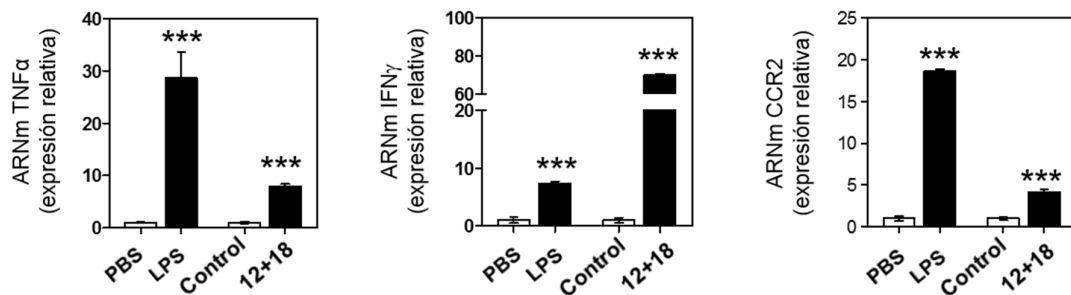


Figura 15. Aumento en la expresión génica de TNF α , IFN γ y CCR2 en cerebro.

Luego de las inyecciones i.p seriadas con LPS, PBS o con la inyección endovenosa hidrodinámica de 12 + 18 o Control, los animales se sacrificaron, se extrajo ARN total de cerebro y se evaluó la expresión de ARNm por PCR en tiempo real. Los gráficos de barras indican el promedio de la expresión relativa del ARNm de TNF α , IFN γ y CCR2; calculado a partir del software de análisis Applied Biosystems. Los * indican el aumento estadísticamente significativo de la expresión génica en cerebros de animales tratados comparado con animales controles *** ($p < 0,001$).

Identificación y recuento de CM y de leucocitos reclutados al cerebro

En condiciones fisiológicas, el recuento de leucocitos es reducido en el tejido nervioso ¹⁰. En regiones especiales del cerebro, se localizan poblaciones de macrófagos (espacio de Virchow-Robin, meninges y plexos coroideos) y CDs (meninges y plexos coroideos), pero en el parénquima del SNC las CM se encuentran como la única población de células mieloides residentes ^{34, 86}. Sin embargo en condiciones inflamatorias, el recuento celular puede variar, ya que el SNC genera una respuesta inmune mediada principalmente por CM ⁵³. Además, en determinadas condiciones se puede inducir el reclutamiento de otras poblaciones leucocitarias periféricas, que contribuirían a inducir la activación persistente de las CM y al daño tisular.

Teniendo en cuenta estos datos, se consideró relevante estudiar si las citocinas pro-inflamatorias sistémicas, además de inducir un aumento en la expresión génica de citocinas inflamatorias en cerebro, podrían modificar el número de CM presentes en el parénquima o el número de leucocitos que son reclutados desde la periferia.

Es importante destacar que en nuestros experimentos los animales fueron perfundidos intracardiácamamente con una solución salina estéril, a fin de minimizar el error por exceso en el recuento celular, producto de células inmunes de la circulación presentes en los vasos sanguíneos cerebrales.

Luego de la disgregación mecánica y enzimática del cerebro y de la purificación de células totales con percoll, se realizó la tinción con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana y la suspensión celular fue analizada a través de citometría de flujo.

La estrategia de marcación utilizada para lograr identificar a las CM residentes se basó en que, tal como se había mencionado anteriormente, las CM son las únicas células que forman parte del parénquima del SNC y tienen un origen mieloide, por lo tanto esta población es positiva para el marcador CD11b. Además, las CM presentan una expresión baja del antígeno leucocitario común CD45 (CD45^{low})^{87 88}. Por lo tanto, la combinación de ambos marcadores nos permitió identificarla. Mientras que las células inmunes reclutadas (leucocitos periféricos) se caracterizan por presentar una alta expresión de CD45 (CD45^{high}).

En los gráficos (dot plots) representativos puede visualizarse la distribución celular según la expresión de CD45 y CD11b luego del tratamiento (Figura 16 A). Claramente, pudo observarse un aumento en la población CD45^{high} en el grupo de animales inyectados con 12 + 18.

Posteriormente, se determinó el número absoluto y la frecuencia de CM y leucocitos a los 7 días post-inyección, detectando que la inyección del ADNc de IL-12 + IL-18 no modificó el número ni el porcentaje de células microgliales (CD11b+ CD45^{low}). Sin embargo, se observó un incremento marcado en el número absoluto y en la frecuencia de células con una expresión alta de CD45 (Figura 16 B).

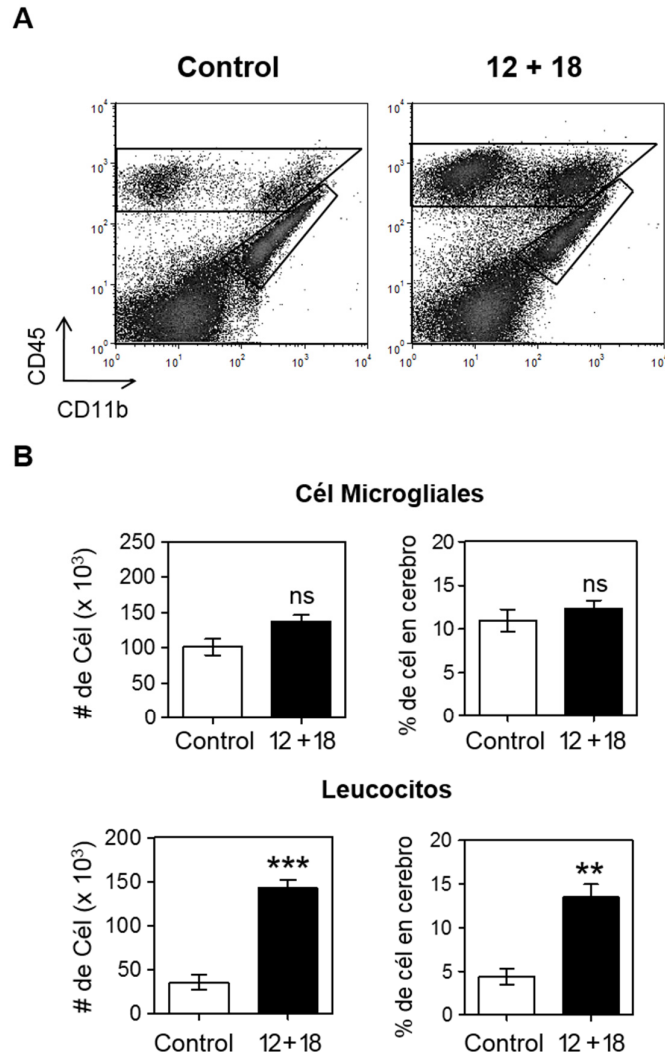


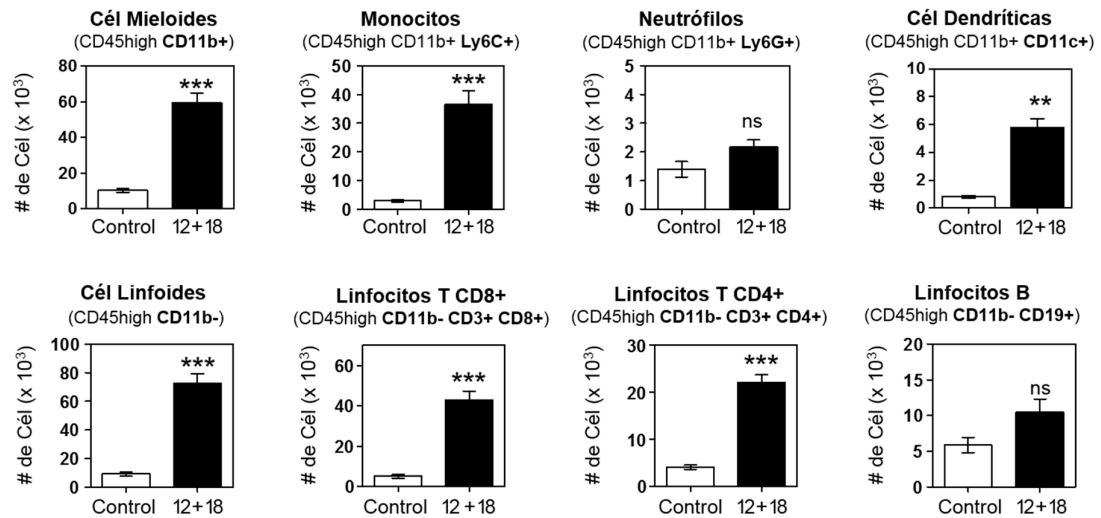
Figura 16. Aumento del reclutamiento leucocitario en animales tratados con 12 + 18.

Luego de 7 días post inyección hidrodinámica con 12 + 18 o Control, las células totales de cerebro se obtuvieron por disgregación mecánica, digestión enzimática y posterior purificación con percoll. Las células se tiñeron con Ac anti-CD11b y anti-CD45 y se analizaron por citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos “Dot Plots” representativos de la tinción con Ac anti-CD11b y anti-CD45, especificando la estrategia de identificación de CM y leucocitos periféricos **(B)** Los gráficos representan el número absoluto y porcentaje de células microgliales (CD11b⁺ CD45^{low}) y leucocitos periféricos (CD11b⁺ CD45^{high}). Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SEM, siendo representativo de tres experimentos independientes. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), ns: no significativo.

Dado que se detectó un aumento de células inmunes reclutadas, el análisis fue profundizado para conocer que poblaciones llegan al cerebro luego del tratamiento. Para ello, la suspensión celular se analizó por citometría, incorporando en la marcación mAc que caracterizan inmunofenotípicamente a las distintas poblaciones leucocitarias, entre ellas: monocitos, neutrófilos, CDs, linfocitos B, Linfocitos T CD4 y CD8.

Se observó que la co-expresión de IL-12 e IL-18 indujo el reclutamiento de leucocitos periféricos (CD45^{high}) de origen mieloide (CD45^{high} CD11b⁺) y linfoide (CD45^{high} CD11b⁻) al cerebro. Dentro de la población mieloide, la población mayoritaria detectada fue de monocitos. En la población linfoide se evaluaron las poblaciones de linfocitos B y linfocitos T, tanto CD4 como CD8. La población mayoritaria de leucocitos reclutados de origen linfoide correspondió a linfocitos T CD8 y CD4 (Figura 17 A). En la figura 17 B se puede observar la distribución porcentual de las poblaciones celulares en el cerebro total. Observándose un aumento en los porcentajes de células reclutadas, principalmente de monocitos y linfocitos T CD8 luego del tratamiento 12 + 18.

A



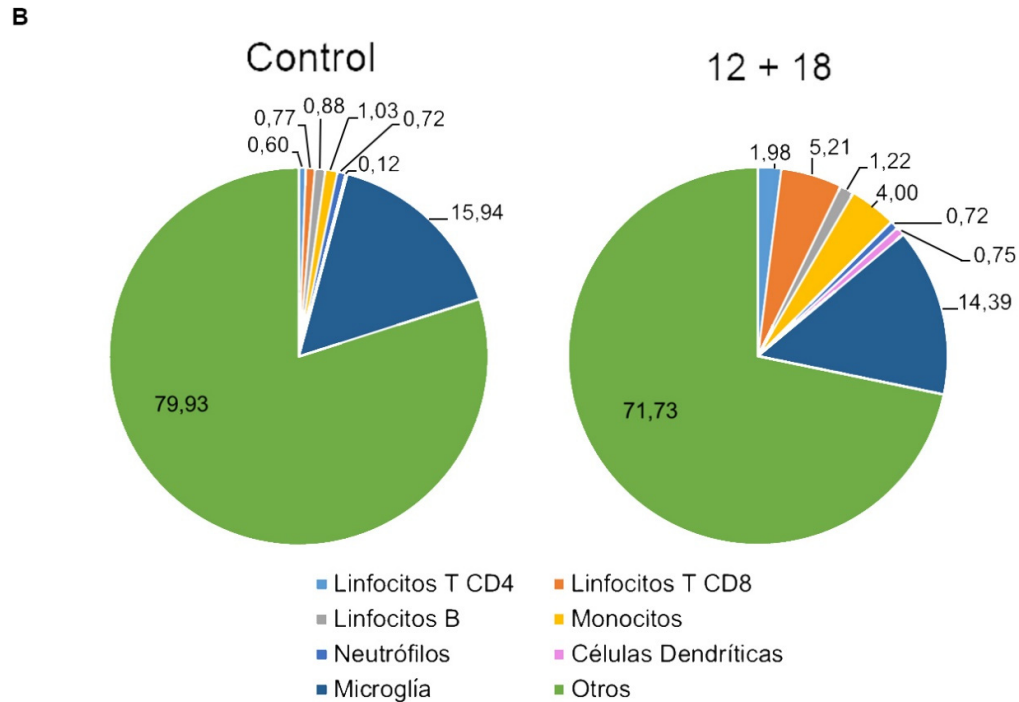


Figura 17. Identificación de poblaciones celulares reclutadas al cerebro luego del aumento sistémico de citocinas.

Células de cerebro de ratones C57BL/6 WT obtenidas 7 días posteriores a la inyección hidrodinámica con los diferentes ADNc, fueron teñidas con anticuerpos específicos para CD11b, CD45, Ly6C, Ly6G, CD11c, CD3, CD4, CD8, CD19 y se analizaron mediante citometría de flujo. **(A)** Los gráficos demuestran el número absoluto de las distintas poblaciones de leucocitos reclutados (CD45^{high}), tanto linfoides como mieloides. **(B)** Gráfico de distribución porcentual de las poblaciones celulares en el cerebro total, luego del tratamiento control y 12+18. *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$), ns: no significativo.

En estos leucocitos reclutados, se evaluó mediante citometría de flujo la frecuencia de células que expresan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II), involucradas en la presentación antigénica y marcadoras de diferenciación y/o activación celular. Se detectó un aumento en la frecuencia de células de origen mieloides que expresan CMH II, profundizando el análisis, se observó que principalmente la población de monocitos aumenta CMH II luego del tratamiento con 12 + 18, asociado posiblemente con activación celular o con la diferenciación de esta población a CDs para presentar antígenos (Figura 18).

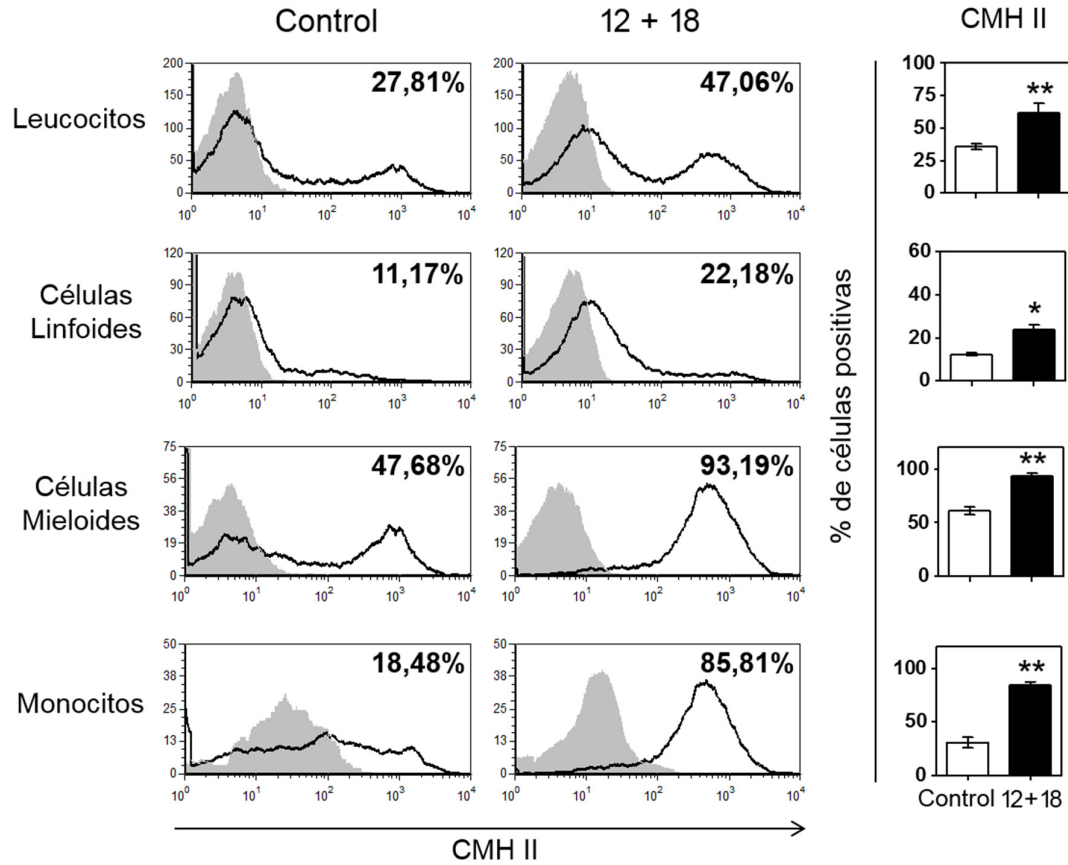


Figura 18. Aumento en la frecuencia de células reclutadas que expresan CMH II.

Células de cerebro de ratones C57BL/6 WT obtenidas 7 días posteriores a la inyección hidrodinámica con los diferentes ADNc, fueron teñidas con anticuerpos específicos para CD11b, CD45, Ly6C, Ly6G y CMH II (IA/IE) y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de moléculas de CMH II en las poblaciones de leucocitos reclutados. A la izquierda pueden observarse histogramas representativos de la expresión de CMH II, el área rellena gris corresponde al control de isotipo y los números indican la frecuencia de células positivas para el marcador. Los gráficos de barras indican la cuantificación del porcentaje de células positivas para CMH II de tres experimentos independientes. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

Estudio de la activación de células microgliales

Las CM son capaces de cambiar rápidamente en respuesta a cualquier perturbación de la homeostasis del sistema nervioso, lo que se conoce comúnmente como activación microglial. Las CM se definen como activadas utilizando criterios basados en cambios de la expresión de antígenos de superficie, en el número de células, cambios en su morfología o alteraciones en la producción de mediadores solubles²⁷. Si uno o más de estos criterios son positivos, la microglía es considerada activada⁶⁰.

A fin de evaluar la activación celular, en primera instancia se determinó la expresión del antígeno de superficie CMH II. El aumento en la frecuencia de este marcador está relacionado con una mayor capacidad de las CM de adquirir propiedades de CPA. El análisis de citometría de flujo reveló que la población de CM en los ratones tratados con 12 + 18, exhibió un aumento muy significativo ($p < 0.001$) de CMH II en comparación con las CM de animales controles inyectados con el plásmido vacío (Figura 19).

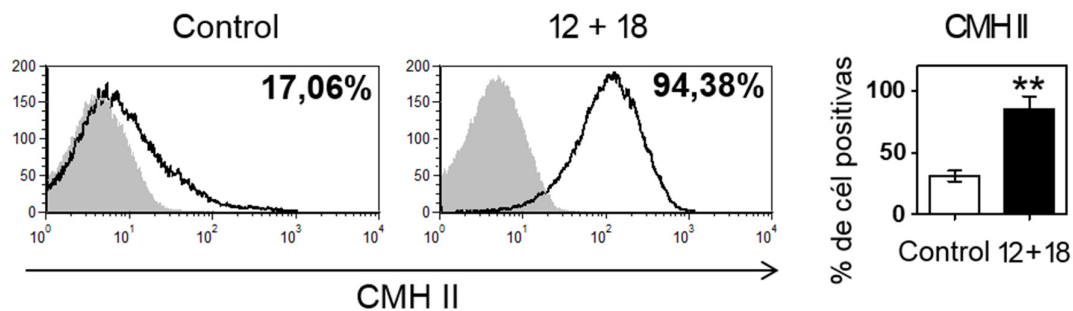


Figura 19. Aumento en la expresión de CMH II en CM luego de inflamación sistémica.

Células de cerebro de ratones C57BL/6 WT obtenidas 7 días posteriores a la inyección hidrodinámica con los diferentes ADNc, fueron teñidas con anticuerpos específicos para CD11b, CD45 y CMH II (IA/IE) y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de moléculas de CMH II en CM. A la izquierda pueden observarse histogramas representativos de la expresión de CMH II, el área rellena gris corresponde al control de isotipo y los números indican la frecuencia de positividad para el marcador. El gráfico de barras indica la cuantificación del porcentaje de células positivas para CMH II de tres experimentos independientes. ** ($p < 0,01$).

Posteriormente, con el objetivo de tener una visualización inmunohistológica de la activación microglial, se procesaron cortes cerebrales para ser estudiados mediante inmunofluorescencia usando el mAc anti-CD45. Tal como en el análisis por citometría de flujo, las CM presentan una menor expresión de CD45, por lo tanto, en los cortes se detecta en verde a las CM y en verde intenso a los leucocitos infiltrantes.

La observación de las inmunofluorescencias reveló que luego de la inyección hidrodinámica con 12 + 18 las CM efectivamente sufrieron alteraciones morfológicas, caracterizadas por el acortamiento, engrosamiento y fusión de las ramificaciones microgliales, y aumento del tamaño del soma celular (Figura 20 A). Estos cambios caracterizan a la microglía reactiva. No se observaron sin embargo modificaciones en el número de CM por campo (Figura 20 B), este resultado concuerda con el hallado en el análisis de citometría.

Por otro lado, se observó que la expresión de CD45 aumentó en los ratones 12 + 18 comparados con el control a través de la evaluación del área de densidad integrada (Figura 20 C) o por citometría observando un aumento leve tanto en el porcentaje como en la intensidad de fluorescencia media (Figura 20 D) De todas formas, es importante aclarar que el aumento en la expresión de CD45 no alcanza a los niveles observados en los leucocitos reclutados.

Estos resultados indican que el esquema experimental de inyección hidrodinámica de IL-12 + IL-18 induciría señales de activación en CM, reconocidas a partir de la observación de cambios en su morfología y por el aumento en la expresión de antígenos de superficie como moléculas del CMH II.

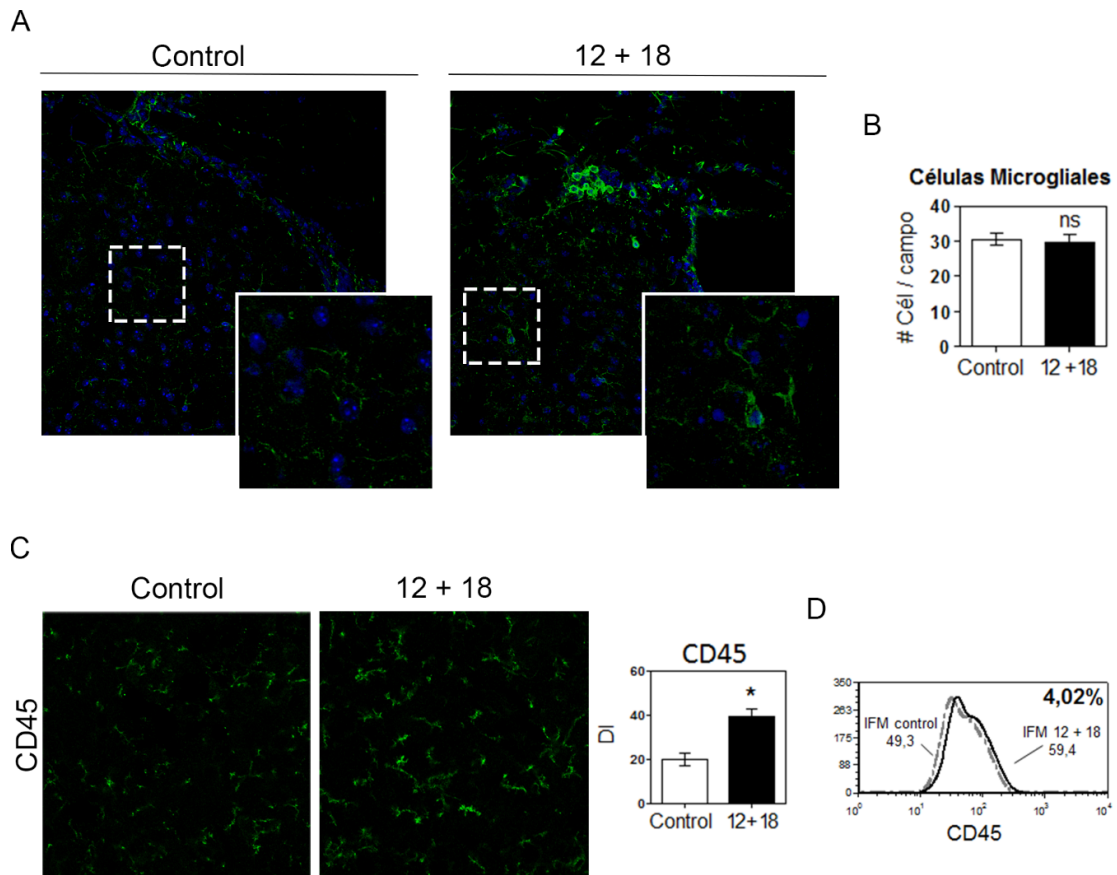


Figura 20. La inyección hidrodinámica de 12 + 18 activa a las CM.

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica con 12 + 18 o Control, los animales fueron sacrificados por perfusión intracardíaca con 30 ml de PBS más 30 ml de paraformaldehído 4%. **(A)** Las figuras muestran la tinción inmunofluorescente de CD45 (Alexa flúor 488) en cortes cerebrales periventriculares de 10 μ m de grosor (Alexa flúor 488, verde) a la escala de aumento 60x, los recuadros blancos muestran ampliaciones de las imágenes **(B)** El gráfico de barras representa el número de CM por campo. **(C)** Área de densidad integrada de fluorescencia de CD45 en CM **(D)** Histogramas representativos de la expresión de CD45, los números indican el porcentaje de aumento de expresión del tratamiento 12 + 18 vs control y las intensidades de fluorescencia media (IFM). * ($p < 0,05$), ns: no significativo.

Estudio de la localización del infiltrado cerebral

Tal como fue mencionado en la introducción, es posible definir tres rutas diferentes de acceso de leucocitos periféricos al SNC: ruta 1) desde la sangre al LCR a través de los plexos coroideos; ruta 2) desde la sangre al espacio de Virchow-Robin subaracnoideo; ruta 3) desde la sangre al espacio perivascular parenquimatoso ¹⁰. Dos aspectos deben ser tenidos en cuenta particularmente

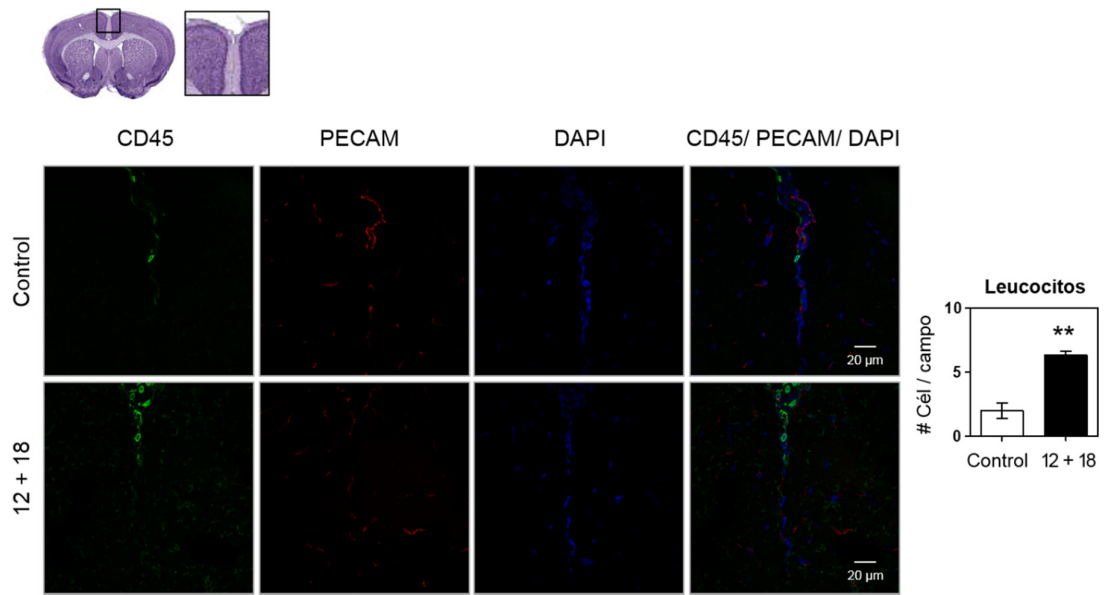
durante el estudio de la infiltración leucocitaria: la magnitud de la infiltración leucocitaria, debido a que se aumentan las probabilidades de daño inflamatorio/presentación antigénica y/o de la respuesta inmune específica (dependiendo si la infiltración es por leucocitos de la inmunidad innata o linfocitos T/ B, respectivamente); y la localización del infiltrado, ya que existen diferencias sustanciales en las propiedades inmunológicas de las áreas nombradas.

Con el objeto de evaluar la localización específica de los leucocitos reclutados al cerebro, se realizaron estudios de inmunofluorescencia en cortes cerebrales de 10 μm usando el mAc anti-CD45, que como ya fue mencionado previamente, permite distinguir a los leucocitos reclutados mediante la alta expresión de CD45 (verde brillante). Teniendo en cuenta las rutas de acceso leucocitarias, las áreas cerebrales analizadas para la evaluación de células reclutadas fueron meninges, plexos coroideos, ventrículos y parénquima.

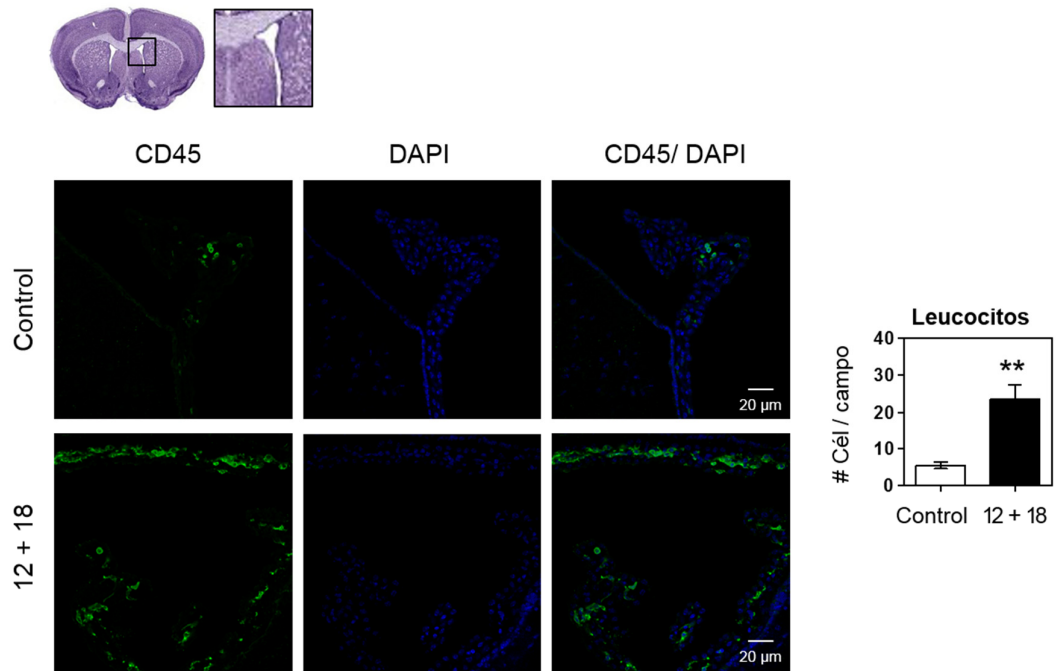
Como puede observarse en la figura 21 A, luego de 7 días del tratamiento con 12 + 18, hubo un aumento en el reclutamiento leucocitario a nivel del tabique medio entre los dos hemisferios cerebrales y que contiene las membranas meníngeas y el espacio subaracnoideo, es decir el *falx cerebri* o mediastino. Sin embargo, principalmente se observa luego del tratamiento un mayor reclutamiento celular a nivel de los plexos coroideos, que constituyen una estructura vascular que se extiende en el espacio ventricular (Figura 21 B) y en el parénquima cercano a estos ventrículos (Figura 21 C). Los estudios también confirmaron que en menor medida, la inyección hidrodinámica de 12 + 18, indujo reclutamiento leucocitario en Caudado Putamen (CPU) (Figura 21 D). Por último, a través de la expresión de PECAM-1, que se une a células endoteliales revelando la presencia del endotelio de vénulas parenquimatosas, se concluyó que estos leucocitos quedarían circunscriptos al espacio vascular/perivascular.

Estos resultados fueron corroborados a través del análisis de cortes sagitales de cerebro de ratones, tratados con 12 + 18 o control, teñidos con hematoxilina- eosina (H-E), observando que el mayor reclutamiento leucocitario se detecta en plexo coroideo (Figura 22).

A



B



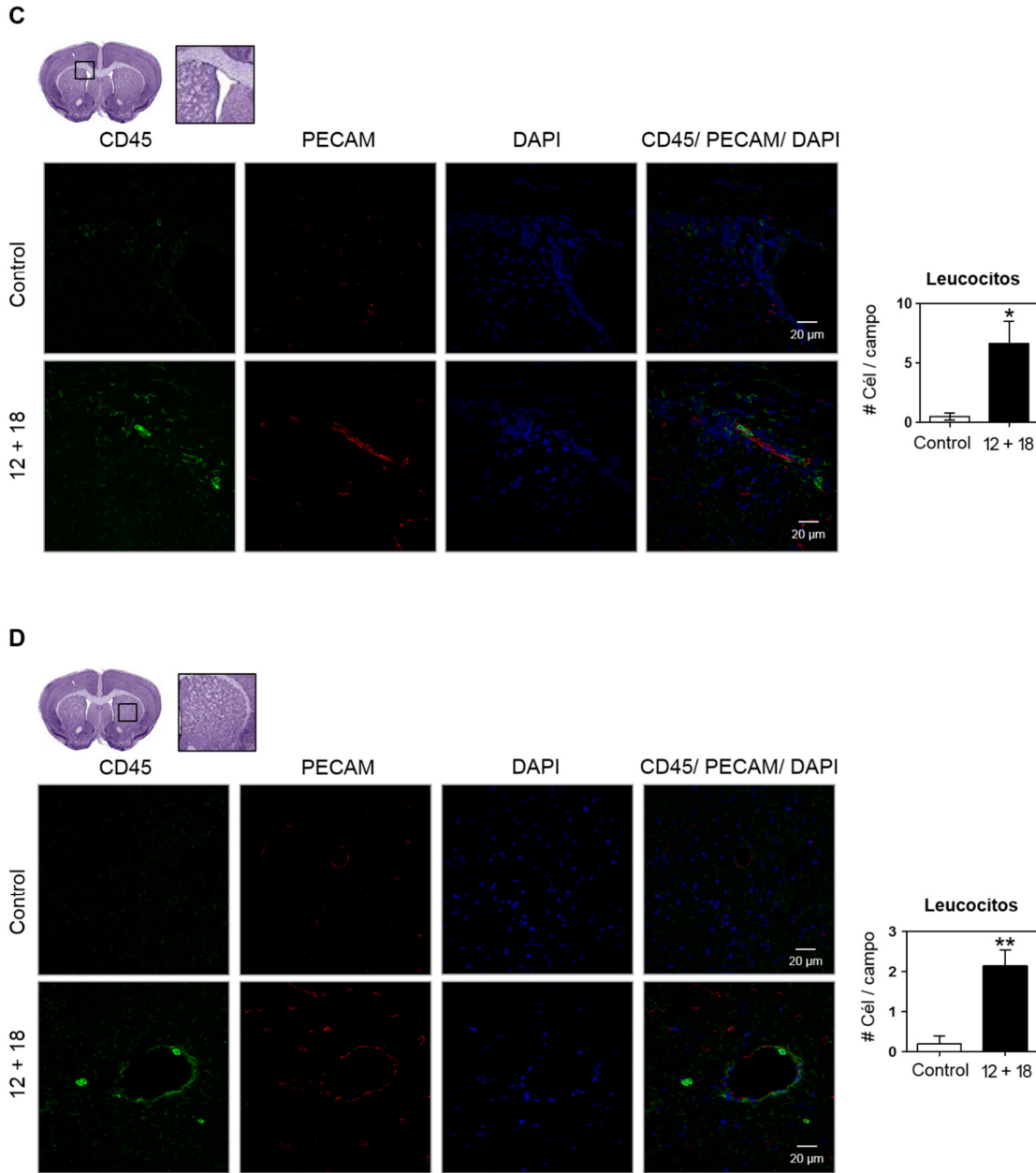


Figura 21. Aumento de infiltración leucocitaria en cerebro luego de inflamación sistémica.

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica con 12 + 18 o Control, los animales fueron sacrificados por perfusión intracardíaca con 30 ml de PBS más 30 ml de paraformaldehído 4%. Las figuras muestran la tinción inmunofluorescente de CD45 (Alexa flúor 488), Pecam (Alexa flúor 546) y DAPI, en secciones cerebrales de 10 µm de grosor de animales WT. En las mismas se observa como verde a las CM y verde intenso a los leucocitos infiltrantes. En la parte superior de cada figura, una foto de atlas cerebral indica la región de estudio **(A) falx cerebri** **(B) plexos coroideos** **(C) parénquima que rodea a los ventrículos** **(D) CPU**. Los gráficos de barras ubicados a la derecha de las fotografías indican la cuantificación de leucocitos por campo. * (p<0,05), ** (p<0,01).

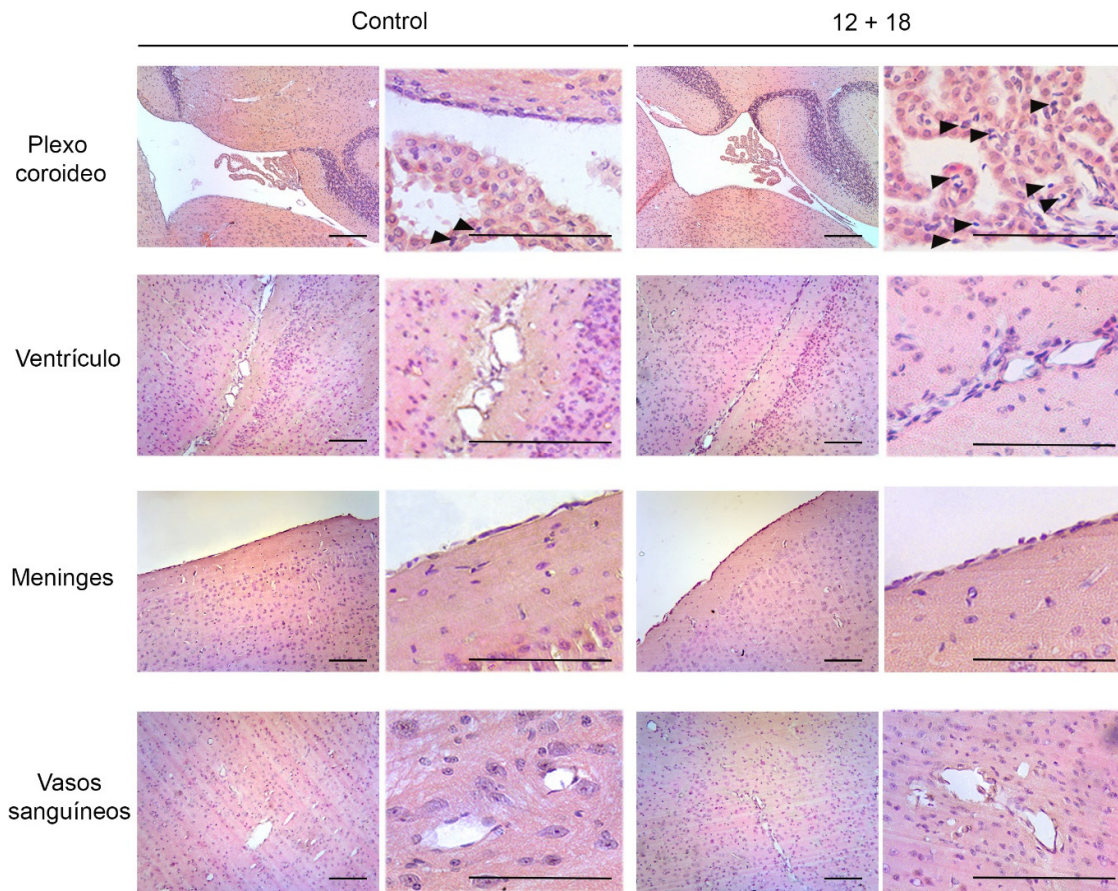


Figura 22. Aumento de infiltración leucocitaria luego de inflamación sistémica.

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica con 12 + 18 o Control, los animales fueron sacrificados por perfusión intracardíaca con 30 ml de PBS más 30 ml de paraformaldehído 4%. Las figuras muestran la tinción de los cortes por H-E en zonas cerebrales discretas, a un menor y mayor aumento (10X) y (40X). Las escalas representan 100 μ m en ambos casos. Las puntas de flecha señalan leucocitos.

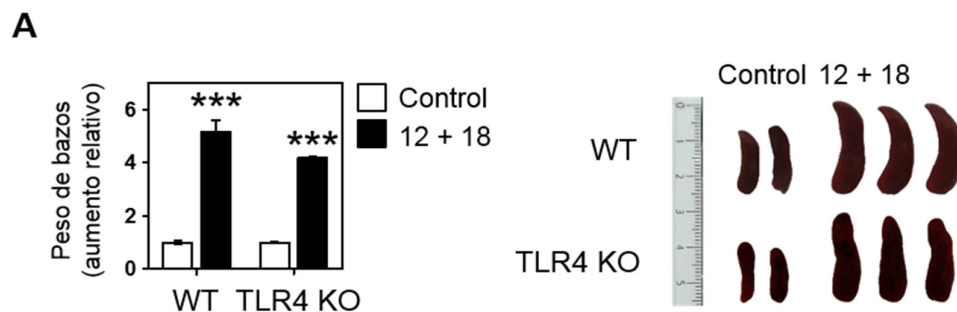
Estudio para evaluar contaminación con LPS

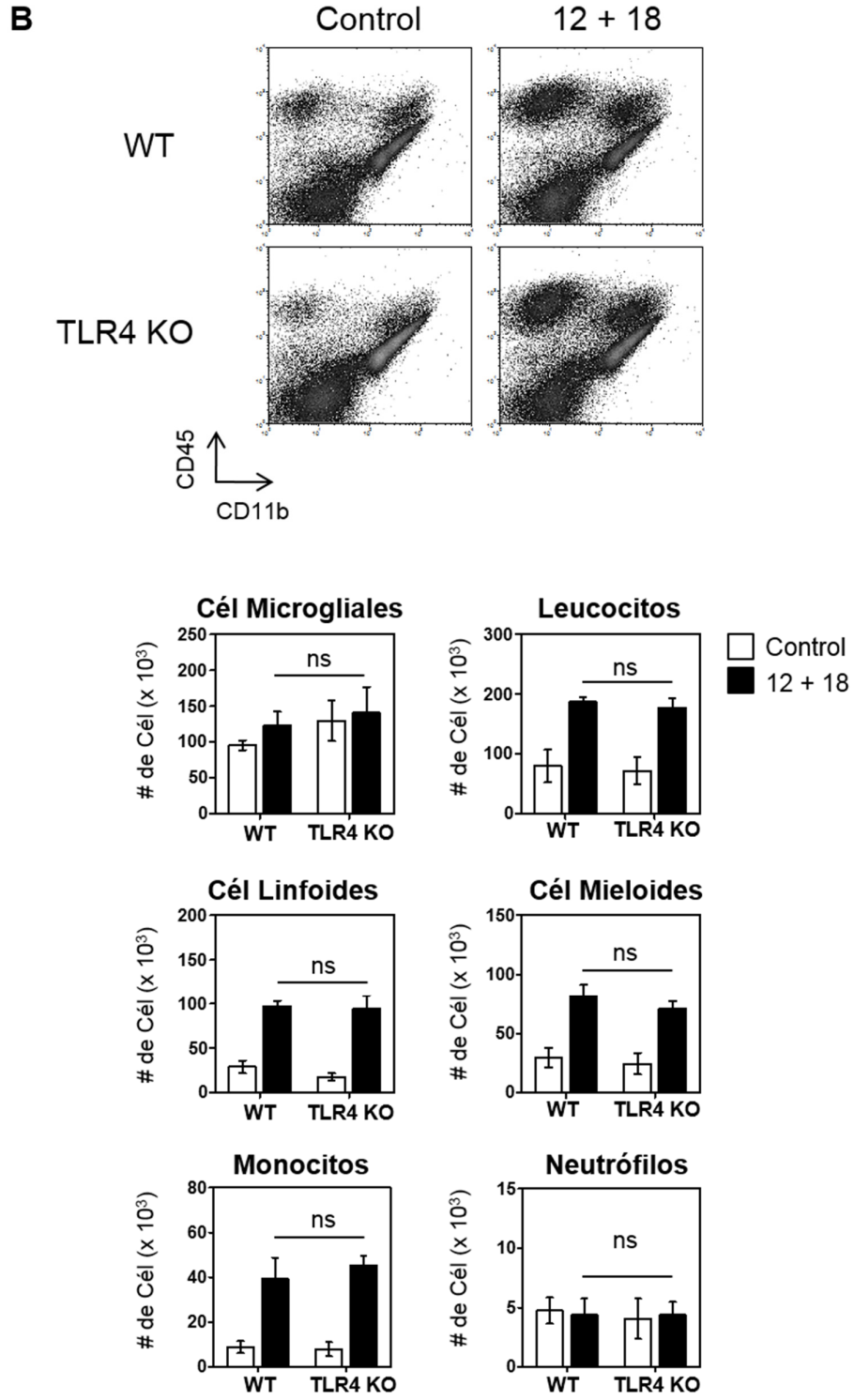
Dado que los plásmidos utilizados en esta tesis fueron amplificados en bacterias y si bien fueron purificados en un kit que permite obtener un producto libre de endotoxina. Teniendo en cuenta, que el modelo experimental tiene como objetivo evaluar el efecto de citocinas pro-inflamatorias sobre la respuesta neuroinflamatoria en ausencia de endotoxina y que tratamientos i.p con mínimas concentraciones de LPS pueden activar el endotelio cerebral^{89 60}. Se consideró relevante corroborar que el efecto observado es consecuencia del aumento de las citocinas IL-12 e IL-18 y no por la activación de un receptor de la inmunidad innata,

en este caso TLR4, al contactar con su ligando LPS, presente en la pared bacteriana. Para llevar a cabo este experimento se utilizaron ratones deficientes en TLR4.

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica con plásmido control o plásmido 12 + 18, los ratones WT y TLR4 KO fueron sacrificados por perfusión intracardíaca y se obtuvieron los bazo para la observación macroscópica y los cerebros para el análisis de las poblaciones celulares por citometría de flujo.

Para comenzar se observó que los ratones TLR4 KO tratados con 12 + 18, desarrollaron esplenomegalia al igual que los ratones WT (Figura 23 A). Por otro lado, el análisis de citometría no arrojó diferencias en cuanto al número absoluto de CM o de leucocitos reclutados, ni a variaciones en las poblaciones identificadas (Figura 23 B). Además se observó que la expresión de CMH II es comparable al ratón WT en los distintos tratamientos (Figura 23 C). Teniendo en cuenta todos estos resultados, concluimos que los efectos de los ADNc de 12 + 18 no se debieron a la contaminación con endotoxina.





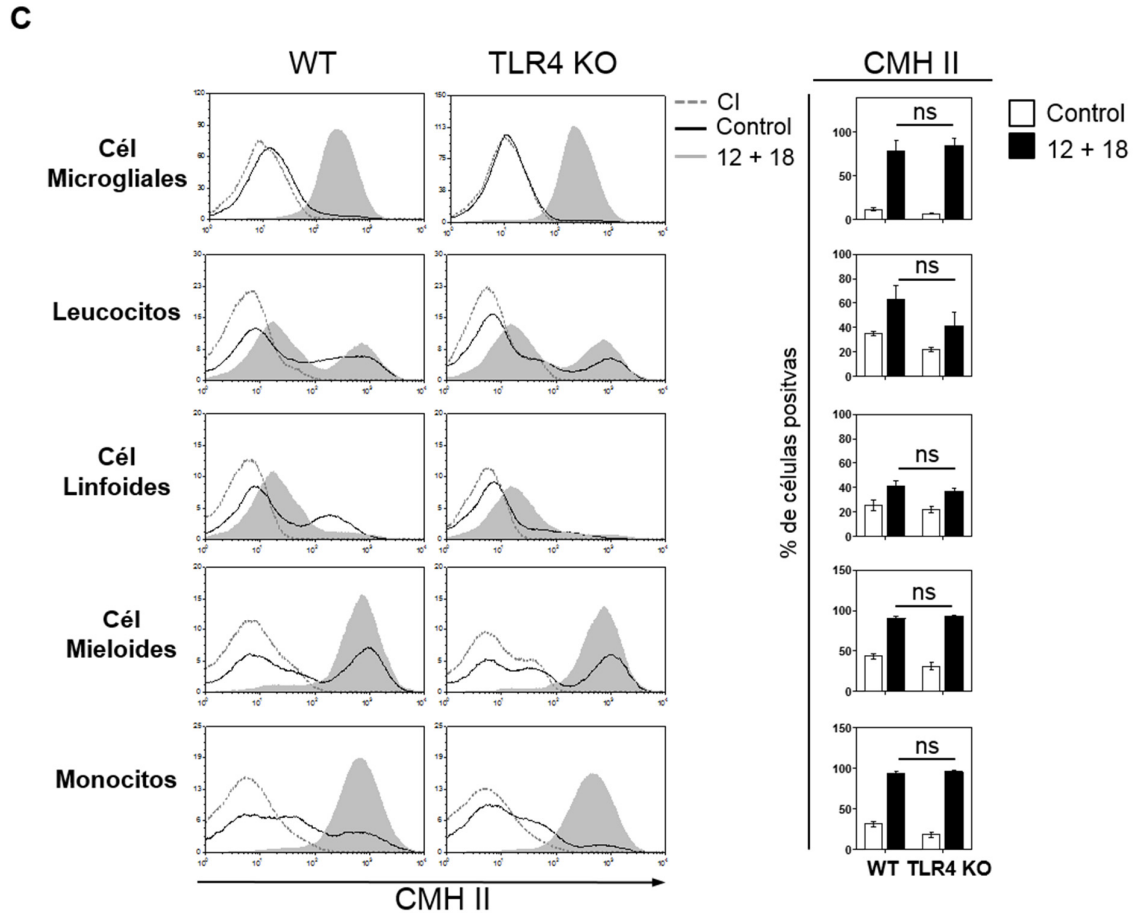


Figura 23. ADNc de IL-12 + IL-18 no presenta contaminación con LPS.

(A) Aumento relativo del peso de bazo de ratones C57BL6 WT y TLR4 KO inyectados hidrodinámicamente con plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 con respecto al control a los 7 días post tratamiento. (B) Número absoluto de células microgliales y de las poblaciones de leucocitos reclutados. (C) Células de cerebro teñidas con anticuerpos específicos para CD11b, CD45, Ly6C y CMH II (IA/IE) y analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de moléculas de CMH II en CM y en las poblaciones de leucocitos reclutados. En los histogramas se observa en línea de puntos gris al control de isotipo (CI), en línea continua negra al control y en área rellena gris al tratamiento 12 + 18. *** ($p < 0,001$), ns: no significativo.

En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento sistémico de citocinas pro-inflamatorias, en ausencia de LPS, induce reclutamiento de leucocitos activados en el cerebro y activación de CM residentes.

Evaluación de Neurodegeneración

Se denomina neurodegeneración a la pérdida de estructura, función o muerte neuronal. Dado que la inflamación es un agente etiológico del desarrollo de neurodegeneración, resulta de fundamental relevancia evaluar si la neuroinflamación caracterizada por la activación de CM y el reclutamiento de leucocitos al cerebro luego de la inyección hidrodinámica de IL-12 e IL-18 induce daños en las neuronas.

Las técnicas utilizadas para evaluar neurodegeneración fueron tinción con Fluorojade B (FJ-B)^{90 91} y la tinción Amino cupro argéntica (A-Cu-Ag)⁹². El FJ-B es una técnica altamente sensible para la tinción de somas degenerados, pero tiene una menor resolución para dendritas y axones. En cambio, la tinción Amino cupro argéntica es altamente sensible para la tinción en degeneración de somas, dendritas, axones, y sus ramificaciones terminales en el tejido cerebral sometido a diferentes condiciones experimentales y neuropatológicas.

Por lo tanto, con el objeto de evaluar neurodegeneración, se realizaron tinciones por ambas técnicas en cortes sagitales cerebrales de 30 μ m. A partir del análisis cualitativo de las muestras, se detectó la presencia de neuronas argirofílicas (positivas para la tinción A-cu-Ag) en los ratones tratados con 12 + 18. Las neuronas argirofílicas se hallaron dispersas y en un escaso número, además, la apariencia de estas neuronas es consistente con muerte celular por apoptosis⁹³. Se obtuvieron resultados similares al aplicar la técnica FJ-B (Figura 24).

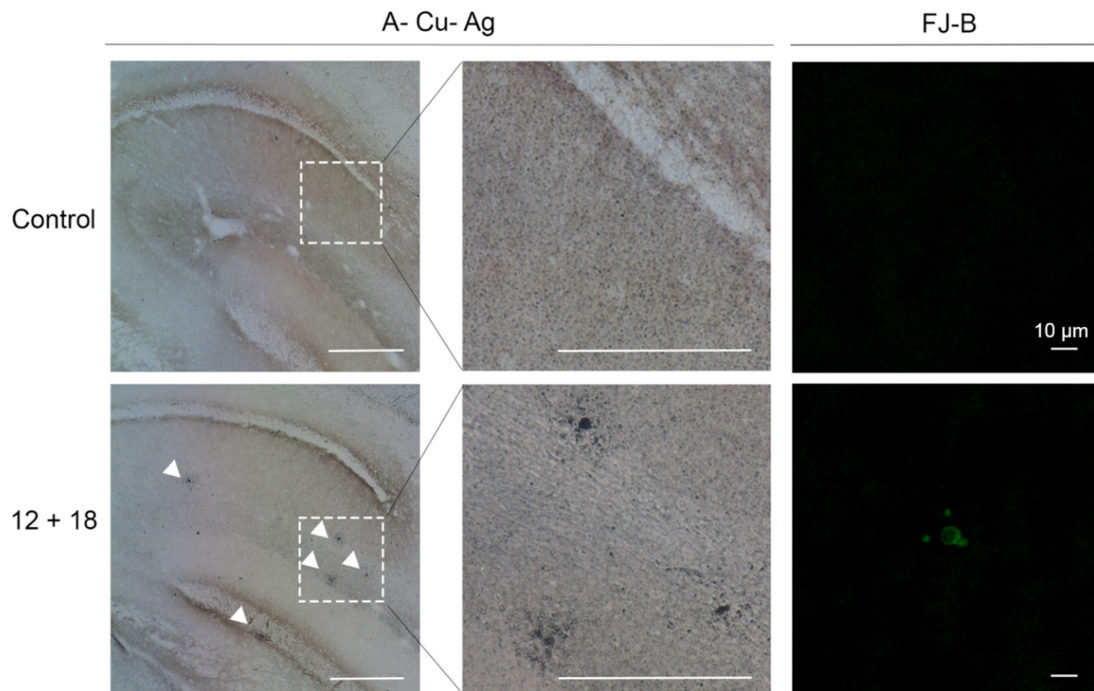


Figura 24. Evaluación de muerte neuronal por apoptosis luego de inflamación sistémica.

Luego de 7 días desde la inyección hidrodinámica con 12 + 18 o Control, los animales fueron sacrificados por perfusión intracardíaca con 30 ml de PBS más 30 ml de paraformaldehído 4%. Las figuras muestran la tinción de cortes sagitales por tinción Amino-cupro-argéntica o por Fluorojade B. Las imágenes obtenidas luego de la tinción amino-cupro-argéntica se presentan a un menor aumento y posteriormente amplificadas. Las escalas representan 100 µm en ambos casos y las puntas de flecha señalan neuronas positivas para la tinción.

CONCLUSIONES II

En esta sección de resultados, se evaluó el impacto del aumento de citocinas inflamatorias sistémicas sobre la respuesta neuroinflamatoria *in vivo*, a través de la utilización del modelo de inyección hidrodinámica de vectores de expresión que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18.

- Se corroboró que los ADNc utilizados no presentan contaminación con endotoxina.
- Cuando la respuesta neuroinflamatoria fue evaluada globalmente a nivel de cerebro, se observó que 12 + 18 indujo un aumento de la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias (TNF α e IFN γ).
- Además se demostró que la inyección de los ADNc de IL-12 e IL-18 no logró modificar el número de CM. Sin embargo, las CM mostraron indicios claros de activación celular. Aumentaron la expresión de moléculas de CMH II y sufrieron cambios morfológicos compatibles con la microgliosis reactiva.
- La inflamación sistémica indujo el reclutamiento de leucocitos periféricos de origen mieloide y linfoide al cerebro, localizándose principalmente a nivel de plexos coroideos, meninges, ventrículos y parénquima a nivel perivascular.
- La población mayoritaria de leucocitos reclutados de origen mieloide correspondió a monocitos y la de origen linfoide a linfocitos T. Además se detectó un aumento en la frecuencia de monocitos que expresan moléculas del CMH II.
- Por último, se observó en los ratones tratados con 12 + 18 muerte neuronal por apoptosis.

En conjunto, estos resultados indican que la inyección hidrodinámica de IL-12 + IL-18 funcionaría no solo como un modelo de inflamación sistémica, sino también, como un modelo experimental de neuroinflamación libre de endotoxina, al inducir activación de CM residentes, aumento en la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias y el reclutamiento de leucocitos al SNC.

RESULTADOS III

RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA *IN VIVO* EN AUSENCIA DE IL-4

Existen diversas moléculas responsables de controlar la neuroinflamación, entre ellas la citocina anti-inflamatoria IL-4, la cual se expresa en el SNC ⁹⁴. Su participación ha sido demostrada en diversos modelos experimentales, por ejemplo, los ratones deficientes en IL-4 desarrollan con mayor severidad EAE (modelo murino de EM) ^{95, 96}. En un modelo murino de EA (ratones transgénicos PPA), se detectaron niveles significativamente disminuidos de IL-4 respecto de los ratones controles ⁹⁷. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que IL-4 fue capaz de inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias y la expresión del receptor mFPR2, en macrófagos y CM activadas ^{98 99 67, 68}. Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que IL-4 ejerce un efecto pro-apoptótico en CM, lo cual sería un mecanismo importante para el control del número de células durante la microgliosis reactiva observada luego de la activación microglial ¹⁰⁰ y además que IL-4 modularía la respuesta neuroinflamatoria inducida por inyecciones sistémicas con LPS ⁷⁴.

En base al contexto de estos antecedentes, y a la necesidad de dilucidar efectos moduladores de IL-4 para comprender en mayor detalle las propiedades de esta molécula, se decidió estudiar si la neuroinflamación provocada por las citocinas pro-inflamatorias sistémicas, podría estar controlada por IL-4.

Para ello se utilizaron tanto ratones C57BL/6 WT como IL-4 KO, con el fin de analizar el impacto de la ausencia sistémica de IL-4 sobre la respuesta neuroinflamatoria causada por la inyección hidrodinámica de ADNc de IL-12 e IL-18. Se observó que IL-4 no logró modular el desarrollo de esplenomegalia en los ratones inyectados con los ADNc de IL-12 e IL-18. Ni las producciones sistémicas de IFN γ y TNF α (Figura 25).

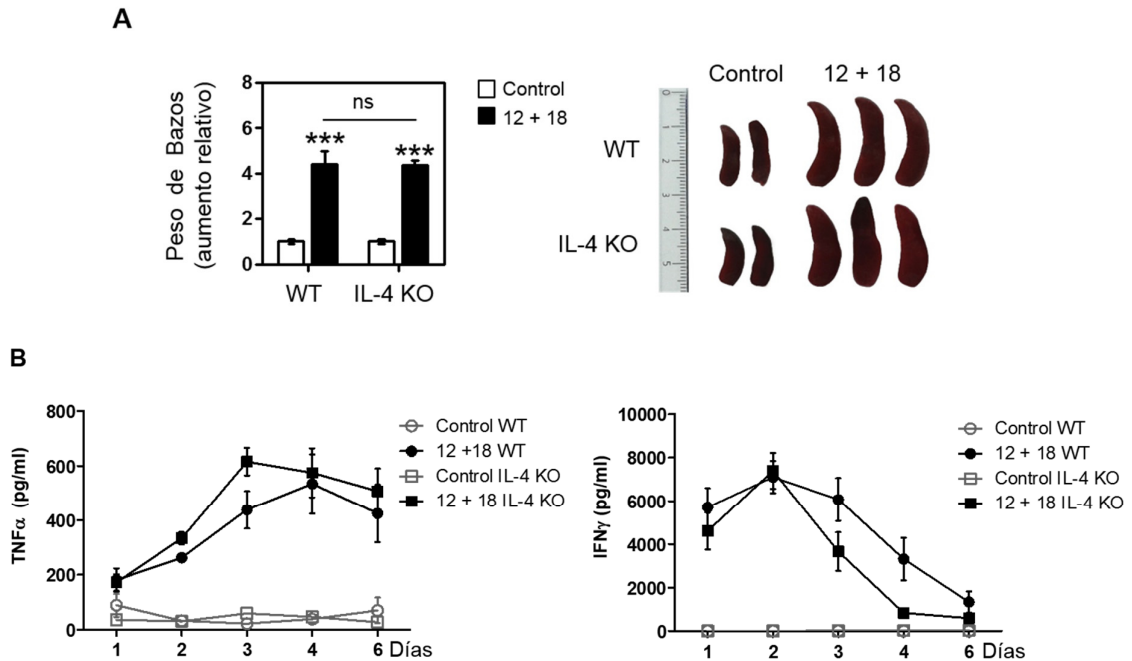


Figura 25. IL-4 no interviene en la modulación de la inflamación sistémica.

(A) Aumento relativo del peso de bazo de ratones C57BL/6 WT e IL-4 KO inyectados hidrodinámicamente con plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 con respecto al control a los 7 días post tratamiento (izquierda). Imagen del tamaño de los bazo (derecha) (B) Ratones C57BL/6 WT e IL-4 KO fueron inyectados hidrodinámicamente con los diferentes ADNc y los niveles de TNFα e IFNγ se analizaron en los sueros obtenidos en los días post-tratamiento por ELISA y los resultados fueron expresados en pg/ml basados en una curva estándar.

Quando se estudió la expresión de moléculas del CMH II en CM, se observó que ambos grupos de ratones tratados con 12 + 18, tenían la capacidad de incrementar significativamente ($p < 0.001$) los niveles de ésta molécula en comparación con los controles inyectados; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre CM de ratones WT e IL-4 KO. Además, los datos sugirieron que a pesar de que hay una tendencia al aumento del reclutamiento leucocitario ante la ausencia de IL-4 esta diferencia no logra ser significativa (Figura 26).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la ausencia de esta citocina, a pesar de tener roles moduladores reconocidos en el SNC, no modifica el desarrollo de la neuroinflamación inducida por la inyección hidrodinámica de ADNc de IL-12 e IL-18.

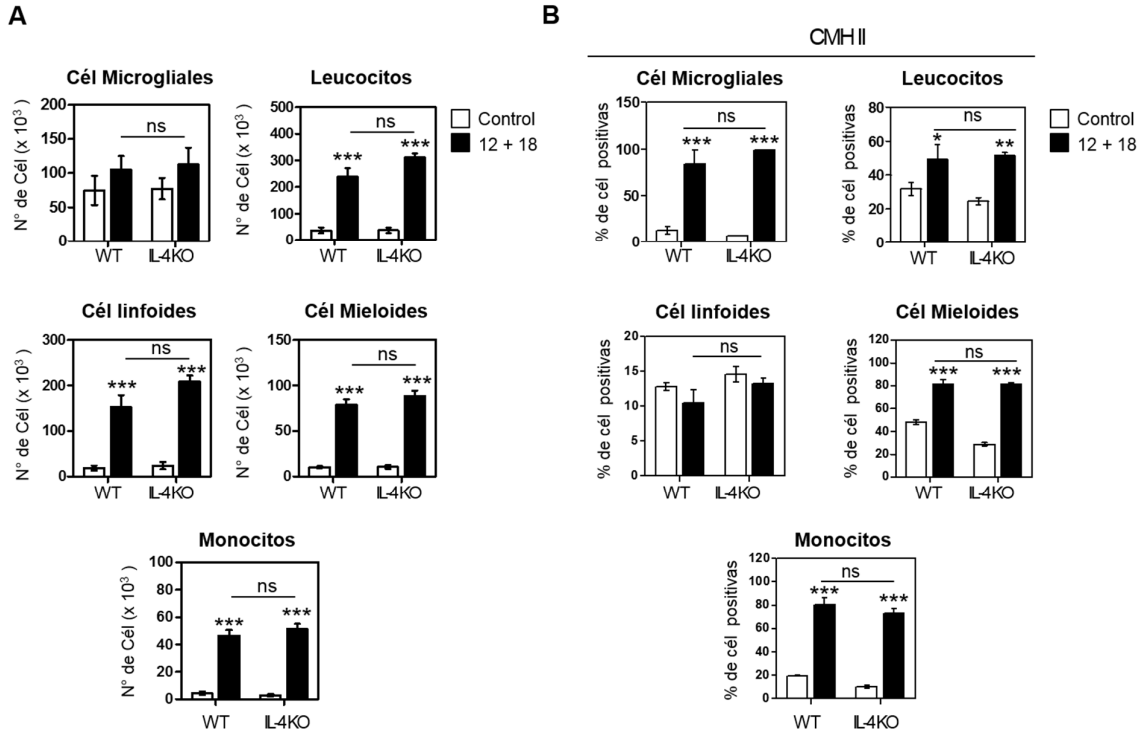


Figura 26. La ausencia de IL-4 no modifica la respuesta neuroinflamatoria inducida por el tratamiento con 12 + 18.

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica con 12 + 18 o Control, las células totales de cerebro de animales WT o IL-4 KO fueron obtenidas por disgregación mecánica, digestión enzimática y posterior purificación con percoll. Las células cerebrales fueron teñidas con anticuerpos específicos para CD11b, CD45, Ly6C y CMH II (IA/IE) y se analizaron mediante citometría de flujo. **(A)** Los gráficos indican el número absoluto de las poblaciones celulares en ambos ratones luego del tratamiento. **(B)** Los gráficos representan la frecuencia de células positivas para las moléculas CMH II. *** 12 + 18 vs Control (p<0,001).

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA EN RATONES DEFICIENTES EN TNF α o IFN γ

Dado que previamente se había reportado que la inyección por vía endovenosa de vectores de expresión que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 inducía niveles sistémicos altos y persistentes de IL-12, IL-18, TNF α e IFN γ se consideró relevante evaluar el impacto de la ausencia sistémica de las citocinas TNF α e IFN γ sobre la respuesta neuroinflamatoria. Por lo tanto, el esquema experimental detallado en la Figura 12, fue llevado a cabo en ratones C57BL/6 WT, en ratones deficientes en el receptor 1 del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α R KO) y en ratones deficientes en interferón gama (IFN γ KO).

Luego de 7 días de la inyección hidrodinámica con plásmido Control o 12 + 18, los ratones fueron sacrificados por perfusión intracardiaca y los bazoos fueron obtenidos para la observación macroscópica y los cerebros para el análisis de las poblaciones celulares por citometría de flujo. Previamente, en los distintos días post-inyección se extrajo sangre para evaluar los niveles de citocinas por ELISA en muestras de plasma.

Estudio de citocinas circulantes en ratones TNF α R KO e IFN γ KO

Para comenzar, tal como se había realizado en el ratón C57BL/6 WT, se midieron los niveles de citocinas pro-inflamatorias producidos luego de la inyección hidrodinámica de 12 + 18, para ello se tomaron muestras de sangre de ambos ratones KO, tanto del grupo control como del 12 + 18, a los distintos días post-tratamiento. Las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias TNF α e IFN γ fueron determinadas en los plasmas por ELISA.

Se observó que en el ratón IFN γ KO la inyección de 12 + 18 aumenta la producción de TNF α recién a partir del día 3 y los niveles se mantienen elevados hasta el día del sacrificio. Tal como era de esperar, estos animales fueron incapaces de producir IFN γ luego de la inyección con 12 + 18, confirmando la deficiencia en la expresión génica de la citocina en este animal.

Con respecto al ratón TNF α R KO tratado con 12 + 18, se observó una producción de TNF α desde el día 1 que se mantiene elevada con respecto al control hasta el día de sacrificio. La producción no se ve afectada, ya que el ratón es KO

en el receptor 1 y no en la citocina. Los niveles de IFN γ en este ratón también aumentan desde el primer día y se mantienen hasta el día 6 (Figura 27).

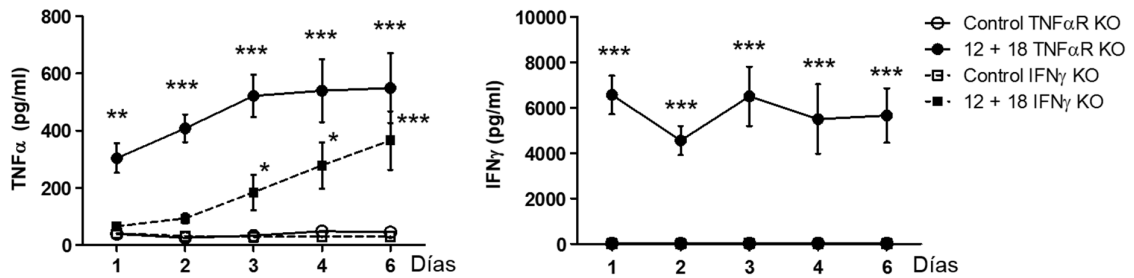


Figura 27. Producción de citocinas después de la inyección hidrodinámica en ratones TNF α R KO e IFN γ KO.

En los distintos días post-inyección hidrodinámica con los diferentes ADNc se extrajeron muestras de plasmas de ratones TNF α R KO e IFN γ KO. Los niveles plasmáticos de TNF α e IFN- γ se determinaron por ELISA y los resultados fueron expresados en pg/ml basados en una curva estándar. Los datos se expresan como la media de tres experimentos diferentes. *** 12 + 18 vs Control ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$).

Por otro lado, la observación macroscópica de los bazo permitió evidenciar que los ratones TNF α R KO claramente presentaron esplenomegalia, tal como los ratones C57BL/6 luego del tratamiento de 12 + 18. En cambio, los animales deficientes en IFN γ inyectados hidrodinámicamente con 12 + 18, no presentaron bazo de mayor tamaño y peso, comparados con el control (Figura 28 A).

Dado que la inducción de esplenomegalia fue utilizada a lo largo de este trabajo como un control de éxito de inserción de los plásmidos que codifican para IL-12 e IL-18. Se midieron los niveles proteicos de IL-12 en los ratones IFN γ KO en distintos días post inyección para asegurar que la transfección había sido exitosa. Las muestras de sangre revelaron que en el ratón IFN γ KO se dosaron valores similares de IL-12 comparado con el ratón WT. Por lo tanto concluimos que la citocina pro-inflamatoria IFN γ interviene en el desarrollo de esplenomegalia (Figura 28 B).

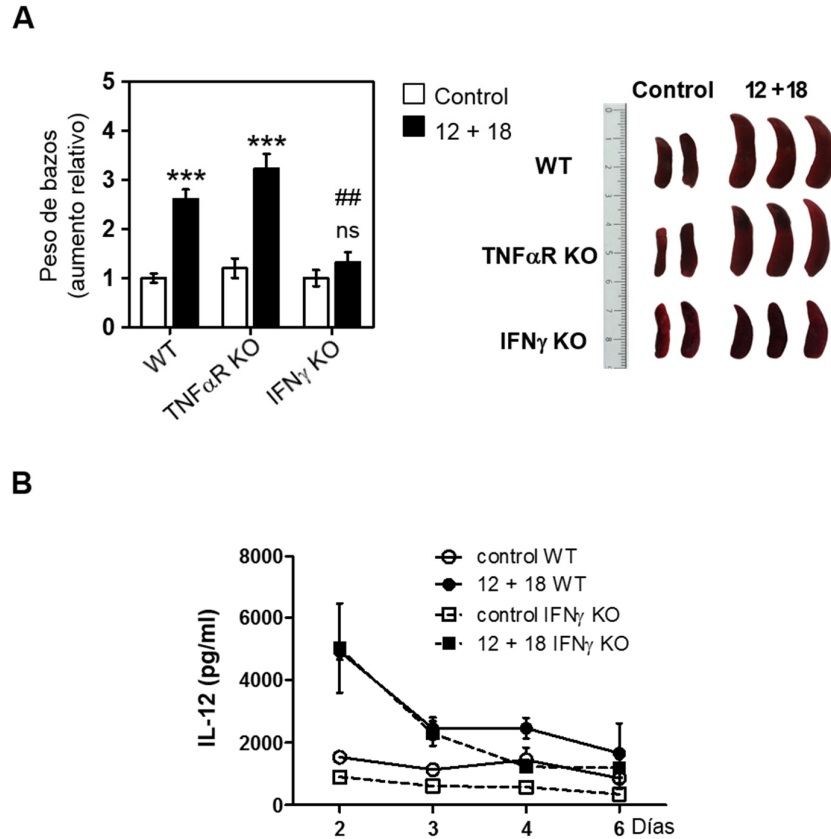


Figura 28. Ratones IFN γ KO no presentan esplenomegalia luego de la inyección hidrodinámica de 12 + 18.

(A) Aumento relativo del peso de bazos de ratones C57BL/6 WT, TNF α R KO o IFN γ KO inyectados hidrodinámicamente con plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 con respecto al control a los 7 días post tratamiento. (B) Ratones C57BL/6 WT e IFN γ KO fueron inyectados hidrodinámicamente con los diferentes ADNc y los niveles de IL-12 se analizaron en los sueros obtenidos en los días post-tratamiento por ELISA y los resultados son expresados en pg/ml basados en una curva estándar. *** 12 + 18 vs control (p < 0,001), ** (p < 0,01), * (p < 0,05.), ns: no significativo. ## 12+18 WT vs 12 + 18 IFN γ KO (p < 0,01).

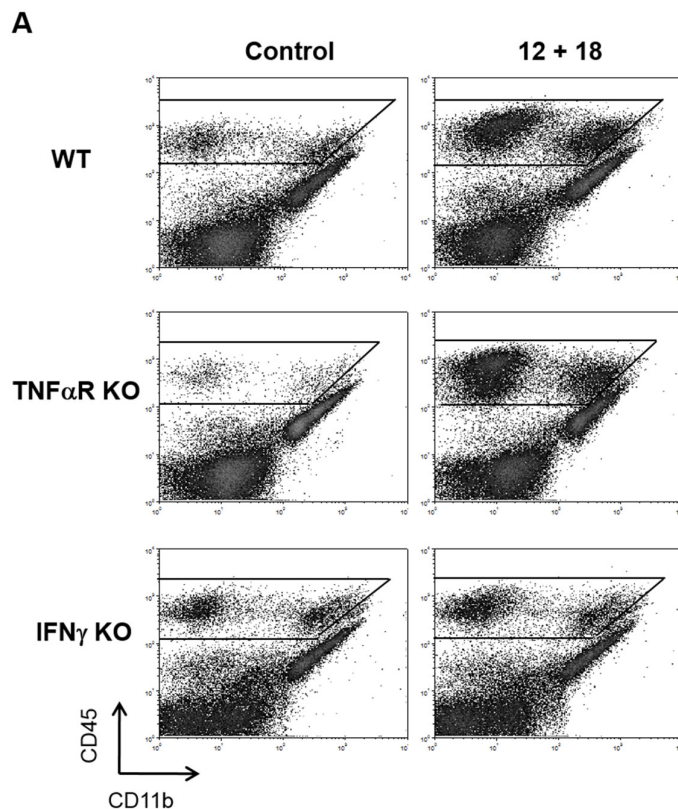
Identificación y recuento de CM y de leucocitos reclutados al cerebro

La ausencia puntual de citocinas pro-inflamatorias sistémicas podría modificar el número de CM presentes en el parénquima cerebral o alterar el número de células que son reclutadas desde la periferia, detectadas previamente en los animales WT inyectados hidrodinámicamente con IL-12 e IL-18. Para evaluar si esto era posible, ratones TNF α R KO, IFN γ KO y WT fueron inyectados hidrodinámicamente. Luego de la disgregación mecánica y enzimática del órgano

y de la purificación de células totales con percoll, se realizó la marcación con anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente antígenos de membrana y la suspensión celular fue analizada a través de citometría de flujo.

En los gráficos (dot plots) representativos puede visualizarse cualitativamente la distribución celular según la expresión de CD45 y CD11b (Figura 29 A). Claramente, se observó un aumento en la población CD45^{high} en el grupo de animales inyectados con 12 + 18 TNF α R KO tal como en el ratón 12 + 18 WT. En cambio, los ratones IFN γ KO no presentaron grandes diferencias comparados con su control.

Cuando analizamos cuantitativamente el número absoluto de células por cerebro se observó que las CM no presentaron diferencias entre tratamientos ni entre ratones. En cambio, se observó un reclutamiento menor de leucocitos, tanto de origen linfoide como mieloide al comparar el ratón inyectado hidrodinámicamente con 12 + 18 IFN γ KO comparado con el WT o el TNF α R KO. Cuando analizamos más profundamente las poblaciones de origen mieloide se detectó que esta disminución se debía principalmente al número menor de monocitos reclutados (Figura 29 B).



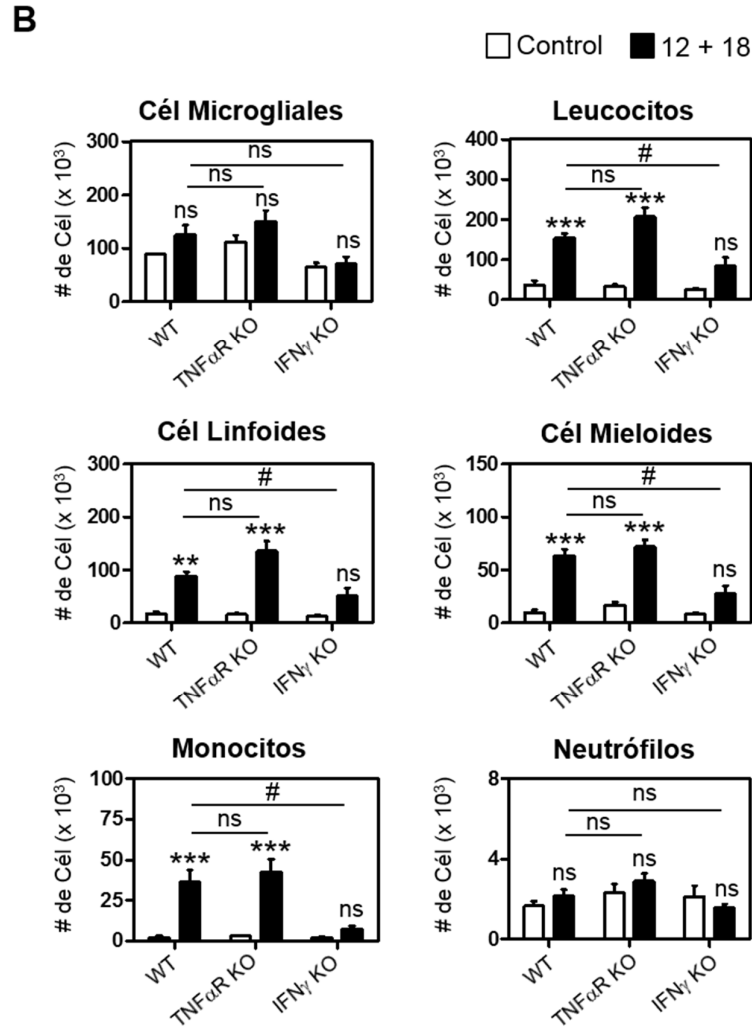


Figura 29. La ausencia de IFN γ afecta el reclutamiento leucocitario.

Luego de 7 días del tratamiento con 12 + 18 o Control, las células totales de cerebro de animales WT, TNF α R KO e IFN γ KO fueron obtenidas por disgregación mecánica, digestión enzimática y posterior purificación con percoll. Las células se tiñeron con Ac específicos para CD11b, CD45, Ly6C, Ly6G, CD3 y se analizaron por citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos “Dot Plots” representativos de la tinción con Ac anti-CD11b y anti-CD45, especificando la estrategia de identificación de leucocitos periféricos **(B)** Los gráficos representan el número absoluto de células microgliales (CD11b⁺ CD45^{low}) y leucocitos periféricos de origen mieloide y linfóide, monocitos y neutrófilos. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SEM, siendo representativo de tres experimentos independientes. ** 12 + 18 vs control ($p < 0,001$), * ($p < 0,01$), * ($p < 0,05$), ns: no significativo. # 12+18 WT vs 12 + 18 IFN γ KO ($p < 0,05$).

Cuando evaluamos la frecuencia de CMH II en CM y los leucocitos reclutados se observó que la población de CM en el ratón $IFN\gamma$ KO además de no presentar diferencias respecto a su número absoluto comparado con el ratón WT tratado, falló en presentar un aumento en la expresión CMH II, asociado con su activación. También, en ausencia de $IFN\gamma$ se detectó una menor frecuencia de células de origen mieloide, principalmente monocitos, que expresan CMH II en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio sistémico (Figura 30).

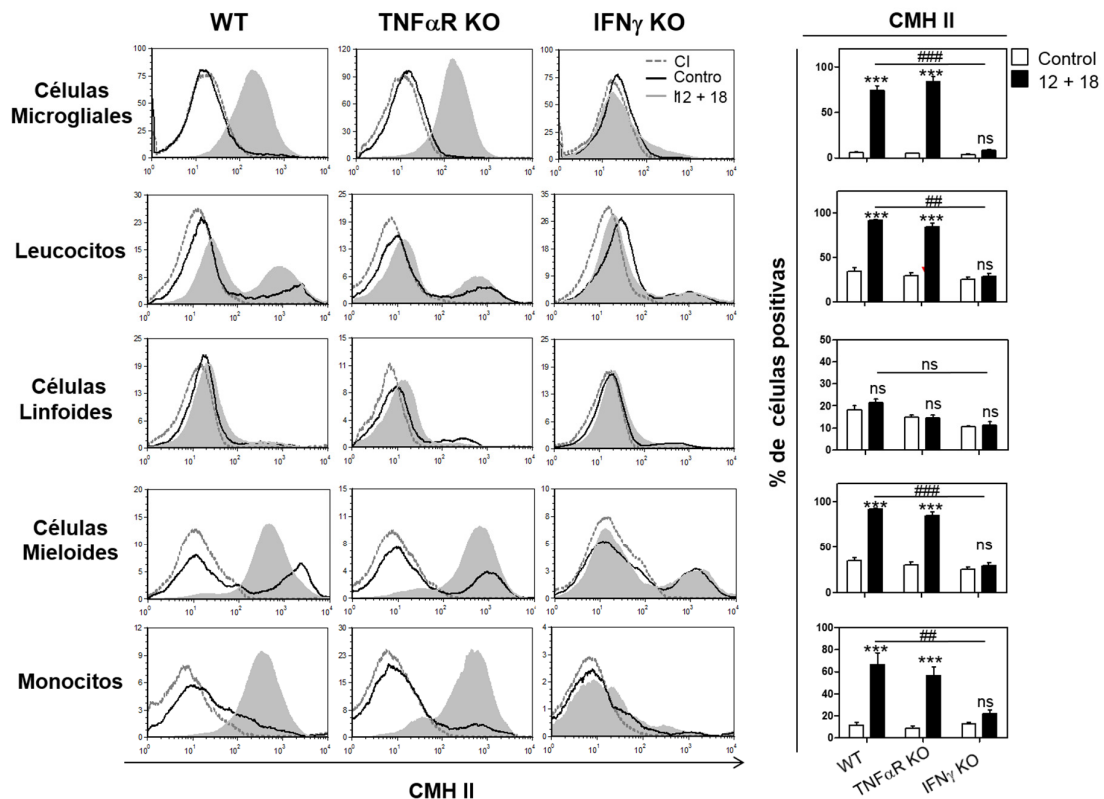


Figura 30. Expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad.

Células de cerebro de ratones C57BL/6 WT, $TNF\alpha R$ KO o $IFN\gamma$ KO inyectados hidrodinámicamente con los diferentes ADNc, fueron teñidas con anticuerpos específicos para CD11b, CD45, Ly6C, Ly6G y MHC II (IA/IE) y analizadas mediante citometría de flujo para determinar la expresión de moléculas de CMH II en CM y en las poblaciones de leucocitos reclutados. *** 12 + 18 vs control (p < 0,001), ** (p < 0,01), * (p < 0,05.), ns: no significativo. ### 12+18 WT vs 12 + 18 $IFN\gamma$ KO (p < 0,001), ## (p < 0,01).

CONCLUSIONES III

En esta sección de resultados, se analizó el impacto de la ausencia sistémica de citocinas puntuales sobre la respuesta neuroinflamatoria causada por la inyección hidrodinámica de ADNc de IL-12 e IL-18, mediante la utilización de ratones IL-4 KO, TNF α R KO e IFN γ KO, se demostró que:

- Frente al desafío inflamatorio sistémico, la respuesta neuroinflamatoria no se modificó ante la ausencia de IL-4, a pesar de su participación reconocida en la modulación de patologías en el SNC.
- La ausencia del receptor 1 de TNF α no parece intervenir en el desarrollo de la respuesta neuroinflamatoria generada por las citocinas sistémicas.
- En cambio, los ratones IFN γ KO presentaron un menor reclutamiento leucocitario al SNC y una menor capacidad para aumentar la expresión CMH II en estas células en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio sistémico.
- En el ratón IFN γ KO no se observó diferencia en el número absoluto de CM y además, estas células fueron incapaces de aumentar la expresión de moléculas CMH II, luego de la inyección hidrodinámica de ADNc de IL-12 + IL-18.

En conjunto, estos resultados sugieren que la citocina IFN γ sería importante en la respuesta neuroinflamatoria ya que su ausencia afecta el reclutamiento leucocitario al SNC y la activación de las CM residentes.

DISCUSIÓN

El SNC es mantenido al resguardo de posibles insultos provenientes de la periferia porque cumple funciones biológicas fundamentales para el organismo y las células que lo componen poseen baja capacidad regenerativa. Por lo tanto, este sistema debe minimizar la respuesta inmunológica que puede resultar neurotóxica mediante mecanismos que determinan un privilegio inmunológico. A pesar de que se lo considera un órgano inmuno-privilegiado, en los últimos años se ha demostrado a través de numerosos trabajos la existencia de comunicación entre el sistema inmune periférico y el SNC, tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. En función de estos antecedentes, en los últimos años se ha puesto un interés especial en intentar dilucidar los mecanismos que posibilitan o permiten esta comunicación, a los fines de poder manipular al SNC a través del sistema inmune según lo requiera cada situación.

Dado que las citocinas juegan un rol muy importante en el sistema inmune, este trabajo de tesis evaluó como las citocinas tipo I (pro-inflamatorias) influyen en la activación de las CM y en el desarrollo de la respuesta neuroinflamatoria.

EL EFECTO DE LAS CITOCINAS SOBRE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL

Los macrófagos periféricos, dependiendo del estímulo que reciban, pueden polarizar su respuesta hacia una activación clásica (M1) o alternativa (M2). Los M1 surgen en respuesta a LPS, TNF α o a IFN γ y desempeñan actividades microbicidas con producción de mediadores pro-inflamatorios tales como TNF α , IL-1 β , IL-6 y especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (ON). En cambio, los M2 se activan en respuesta a estímulos con citocinas anti-inflamatorias tipo II como IL-4 e IL-13 y están involucrados en tareas de reparación tisular y reconstrucción. Dado a las características particulares que tienen las CM, por ejemplo, su ontogenia, su alta longevidad, su capacidad para auto-regenerarse, su permanencia aislada en el parénquima cerebral a través de barreras y de un microambiente que regula sus funciones, se pone en duda si las CM pueden desarrollar el mismo tipo de activación que un macrófago periférico o si los mecanismos de activación son diferentes. Las últimas revisiones coinciden en llamarlas CM activadas de forma similar a M1 o similar a M2. Tal como ocurre con los macrófagos periféricos, los autores concuerdan en que es más probable que haya un espectro de condiciones

funcionales de activación de fagocitos mononucleares en lugar de un conjunto discreto de estados de activación ^{26 101}.

Con el objetivo de observar la polarización de CM, utilizamos una línea celular de microglía de ratón y la estimulamos con citocinas tipo I o II. Cuando la línea celular BV2 fue estimulada con IFN γ , TNF α (citocinas tipo I) o con IL-4 (citocina tipo II) como control, se observó como las células luego de activarse, modularon de manera diferencial los niveles de IL-10 y de TNF α .

Además, se observó como la activación de las CM no modula sólo sus funciones inmunes, sino también otras funciones fisiológicas, como la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas. En este trabajo se evaluó IGF-1, considerado un factor de crecimiento neuroprotectivo ¹⁰². En ratas Wistar envejecidas, se detectó un aumento en los niveles de IFN γ y una disminución en las concentraciones de IGF-1 en hipocampo ¹⁰³, en concordancia con los resultados obtenidos por Maher y col, observamos que la polarización de las CM hacia un perfil similar a M1 con IFN γ disminuye los niveles de IGF-1, en cambio, la estimulación con TNF α no modifica la expresión génica de IGF-1. Tal como sucede en los macrófagos periféricos ¹⁰⁴, la estimulación con IL-4 que polarizaría a las CM a un estado similar a M2 asociado con funciones de reparación y reconstrucción, aumenta los niveles de IGF-1.

El microambiente local desempeña un papel crítico en la regulación del fenotipo microglial. Este fenotipo, es inducido a través de la interacción con mediadores solubles o unidos a membrana de neuronas, CEs y astrocitos. En este sentido la expresión de receptores quimiotácticos, particularmente CX3CR1, es importante ya que determinaría las chances de que sucedan mecanismos regulatorios desde las neuronas hacia las CM. Cuando evaluamos este receptor, nos encontramos con el hallazgo interesante que la expresión del receptor quimiotáctico CX3CR1 disminuye con ambos estímulos, aunque los niveles de expresión génica difieren. A diferencia de los resultados anteriores, donde generalmente la regulación de citocinas o IGF-1 era diferencial, dependiendo del estímulo recibido. Esto sugiere que la regulación del receptor CX3CR1, quizás es sensible en general a la activación de CM y no al tipo de polarización. Por ejemplo, estudios realizados en ratones BALB/c demuestran también una disminución en la expresión de CX3CR1 en CM, luego de una inyección i.p de LPS ¹⁰⁵. La disminución

en los niveles de expresión de CX3CR1 luego de la estimulación con LPS, también se reporta en una línea celular de microglía y además se demuestra un incremento muy modesto en los niveles cuando las células son co-estimuladas con IL-10¹⁰⁶.

Los resultados obtenidos en la primera parte de esta tesis, aportan evidencias relacionadas a la idea que el ambiente de citocinas activa a las CM modulando sus funciones inmunes y neuroprotectivas.

EL ROL DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA

A través de varios modelos experimentales, se ha estudiado como un desafío inmune periférico, induce en los roedores y en los seres humanos respuestas fisiopatológicas y estados que incluyen fiebre, malestar, letargo, anorexia o hasta depresión o ansiedad¹⁰⁷. Esto corresponde a la inducción de la neuroinflamación, que se caracteriza por la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias, principalmente IL-1 β , TNF α e IL-6, dando lugar a perturbaciones del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. La contribución relativa de citocinas, quimiocinas, de las células residentes o la infiltración de células inmunes hacia el cerebro sigue sin estar claro.

Las vías moleculares a través de las cuales la inflamación sistémica desarrolla o intensifica la inflamación en el SNC y genera cambios en el comportamiento asociados a enfermedad se han estudiado en modelos experimentales murinos utilizando desafíos periféricos con agonistas de TLR como LPS (agonista de TLR4)^{108 69}, con poly I:C (agonista de TLR3)^{109 110} o la administración de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF α , por separado o combinadas^{111, 112 113}. También se utilizaron inyecciones con enterotoxina B de *staphylococcus aureus* o con la bacteria *Escherichia coli*¹¹⁴, y además se investigó como inflamaciones periféricas crónicas pueden afectar al SNC a través de inyecciones múltiples con LPS.

Si bien la mayoría de los modelos experimentales están asociados a infecciones agudas, ya sean bacterianas, virales o por parásitos intracelulares, estudios recientes sugieren que este tipo de comunicación también se observa durante las enfermedades inflamatorias crónicas o inflamaciones asépticas, como artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis y trastornos

metabólicos como diabetes, obesidad, aterosclerosis, etc ¹¹⁵. Por ejemplo, obesidad y aterosclerosis han sido previamente asociados con la activación microglial tal como se evaluó por inmunohistoquímica ^{116 117 118} y por tomografía por emisión de positrones ¹¹⁶. Artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria del intestino y psoriasis han sido asociadas con depresión, ansiedad y fatiga ⁵⁸.

Todas estas patologías están caracterizadas por desarrollar procesos inflamatorios con inducción de respuesta Th1, polarizando a los macrófagos hacia una activación clásica y al aumento de citocinas tipo I (pro-inflamatorias).

Los resultados obtenidos en la segunda sección de esta tesis doctoral, evalúan el impacto del aumento de citocinas inflamatorias sistémicas sobre la respuesta neuroinflamatoria *in vivo*, en ausencia de moléculas asociadas a microorganismos. Esto se abordó a través de la utilización de un modelo de inyección hidrodinámica de vectores de expresión que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 en ratones C57BL/6. Durante el desarrollo de esta tesis no hallamos reportes en la literatura que estudien las consecuencias de la presencia de citocinas inflamatorias sistémicas en el SNC, bajo estas condiciones experimentales.

Previamente, Rodríguez-Galán y col. habían indicado que cuando IL-12 e IL-18 eran expresados sistémicamente a través de una inyección única de sus respectivos ADNc, se observaban niveles séricos altos de las citocinas durante varios días y que estos niveles eran tolerados en ratones BALB/c y C57BL/6 de por lo menos 12 semanas de edad ⁸². Esta situación presenta ventajas respecto al uso directo de citocinas recombinantes, ya que se evita la administración repetida de las proteínas recombinantes de IL-12 e IL-18 para alcanzar los niveles persistentes de la citocina. Estudios farmacocinéticos previos habían demostrado que una única administración de la proteína recombinante de IL-12 resultaba en niveles séricos más bajos de IL-12 que disminuían rápidamente con el tiempo, en comparación con una concentración persistente de la citocina cuando se administra el ADNc sistémico de IL-12 ¹¹⁹. Los niveles de IL-12 dosados a los distintos días post-inyección en este trabajo, concuerdan con los obtenidos previamente por Rodríguez-Galán ¹²⁰. Niveles séricos de IL-12 de 0,4 a 15 ng/ml y de IL-18 de 1ng/ml pueden ser encontrados en ratones luego de infecciones con ciertos patógenos ¹²¹, por lo tanto, tanto las concentraciones de IL-12 como de IL-18 obtenidas luego de

la inyección hidrodinámica de ADNc 12 + 18 corresponden a niveles fisiopatológicos.

A nivel sistémico, observamos como el tratamiento con 12 + 18 aumentó los niveles de las citocinas circulantes $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e IL-10, no observamos variaciones en IL-1 β . Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rodríguez-Galán y col. y Barrios y col. quienes utilizaron este modelo experimental para evaluar su efectividad como tratamiento anti-tumoral^{82 84}.

Por otro lado, los ratones tratados no presentan variaciones de peso comparando con los controles, a diferencia de lo observado en modelos experimentales de inflamación sistémica con LPS, $TNF\alpha$ o IL-1 β ^{122 123}. Sin embargo otros parámetros asociados a cambios en el comportamiento debido a enfermedad no fueron evaluados en este trabajo, como interacción social, actividad locomotora, entre otros. Por lo que no descartamos la posibilidad de que se desarrollen.

En cerebro, se demuestra un aumento en la expresión génica de las citocinas pro-inflamatorias $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ después de la inyección hidrodinámica de 12 + 18. Este perfil de citocinas conduciría a la activación clásica de CM/macrófagos. Resultados similares fueron obtenidos luego de un desafío agudo con LPS sistémico, aunque los niveles de expresión génica difieren^{69 74}.

El estudio del papel de la microglía y las células infiltrantes en repuestas neuroinflamatorias y en EN a menudo muestran discordancias en cuanto a la discriminación entre CM y células de origen mieloide que infiltran el SNC en condiciones patológicas. En este estudio, se realizó un análisis detallado por citometría de flujo para distinguir las distintas poblaciones celulares. Con esta técnica, se muestra que la inyección hidrodinámica de 12 + 18 promueve el aumento de leucocitos reclutados, sin modificaciones en el número de CM.

A pesar de que no se presenta un aumento en el número de CM, como respuesta a la inflamación sistémica inducida, se detectaron señales de activación en esta población. Reconocidas a partir del cambio morfológico observado en las células, caracterizado por el acortamiento y engrosamiento de las ramificaciones microgliales y el aumento del tamaño del soma celular. También, por el aumento leve en la expresión de CD45 y marcado de CMH II en estas células. El incremento del marcador CD45 en la superficie de la microglía en situaciones inflamatorias se

ha descrito anteriormente ¹²⁴. Esto podría aportar a la identificación errónea de CM y poblaciones de leucocitos con origen mieloide reclutadas. Sin embargo, es poco probable que la microglía se confunda con monocitos inflamatorios o neutrófilos porque las CM no expresan ni Ly6G ni Ly6C. Además, es importante aclarar que el aumento en la expresión de CD45 no alcanza a los niveles observados en los leucocitos reclutados ¹²⁴, ya que el valor de IFM de CD45 hallado en las CM es por lo menos un orden de magnitud menor al que se encuentra en los leucocitos (datos no mostrados).

Además de desempeñar un papel muy importante en la activación de las CM, las citocinas pro-inflamatorias son importantes en la inducción de quimiocinas, en la activación de CEs, en la inducción de moléculas de adhesión y en el reclutamiento de leucocitos. Durante el transcurso de patologías, la reacción inflamatoria local es acompañada por el reclutamiento de células del sistema inmune desde la periferia. En este trabajo, observamos que la co-expresión de IL-12 e IL-18 indujo el reclutamiento de leucocitos periféricos (CD45^{high}) de origen mieloide (CD45^{high} CD11b⁺) y linfoide (CD45^{high} CD11b⁻) al cerebro. Dentro de la población mieloide, la población mayoritaria detectada fue de monocitos. En la población linfoide se evaluaron las poblaciones de linfocitos B y linfocitos T, tanto CD4 como CD8. La población mayoritaria de leucocitos reclutados de origen linfoide correspondió a linfocitos T CD8 y CD4. A su vez, detectamos un aumento en la frecuencia de células de origen mieloide que expresan CMH II, profundizando el análisis, se observó que la población de monocitos aumenta CMH II luego del tratamiento con 12 + 18. Además, a través del análisis de cortes histológicos detectamos que los leucocitos reclutados se localizaron principalmente a nivel de plexos coroideos y también en meninges, ventrículos y parénquima a nivel perivascular.

El epitelio del plexo coroideo constituye la base estructural de la barrera sangre- LCR. Curiosamente, el aumento del reclutamiento en la zona de plexo coroideo se asocia con alteraciones en la barrera de células epiteliales observadas a través del aumento selectivo de ARNm de TNF α en esta estructura ¹²⁵. Es importante destacar, que esta modificación de la permeabilidad del plexo coroideo, tal como en nuestro caso, no resultó en la migración de células inmunes hacia el parénquima. También se observó reclutamiento de linfocitos T y granulocitos en el

plexo coroideo en modelos de aterosclerosis y obesidad, que utilizan ratones Apo E^{-/-} con una dieta rica en grasas ¹¹⁶. Un informe que utiliza el modelo de EAE en ratones, pone de relieve un papel fundamental de las células T colaboradoras productoras IL-17 en el reclutamiento de células inmunes en el plexo coroideo ¹²⁶. Es interesante especular, por lo tanto, que nuestros datos también ponen de relieve la posibilidad de que un proceso de este tipo podría ocurrir solo como consecuencia de la inflamación sistémica por citocinas tipo I.

Teniendo en cuenta el mayor reclutamiento de células al SNC y como las poblaciones reclutadas varían según el modelo experimental utilizado, sería conveniente profundizar el estudio para determinar la importancia fisiológica del reclutamiento de células inmunes en el SNC durante el aumento sistémico de citocinas tipo I y si estas células son reclutadas como consecuencia de la neuroinflamación inducida por la inflamación sistémica y/o si contribuirían a la neuropatología asociada a las enfermedades inflamatorias periféricas tanto infecciosas como asépticas.

Las revisiones actuales concuerdan en que la pre-activación microglial causada por EN o amiloidosis centrales, provocan posteriormente una respuesta exagerada ante estímulos inflamatorios centrales o sistémicos. Por ejemplo, en un modelo murino de enfermedad de priones, la estimulación sistémica o intra-cerebral con LPS indujo activación microglial y el aumento en la expresión de citocinas comparado con el ratón control ^{108 127}. Nuestros datos indican que las inflamaciones sistémicas también podrían pre-activar a las CM. Esta pre-activación haría más susceptibles a las CM a la activación por nuevos estímulos. La presencia de CM activadas e inflamación cerebral a causa de una inflamación sistémica, posiblemente no conduzcan a alteraciones neuroinflamatorias irreversibles, pero tal vez, podrían contribuir al desarrollo de patologías cerebrales ⁶³. En concordancia con nuestros datos, reportes bibliográficos demuestran que la pre-activación microglial en respuesta a cambios inflamatorios sistémicos, como aterosclerosis, diabetes, hipertensión y obesidad, parece estar muy implicada en el desarrollo de accidente cerebrovascular ^{116 128}.

A través de la utilización de dos técnicas útiles para detectar degeneración neuronal (Fluor Jade-B y tinción Amino cupro argéntica) se observó preliminarmente que el aumento de citocinas tipo I sistémicas provocaría de forma

leve y dispersa muerte de neuronas por apoptosis. El mecanismo que induce la apoptosis de estas neuronas debería ser investigado con mayor profundidad. Una posibilidad podría ser una muerte directa a causa de las citocinas producidas en SNC, un producto de la activación de las CM o de los astrocitos o a causa de los leucocitos que fueron reclutados hacia el SNC. Respecto a estos mecanismos, datos en la bibliografía afirman que CM y / o macrófagos polarizados de forma similar a M1 ejercen efectos citotóxicos sobre las neuronas y oligodendrocitos *in vitro*, mientras que las células polarizadas de modo similar a M2 exhiben capacidad fagocítica y promueven el crecimiento de neuritas^{129 50}. Por otro lado, un número creciente de estudios han demostrado la importancia de los monocitos / macrófagos periféricos y linfocitos T CD4+ en la progresión de la neuroinflamación y su potencial terapéutico para los trastornos neurodegenerativos¹³⁰.

RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA *IN VIVO* EN AUSENCIA DE IL-4

Como se mencionó anteriormente, IL-4 es una citocina tipo II que participa en la modulación de la respuesta inflamatoria, a través de la inducción de la producción de citocinas anti-inflamatorias y la inhibición de las pro-inflamatorias. También, IL-4 participaría en la modulación de la respuesta neuroinflamatoria, por ejemplo, en un modelo experimental de accidente cerebro vascular se ha visto a través de la inducción de un infarto cerebral focalizado y transitorio que la ausencia de IL-4 empeora el daño cerebral y el pronóstico neurológico¹³¹. Además, hallazgos aún no publicados de nuestro grupo, concuerdan con que IL-4 podría modular la respuesta neuroinflamatoria inducida por la administración i.p de LPS. Teniendo en cuenta estos datos, estudiamos si la ausencia de IL-4 intensificaba la respuesta neuroinflamatoria inducida luego de la inyección hidrodinámica con los plásmidos que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 y en este caso, no observamos variaciones en la respuesta neuroinflamatoria en ausencia de la citocina. Esto posiblemente pueda deberse a que los niveles séricos y de expresión génica en cerebro de las citocinas pro- inflamatorias difieren en los modelos experimentales y por lo tanto, IL-4 no tenga la misma capacidad moduladora. Por ejemplo, a diferencia de los niveles dosados en el modelo experimental de inyección hidrodinámica de ADNc de IL-12 e IL-18, tanto LPS como el modelo experimental de accidente cerebro vascular presentan aumento de los niveles de IL-1 β ¹³².

Además se demuestra en cultivos primarios gliales de rata estimulados con LPS, como el aumento en los niveles de IL-1 β inducido por la endotoxina, pueden ser modulados por IL-4. Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, se observó que IL-4 no logra modificar los niveles de ARNm de CMH II en estos cultivos ¹³³.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA EN RATONES DEFICIENTES EN TNF α o IFN γ

Dado a que las citocinas tipo I, TNF α e IFN γ , presentaban niveles elevados en los distintos días post inyección hidrodinámica, en este trabajo se consideró relevante evaluar el impacto de la ausencia sistémica de cada citocina sobre la respuesta neuroinflamatoria. Para ello, se utilizaron ratones deficientes en el receptor 1 de TNF α (TNF α R KO) y ratones deficientes en IFN γ (IFN γ KO)

La inducción de esplenomegalia fue utilizada a lo largo de este trabajo como un control de éxito de inserción de los plásmidos que codifican para IL-12 e IL-18. Wohleb y col y Qitang Li y col también observaron esplenomegalia luego de la inducción de inflamación sistémica con LPS y con un modelo que asemeja al Lupus respectivamente ^{134 135}.

De manera sorprendente, a diferencia de lo ocurrido en ratones WT y TNF α R KO, observamos que los ratones IFN γ KO inyectados con IL-12 + IL-18 no presentaron esplenomegalia. Las muestras de sangre en el ratón IFN γ KO revelaron aumentos similares de IL-12 a los dosados en el ratón WT, corroborando que la transfección había sido exitosa. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren, que la citocina pro-inflamatoria IFN γ interviene en el desarrollo de esplenomegalia. A su vez, resulta sumamente interesante que numerosos reportes han vinculado estrechamente la producción crónica de IFN γ y el desarrollo de anemia. IFN γ es capaz de inhibir la eritropoyesis, por lo que el número de glóbulos rojos disminuye. Durante el desarrollo de anemia la médula ósea fracasa, ya que no logra compensar la pérdida y ante esta situación, ocurre hematopoyesis maligna extramedular, en órganos como hígado y bazo ^{136 137}. El desarrollo de anemia a causa de la producción aumentada de IFN γ podría ser una posible explicación a la esplenomegalia observada en este modelo experimental en el ratón WT, por lo que sería conveniente evaluar los niveles de hemoglobina en estos animales.

Por otra parte, nuestros resultados indican que la ausencia del receptor 1 de TNF α no parece intervenir en el desarrollo de la respuesta neuroinflamatoria generada por las citocinas sistémicas. Sin embargo, no podemos afirmar con seguridad que TNF α no interviene en el reclutamiento. Para ello, deberían realizarse experimentos utilizando ratones deficientes en la citocina o en ambos receptores o bien bloqueando a TNF α a través de la inyección de un Ac anti-TNF α .

Cuando analizamos la respuesta neuroinflamatoria en el ratón IFN γ KO observamos que la población de CM no presenta diferencias respecto a su número absoluto comparado con el ratón WT tratado 12 + 18, sin embargo, esta población falla en presentar un aumento en la expresión del CMH II, asociado con su activación. En concordancia con reportes bibliográficos, nuestros resultados sugieren que IFN γ aumenta la expresión de moléculas del CMH II en CM ^{138 139}.

Además, los ratones IFN γ KO presentaron un menor reclutamiento de linfocitos y monocitos al SNC y una menor frecuencia de expresión de CMH II en estas células en respuesta a un estímulo pro-inflamatorio sistémico. Durante la infección con *Toxoplasma gondii*, IFN- γ también tiene un papel crucial en el reclutamiento de células T en el cerebro después de la infección mediante la inducción de la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en las células endoteliales cerebrovasculares, y quimiocinas, tales como CXCL9, CXCL10 y CCL5 ¹⁴⁰. Resultados similares son observados durante la infección con *Listeria monocytogenes*; aquí el reclutamiento de monocitos al cerebro es independiente de la invasión bacteriana al SNC y se activa por citocinas pro-inflamatorias, en particular IFN γ , producidos por la respuesta inmune innata a la infección intracelular en la periferia ¹⁴¹. Por lo tanto, en concordancia con reportes bibliográficos, nuestros resultados demuestran que IFN γ sería importante de manera directa o indirecta para mediar el reclutamiento leucocitario al SNC.

Los resultados expuestos en esta tesis, integrados junto a datos anteriores de nuestro laboratorio nos permiten aportar nuevos elementos que enfatizan la importancia de estudiar las interacciones entre el sistema inmune periférico y el SNC, ya que definitivamente existe una interrelación funcional entre ellos.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conclusión, a lo largo de este trabajo de tesis, utilizando estrategias experimentales *in vitro* e *in vivo*, investigamos como las citocinas tipo I influyen sobre la respuesta neuroinflamatoria. Presentamos a través de un modelo experimental aséptico, basado en la inyección hidrodinámica de vectores de expresión que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18, como las citocinas inflamatorias sistémicas se comunican con el SNC. Nuestros hallazgos permitieron demostrar que este tratamiento induce niveles sistémicos y persistentes de citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IFN γ y esplenomegalia dependiente IFN γ . En cerebro, se identifica un aumento en la expresión génica de TNF α e IFN γ , activación de las células microgliales residentes en el tejido, reclutamiento de leucocitos hacia el cerebro y escasa apoptosis de neuronas. Las CM revelaron mayores niveles de moléculas de activación inmune en la superficie celular y se indujeron alteraciones morfológicas, tales como aumento del tamaño del soma celular y el acortamiento y engrosamiento de sus ramificaciones. Los leucocitos reclutados fueron principalmente linfocitos T y monocitos, que se hallaron mayoritariamente en plexos coroideos y en menor medida en espacio subaracnoideo, parénquima cercano a ventrículos y a nivel perivascular. A su vez, nuestros datos demuestran que la citocina IFN γ sería importante en la respuesta neuroinflamatoria ya que su ausencia afecta el reclutamiento leucocitario al SNC y la activación de las CM residentes. Además, resultados *in vitro*, demuestran que al activarse con IFN γ , las CM presentan un tipo de activación similar a M1, aumentando la secreción de citocinas pro-inflamatorias y disminuyendo la producción de factores neurotróficos como IGF-1.

A la luz de estos resultados, nuestros datos enfatizan la importancia de estudiar las interacciones entre el sistema inmune periférico y el SNC y apoyan la noción de que existe una interrelación funcional entre ellos. Además, el concepto de que el sistema inmune está implicado tanto en la mediación de daños, así como en la regeneración y reparación en los trastornos neurodegenerativos, podría aportar en un futuro al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos a partir de la modulación del sistema inmune.

Por otro lado, reforzamos el concepto de que las inflamaciones sistémicas también podrían pre-activar a las CM. La presencia de CM activadas e inflamación cerebral a causa de una inflamación sistémica, posiblemente no conduzcan a

alteraciones neuroinflamatorias irreversibles, pero tal vez, podrían contribuir junto con predisposiciones genéticas al desarrollo de patologías cerebrales.

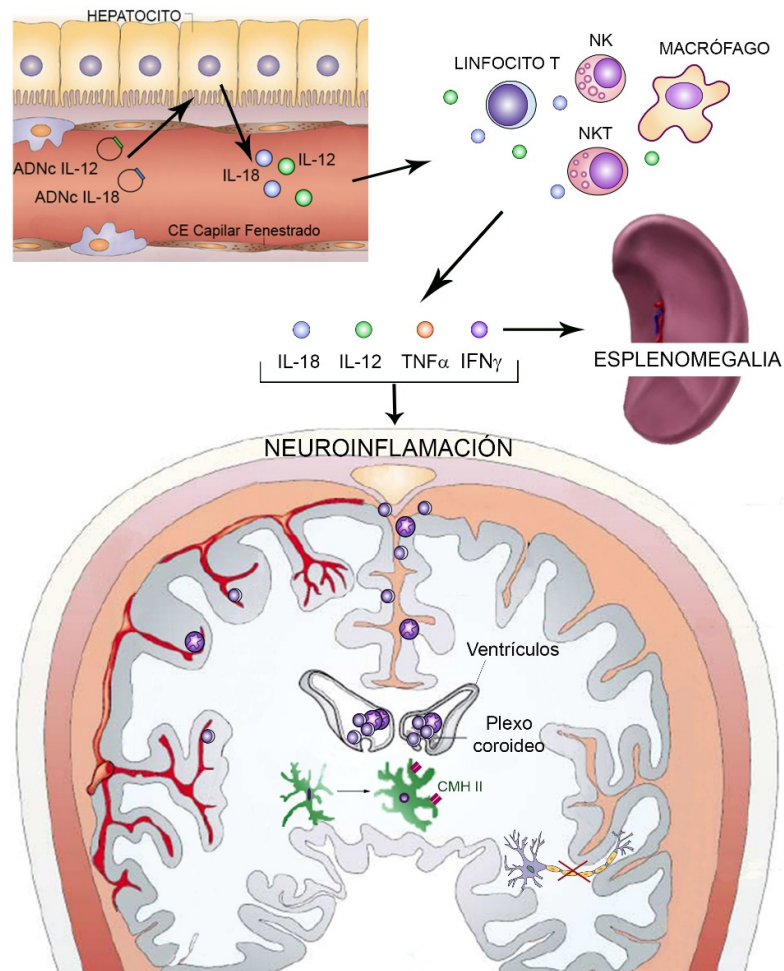


Figura 31. Regulación de la respuesta neuroinflamatoria por citocinas tipo I.

El modelo experimental de inflamación sistémica, libre de endotoxina, basado en la inyección hidrodinámica de vectores de expresión que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 induce niveles sistémicos y persistentes de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-18, TNF α e IFN γ . La inflamación sistémica induce esplenomegalia dependiente IFN γ y efectos inflamatorios en el tejido cerebral, como el aumento en la expresión génica de citocinas pro-inflamatorias en cerebro, activación de las CM residentes del tejido, reclutamiento de leucocitos hacia el cerebro y escasa apoptosis neuronal. Las CM revelaron cambios celulares y moleculares típicos de activación microglial. Se detectaron mayores niveles de moléculas de activación inmune en la superficie celular y se indujeron alteraciones morfológicas. Los leucocitos reclutados fueron principalmente linfocitos T y monocitos, que se hallaron mayoritariamente en plexos coroideos y en menor medida en espacio subaracnoideo, parénquima cercano a ventrículos y a nivel perivascular. Por último, la citocina IFN γ sería importante en la respuesta neuroinflamatoria ya que su ausencia afecta el reclutamiento leucocitario al SNC y la activación de las CM residentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR

Línea celular murina de microglía

La línea celular de microglía de ratón BV2 fue provista gentilmente por el Dr. Dennis J. Selkoe (Harvard Medical School, Center for Neurologic Diseases, Brigham & Women's Hospital, Boston, MA, EEUU). La gestión que posibilitó la obtención de las mismas fue por medio del Dr. Ji Ming Wang (NIH, EEUU).

Medios de Cultivos

Las células BV2 se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) suplementado con SFB 10% (PAA, GE Healthcare Life Sciences, Fairfield, CT, EEUU) inactivado por calor, L-glutamina 2 mM penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml (GIBCO) y sodio piruvato 1mM (GIBCO) hasta un 90% de confluencia (en estufa a 37°C y a una atmósfera de 5% CO₂). Habitualmente fueron tripsinizadas con Tripsin-EDTA 0.25% (GIBCO) para su posterior utilización.

Durante los ensayos de estimulación, las células BV2 fueron cultivadas en DMEM suplementado con SFB 5%.

Reactivos utilizados en cultivos celulares

Los estímulos utilizados en cultivo celular se detallan a continuación. LPS de *Escherichia coli* serotipo 055:B5 y Fractalquina (CX3CL1) fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). En cambio, los recombinante de ratón IL-4, IL-13, TNF α e IFN γ fueron adquiridos en PeproTech (Rocky Hill, NJ, EEUU).

RATONES

Para los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron ratones hembras de la cepa C57BL/6 de 10 a 12 semanas de edad provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (Buenos Aires, Argentina) o de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron en algunos experimentos ratones modificados genéticamente. Los animales IL-4 KO y TNF α R1 KO fueron provistos gentilmente por la Dra. Silvia Di Genaro (Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas, IMIBIO-SL, CONICET. Universidad Nacional de San Luis). Los ratones IFN γ KO y TLR4 KO fueron obtenidos de Laboratorios Jackson (Sacramento, California, EEUU).

Los animales fueron mantenidos en el Bioterio del CIBICI-CONICET (Centro de investigación en bioquímica clínica e inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) de acuerdo con los requisitos del comité ético para animales de experimentación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resolución del Honorable Consejo Directivo 480/05). El cuidado de los animales fue llevado a cabo según los procedimientos descriptos en la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (NIH-National Institutes of Health – EEUU. Publicación N ° 86-23, 1985).

Los protocolos experimentales, también fueron aprobados por el Comité Institucional de uso y cuidado animal (IACUC). El NIH aprobó la seguridad del bienestar de los animales mantenidos en el bioterio del CIBICI-CONICET (número de certificación A5802-01, OLAW, NIH, EE.UU).

MODELOS DE INDUCCIÓN DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA

Administración de LPS

Se indujo inflamación sistémica en ratones adultos utilizando un protocolo adaptado de un reporte previo de Cardona y col ⁴. Brevemente, ratones C57BL/6 adultos de 8 a 12 semanas, machos o hembras, fueron inyectados diariamente intra-peritonealmente (i.p.) con 40 μ g de LPS de *Escherichia coli* serotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich) en 200 μ l de PBS durante 4 días. Como control, los ratones fueron

inyectados con 200 μ l de PBS estéril. Luego de 4 horas de la última inyección, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el cerebro para su análisis.

Administración de ADNc por inyección hidrodinámica

En este caso, la inflamación sistémica se indujo utilizando un protocolo de transfección génica transitoria por inyección hidrodinámica endovenosa de vectores de expresión (ADNc desnudo) que codifican para las citocinas IL-12 e IL-18 reportado previamente por Rodríguez-Galán y col ⁸².

Brevemente, hembras C57BL/6 de 10 a 12 semanas fueron inyectadas en la vena de la cola, en menos de 8 segundos con los plásmidos correspondientes disueltos en 1,6 ml de una solución estéril de cloruro de sodio al 0,9% (SF). Los animales fueron divididos en dos grupos, control y 12 + 18. Los ratones del grupo control fueron inyectados con una solución que contiene 11 μ g de vector ORF vacío. Los animales que forman el grupo 12 + 18 fueron inyectados con 1 μ g de plásmido que contiene el gen que codifica para la citocina IL-12 (este plásmido es una fusión de las secuencias que codifican para la subunidad p40 y p35, permitiendo la producción de IL-12 con actividad biológica, conocida como subunidad IL-12 p70) más 10 μ g de ADNc desnudo de IL-18 (pDEF pro-IL-18). Los plásmidos utilizan la expresión del promotor de elongación humano 1 para conducir la transcripción. Los efectos observados *in vivo* tras la inducción de las citocinas fueron debidos puramente a la expresión de los ADNc de interleucinas y no por contaminación con LPS.

Purificación de plásmidos libres de endotoxina

Las bacterias transformadas con los plásmidos con las secuencias incorporadas fueron cedidas gentilmente por la Dra. Cecilia Rodríguez-Galán, las mismas fueron expandidas en medio Luria Bertani (LB) con antibiótico ampicilina.

Para purificar el ADNc se utilizó el kit comercial Endofree Plasmid Maxi Kit (Quiagen, Limburgo, Países Bajos) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tal como indica su nombre, este kit permite obtener plásmidos libres de endotoxina permitiendo que el efecto observado *in vivo* sea a causa de la secuencia incorporada y no por una posible contaminación con LPS. El procedimiento de purificación fue monitoreado por alícuotas tomadas de lavados y fracciones de

elución. El ácido nucleico fue precipitado con isopropanol y la calidad del producto obtenido fue chequeada mediante electroforesis en gel de agarosa. Los geles se fotografiaron. Por último, la concentración de ADNc fue medida por espectrofotometría en Bio-tek Synergy™HT Multi-Detection (BioTek Instruments, EEUU).

ESTUDIO DEL PORCENTAJE DE PESO PERDIDO Y ESPLENOMEGALIA

Luego de la inyección hidrodinámica, los ratones C57BL/6 de ambos grupos fueron pesados en los distintos días post-tratamiento. El cálculo del porcentaje de peso perdido se realiza considerando la variación en el peso del ratón respecto al peso del día inicial el porcentaje se calcula considerando como 100% al peso inicial del ratón.

Para la evaluación de esplenomegalia, luego de 7 días post-tratamiento, el bazo de cada ratón se extrajo, se pesó y se fotografió. Para el cálculo del aumento relativo, el peso del bazo en mg fue dividido por el peso del ratón al día 7 en g, posteriormente se calcula las veces de aumento de peso en relación al promedio de los controles.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS TOTALES DE CEREBRO

Luego de la inducción de inflamación sistémica, los ratones (4 por grupo) fueron anestesiados con ketamina/ xilacina y perfundidos intracardíacamente con 60 ml de PBS frío. El cerebro se extrajo y disgregó mecánicamente con tijeras. El homogenato fue digerido enzimáticamente en PBS conteniendo 0.3% de colagenasa D (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y DNasa e incubado durante 30 minutos a 37°C. Luego de detener la digestión enzimática agregando EDTA, el homogenato fue filtrado en filtros celulares BD de 70 µm. Posteriormente, se centrifugó (4 °C, 8 min a 1800 rpm), se lavó y resuspendió en 6 ml de Percoll isotónico 37% (GE Healthcare Life Sciences). La suspensión celular se centrifugó nuevamente (18°C, 25 min a 800g). Luego, la capa superior formada, correspondiente a mielina e impurezas, fue descartada. El pellet celular obtenido se lavó 2 veces con DMEM y se resuspendió en buffer FACS (SFB 2%, Azida sódica 0,1%, EDTA en PBS). Finalmente las células totales se contaron en cámara celular de Neubauer.

TÉCNICAS GENERALES

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrica cuyo fundamento se basa en el paso de una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas por delante de un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que son recogidas por detectores, convertidos en señales electrónicas y posteriormente digitalizadas. Permitiendo la medida simultánea de parámetros físicos y químicos en una misma célula. Los parámetros físicos se relacionan con características intrínsecas de la célula, como tamaño y la complejidad citoplasmática que representa la cantidad de gránulos presentes en el citoplasma. En cambio, los parámetros químicos se relacionan con características antigénicas de cada célula (Inmunofenotipo).

En este trabajo, las células totales de cerebro fueron marcadas contra antígenos de superficie característicos con el fin de identificar a las CM y a las distintas poblaciones de leucocitos reclutados al SNC.

Brevemente, entre 0.4 y 0.8×10^6 células aisladas de cerebro fueron resuspendidas en buffer FACS, se incubaron durante 30 minutos a 4° C con Ac dirigidos contra distintas moléculas de superficie (ver detalle en tabla) ya sean conjugados a fluorocromos, sin conjugar o biotinilados. Posteriormente fueron lavadas y resuspendidas en buffer FACS. En aquellos casos en que se utilizó Ac primarios sin conjugar o Ac biotinilados, se realizó una segunda etapa de incubación de 30 minutos a 4° C con un Ac secundario unido a un fluorocromo o Estreptavidina-fluorocromo, respectivamente. Finalmente, las células fueron resuspendidas en buffer FACS y adquiridas en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson, EEUU). En todos los ensayos, se adquirieron al menos 100000 eventos y los datos fueron analizados mediante el software FCS Express (De Novo Software, EEUU) Las CM fueron identificadas por la expresión CD11b+ y CD45low, mientras que los leucocitos periféricos, fueron identificados por la expresión CD45high⁸⁸.

Anticuerpo	Marca	Especificidad	Nº Cat. y empresa	Isotipo
CD3	PE-Cy5	Ratón	555276 (BD)	Rata IgG2b, k
CD4	FITC	Ratón	553055 (BD)	Rata IgG2b, k
CD8a	PE	Ratón	553033 (BD)	Rata IgG2a, k
CD11b	Biotina	Ratón	553309 (BD)	
	Alexa 488	Ratón/H	557672 (BD)	Rata (DA)IgG2b, k
	FITC	Ratón	557396 (BD)	Rata IgG2b, k
	FITC	Ratón/H	553310 (BD)	Rata (DA)IgG2b, k
	APC	Ratón	101211 (Biolegend)	Rata IgG2b, k
CD11c	APC	Ratón	550261 (BD)	Ar Hamster IgG1, λ2
	PE	Ratón	553802 (BD)	Ar Hamster IgG1, λ2
CD19	PE Cy7	Ratón	552854(BD)	Rata IgG2a, k
CD45	APC Cy7	Ratón	103115 (Biolegend)	Rata IgG2b, k
	FITC	Ratón	553080 (BD)	Rata (lou) IgG2b, k
	PE	Ratón	553081 (BD)	Rata (lou) IgG2b, k
	PerCP	Ratón	557235 (BD)	Rata (lou) IgG2b, k
GR-1	PerCP-Cy5	Ratón	552093 (BD)	Rata IgG2b, k
IA/IE (CMH II)	Alexa 647	Ratón	107617 (Biolegend)	Rata IgG2b, k
	Biotin	Ratón	553622 (BD)	Rata (DA) IgG2a, k
	FITC	Ratón	553623 (BD)	Rata IgG2a, k
	PE	Ratón	557000 (BD)	Rata IgG2b, k
Ly6C	Biotina	Ratón	557359 (BD)	Rata IgM, k
	FITC	Ratón	553104 (BD)	Rata IgM, k
	PE Cy7	Ratón	560593 (BD)	Rata IgM, k
Ly6G	PE	Ratón	551461 (BD)	Rata IgG2a, k
Control de Isotipo	Alexa 488	Ratón	557726 (BD)	Rata (lou)IgG2b, k
	APC	Ratón	553932 (BD)	Rata IgG2a, k
	APC Cy7	Ratón	552773 (BD)	Rata (lou)IgG2b, k
	FITC	Ratón	553988 (BD)	Rata IgG2b, k
	PE	Ratón	556925 (BD)	Rata IgG2b, k
	PE	Ratón	12-4321-81 (ebioscience)	Rata IgG2a
	PE-Cy5	Ratón	553990 (BD)	Rata IgG2b, k
	PE-Cy7	Ratón	552868 (BD)	Ratón BALB/c IgG ^{2a} , κ
	PerCP-Cy5	Ratón	550764 (BD)	Rata IgG2b, k
	PerCP	Ratón	552991 (BD)	Rata IgG2b, k
Streptavidina	APC		554067 (BD)	
	PerCP		554064(BD)	

Tabla 1. Ac utilizados para el análisis de citometría de flujo

APC: Alofococianina; APC Cy7: Alofococianina-cianina 7; FITC: Isotiocianato de fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PE-Cy5: Ficoeritrina-cianina 5; PE-Cy7: Ficoeritrina-cianina 7; PerCP: Proteína peridina clorofila; PerCP-Cy5: Proteína peridina clorofila-cianina 5.

ELISA

Obtención de muestras de plasma para la medición de citocinas

Para determinar los niveles plasmáticos de citocinas, se extrajeron aproximadamente 0,2 ml de sangre en tubos cónicos con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Wiener Lab, Argentina) en los distintos días post inyección. Las muestras fueron centrifugadas (4 °C, 10 min a 2000 rpm) y el plasma fue separado en tubos cónicos de 0,5 ml y almacenado a -80 °C hasta su análisis por ELISA.

ELISA

Para la detección de citocinas como TNF α , IL-12 (BioLegend, San Diego, CA, EEUU), IFN γ , IL-10 (BD) y factores neurotróficos como IGF-1 (PeproTech), en muestras de plasma o sobrenadantes de cultivo, se utilizaron kits de ELISA comerciales de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se sensibilizaron placas de 96 reservorios con el Ac de captura específico para cada citocina (TNF α , IFN γ , IL-12 o IL-10) diluido en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9,6, fosfato pH 7,2 o PBS) y se incubaron hasta el día siguiente.

En todos los casos, luego de lavar 3 veces con buffer de lavado (PBS-0,05% Tween-20), las placas fueron incubadas con buffer de bloqueo (PBS-10% SFB) durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Luego, las muestras convenientemente diluidas y la curva estándar, fueron incubadas por duplicado, como mínimo 2 hs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después de la incubación, los reservorios se lavaron 4 veces y se agregó el Ac secundario biotinilado que se incubó 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó el exceso de Ac y se incubó con estreptavidina-HRP durante 30 minutos. Finalmente, se realizaron 7 lavados y la reacción se reveló agregando H₂O₂ y sustrato 3,3',5,5'-tetramethylbenzidina (TMB) (BD OptEIA™, EEUU) La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el lector de placas Microplate Reader 450 (BioRad, EEUU).

En el caso particular de IGF-1 la reacción fue revelada con solución sustrato líquida ABTS (Sigma-Aldrich) y se monitoreó el desarrollo de color, midiéndose a una densidad óptica de 405nm cada 5 minutos durante 30 minutos en el lector de placas Bio-tek Synergy™ HT Multi-Detection (BioTek Instruments, EEUU).

La concentración de cada citocina fue determinada utilizando como referencia curvas de trabajo realizadas con estándares de origen murino específicos para cada una.

Microscopía

Microscopía de contraste de fase

Los cambios morfológicos de la línea celular BV2 luego de las estimulaciones con IL-4 o INF γ , fueron observados directamente en un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse TE 2000-U Germany) a un aumento de 40 veces y las fotos fueron obtenidas utilizando una cámara digital Nikon (ACT-2U Nikon, Japón).

Estudios Histológicos

Preparación del tejido para tinciones histológicas

Luego de la inducción de la inflamación sistémica, los ratones fueron anestesiados i.p. con una solución de Ketamina/xilacina en PBS y sacrificados por exanguinación y perfusión intracardiaca con 30 ml de PBS frio más 30 ml de Paraformaldehído 4% (Sigma-Aldrich, EEUU) a fin de fijar el tejido *in situ*. Los cerebros fueron extraídos y sumergidos en paraformaldehído al 4% a 4 °C, hasta el día siguiente, para un proceso adicional de fijación. Luego fueron sumergidos en una solución de sucrosa al 30% a 4°C (Sigma-Aldrich) y mantenidos hasta su procesamiento. Los cortes de cerebro fueron realizados en el criostato Shandon Cryotomo E (Thermo fisher scientific). Para realizar los cortes se utilizó OCT (Sakura, Holanda) y éstos se montaron en portaobjetos silanizados (StarFrost®, Alemania), los cuales se secaron a temperatura ambiente por 1 h y luego se almacenaron a -20°C.

Inmunofluorescencia

Crio secciones de 10µm de cerebro se equilibraron a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon con Buffer de bloqueo (10% albúmina sérica bovina (Sigma- Aldrich), 0.3% Tritón en TBS) por 1 h en cámara húmeda. Los cortes fueron incubados con los Acs primarios correspondientes (ver tabla 3) toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente, fueron incubadas con los Acs secundarios marcados con fluorocromo por 1 h a 4°C. Luego de la tinción, los preparados se lavaron y los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Por último, los vidrios fueron montados en FluorSave™ (Calbiochem®-Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Las imágenes de los distintos estudios histológicos realizados se capturaron usando un microscopio confocal laser-scanning (Olympus FV300, Tokyo, Japan). Los análisis y cuantificaciones se efectuaron utilizando el programa ImageJ (NIH, USA).

Anticuerpo	Marca	Especificidad	Nº Cat. y empresa	Isotipo
CD45	s/m	Ratón	103119 (BioLegend)	Rata IgG2b, k
PECAM-1	s/m	Ratón	sc-1506 (Santa Cruz)	Conejo IgG
Anti-Ig total Rata	Alexa 546	Rata	A-11081 (Invitrogen)	Cabra IgG
Anti-Ig total Rata	Alexa 488	Rata	A-11006 (Invitrogen)	Cabra IgG
Anti-Ig total Conejo	Alexa 546	Conejo	A-11071 (Invitrogen)	Cabra IgG
Anti-Ig total Conejo	Alexa 488	Conejo	A-11070 (Invitrogen)	Cabra IgG

Tabla 2. Ac para el análisis por Inmunofluorescencia.

Hematoxilina-Eosina (H-E)

Las tinciones histológicas de H-E fueron realizadas por la Dra. Soledad de Olmos, del Servicio de Neuroanatomía e Histología Experimental del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra como Servicio Tecnológico de Alto Nivel (STAN).

Cortes en parafina de 10 μm se sumergieron en un baño de hematoxilina durante 5 minutos, posteriormente los cortes fueron lavados con agua durante 5 minutos. Luego, los vidrios se sumergieron en eosina y se lavaron 3 veces rápidamente en alcohol isopropílico al 95%. Por último, fueron lavados en una solución de xilol y alcohol y 2 veces en xilol (baño de aclaramiento). Para montar los vidrios, se utilizó una gota de bálsamo de Canadá. Los cortes de cerebro teñidos con H-E fueron observados en un microscopio (Nikon Eclipse TE 2000-U Germany) y las fotos fueron obtenidas utilizando una cámara digital Nikon (ACT-2U Nikon, Japón).

Detección de degeneración neuronal

Las tinciones neurohistológicas para detectar neurodegeneración (Fluor Jade B y Amino Cupro Argéntica) fueron realizadas por la Dra. Soledad de Olmos, del Servicio de Neuroanatomía e Histología Experimental del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra como Servicio Tecnológico de Alto Nivel (STAN). Los resultados obtenidos son preliminares.

Fluoro-Jade B (FJ-B)

El FJ-B es una técnica altamente sensible para la tinción de somas degenerados, pero tiene una menor resolución para dendritas y axones^{90 91}. Para la tinción con FJ-B, criosecciones de cerebro de 20 μm montadas sobre un portaobjetos fueron sumergidas en una solución de 0,06% de permanganato de potasio durante 10 min y luego se enjuagaron en agua destilada durante 2 min. La solución de tinción de FJ-B, se prepara a partir de una solución madre 0,01% de FJ-B (Chemicon) preparada según las instrucciones del fabricante. La solución madre se diluyó por la adición de ácido acético 0,1%, resultando en una concentración de colorante final de 0,0004%. La solución de tinción de trabajo se preparó el día de uso y se agregó DAPI para teñir los núcleos celulares. Los vidrios fueron incubados durante 20 minutos y luego enjuagados 3 veces con agua destilada. Posteriormente, los portaobjetos se dejaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que estuvieron totalmente secos. Los vidrios fueron aclarados por inmersión en xilol durante 2 min antes de ser montados con DPX (Sigma- Aldrich).

El análisis de imágenes y la evaluación cualitativa de células FJ-B positivas fue visualizado en un microscopio de fluorescencia (Olympus FV1000, Tokyo, Japan).

Impregnación Amino-Cúprico-Argéntica (A-Cu-Ag)

El A-Cu-Ag es una versión más reciente del método Cúprico-Argéntico ⁹² es adecuada y altamente sensible para la tinción en degeneración de somas, dendritas, axones, y sus ramificaciones terminales en el tejido cerebral sometidos a diferentes condiciones experimentales y neuropatológicos. Brevemente, las secciones se enjuagaron en agua destilada y se incubaron en una solución de nitrato de plata a 50° C. Después de que recuperaron temperatura ambiente, los vidrios se aclararon con acetona y se incubaron en una solución de impregnación de plata diamina concentrada durante 40 min. Las secciones se sumergieron en una solución de formaldehído / ácido cítrico reductor por 25 min y luego la reacción fue detenida al poner los cortes en ácido acético al 0,5%. Se realizó un aclaramiento de los cerebros en dos pasos con el fin de eliminar los depósitos no específicos de plata en el tejido, primero se sumergieron en ferricianuro de potasio al 6%, se lavaron en agua destilada, y luego se incubaron con permanganato de potasio al 0,06% durante 20 segundos. Después de lavar nuevamente, la impregnación se estabilizó en tiosulfato de sodio al 2%, se lavó, se sumergió en solución fijadora durante 1 minuto y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que estuvieron completamente secos. Los vidrios secos se aclaran por inmersión en xilol durante 10 minutos antes de montar.

El análisis de imágenes y la evaluación cualitativa de células positivas se visualizó en un microscopio (Nikon Eclipse TE 2000-U Germany) y las fotos fueron obtenidas utilizando una cámara digital Nikon (ACT-2U Nikon, Japón).

PCR en tiempo real

Preparación del tejido para PCR en tiempo real

Luego de la inducción de inflamación sistémica, los ratones (4 por grupo) fueron anestesiados con ketamina/ xilacina y sacrificados, previa perfusión intracardiaca con 60 ml de PBS frío. El cerebro fue extraído mediante cirugía y

disgregado mecánicamente con tijeras. El homogenato fue resuspendido en 4 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB.

Aislamiento de ARN total

El ARN total se extrajo a partir de 1.5 ml del homogenato total de cerebro o de cultivos de células BV2 utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo fisher scientific) en una proporción de 1 ml cada 1×10^6 células. Brevemente, las muestras tratadas con TRIzol se separaron utilizando 0,2 ml de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol. Posteriormente, el ARN presente en la fase acuosa se precipitó con 0,5 ml de alcohol isopropílico. Finalmente el ARN se lavó con etanol al 75% y se resuspendió en agua destilada libre de RNAsas y DNAsas Invitrogen (Thermo fisher scientific) La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría, midiéndose la absorbancia de la muestra a 260 nm (BioTek, EEUU). Las muestras se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

DNasa, obtención del ADNc (transcripción reversa) y PCR en tiempo real

Antes de realizar la transcripción reversa, se utilizó un kit de DNasa Invitrogen (Thermo fisher scientific) con el objetivo de eliminar la contaminación de ADN en la muestra de ARN. El protocolo de trabajo se siguió de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Para la síntesis de la cadena de ADN complementario (ADNc) se utilizó el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems (Thermo fisher scientific). Brevemente, se preparó en hielo una mezcla de reacción con 1 μg de ARN total (templado); 2 μl de Random Primers RT 10X, 2 μl de Buffer RT 10X, 0.8 μl de Mix dNTP 25X (100 mM), 1 μl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase y agua destilada libre de RNAsas y DNAsas Invitrogen hasta un volumen final de 20 μl . El ciclado térmico se llevó a cabo en un termociclador Biometra T personal (Biometra, Alemania).

La cuantificación relativa del ADNc se realizó mediante PCR en tiempo real. Las muestras se corrieron por triplicado y los niveles del gen de interés fueron normalizados utilizando HPRT-1 como control endógeno, las veces de diferencia se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ¹⁴². Brevemente, en los tubos de reacción se agregó SYBR® Green PCR Master Mix 2X Applied Biosystems (Thermo fisher

scientific), primers específicos para el gen endógeno o el gen de interés y ADNc de la muestra a analizar, en un volumen final de 15 μ l. La reacción de PCR se ejecutó en el equipo para PCR múltiple en tiempo real Step one plus Applied Biosystems (Thermo fisher scientific). Las secuencias de los primers utilizados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla.

Gen	Secuencia de Primers
CX3CR1	Sense: 5'-GGACTCACTACCTCATCAGCC
	Antisense: 5'-TCCGTTGTTTCATGGAGTTGG
CCR2	Sense: 5'-GTGTGATTGACAAGCACTTAGACC
	Antisense: 5'-GGAGAGATACCTTCGGAACCTCTC
HPRT-1	Sense: 5'-TCAGTCAACGGGGACATAAA
	Antisense: 5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
IFN γ	Sense: 5'-GGAGGAACTGGCAAAGGATG
	Antisense: 5'-GATGGCCTGATTGTCTTTCAAGA
IGF-1	Sence: 5'-TCATGTCGTCTTCACACCTCTTCT
	Antisense: 5'-CCACACACGAACTGAAGAGCAT
TNF α	Sense: 5'-AGCCGATGGGTTGTACCTTGCTA
	Antisense: 5'-TGAGATAGCAAATCGGCTGACGGT

Tabla 3. Secuencias de primers utilizados para PCR en tiempo real

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, EEUU) y se expresó como media \pm error estándar de la media (SEM). El test t de Student para datos no pareados fue utilizado para comparaciones entre dos grupos de datos. Las diferencias significativas entre más de dos grupos fueron calculadas utilizando la prueba estadística ANOVA de una vía con post-test de Bonferroni. En cambio, en los experimentos realizados en ratones WT y KO las diferencias fueron calculadas utilizando la prueba estadística ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni. Los valores de p menores 0,05 se consideraron estadísticamente significativos (95% de confianza). Los experimentos de este trabajo fueron realizados por triplicado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kang JW, Kim SJ, Cho HI, Lee SM. DAMPs activating innate immune responses in sepsis. *Ageing research reviews*. 2015.
2. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*. 2015; **16**(4): 343-53.
3. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003; **3**(2): 133-46.
4. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, et al. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*. 2006; **9**(7): 917-24.
5. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature reviews Immunology*. 2012; **12**(9): 623-35.
6. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; **523**(7560): 337-41.
7. Bordon Y. Neuroimmunology: A brain drain. *Nature reviews Immunology*. 2015; **15**(7): 404.
8. De Bock M, Vandenbroucke RE, Decrock E, Culot M, Cecchelli R, Leybaert L. A new angle on blood-CNS interfaces: a role for connexins? *FEBS letters*. 2014; **588**(8): 1259-70.
9. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*. 2013; **19**(12): 1584-96.
10. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews Immunology*. 2003; **3**(7): 569-81.
11. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends in immunology*. 2007; **28**(1): 5-11.
12. Ehrlich P. *Das Sauerstoff-Bedurfnis des Organismus*. 1885.
13. Lewandowski M. Zur Lehre von der cerebrospinalflüssigkeit. *Z Klein Forsch*. 1900; **40**: 14.
14. Goldmann E. Vitalfärbungen am Zentralnervensystem. Beitrag Zur pathologie des plexus choroideus und derhirnhäute. *Physikalisch- mathematische classe 1*. 1913: 64.
15. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience*. 2006; **7**(1): 41-53.

16. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of neurology*. 2012; **72**(5): 648-72.
17. Demeestere D, Libert C, Vandebroucke RE. Clinical implications of leukocyte infiltration at the choroid plexus in (neuro)inflammatory disorders. *Drug discovery today*. 2015; **20**(8): 928-41.
18. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*. 2012; **122**(4): 1164-71.
19. Galea I, Bechmann I, Perry VH. What is immune privilege (not)? *Trends in immunology*. 2007; **28**(1): 12-8.
20. Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*. 2010; **468**(7321): 253-62.
21. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature reviews Immunology*. 2013; **13**(3): 206-18.
22. Freeman MR. Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science*. 2010; **330**(6005): 774-8.
23. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*. 2007; **28**(3): 138-45.
24. Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*. 2010; **330**(6005): 779-82.
25. Del Río Hortega P. *Microglia Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. 1932.
26. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2014; **15**(5): 300-12.
27. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*. 2009; **27**: 119-45.
28. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nature reviews Immunology*. 2009; **9**(6): 429-39.
29. McKercher SR, Torbett BE, Anderson KL, Henkel GW, Vestal DJ, Baribault H, et al. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *The EMBO journal*. 1996; **15**(20): 5647-58.
30. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010; **330**(6005): 841-5.

31. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience*. 2007; **10**(12): 1538-43.
32. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature neuroscience*. 2011; **14**(9): 1142-9.
33. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience*. 2013; **16**(3): 273-80.
34. Graeber MB. Changing face of microglia. *Science*. 2010; **330**(6005): 783-8.
35. Ransohoff RM, Stevens B. Neuroscience. How many cell types does it take to wire a brain? *Science*. 2011; **333**(6048): 1391-2.
36. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*. 2014; **158**(1): 15-24.
37. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009; **9**(4): 259-70.
38. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*. 1996; **19**(8): 312-8.
39. Perry VH, Nicoll JA, Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology*. 2010; **6**(4): 193-201.
40. Chavarria A, Cardenas G. Neuronal influence behind the central nervous system regulation of the immune cells. *Frontiers in integrative neuroscience*. 2013; **7**: 64.
41. Lourbopoulos A, Erturk A, Hellal F. Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015; **9**: 54.
42. Neumann H. Control of glial immune function by neurons. *Glia*. 2001; **36**(2): 191-9.
43. Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*. 2010; **13**(4): 411-3.
44. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology*. 2000; **20**(11): 4106-14.
45. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology*. 2009; **27**: 451-83.

46. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*. 2004; **25**(12): 677-86.
47. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*. 2008; **8**(12): 958-69.
48. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology*. 2011; **11**(11): 723-37.
49. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology*. 2014; **10**(4): 217-24.
50. Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2012; **43**(11): 3063-70.
51. Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, et al. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nature reviews Neurology*. 2015; **11**(1): 56-64.
52. Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nature reviews Neuroscience*. 2008; **9**(6): 481-93.
53. Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010; **140**(6): 918-34.
54. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002; **40**(2): 140-55.
55. Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS letters*. 2011; **585**(23): 3798-805.
56. Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Seminars in immunopathology*. 2013; **35**(5): 601-12.
57. Teeling JL, Perry VH. Systemic infection and inflammation in acute CNS injury and chronic neurodegeneration: underlying mechanisms. *Neuroscience*. 2009; **158**(3): 1062-73.
58. Thomson CA, McColl A, Cavanagh J, Graham GJ. Peripheral inflammation is associated with remote global gene expression changes in the brain. *Journal of neuroinflammation*. 2014; **11**: 73.
59. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature reviews Immunology*. 2007; **7**(2): 161-7.

60. Hoogland IC, Houbolt C, van Westerlo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. *Journal of neuroinflammation*. 2015; **12**: 114.
61. Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, van der Valk P, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology*. 2014; **142**(2): 151-66.
62. Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. 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, behavior, and immunity*. 2009; **23**(3): 309-17.
63. Cunningham C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*. 2013; **61**(1): 71-90.
64. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 2009; **73**(10): 768-74.
65. Cui YH, Le Y, Gong W, Proost P, Van Damme J, Murphy WJ, et al. Bacterial lipopolysaccharide selectively up-regulates the function of the chemotactic peptide receptor formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells. *J Immunol*. 2002; **168**(1): 434-42.
66. Cui YH, Le Y, Zhang X, Gong W, Abe K, Sun R, et al. Up-regulation of FPR2, a chemotactic receptor for amyloid beta 1-42 (A beta 42), in murine microglial cells by TNF alpha. *Neurobiology of disease*. 2002; **10**(3): 366-77.
67. Iribarren P, Chen K, Hu J, Zhang X, Gong W, Wang JM. IL-4 inhibits the expression of mouse formyl peptide receptor 2, a receptor for amyloid beta1-42, in TNF-alpha-activated microglia. *J Immunol*. 2005; **175**(9): 6100-6.
68. Iribarren P, Cui YH, Le Y, Ying G, Zhang X, Gong W, et al. IL-4 down-regulates lipopolysaccharide-induced formyl peptide receptor 2 in murine microglial cells by inhibiting the activation of mitogen-activated protein kinases. *J Immunol*. 2003; **171**(10): 5482-8.
69. Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *Journal of neuroinflammation*. 2014; **11**: 132.
70. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Culliford D, Perry VH. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology*. 2011; **77**(3): 212-8.
71. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of neuroimmunology*. 1990; **27**(2-3): 229-37.

72. Fernandez AM, Torres-Aleman I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature reviews Neuroscience*. 2012; **13**(4): 225-39.
73. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nature reviews Cancer*. 2004; **4**(7): 540-50.
74. Gaviglio EA. Interleukin 4 deficiency enhances microglial cell activation and neuroinflammation. sent to publicate. 2015.
75. Al-Dosari MS, Knapp JE, Liu D. Hydrodynamic delivery. *Advances in genetics*. 2005; **54**: 65-82.
76. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene therapy*. 1999; **6**(7): 1258-66.
77. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Human gene therapy*. 1999; **10**(10): 1735-7.
78. Bonamassa B, Hai L, Liu D. Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. *Pharmaceutical research*. 2011; **28**(4): 694-701.
79. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, Noble M, Budker V, Lewis DL, et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2004; **10**(2): 386-98.
80. Suda T, Gao X, Stolz DB, Liu D. Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene therapy*. 2007; **14**(2): 129-37.
81. Zhang G, Ludtke JJ, Thioudellet C, Kleinpeter P, Antoniou M, Herweijer H, et al. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Human gene therapy*. 2004; **15**(8): 770-82.
82. Rodriguez-Galan MC, Reynolds D, Correa SG, Iribarren P, Watanabe M, Young HA. Coexpression of IL-18 strongly attenuates IL-12-induced systemic toxicity through a rapid induction of IL-10 without affecting its antitumor capacity. *J Immunol*. 2009; **183**(1): 740-8.
83. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Seminars in immunology*. 2013; **25**(6): 439-48.
84. Barrios B, Baez NS, Reynolds D, Iribarren P, Cejas H, Young HA, et al. Abrogation of TNFalpha production during cancer immunotherapy is crucial for suppressing side effects due to the systemic expression of IL-12. *PloS one*. 2014; **9**(2): e90116.

85. Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, Banks WA. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and immunity*. 2006; **20**(5): 449-55.
86. Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature neuroscience*. 2011; **14**(10): 1227-35.
87. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. 2011; **91**(2): 461-553.
88. Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol*. 1995; **154**(9): 4309-21.
89. Murray CL, Skelly DT, Cunningham C. Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1beta and IL-6. *Journal of neuroinflammation*. 2011; **8**: 50.
90. Schmued LC, Albertson C, Slikker W, Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain research*. 1997; **751**(1): 37-46.
91. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain research*. 2000; **874**(2): 123-30.
92. de Olmos JS, Beltramino CA, de Olmos de Lorenzo S. Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia, and physical trauma. *Neurotoxicology and teratology*. 1994; **16**(6): 545-61.
93. Bueno A, De Olmos S, Heimer L, De Olmos J. NMDA-antagonist MK-801-induced neuronal degeneration in Wistar rat brain detected by the Amino-Cupric-Silver method. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2003; **54**(4): 319-34.
94. Park KW, Lee DY, Joe EH, Kim SU, Jin BK. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *Journal of neuroscience research*. 2005; **81**(3): 397-402.
95. Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol*. 1998; **161**(7): 3299-306.
96. Falcone M, Rajan AJ, Bloom BR, Brosnan CF. A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice. *J Immunol*. 1998; **160**(10): 4822-30.

97. Abbas N, Bednar I, Mix E, Marie S, Paterson D, Ljungberg A, et al. Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *Journal of neuroimmunology*. 2002; **126**(1-2): 50-7.
98. Kitamura Y, Taniguchi T, Kimura H, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ. Interleukin-4-inhibited mRNA expression in mixed rat glial and in isolated microglial cultures. *Journal of neuroimmunology*. 2000; **106**(1-2): 95-104.
99. Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Journal of neuroimmunology*. 2001; **113**(1): 49-62.
100. Soria JA, Arroyo DS, Gaviglio EA, Rodriguez-Galan MC, Wang JM, Iribarren P. Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. *Neurobiology of disease*. 2011; **43**(3): 616-24.
101. Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *Journal of neuroinflammation*. 2006; **3**: 27.
102. Escartin C, Boyer F, Bemelmans AP, Hantraye P, Brouillet E. Insulin growth factor-1 protects against excitotoxicity in the rat striatum. *Neuroreport*. 2004; **15**(14): 2251-4.
103. Maher FO, Clarke RM, Kelly A, Nally RE, Lynch MA. Interaction between interferon gamma and insulin-like growth factor-1 in hippocampus impacts on the ability of rats to sustain long-term potentiation. *Journal of neurochemistry*. 2006; **96**(6): 1560-71.
104. Wynes MW, Riches DW. Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*. 2003; **171**(7): 3550-9.
105. Wynne AM, Henry CJ, Huang Y, Cleland A, Godbout JP. Protracted downregulation of CX3CR1 on microglia of aged mice after lipopolysaccharide challenge. *Brain, behavior, and immunity*. 2010; **24**(7): 1190-201.
106. Kremlev SG, Palmer C. Interleukin-10 inhibits endotoxin-induced pro-inflammatory cytokines in microglial cell cultures. *Journal of neuroimmunology*. 2005; **162**(1-2): 71-80.
107. Dantzer R, Kelley KW. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain, behavior, and immunity*. 2007; **21**(2): 153-60.
108. Cunningham C, Wilcockson DC, Campion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005; **25**(40): 9275-84.

109. Cunningham C, Champion S, Teeling J, Felton L, Perry VH. The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain, behavior, and immunity*. 2007; **21**(4): 490-502.
110. Krstic D, Madhusudan A, Doehner J, Vogel P, Notter T, Imhof C, et al. Systemic immune challenges trigger and drive Alzheimer-like neuropathology in mice. *Journal of neuroinflammation*. 2012; **9**: 151.
111. Bluthe RM, Laye S, Michaud B, Combe C, Dantzer R, Parnet P. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *The European journal of neuroscience*. 2000; **12**(12): 4447-56.
112. Bluthe RM, Michaud B, Poli V, Dantzer R. Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. *Physiology & behavior*. 2000; **70**(3-4): 367-73.
113. Blond D, Campbell SJ, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC. Differential induction of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha may account for specific patterns of leukocyte recruitment in the brain. *Brain research*. 2002; **958**(1): 89-99.
114. Terrando N, Rei Fidalgo A, Vizcaychipi M, Cibelli M, Ma D, Monaco C, et al. The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit Care*. 2010; **14**(3): R88.
115. Buckman LB, Hasty AH, Flaherty DK, Buckman CT, Thompson MM, Matlock BK, et al. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain, behavior, and immunity*. 2014; **35**: 33-42.
116. Drake C, Boutin H, Jones MS, Denes A, McColl BW, Selvarajah JR, et al. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. *Brain, behavior, and immunity*. 2011; **25**(6): 1113-22.
117. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2012; **122**(1): 153-62.
118. Yi CX, Al-Massadi O, Donelan E, Lehti M, Weber J, Ressler C, et al. Exercise protects against high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. *Physiology & behavior*. 2012; **106**(4): 485-90.
119. Lui VW, He Y, Falo L, Huang L. Systemic administration of naked DNA encoding interleukin 12 for the treatment of human papillomavirus DNA-positive tumor. *Human gene therapy*. 2002; **13**(2): 177-85.

120. Rodriguez-Galan MC, Bream JH, Farr A, Young HA. Synergistic effect of IL-2, IL-12, and IL-18 on thymocyte apoptosis and Th1/Th2 cytokine expression. *J Immunol.* 2005; **174**(5): 2796-804.
121. Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol.* 2001; **167**(8): 4574-84.
122. Skelly DT, Hennessy E, Dansereau MA, Cunningham C. A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. *PloS one.* 2013; **8**(7): e69123.
123. Henry CJ, Huang Y, Wynne A, Hanke M, Himler J, Bailey MT, et al. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *Journal of neuroinflammation.* 2008; **5**: 15.
124. Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1991; **88**(16): 7438-42.
125. Schwerk C, Rybarczyk K, Essmann F, Seibt A, Molleken ML, Zeni P, et al. TNFalpha induces choroid plexus epithelial cell barrier alterations by apoptotic and nonapoptotic mechanisms. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2010; **2010**: 307231.
126. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature immunology.* 2009; **10**(5): 514-23.
127. Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, et al. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biological psychiatry.* 2009; **65**(4): 304-12.
128. Maysami S, Haley MJ, Gorenkova N, Krishnan S, McColl BW, Lawrence CB. Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke. *Journal of neuroinflammation.* 2015; **12**: 140.
129. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2009; **29**(43): 13435-44.
130. Gonzalez H, Pacheco R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *Journal of neuroinflammation.* 2014; **11**: 201.

131. Xiong X, Barreto GE, Xu L, Ouyang YB, Xie X, Giffard RG. Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2011; **42**(7): 2026-32.
132. Denes A, Wilkinson F, Bigger B, Chu M, Rothwell NJ, Allan SM. Central and haematopoietic interleukin-1 both contribute to ischaemic brain injury in mice. *Disease models & mechanisms*. 2013; **6**(4): 1043-8.
133. Loane DJ, Deighan BF, Clarke RM, Griffin RJ, Lynch AM, Lynch MA. Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain. *Neurobiology of aging*. 2009; **30**(6): 920-31.
134. Wohleb ES, Fenn AM, Pacenta AM, Powell ND, Sheridan JF, Godbout JP. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; **37**(9): 1491-505.
135. Li Q, Lu Q, Lu H, Tian S. Systemic autoimmunity in TAM triple knockout mice causes inflammatory brain damage and cell death. *PloS one*. 2013; **8**(6): e64812.
136. de Bruin AM, Voermans C, Nolte MA. Impact of interferon-gamma on hematopoiesis. *Blood*. 2014; **124**(16): 2479-86.
137. Noyes HA, Alimohammadian MH, Agaba M, Brass A, Fuchs H, Gailus-Durner V, et al. Mechanisms controlling anaemia in *Trypanosoma congolense* infected mice. *PloS one*. 2009; **4**(4): e5170.
138. Loughlin AJ, Woodroffe MN, Cuzner ML. Modulation of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II and Fc receptor expression on isolated microglia by transforming growth factor-beta 1, interleukin-4, noradrenaline and glucocorticoids. *Immunology*. 1993; **79**(1): 125-30.
139. Tran EH, Prince EN, Owens T. IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines. *J Immunol*. 2000; **164**(5): 2759-68.
140. Suzuki Y, Sa Q, Gehman M, Ochiai E. Interferon-gamma- and perforin-mediated immune responses for resistance against *Toxoplasma gondii* in the brain. *Expert reviews in molecular medicine*. 2011; **13**: e31.
141. Drevets DA, Bronze MS. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008; **53**(2): 151-65.
142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001; **25**(4): 402-8.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones científicas en revista con arbitraje

1. **“Interleukin 4 deficiency enhances microglial cell activation and neuroinflammation”**

Gaviglio E A*; Soria J A*, Arroyo D S, Peralta Ramos J M, Bussi C, Wang JM; Rodríguez-Galán M C, Iribarren P.

Enviado a publicar.

2. **“Systemic coexpression of IL-12 and IL-18 induces microglial cell activation and leukocyte recruitment to the central nervous system”**

Gaviglio E A, Peralta Ramos J M; Arroyo D S, Bussi C; Rodríguez-Galán M C, Iribarren P.

Manuscrito en preparación.

3. **Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer.**

Arroyo D S, **Gaviglio E A**, Peralta Ramos J M, Bussi C, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P.

International Immunopharmacology 2013. (Review)

4. **“Toll-like receptor 2 ligands promote microglial cell death by inducing Autophagy”**

Arroyo D S, Soria J A, **Gaviglio E A**, García-Keller C, Cancela LM, Rodríguez-Galán M C, Wang JM, Iribarren P.

FASEB Journal. 2012.

5. **“Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism”**

Soria J A, Arroyo D S, **Gaviglio E A**, Rodríguez-Galán M C, Wang JM and Iribarren P. Neurobiol Dis. 2011.

6. **“Toll-like receptors are key players in neurodegeneration”**

Arroyo D S, Soria J A, **Gaviglio E A**, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P.

Int Immunopharmacol. 2011. (Review)

Presentaciones a congresos y reuniones científicas**Nacionales****1. "Participation of INF gamma in IL-12 plus IL-18-induced neuroinflammation"**

Gaviglio E A, Peralta Ramos J M, Arroyo D S, Bussi C, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LIX Reunión Científica de la sociedad argentina de investigación clínica. Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2014.

2. "Lipopolysaccharide modulates the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 and induces recruitment of leukocytes to the central nervous system"

Peralta Ramos J M, Gaviglio E A, Arroyo D S, Bussi C, Iribarren P. LXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LIX Reunión Científica de la sociedad argentina de investigación clínica. Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2014.

3. "Autophagy induction by TLR2 ligands regulates leukocyte recruitment in the brain"

Arroyo D S, Gaviglio E A, Peralta Ramos J M, Bussi C, Avalos P, Cancela L, Iribarren P. LXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LIX Reunión Científica de la sociedad argentina de investigación clínica. Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2014.

4. "Autophagy modulates cytokine production in microglial cells"

Bussi C, Peralta Ramos J M, Gaviglio E A, Arroyo D S, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LXII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LIX Reunión Científica de la sociedad argentina de investigación clínica. Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2014.

5. "Differential regulation of IGF-1 production in microglial cells stimulated with IL-4 or IFN gamma"

Gaviglio E A, Peralta Ramos J M, Arroyo D S, Bussi C, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LXI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos. Argentina. Noviembre 2013.

6. **“Peptidoglycan from staphylococcus aureus induces recruitment of leukocytes to the Central Nervous System and modulates the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1”**

Peralta Ramos J M, Gaviglio E A, Arroyo DS, Bussi C, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LXI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos. Argentina. Noviembre 2013.

7. **“Autophagy induction by TLR2 ligands regulate neuroinflammatory response”**

Arroyo D S, Gaviglio E A, Peralta Ramos J M, Bussi C, Garcia Keller C, Cancela L, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LXI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos. Argentina. Noviembre 2013.

8. **“Differential regulation of neuronal and microglial cell death by Toll-like receptors (TLRs)”**

Bussi C, Peralta Ramos J M, Gaviglio E A, Arroyo DS, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LXI Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos. Argentina. Noviembre 2013.

9. **“Regulación de la respuesta neuroinflamatoria luego de la administración génica de IL-12 e IL-18”**

Gaviglio E A, Peralta Ramos J M, Arroyo D S, Bussi C, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LVII Reunión Científica de la sociedad argentina de investigación clínica. Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2012.

10. **“Modulación de receptores quimiotáctico en células microgliales por receptores semejantes a Toll”**

Peralta Ramos J M, Gaviglio E A, Arroyo DS, Bussi C, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología y LVII Reunión Científica de la sociedad argentina de investigación clínica. Mar del Plata. Arg. Noviembre 2012.

11. **“La administración génica de IL-12 e IL-18 induce reclutamiento leucocitario y la activación de microglia en el cerebro”**

Gaviglio E A, Rodríguez-Galán M C, Soria JA, Barrios B, Arroyo DS, Iribarren P. LIX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. San Miguel de Tucumán. Argentina. Octubre 2011.

12. **“Activación de TLR2 regula la supervivencia de células microgliales mediante la inducción de autofagia”**

Arroyo D S, Soria J A, Gaviglio E A, García Keller C, Cancela L, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. LIX Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. San Miguel de Tucumán. Argentina. Octubre 2011.

13. **“IL-4 ejerce efectos moduladores críticos para el control de la neuroinflamación en modelos *in vitro* e *in vivo*”**

Soria J A, Arroyo D S, Gaviglio E A, Iribarren P. LIX Reunión científica de la Sociedad Argentina de Inmunología. San Miguel de Tucumán. Argentina. Octubre 2011.

14. **“Regulation of microglial cell cytokine production by type 2 cytokines”**

Gaviglio E A, Soria J A; Arroyo D S; Iribarren P. Primer Congreso Franco - Argentino de Inmunología. Buenos Aires. Argentina. Noviembre 2010.

15. **“IL-4 regulates activation of peptidoglycan-stimulated microglial cells”**

Arroyo D S, Gaviglio E A, Soria J A, Iribarren P. Primer Congreso Franco - Argentino de Inmunología. Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2010.

16. **“Role of IL-4 in limiting neuroinflammation in vivo”**

Soria J A, Gaviglio E A, Arroyo D S, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. Primer Congreso Franco - Argentino de Inmunología. Buenos Aires. Argentina. Noviembre 2010.

17. **“Modulation of microglial cells survival by IL-4: targeting neuroinflammation”**

Soria J A, Arroyo D S, Gaviglio E A, Iribarren P. Primer Congreso Franco - Argentino de Inmunología. Buenos Aires. Argentina. Noviembre 2010.

18. **“Interleukin 4 modulates neuroinflammatory responses in vivo”**

Soria, J A, Gaviglio E A, Arroyo D S, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. Reunión anual Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2009.

19. **“Peptidoglycan of staphylococcus aureus induces atypical cell death of microglial cells by a caspase-3 independent pathway”**

Arroyo D S, Gaviglio E A, Soria J A, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P.

Reunión anual Sociedad Argentina de Inmunología.
Mar del Plata. Argentina. Noviembre 2009.

Internacionales

1. **“Toll-like receptor 2 ligands promote microglial cell death by inducing autophagy”**

Arroyo DS, Gaviglio EA, Peralta Ramos JM, Bussi C, García Keller C, Cancela L, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. Chilean society for cell biology XXVII Annual meeting. Puerto Varas, Chile. Octubre 2013.

2. **“Interlukin 12 and Interleukin 18 gene administration induces leukocyte recruitment and activation of microglia in the brain”**

Rodríguez-Galán M C, Gaviglio EA, Soria JA, Barrios B, Arroyo DS, Iribarren, P. IBRO world congress of neuroscience. International Brain Research Organization. Florencia. Italia. Julio 2011.

3. **“Interleukin 4 modulates neuroinflammatory responses in vivo”**

Soria, JA, Gaviglio EA, Arroyo DS, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. Congreso latinoamericano de inmunología. Viña del Mar, Chile. Noviembre 2009.

4. **“Peptidoglycan of staphylococcus aureus induces atypical cell death of microglial cells by a caspase-3 independent pathway”**

Arroyo, DS, Gaviglio EA, Soria JA, Rodríguez-Galán M C, Iribarren P. Congreso latinoamericano de inmunología. Viña del Mar, Chile. Noviembre 2009.