



**FCQ**

Facultad de  
Ciencias Químicas

C I B I C I

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Químicas - Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**IMPACTO DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA  
RESPUESTA INMUNE DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Biól. Javier M. Peralta Ramos

Director de Tesis: Prof. Dr. Pablo Iribarren

Córdoba, Argentina

- 2018 -

---

Comisión Asesora:

- Prof. Dra. Teresa Scimonelli
- Prof. Dr. Pablo H. López
- Prof. Dr. Gabriel Morón

Evaluador Externo:

- Prof. Dr. A. Javier Ramos

---

El presente trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del National Institutes of Health (NIH), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT), de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

***A Bauti y Juani,  
por brindarme la posibilidad  
de redescubrirme como padre junto a ellos.***

*"...voy tras mis sueños, si no fuera así, qué papá sería para mis hijos?".*

***- Diario de José Antonio Delgado, Nanga Parbat (2006) -***

## **AGRADECIMIENTOS**

A Silvia Correa, por acercarme a la Inmunología a través de sus clases de ensueño y por su siempre atento y cálido apoyo.

A Claudia Sotomayor, por creer en mí y ofrecerme la oportunidad de dar mis primeros pasos en la investigación bajo su cariñoso sostén.

A Ceci Rodríguez-Galán y Pauli Icely, por escucharme y acompañarme con sus palabras e infaltable buen humor que las caracteriza.

A Pablo, por brindarme la posibilidad de realizar la tesis doctoral bajo su dirección, por los valiosos intercambios científicos y por permitirme crecer académicamente con libertad.

A Dani, Emi, Nati y Vicky, por su leal amistad y compañía, por su invaluable contención en los momentos difíciles.

A Clau, por las innumerables y enriquecedoras charlas compartidas, porque sin lugar a dudas cada una de ellas me hizo crecer como persona.

A Cande y Lucho, por su nobleza, por honrar con creces los valores de la amistad.

A Nico Nuñez, David Nocera, Gera Gatti, Leo Sánchez, Nico Ponce, Cris Falcón, Luquitas Trucco y Nico Gigena, por las incontables horas de risas y anécdotas compartidas.

A Lili, Cintia, Jime, Rachel y Anita, por regalarme un abrazo y dibujarme una sonrisa siempre.

A todo el personal de Secretaría, Postgrado, Bioterio, Cultivo y Citometría de Flujo, por su paciente asistencia y no siempre visible trabajo.

A los miembros de mi Comisión de Tesis, por los constructivos aportes realizados a lo largo de estos años y por la buena predisposición para la discusión.

A Anke Van der Perren, Greetje Vande Velde y Veerle Baekelandt, por ofrecerme la enorme posibilidad de trabajar junto a ellas y facilitarme todo lo necesario para lograr que mi experiencia personal y académica en Leuven fuera inolvidable.

A Denu, por ser la mejor compañera de vida que podría tener, por apoyarme y acompañarme incondicionalmente en mis desafíos personales, por tu amor fiel e inquebrantable.

A mi familia, por su infinito amor y apoyo.

**INDICE DE CONTENIDO**

RESUMEN .....	8
IMPACTO DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	9
IMPACT OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM INNATE IMMUNE RESPONSE.....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
Fisiología e inmunidad del SNC en la homeostasis .....	14
ESQUEMA 1   El sistema inmune del SNC en la homeostasis.....	17
Vías de acceso para la migración de leucocitos al SNC .....	18
ESQUEMA 2   Modelo de la entrada de leucocitos al CSF .....	20
Neuroinflamación.....	21
Microglía & Monocitos.....	22
LPS .....	26
ESQUEMA 3   Vías de la respuesta inflamatoria al LPS .....	29
Impacto de la pre-activación de la microglía y la inflamación sistémica en la progresión de enfermedades neurodegenerativas.....	31
El PD y el concepto de los priones .....	35
ESQUEMA 4   Resumen ilustrado del PD .....	36
HIPÓTESIS & OBJETIVOS.....	39
MATERIALES & MÉTODOS.....	42
Animales y administración de LPS o $\alpha$ -SYN .....	43
ESQUEMA 1   Modelo de neuroinflamación inducido por LPS.....	43
ESQUEMA 2   Modelo de neuroinflamación inducido por $\alpha$ -SYN .....	44
Purificación de células inmunes derivadas de cerebros o médula espinal de ratón .....	44
Citometría de Flujo y <i>cell sorting</i> .....	45
Ensayos de supresión <i>ex vivo</i> .....	46
Transcripción reversa del mRNA y cuantificación mediante PCR en tiempo real.....	47
Tinción con H&E e inmunofluorescencia .....	48
Análisis estadístico .....	49
RESULTADOS .....	50
El desafío con LPS sistémico induce activación glial y reclutamiento de monocitos inflamatorios periféricos al SNC .....	51

FIGURA 1   Secuencia de <i>gating</i> multiparamétrico empleada para el análisis por citometría de flujo y <i>cell sorting</i> .....	51
FIGURA 2   La estimulación con LPS induce el reclutamiento de células CD11b <sup>+</sup> /- CD45 <sup>hi</sup> al SNC .....	53
FIGURA 3   Características fenotípicas de las células inmunes involucradas en la neuroinflamación de cerebros de ratones endotoxémicos .....	54
FIGURA 4   El desafío con LPS induce activación glial y el reclutamiento de leucocitos a órganos circunventriculares .....	55
La estimulación con LPS modula la expresión de CCR2 y CX <sub>3</sub> CR1 en microglía residente y monocitos inflamatorios periféricos .....	56
FIGURA 5   Incremento de células residentes de cerebro CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>lo</sup> y periféricas CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Ly6G <sup>-</sup> con expresión de CCR2 y CX <sub>3</sub> CR1 en animales tratados con LPS.....	58
FIGURA 6   Control de la marcación intracelular .....	58
Monocitos inflamatorios pre-activados <i>in vivo</i> con LPS regulan la proliferación de células T .....	59
FIGURA 7   Función inmune de células inflamatorias CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Ly6G <sup>-</sup> purificadas luego de un desafío sistémico con LPS.....	60
Los IFNs de tipo I son requeridos en el reclutamiento de monocitos inflamatorios al SNC en animales endotoxémicos .....	62
FIGURA 8   Comparación de la pérdida de peso entre ratones WT, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFNAR <sup>-/-</sup> luego del estímulo con LPS .....	63
FIGURA 9   Disminución del reclutamiento de células inflamatorias CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Ly6G <sup>-</sup> en ratones endotoxémicos IFNAR <sup>-/-</sup> .....	64
FIGURA 10   Comparación de la expresión de MHC II entre células residentes de cerebro CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>lo</sup> vs. periféricas CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>+</sup> Ly6G <sup>+</sup> y CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> Ly6G <sup>-</sup> en ratones WT, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFNAR <sup>-/-</sup> tratados con LPS .....	65
La inflamación sistémica inducida por LPS regula la vigilancia inmunológica del SNC a través del reclutamiento de monocitos inflamatorios luego de la administración de $\alpha$ -SYN .....	66
FIGURA 11   Características fenotípicas de las células inmunes reclutadas al SNC luego del desafío con $\alpha$ -SYN .....	67
FIGURA 12   Células pre-activadas <i>in vivo</i> CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> promueven la diseminación de $\alpha$ -SYN al cerebro.....	68
FIGURA 13   La administración sistémica de $\alpha$ -SYN induce la migración de células inmunes periféricas a la médula espinal.....	70
FIGURA 14   Células pre-activadas <i>in vivo</i> CD11b <sup>+</sup> CD45 <sup>hi</sup> Ly6C <sup>hi</sup> promueven la diseminación de $\alpha$ -SYN a la médula espinal.....	71
DISCUSIÓN & CONCLUSIONES.....	73
ESQUEMA A   La administración sistémica con LPS induce microgliosis y el reclutamiento de monocitos inflamatorios CCR2 <sup>+</sup> CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> al SNC .....	76

ESQUEMA B   Microglía y monocitos inflamatorios pre-activados con LPS y purificados de SNC, modulan diferencialmente la respuesta proliferativa T .....	77
ESQUEMA C   El reclutamiento de monocitos inflamatorios al SNC depende de IFNs de tipo I en ratones endotoxémicos.....	78
ESQUEMA D   Modelo propuesto en el que la inflamación sistémica inducida con LPS regula la diseminación de $\alpha$ -SYN al SNC .....	81
ABREVIATURAS.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	87
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	101
Publicaciones científicas.....	102
Presentaciones a congresos internacionales .....	102
Presentaciones en formato oral a congresos nacionales.....	103
Presentaciones en formato póster a congresos nacionales .....	103
Becas internacionales otorgadas .....	104
Becas nacionales otorgadas .....	105



---

---

# RESUMEN

---

---

## **IMPACTO DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

La microglía residente y los leucocitos periféricos tienen un rol esencial influenciando la respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC). Estas células se activan y migran en respuesta a quimiocinas producidas durante respuestas inmunes activas, pudiendo contribuir a la progresión de la neuroinflamación. El reciente hallazgo de agregados de proteína alfa-sinucleína ( $\alpha$ -SYN) mal plegada que amplifican de forma similar a los priones, ha llevado a la hipótesis de que el sistema inmune podría estar participando en la propagación de  $\alpha$ -SYN en sinucleinopatías como la enfermedad de Parkinson (PD).

En este trabajo de tesis, evaluamos la participación de los interferones (IFNs) de tipo I y II en la respuesta ejercida por la microglía y los monocitos inflamatorios para de esta forma, comprender la contribución de estas citocinas en el establecimiento y desarrollo de un proceso neuroinflamatorio. Además, determinamos el impacto de la inflamación sistémica en la diseminación de  $\alpha$ -SYN para comprender el rol de la microglía y los monocitos inflamatorios en la progresión del PD.

Luego del desafío sistémico con lipopolisacárido (LPS), encontramos reactividad glial junto con un activo reclutamiento de leucocitos en órganos circunventriculares, próximo a células vasculares endoteliales. A diferencia de la microglía, los monocitos inflamatorios pre-activados con LPS y purificados de cerebro fueron capaces de inducir la proliferación de células T. Además, su re-estimulación *ex vivo* con LPS promovió la exacerbación de la respuesta proliferativa T. Estas células mieloides, al contrario de los neutrófilos, demostraron también ser reclutadas de manera dependiente de los IFNs de tipo I, revelando un rol para estas citocinas en su migración al SNC. En un modelo patológico,  $\alpha$ -SYN administrada sistémicamente, fue internalizada preferentemente por monocitos

inflamatorios pre-activados con LPS, respuesta que favoreció su diseminación en cerebro y médula espinal.

En síntesis, nuestros resultados comparan las características funcionales y fenotípicas entre células residentes vs. reclutadas periféricas en un microambiente inflamatorio, identificando a los monocitos inflamatorios como un tipo celular clave en un modelo de neuroinflamación inducido por la administración sistémica con LPS y como potenciales células *carrier* que participarían en la diseminación de  $\alpha$ -SYN en el desarrollo del PD.

Palabras clave:

Microglía - Monocitos inflamatorios - Inflamación - LPS - IFNs -  $\alpha$ -SYN

## **IMPACT OF SYSTEMIC INFLAMMATION ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM INNATE IMMUNE RESPONSE**

Brain-resident microglia and peripheral migratory leukocytes play essential roles in shaping the immune response in the central nervous system (CNS). These cells activate and migrate in response to chemokines produced during active immune responses and may contribute to the progression of neuroinflammation. The recent discovery of misfolded protein aggregates of alpha-synuclein ( $\alpha$ -SYN) that amplify in a 'prion-like' fashion, has led to the hypothesis that the immune system might be participating in the propagation of  $\alpha$ -SYN in synucleinopathies such as Parkinson's disease (PD).

Herein, we addressed the participation of type I-II interferons (IFNs) in the immune response displayed by microglia and inflammatory monocytes to comprehend the contribution of these cytokines in the establishment and development of a neuroinflammatory process. Besides, to understand the role of microglia and inflammatory monocytes in the progression of PD, we also assessed the impact of lipopolysaccharide (LPS)-induced systemic inflammation on  $\alpha$ -SYN spreading.

Following systemic LPS challenge, we found glial reactivity and an active recruitment of leukocytes close to vascular endothelial cells in circumventricular organs. Isolated primed inflammatory monocytes were able to induce T cell proliferation, unlike microglia. Moreover, *ex vivo* re-stimulation with LPS exhibited an enhancement of T cell proliferative response promoted by inflammatory monocytes. These myeloid cells also proved to be recruited in a type I IFN-dependent fashion as opposed to neutrophils, unveiling a role of these cytokines in their trafficking. In a pathologic model,  $\alpha$ -SYN was internalised mainly by LPS-primed inflammatory monocytes upon systemic administration, which favoured  $\alpha$ -SYN spreading through brain and spinal cord.

Together, our results compares the phenotypic and functional features between tissue-resident vs. peripheral recruited cells in an inflamed microenvironment, identifying inflammatory monocytes as a recruited key cell population in an induced murine model of neuroinflammation after systemic administration of LPS and as potential carriers that would participate in the spreading of  $\alpha$ -SYN in the development of PD.

Keywords:

Microglia - Inflammatory monocytes - Inflammation - LPS - IFNs -  $\alpha$ -SYN

---

---

# INTRODUCCIÓN

---

---

## **Fisiología e inmunidad del SNC en la homeostasis**

Con el fin de asegurar su integridad estructural, la superficie del cerebro adulto está protegida por varias capas. El cráneo es la estructura ósea que recubre el cerebro y posee dos capas adherentes de meninges, la duramadre y la leptomeninges. Esta última consta de la aracnoides y la piamadre, y recubren el cerebro y el sistema vascular intracerebral hacia la profundidad del parénquima nervioso, construyendo el espacio perivascular denominado de Virchow-Robin. Ambos compartimentos de las meninges han despertado un gran interés durante estos últimos años debido al contenido de células inmunes. Los vasos linfáticos de la duramadre fueron descritos estructuralmente hace 50 años <sup>1</sup>, pero su relevancia funcional no había sido esclarecida sino hasta hace poco. Se descubrió que estos vasos son capaces de absorber líquido cefalorraquídeo (CSF) del espacio subaracnoideo y líquido intersticial cerebral mediante el sistema glinfático. Estos vasos transportan luego el líquido a través de aberturas en la base del cráneo hacia los nódulos linfáticos cervicales profundos <sup>2,3</sup>. Se encontraron vasos linfáticos convencionales en la duramadre, delineando los senos y saliendo del sistema nervioso central (SNC) en la base del cráneo <sup>2,4</sup>. Notablemente, se hallaron bajo condiciones homeostáticas, células inmunes clásicas como las T y B así como mieloides CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> en vasos linfáticos <sup>4</sup>, sugiriendo que este sistema linfático de las meninges podría estar participando en el tráfico de células inmunes desde las meninges. Se cree que la fracción acelular del CSF drena nuevamente hacia la corriente sanguínea mediante granulaciones aracnoideas localizadas a lo largo de los senos, donde las células inmunes junto con las proteínas pueden ser drenadas fundamentalmente a través de las estructuras linfáticas de la duramadre y alcanzar los nódulos linfáticos cervicales profundos <sup>5</sup>.

El CSF baña al cerebro y provee de cierta flotabilidad al SNC, así como también contribuye al transporte de citocinas, neurotransmisores y hormonas <sup>6</sup>. El CSF fluye a

través de la aracnoides y la piamadre y es producido como un filtrado de los vasos sanguíneos fenestrados de los plexos coroideos en los ventrículos del cerebro. Desde allí, fluye hacia el tercer ventrículo, atravesando el cerebro medio mediante el acueducto y alcanzando la superficie exterior a través del cuarto ventrículo. Pocos linfocitos CD4<sup>+</sup> y aún menos células presentadoras de antígeno, pueden ser encontrados en el CSF. Esta población de células T CD4<sup>+</sup> presente en el cerebro ingresa al SNC a través de los capilares sanguíneos fenestrados de los plexos coroideos en los ventrículos <sup>7</sup> y consiste en pocas células naïve <sup>8</sup>, siendo la mayoría de las células T en el CSF efectoras de memoria que expresan los receptores necesarios para establecerse en tejidos inflamados <sup>9</sup>.

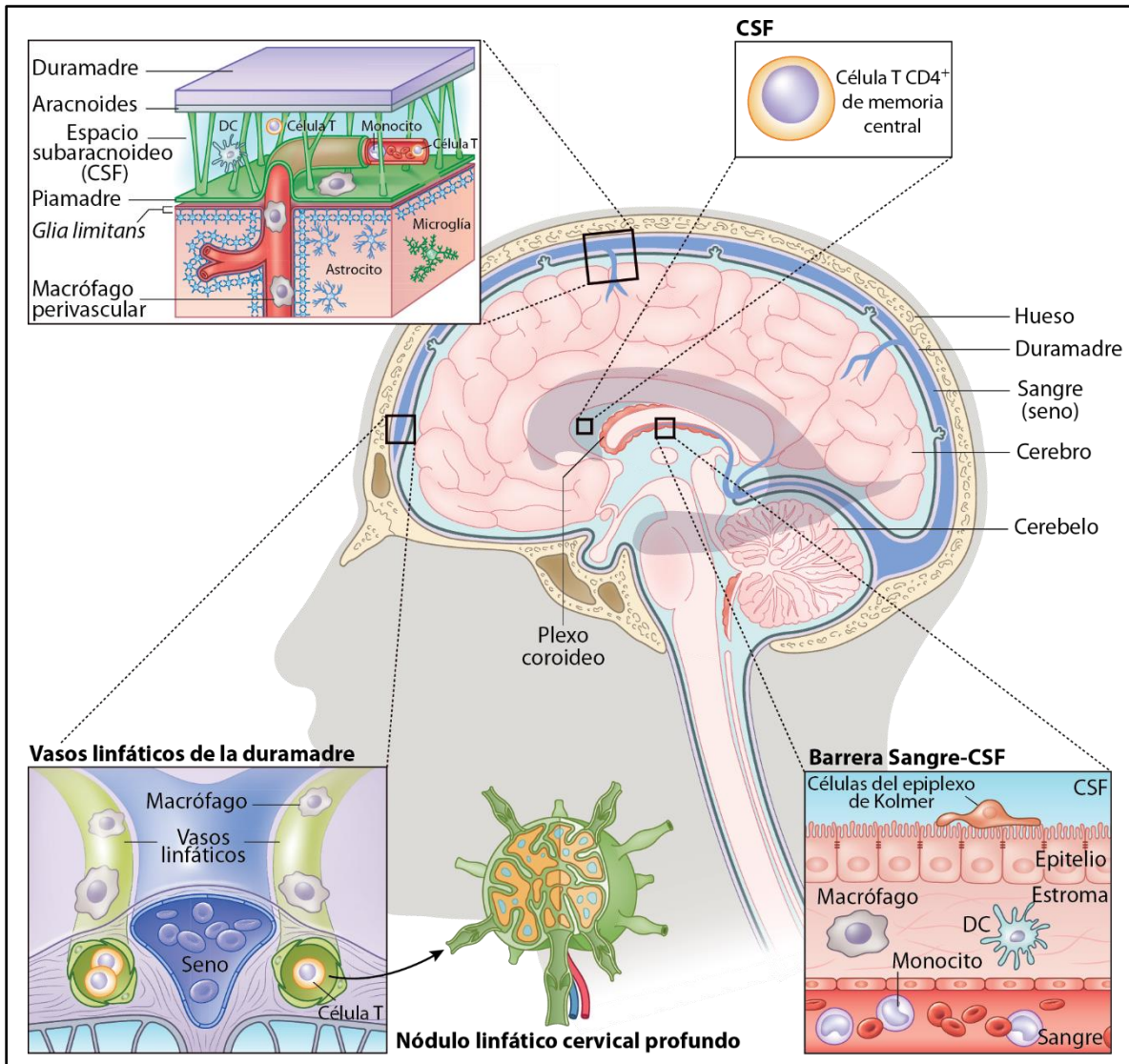
A pesar de su rol patogénico durante la inflamación autoinmune, los linfocitos están presentes de manera escasa en el CSF de la duramadre. La leptomeninges contiene células estromales ricas en colágeno y células epiteliales aracnoideas y prácticamente no hay células del sistema inmune adaptativo <sup>10</sup>. De hecho, tanto el parénquima cerebral humano como el de ratón carecen de linfocitos en condiciones homeostáticas.

En contraste con los órganos periféricos, no hay en el parénquima del SNC células dendríticas (DCs) clásicas que se puedan definir funcionalmente como tal <sup>11</sup>. A pesar de adquirir ciertos marcadores de superficie característicos, tales como CD11c, el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) y CD11b, las células parenquimales del SNC no son DCs por definición. De hecho, se encontró expresión de CD11c en microglía activada <sup>12</sup>, fagocitos derivados de médula ósea en el SNC murino <sup>13</sup>, así como en muestras de SNC humano <sup>14</sup>. Mediante caracterización fenotípica, un estudio demostró recientemente que células parenquimales CD11c<sup>+</sup> no exhiben el fenotipo de DCs pero si representan una sub-población microglial <sup>15</sup>, lo que sostiene la idea de que el SNC carece de DCs clásicas. En línea con esto, otro estudio demostró que células T específicas para un virus son capaces de inducir la proliferación de la microglía y convertirla en células presentadoras de antígeno CD11c<sup>+</sup> <sup>16</sup>.



Entonces, ¿qué células del SNC se encargan de la vigilancia inmunológica en la homeostasis, representan la primera línea de defensa frente a patógenos y modulan la inflamación en el SNC? Como otros órganos del cuerpo, el SNC contiene macrófagos residentes de tejido como células inmunes innatas típicas. Además de la microglía del parénquima, esta familia consiste de macrófagos perivasculares, de las meninges y de los plexos coroideos, estos últimos incluyendo también a las células del epiplexo de Kolmer <sup>17</sup>. A pesar del hecho de que todas estas poblaciones de macrófagos se originan de fuentes pre-natales, concretamente del saco y/o el hígado embrionario <sup>18-23</sup>, y de que comparten numerosos marcadores mieloides y de macrófagos específicos (Iba-1, F4/80 y CX<sub>3</sub>CR1), cumplen ciertas funciones específicas de cada tipo celular <sup>24</sup>. Estratégicamente posicionados en las barreras del SNC, los macrófagos perivasculares, de las meninges y de los plexos coroideos podrían modular la entrada de células inmunes y el fenotipo durante la inflamación. Estas células mieloides han sido implicadas en varios procesos inmunopatológicos, incluyendo la presentación antigénica a linfocitos circulantes <sup>25-27</sup>. Se cree que en condiciones fisiológicas, los macrófagos perivasculares detectan las señales de daño en la sangre, incluyendo a los patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), debido a su localización entre las membranas basales endoteliales y gliales <sup>21</sup>. Durante la angiogénesis, estas células modulan la anastomosis en la vasculatura en desarrollo <sup>28</sup>. Además, se cree que los macrófagos de los plexos coroideos controlan la producción de CSF en condiciones homeostáticas <sup>29,30</sup>.

La microglía y los miembros de la familia de células no parenquimales así como los macrófagos residentes de tejido de origen pre-natal, cuentan con una vida media larga y no manifiestan recambio con los monocitos derivados de sangre <sup>31,32</sup>. Sin embargo, exhiben una considerable capacidad de auto-renovación bajo condiciones fisiológicas <sup>33-35</sup>.



**ESQUEMA 1 | El sistema inmune del SNC en la homeostasis.** Esquema del cerebro sano, representando estructuras anatómicas y células involucradas en garantizar la integridad del tejido. En condiciones fisiológicas, el cerebro está cubierto por el cráneo y la galea aponeurótica (no se muestra). Las capas de tejido conectivo, la duramadre y la leptomeninges (aracnoides y piamadre), están localizadas debajo del cráneo. El CSF es producido en los plexos coroideos (el cual tiene una barrera de sangre-CSF), baña al cerebro y contiene células T y fluye tanto en el parénquima como en el área subaracnoidea, que comprende a arterias y al espacio perivascular. Mientras que el CSF drena nuevamente a la circulación sanguínea, las células inmunes y proteínas en el CSF pueden ser drenadas principalmente a través de estructuras linfáticas de las meninges para alcanzar los nódulos linfáticos cervicales profundos, órganos linfáticos secundarios típicos. Los leucocitos (granulocitos y células T y B) permanecen dentro de los vasos sanguíneos y normalmente no acceden al tejido cerebral sano. De esta forma, las únicas células inmunes endógenas dentro del SNC son parenquimales (microglía) y macrófagos no parenquimales (macrófagos perivascuales, macrófagos de las meninges y de los plexos coroideos, como ser las células del epiplexo del Kolmer). Esquema adaptado de Prinz & Priller, 2017 <sup>36</sup>.

Notablemente, los monocitos derivados de sangre nunca abandonan el espacio endovascular del cerebro sano para poblar el parénquima del SNC, por lo que reportes atribuyendo cualquier efecto a estas células puede explicarse debido a mecanismos indirectos<sup>37</sup> o a un mínimo pasaje fisiológico a través de los plexos coroideos<sup>21,38</sup>. Por lo tanto, las únicas células inmunes que pueblan el parénquima de un cerebro y médula espinal sanos son los macrófagos residentes de tejido, incluyendo a la microglía del parénquima, a los macrófagos perivasculares y de las meninges, y los macrófagos de los plexos coroideos. La presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) previene la entrada de células inmunes desde la periferia al SNC y el ambiente local no es propicio para las células derivadas de la sangre<sup>39</sup>. Sin embargo, dentro del CSF, las células T de memoria posiblemente monitorean el SNC dentro del espacio subaracnoideo y de la leptomeninges, donde se pueden encontrar con los macrófagos mencionados anteriormente en las distintas interfases del cerebro.

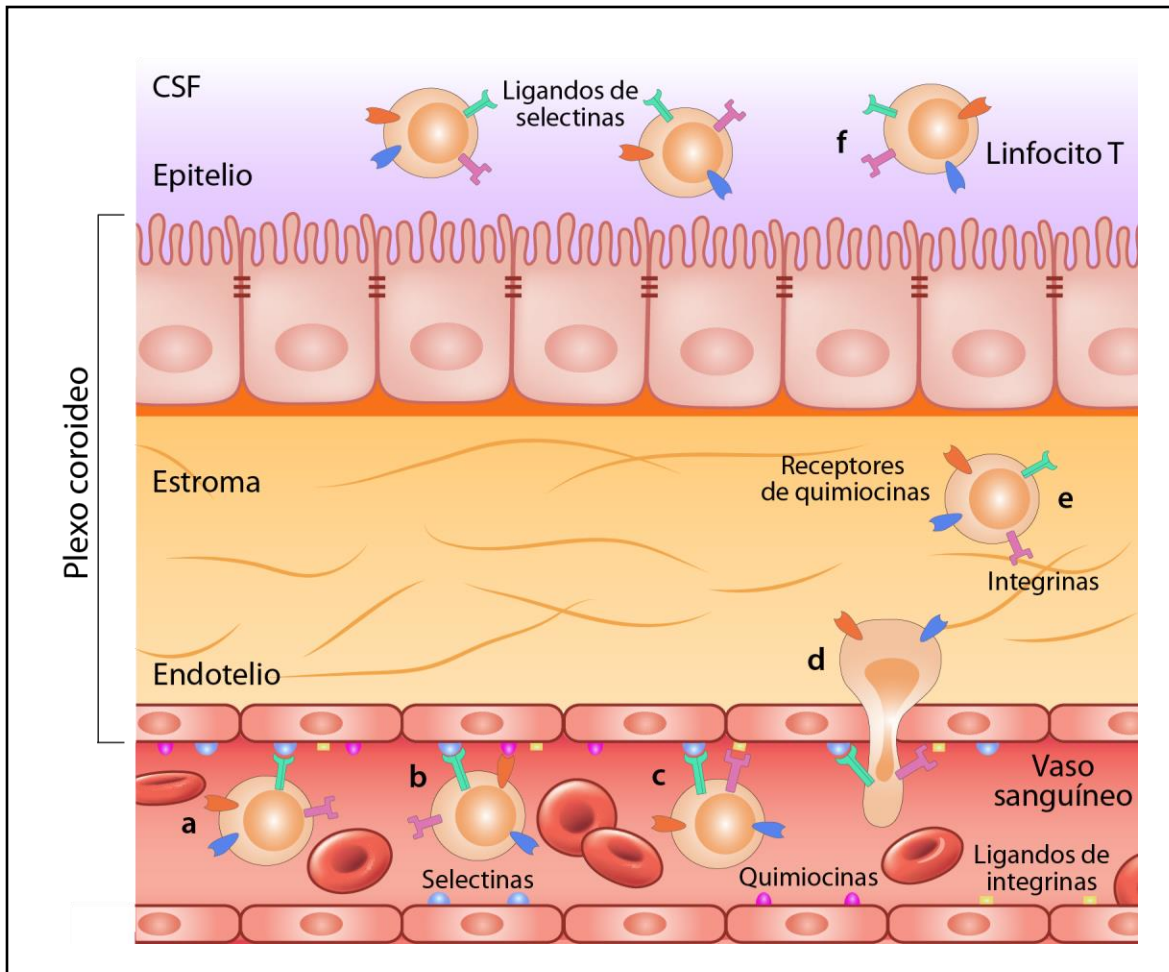
### **Vías de acceso para la migración de leucocitos al SNC**

Es posible definir tres vías distintas para la entrada de los leucocitos al sistema nervioso y a partir de allí poder evaluar el tráfico a través de estos sitios. Para establecer un contexto apropiado para esta discusión es importante recordar que hay sólo unos pocos leucocitos en el SNC a menos que haya inflamación. Por esta razón, la mayoría de la investigación en esta área involucra el uso de modelos de enfermedad o daño.

Vía de acceso I, desde la sangre al CSF a través de los plexos coroideos: esta primera vía de migración de los leucocitos al SNC sigue la formación del CSF. En esta vía de acceso, los leucocitos extravasan a través del endotelio fenestrado en el estroma de los plexos coroideos, migrando a través del centro hacia las vellosidades e interactuando con células epiteliales y entrando finalmente a los plexos coroideos en el mismo sitio en el que se forma el CSF. Es probable que esta vía sea la ruta por la cual las células entran al CSF

en condiciones fisiológicas<sup>40</sup>. Un estudio que profundizó acerca del mecanismo de esta vía de migración mostró, en ratones deficientes para la selectina P, una marcada reducción en la entrada de leucocitos al SNC. Sin embargo, los leucocitos en el CSF humano tienen un fenotipo distintivo, expresando altos niveles de CXCR3<sup>41</sup> en comparación con las células T circulantes. La acumulación de células T no depende de VCAM1, ni ICAM1 o sus co-receptores, lo cual fue confirmado mediante ensayos de neutralización con anticuerpos. Además, la inyección con un constructo de PECAM fusionado con una inmunoglobulina inhibió el ingreso de leucocitos al CSF, consistente con un rol para PECAM en este modelo<sup>42</sup>.

Vía de acceso II, de la sangre al espacio subaracnoideo: en la segunda vía, los leucocitos pueden cruzar desde la arteria carótida interna, extravasando a través de las vénulas post-capilares en la superficie pial del cerebro hacia el espacio subaracnoideo y el espacio perivascular de Virchow-Robin. Allí, se encuentran con células de linaje mieloide competentes para la presentación antigénica. Utilizando quimeras, se demostró que las células perivasculares se intercambian con las poblaciones de leucocitos circulantes<sup>43-45</sup>. Por este motivo, las regiones perivasculares, en particular el espacio de Virchow-Robin que está en comunicación directa con el compartimento del CSF, son considerados sitios probables de interacción entre linfocitos y células presentadoras de antígeno, y por consiguiente, de vigilancia inmunológica del SNC. Estudios recientes han utilizado microscopía intravital para evaluar el *rolling* leucocitario en capilares de la superficie pial de los hemisferios cerebrales<sup>46</sup>. El *rolling* leucocitario en estos vasos no se observó en ratones sanos pero sí en aquellos en los que se indujo la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE). Esta respuesta fue parcialmente sensible al bloqueo de la integrina  $\alpha 4$ , pero requirió absolutamente de la selectina P. Además, la adhesión fue parcialmente bloqueada inhibiendo el *rolling* con un anticuerpo específico para selectina P.



**ESQUEMA 2 | Modelo de la entrada de leucocitos al CSF.** Esta figura muestra una porción de los plexos coroideos, constituido por vellosidades y un estroma central. El lumen del endotelio expresa selectinas, ligandos de integrinas y quimiocinas inmovilizadas. Un leucocito luminal que expresa e integrinas, receptores de quimiocinas y ligandos de selectinas sobre la superficie celular, **(a)** se muestra realizando el *rolling* de manera secuencial, **(b)** estableciendo la unión entre el receptor de quimiocina y su ligando inmovilizado, **(c)** la posterior activación de la integrina, **(d)** seguido de la diapédesis. Una vez en el estroma, **(e)** el leucocito puede quedar expuesto a más quimiocinas que son producidas por células epiteliales de los plexos coroideos, **(f)** llevando a la migración a través de la monocapa epitelial hacia el CSF. Adaptado de Ransohoff y col., 2003 <sup>47</sup>.

Vía de acceso III, de la sangre al espacio parenquimal perivascular: en la tercera vía los leucocitos pueden entrar al parénquima directamente, pasando de las carótidas internas a través de la vasculatura ramificada de arteriolas y capilares, extravasando finalmente las vénulas post-capilares, proceso que requiere que los leucocitos crucen la BHE y la lámina basal endotelial. Un estudio en el que se analizó la extravasación leucocitaria a través de

las vénulas parenquimales en la EAE, sostiene la idea de que el tránsito de linfocitos activados a través de un endotelio cerebrovascular en condiciones homeostáticas es un evento de baja eficiencia. En este contexto, si bien se observó interacción entre los leucocitos y el endotelio, anticuerpos específicos para selectina P o PSGL1 bloquearon el *rolling* tal como se describió previamente para los vasos en la superficie pial <sup>46</sup>. Luego, se demostró que las interacciones entre integrinas y moléculas de adhesión (LFA1-ICAM1 y  $\alpha\beta 1$ -VCAM1) podrían mediar el *rolling* ya que la interferencia por anticuerpos de cualquiera de las vías redujo este fenómeno. Sin embargo, el bloqueo de estos componentes no afectó las características de *rolling* de aquellas células que continuaban interactuando con el endotelio.

## Neuroinflamación

La enfermedad de Alzheimer (AD) y la enfermedad de Parkinson (PD) son desórdenes neurodegenerativos comunes que representan una gran carga socioeconómica. Al presente, no existen tratamientos para el AD y el PD así como tampoco para otras condiciones neurodegenerativas menos comunes, como la enfermedad de Huntington (HD), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD o enfermedad priónica) entre otras. Las características neuropatológicas de estos desórdenes neurodegenerativos incluyen la agregación y acumulación de proteínas intracelulares y/o extracelulares asociadas a la pérdida de neuronas en regiones específicas del SNC. La proliferación y activación de células gliales, denominada gliosis, es una característica distintiva bien establecida de estas enfermedades. De hecho, se cree que la respuesta de la microglía modifica la enfermedad, lo que la hace atractiva para numerosos estudios <sup>29,48</sup>.

Es importante destacar que las respuestas inmunes celulares en AD, PD, HD, ALS, CJD entre otras, son consistentes con las de la inmunidad innata. Las respuestas inmunes

adaptativas involucran especificidad inmunológica (por los antígenos) y memoria (indicando una reacción acelerada a la re-exposición con antígenos) basado en las propiedades únicas de los linfocitos T y B. Cabe destacar que la presencia de estas y otras células hematopoyéticas dentro del SNC podría justificar el término neuroinflamación tal como se observa en enfermedades bacterianas, virales o autoinmunes del SNC <sup>36</sup>. Las enfermedades neurodegenerativas como el AD deberían ser consideradas como reacciones inmunes innatas que pueden incluir además la liberación de citocinas y quimiocinas. A pesar del colapso de la BHE en etapas posteriores de la neurodegeneración, la presencia de linfocitos en AD y PD ha sido reportada en algunos casos <sup>49,50</sup>. El significado del término inflamación ha sufrido revisiones considerables en los últimos años, y por ende, el concepto de la neuroinflamación se ha expandido gradualmente para incluir también a las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, numerosos reportes han considerado a la AD como una condición neuroinflamatoria más que una respuesta inmune innata a un estado de neurodegeneración <sup>51,52</sup>. Esto no es solamente una cuestión de semántica, debido a que esta imprecisión podría llevar a una incomprensión de la patofisiología de la neurodegeneración y por consiguiente, podría dificultar aproximaciones terapéuticas específicas para cada tipo celular.

### **Microglía & Monocitos**

La microglía, células inmunes residentes del SNC, ha tomado protagonismo gracias a rol dual, tanto en la salud como en la enfermedad. En un cerebro y médula espinal sanos, la microglía representa el 10% de las células del SNC y forma un entramado tridimensional en el que cada célula ocupa un territorio único. Además, constituyen un grupo de células altamente ramificadas que poseen una gran cantidad de procesos finos y móviles que controlan continuamente el ambiente parenquimal <sup>53,54</sup>. A través de esta vigilancia, la

microglía detecta diversas señales extracelulares, y consecuentemente, traduce, integra y responde a ellas con el fin de mantener la homeostasis cerebral <sup>55</sup>.

Estudios en ratones han establecido que la microglía deriva de progenitores del saco embrionario que expresan el factor de transcripción RUNX1 y el receptor tirosina quinasa c-Kit, pero que no expresan el marcador pan-leucocitario CD45 <sup>20</sup>. Dichos progenitores migran a través del torrente sanguíneo hacia el SNC en desarrollo, comenzando en el día embrionario 8,5 y continuando hasta que la BHE esté formada <sup>18,56</sup>. La microglía podría ser considerada similar a macrófagos presentes en otros tejidos no cerebrales, sin embargo se ha determinado que son las únicas células mieloides que derivan del saco embrionario en condiciones fisiológicas <sup>57,58</sup>. Genes específicos de linaje, tales como Pu.1 e Irf8, definen la red transcripcional de la microglía y la distinguen de los macrófagos residentes <sup>20,22,59,60</sup>. La microglía, que son células parenquimales del SNC, es también distinta de macrófagos perivasculares, de las meninges y de los plexos coroideos. A pesar que hay características en común respecto a la ontogenia y a los programas de desarrollo de la microglía, ciertos análisis indican que podría haber subpoblaciones con distintos transcriptomas <sup>61</sup>. Este concepto se basa en hallazgos funcionales y morfológicos de subpoblaciones de la microglía en diferentes regiones del cerebro <sup>62,63</sup>.

El mantenimiento de la microglía no depende de los monocitos circulantes <sup>33,35,57</sup> sino que cuando se requiere de nuevas células, la microglía debe ser generada por auto-renovación de conjuntos de células locales que persisten durante largos periodos. El mantenimiento de la población microglial depende de la activación continua del receptor del factor estimulante de colonias de tipo 1 (CSF-1R), que es además esencial para el desarrollo de la microglía y los macrófagos <sup>18,64</sup>.

Durante el desarrollo, la microglía esculpe los circuitos neuronales inmaduros eliminando las estructuras sinápticas (axones y espinas dendríticas) en un proceso conocido como *pruning* sináptico <sup>65-67</sup>. Interesantemente, en el sistema visual del ratón, este



*pruning* depende de la actividad neuronal y de la experiencia sensorial <sup>65,66</sup>, donde la microglía elimina preferentemente a las terminales pre-sinápticas menos activas.

En el sistema inmune innato, las proteínas del complemento involucradas en el *pruning* sináptico <sup>66,68-70</sup>, constituyen señales encargadas de marcar a las células apoptóticas y patógenos para ser removidos por los macrófagos circulantes que expresan los receptores C3 (CR3/CD11b) <sup>71</sup>. En el cerebro murino sano en desarrollo, C3 y C1q son ampliamente expresadas y localizadas en sinapsis inmaduras <sup>69</sup>. La microglía, el único tipo celular del SNC que expresa el receptor C3, fagocita estas terminales sinápticas a través de la misma vía de señalización C3-C3R que es usada por el sistema inmune innato <sup>66</sup>. La fractalquina, el ligando CX<sub>3</sub>CL1 de CX<sub>3</sub>CR1 neuronal, ha sido también implicada en el *pruning* sináptico de la microglía, ya que ratones que carecen de este receptor tienen marcadamente menos microglía durante el desarrollo post-natal temprano que aquellos que sí lo expresan <sup>67</sup>.

Dado que las células microgliales son esencialmente fagocíticas, su rol en el desarrollo del SNC es el de eliminar las neuronas que mueren como resultado de la muerte celular programada, proceso que descarta el exceso de neuronas generadas como parte del desarrollo normal y de la neurogénesis en el adulto <sup>72,73</sup>. Los receptores TAM Axl y Mer <sup>74</sup>, son cruciales para la remoción de los cuerpos celulares en la neurogénesis adulta. La microglía también dirige la muerte celular programada mediante inducción de la apoptosis neuronal sin provocar inflamación, a través de liberación de iones superóxido <sup>75</sup>, factor de crecimiento nervioso <sup>76</sup> o factor de necrosis tumoral <sup>77</sup>. La muerte neuronal inducida por la microglía depende del receptor de superficie celular C3R, promoviendo finalmente la liberación de factores neurotóxicos <sup>78</sup>. Además de tener un rol en la inicio de la muerte neuronal programada, la microglía está involucrada también en acelerar los procesos que determinan la muerte de neuronas pero que son inducidos por otros mecanismos <sup>79</sup>. En condiciones fisiológicas, la fagocitosis microglial está acoplada a la apoptosis a través de

señales como el nucleótido adenosín trifosfato (ATP), liberado por células apoptóticas, por lo que es fisiológicamente importante un correcto acoplamiento de ambos procesos <sup>80</sup>.

Otro tipo celular involucrado en la respuesta inmune innata en el SNC son los monocitos, una población conservada de leucocitos que están presentes en todos los vertebrados. Los monocitos surgen de células mieloides precursoras en órganos linfáticos primarios, incluidos el hígado embrionario y la médula ósea, tanto durante la hematopoyesis embrionaria como la adulta <sup>81</sup>. Están definidos por su localización, fenotipo y morfología, así como por su expresión génica y de microRNA característica <sup>82-85</sup>. El desarrollo y supervivencia de los monocitos depende completamente del factor estimulante de colonias de tipo 1 (CSF-1), de hecho los ratones que son deficientes de este factor de crecimiento o de su receptor exhiben una monocitopenia severa <sup>86-88</sup>. En ratones y humanos, los monocitos representan un 4% y 10% de las células nucleadas de la sangre respectivamente, con una considerable cantidad de células en el bazo y en los pulmones disponibles en el caso de que se necesitara que fueran movilizadas <sup>89,90</sup>. En la sangre, los monocitos (en particular la clásica subpoblación murina Ly6C<sup>hi</sup>) exhiben una corta vida media de unas 20 horas <sup>91,92</sup>, factor que combinado con la observación de que en condiciones inflamatorias estas células dan origen a células residentes, hace suponer que los monocitos constituyen meramente un reservorio temporal de precursores para los fagocitos mononucleares residentes <sup>91</sup>.

Estudios recientes establecieron la existencia de subpoblaciones de monocitos en la sangre humana <sup>93</sup>, existiendo actualmente dos subpoblaciones de monocitos definidos como CD14<sup>+</sup> y CD14<sup>lo</sup> CD16<sup>+</sup>. En ratones, las subpoblaciones de monocitos CSF-1R<sup>+</sup> actualmente consisten en aquellos Ly6C<sup>hi</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>dim</sup> CCR2<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD43<sup>lo</sup> y los Ly6C<sup>lo</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>hi</sup> CCR2<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup> CD43<sup>hi</sup> <sup>94-97</sup>. Evidencia reciente sugiere que, en condiciones homeostáticas, las subpoblaciones de monocitos circulantes representan estadios de desarrollo donde los monocitos Ly6C<sup>hi</sup> se diferencian, probablemente en circulación, en células Ly6C<sup>lo</sup> <sup>92,98</sup>. Las células Ly6C<sup>lo</sup> de ratón y sus equivalentes humanas CD14<sup>lo</sup> CD16<sup>+</sup>,

podrían entonces estar terminantemente diferenciadas en macrófagos residentes más que ser monocitos *per se*. De hecho, actualmente hay cierta evidencia que la función principal de las células Ly6C<sup>lo</sup> es controlar la integridad endotelial <sup>99,100</sup>. Por otra parte, los monocitos Ly6C<sup>hi</sup> en ratones y CD14<sup>+</sup> en humanos, representan a los monocitos clásicos que son reclutados a los sitios de inflamación y que pueden actuar como los precursores de fagocitos mononucleares periféricos <sup>101</sup>. La función de los monocitos Ly6C<sup>hi</sup> circulantes permanece aún pobremente definida pero probablemente esté relacionada a su alta capacidad fagocítica y habilidad para acceder de forma inmediata a todos los tejidos y órganos. El rápido reclutamiento de los monocitos Ly6C<sup>hi</sup> a los sitios de inflamación e injuria hace de estas células versátiles un componente clave de la respuesta del hospedador hacia insultos patogénicos <sup>102</sup>. Sin embargo, la movilidad de los monocitos tiene su precio, ya que estas células pueden contribuir a la diseminación de patógenos, actuando como caballos de Troya mediante el traslado de bacterias hacia el cerebro <sup>103</sup>.

## LPS

El lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas y ligando canónico del receptor de tipo Toll 4 (TLR4), cumple un rol esencial en la inducción de la inflamación en infecciones bacterianas tanto en humanos como en ratones. Estos organismos son capaces de detectar la presencia del LPS gracias a la acción de la proteína ligando de LPS (LBP), presente en fluidos extracelulares <sup>104</sup>. La LBP se contacta físicamente con micelas de LPS libre o con bacterias Gram-negativas <sup>105</sup>, facilitando por medio de estas interacciones, la extracción de un monómero de LPS que es captado por el receptor CD14 unido a la membrana celular <sup>105,106</sup>. El CD14 existe como una proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclada a la membrana plasmática de muchas células, en particular de fagocitos, pero puede ser secretada también por otras células en

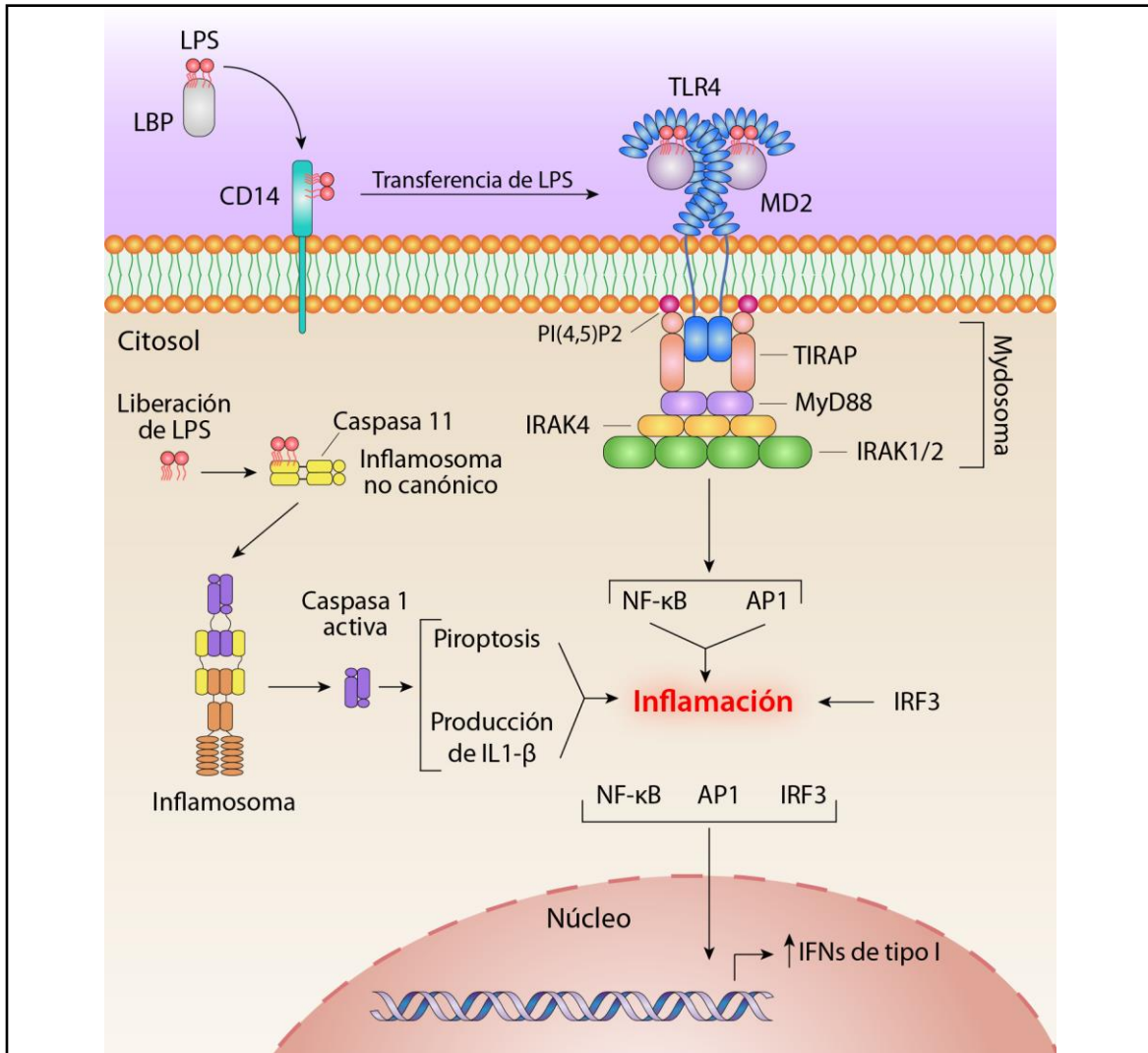
un estado soluble (GPI libre) <sup>107</sup>. Los complejos de LPS-CD14 son críticos en la respuesta inflamatoria posterior por tres razones.

Primero, el LPS presente en el complejo junto con CD14 puede ser transferido a dos juegos de heterodímeros de MD2 y TLR4 <sup>105,108,109</sup>. De estas dos proteínas, TLR4 es singular dado que existe como proteína transmembrana, sirviendo de este modo para transmitir la información de la detección del LPS al citosol <sup>110</sup>. Mecánicamente, la transferencia de LPS mediada por CD14 a dos juegos de complejos de TLR4/MD2, resulta en la dimerización del dominio citosólico Toll/IL-1R (TIR) presente en estas moléculas de TLR4, y en la acumulación de este complejo en microdominios de la membrana plasmática con características similares a los *lipid rafts* <sup>111</sup>. Los dominios dimerizados TLR4-TIR son detectados por TIRAP <sup>112,113</sup>, una proteína promiscua ligando de fosfoinosítidos <sup>114,115</sup>. Las interacciones entre TIRAP y el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P2) localizado en la membrana plasmática, posiciona a este adaptador en la superficie de la célula previo al encuentro microbiano. Este posicionamiento le permite a TIRAP detectar rápidamente dímeros de TLR4, un evento que posteriormente lleva al ensamblado de un centro citosólico supramolecular denominado mydosoma <sup>114,116</sup>. El mydosoma constituye el principal sitio subcelular para la transducción de señales provenientes de los TLRs <sup>114,117-119</sup> y consta de TIRAP, su proteína adaptadora relacionada MyD88, y varias quinasas de familia IRAK encargada de iniciar la señalización *downstream* <sup>114</sup>. Las proteínas del mydosoma promueven la respuesta inflamatoria dependiente de NF-κB y AP1, que representan la vía transduccional de TLR4 <sup>120</sup>.

La segunda función del LPS unido a CD14 es promover su propia internalización junto con la del dímero de TLR4 de la membrana plasmática <sup>121</sup>. Este proceso traslada al TLR4 a los endosomas, dando lugar a una segunda ola de activación de NF-κB y AP1 que refuerza la respuesta inducida desde la membrana plasmática <sup>121,122</sup>. La señalización de TLR4 desde los endosomas también induce respuestas transcripcionales distintas de

aquellas iniciadas en la superficie celular, que se caracterizan por ser mediadas por el factor de transcripción IRF3<sup>121,122</sup>. La activación de IRF3 es regulada por las proteínas adaptadoras TRAM y TRIF. IRF3 actúa junto a NF-κB y AP1 para dirigir la expresión de los genes de los interferones (IFNs) de tipo I, de relevancia en varias respuestas antibacterianas intrínsecas a la célula, como la autofagia y la piroptosis<sup>123,124</sup>. Mientras que TLR4 representa un cargo para esta vía endocítica, es CD14 el encargado de modular el proceso de endocitosis para posicionar a TLR4 en una localización subcelular donde la señalización dependiente de IRF3 pueda ocurrir<sup>125,126</sup>. Si bien varios reguladores de la única vía de señalización activada por CD14 ya han sido definidos<sup>121,125,127-130</sup>, los mecanismos moleculares aún no han sido dilucidados.

La tercera consecuencia de las interacciones de LPS-CD14 es la rápida modificación de los fosfoinosítidos de la membrana<sup>131,132</sup>. La detección de LPS por CD14 lleva a la activación de quinasas citosólicas fosfoinosítidas PIP5 K Iα y PIP 5 Ky, que fosforilan al fosfato 5' presente en PI(4)P localizado en la membrana plasmática, para generar PI(4,5)P2<sup>131,132</sup>. Este proceso (que es independiente de la señalización de TLR4) es notable, ya que PI(4,5)P2 es un regulador central de la localización de TIRAP así como del proceso de endocitosis y fagocitosis<sup>114,115,133</sup>. Actuando de manera *upstream* de TLR4, CD14 le transfiere LPS e inicia su dimerización estimulando posteriormente la síntesis de PI(4,5)P2. Como consecuencia de la formación del mydosoma y las respuestas inflamatorias dependientes de NF-κB/AP1, se estimula la internalización de TLR4 que resulta en la expresión dependiente de IRF3 de IFNs de tipo I. Por lo tanto, se podría considerar a CD14 como el responsable de orquestar todas las respuestas celulares a LPS inducidas por TLR4.



**ESQUEMA 3 | Vías de la respuesta inflamatoria al LPS.** El LPS es detectado inicialmente en la membrana plasmática por LBP, colaborando con CD14 a extraer este PAMP de la pared bacteriana. Luego, el CD14 transfiere el LPS al complejo TLR4-MD2, promoviendo la dimerización y activación de TLR4, proceso que estimula la síntesis de PI(4,5)P2 para inducir la formación del mydosoma y la respuesta inflamatoria dependiente de NF-κB/AP1. De esta forma, se estimula la internalización de TLR4, que consecuentemente induce la expresión dependiente de IRF3 de IFNs de tipo I. Por otra parte, el LPS que alcanza el citosol puede unirse a caspasa 11, iniciando la formación del inflamosoma no canónico dando lugar a la piroptosis. La actividad de la caspasa 11 también estimula la formación del inflamosoma canónico, el cual desencadena el procesamiento y liberación de IL1-β. Adaptado de Kagan y col., 2014; Kieser & Kagan, 2017 <sup>116,134</sup>.

Hay evidencia de que TLR4 intracelular está presente en endosomas en proceso de reciclado en fagocitos humanos y murinos <sup>135,136</sup>. Este TLR4 es movilizado a endosomas tempranos que contienen TLR4 que fue previamente internalizado desde la membrana plasmática, y aparentemente amplifica la respuesta inmune innata desde dicha localización

<sup>135</sup>. Finalmente, TLR4 endosomal es aislado dentro del lumen de cuerpos multivesiculares por un proceso dependiente del adaptador de tráfico HRS <sup>137</sup>. Este evento de aislamiento es importante para inactivar la transducción de la señal de TLR4 <sup>137</sup>.

Mientras que los estudios de la endocitosis de TLR4 dependiente de CD14 proveyeron la primera evidencia de que TLR4 no controla todas las respuestas celulares a LPS <sup>121</sup>, trabajos recientes han revelado respuestas adicionales a LPS independientes de TLR4, que no son reguladas por CD14. Por ejemplo, la entrada de LPS al citosol induce una potente respuesta de muerte celular por piroptosis <sup>138,139</sup>. Esta respuesta es importante para prevenir que las células de los mamíferos sean usadas como sustrato de crecimiento por bacterias intracelulares <sup>140</sup>. La piroptosis inducida por LPS no es dependiente de CD14 ni de TLR4, sino más bien mediada por el receptor citosólico de LPS, caspasa 11 (o caspasas 4/5 en humanos) <sup>138,139,141</sup>. La unión de LPS al dominio de activación y reclutamiento amino terminal de la caspasa 11 promueve la oligomerización de esta proteína, y la activación de su actividad enzimática intrínseca <sup>141</sup>. Luego, la caspasa 11 activada cliva su sustrato citosólico gasdermina D <sup>142,143</sup>, liberando su dominio amino terminal para que se oligomerice en un poro anular que interactúa con lípidos ácidos de la membrana plasmática, como ser PI(4,5)P2 <sup>144,145</sup>. La formación del poro de gasdermina D en la membrana plasmática altera el balance osmótico en la célula causando finalmente inflamación y ruptura de la membrana plasmática.

Mientras que el proceso por el cual el LPS promueve la piroptosis dependiente de caspasa 11 se vuelve más claro, los mecanismos por los cuales el LPS accede al citosol aún permanecen sin ser revelados. Durante las infecciones bacterianas, el LPS accede al citosol a través del daño infligido a la membrana de las células del huésped por medio de los sistemas de secreción virulentos o toxinas formadoras de poros <sup>138</sup>. Sin embargo, también la inyección de LPS en ratones induce respuestas dependientes de caspasa 11 <sup>146</sup>.

Considerando el amplio espectro de interacciones del LPS en células de mamíferos, existe una diversidad notable de mecanismos de interacción, con distintos dominios de distintas proteínas operando en diversas ubicaciones dentro y fuera de la célula.

### **Impacto de la pre-activación de la microglía y la inflamación sistémica en la progresión de enfermedades neurodegenerativas**

Aunque al día de hoy está bien establecido que la inflamación del SNC tiene un rol central en la progresión de enfermedades neurodegenerativas crónicas, los mecanismos a través de los cuales esto ocurre permanecen poco claros. La respuesta inflamatoria montada durante la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas está dominada por la microglía <sup>147</sup>. Los mecanismos mediante los cuales estas células contribuyen al daño neuronal y posterior degeneración son aún sujeto de un intenso estudio. Recientemente se ha demostrado que la inflamación sistémica es clave en la progresión de estas enfermedades. Existen vías adaptativas bien descritas para el envío de las señales sistémicas inflamatorias al cerebro, aunque si el insulto es lo suficientemente robusto como en la sepsis severa o suficientemente prolongado como en la estimulación repetida de dosis de inflamógenos como el LPS, estas vías resultan ser nocivas para el cerebro <sup>147</sup>. De hecho, dosis moderadas de estos inflamógenos son capaces de producir una nueva patología en el cerebro y exacerbar o acelerar características de la enfermedad cuando se superponen frente a una patología preexistente o una predisposición genética. En el contexto de la microglía pre-activada por la patología previa o por predisposición genética, la misma se encuentra condicionada a responder de forma más vigorosa frente a una estimulación inflamatoria subsecuente, transformando así una respuesta inflamatoria adaptativa del SNC en una que posee consecuencias dañinas para el individuo <sup>147</sup>.



La pre-activación de la microglía induce una respuesta microglial exacerbada frente a un segundo estímulo inflamatorio, más fuerte que aquella observada en la estimulación de la microglía naïve. Si bien es evidente que los cambios en la morfología, el incremento de antígenos de superficie y la proliferación son todas características asociadas a la pre-activación de la microglía, no se han definido aún marcadores claros o únicos de la microglía pre-activada <sup>148</sup>. El fenómeno de la pre-activación microglial fue descrito por primera vez en los cerebros de animales con la enfermedad priónica que fueron sujeto de un desafío con miméticos de una infección sistémica, tal como LPS o el ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C) <sup>149-152</sup> aunque hoy se ha observado en diversas condiciones asociadas a neurodegeneración crónica. Por ejemplo, en modelos animales de AD o PD <sup>147,153</sup>, los desafíos sistémicos inflamatorios generan una respuesta inmunológica exacerbada en el SNC que es mediada por el sistema inmune innato local. Aún no está claro si diversos patrones de pre-activación, que dan origen a diferentes fenotipos y perfiles moleculares, resultan de distintas formas de neurodegeneración o estímulos sistémicos inflamatorios.

Una infección periférica temporal o una exposición crónica a bajos niveles de patógenos infecciosos (esto es, por debajo de aquellos necesarios para causar síntomas clínicos), pueden no sólo activar sino también pre-activar a la microglía <sup>154</sup>. La inflamación sistémica puede también llevar a una respuesta exacerbada frente a una injuria cerebral aguda, tal como un insulto isquémico <sup>155</sup>. La exposición prolongada de macrófagos residentes a niveles muy bajos de LPS induce pre-activación más que tolerancia al LPS <sup>156</sup>, lo cual es de vital importancia en el contexto del PD: dado que los pacientes con PD son susceptibles a la constipación, en estos individuos el LPS puede escapar de los intestinos hacia la circulación sistémica <sup>157</sup>, y el aumento de la exposición sistémica al LPS podría exacerbar el proceso neurodegenerativo a través de la inducción de la pre-activación microglial <sup>158</sup>.

En roedores, el desafío sistémico inflamatorio en presencia de la microglía pre-activada genera fiebre y una expresión exagerada del *sickness behaviour*, incluyendo la pérdida de actividad motriz y anorexia. Estos cambios están asociados con el aumento de la síntesis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 así como óxido nítrico en el cerebro <sup>149-151</sup>. La respuesta inflamatoria alterada puede llevar también al aumento de la pérdida neuronal y a una aceleración en la progresión de la enfermedad. Múltiples desafíos sistémicos con poli I:C, utilizado con el propósito de mimetizar infecciones virales repetidas, en modelos murinos de la enfermedad priónica lleva a un deterioro en el rendimiento motriz en cada desafío, y particularmente a una disminución en la coordinación y la fuerza, contribuyendo así a la aceleración de la progresión de la enfermedad <sup>152</sup>.

El concepto de la pre-activación de la microglía provee de este modo una vía celular y molecular por la que la inflamación sistémica podría contribuir a la progresión de enfermedades neurodegenerativas crónicas. Además del incremento en la expresión de citocinas que pueden dañar a las neuronas, la microglía pre-activada responde a la estimulación subsecuente a través de la alteración del repertorio de receptores de un modo que podría tener importantes consecuencias. En ratones con una enfermedad neurodegenerativa crónica, el desafío sistémico inflamatorio aumenta la expresión de receptores de inmunoglobulinas del tipo Fc en la microglía, con un efecto que es muchas veces más grande que la influencia de la enfermedad neurodegenerativa o la inflamación sistémica por sí mismas <sup>159</sup>. La expresión incrementada de los receptores Fc en la microglía conlleva un cambio dramático hacia un estado pro-inflamatorio. Si bien se cree que la IgG no ingresa al parénquima cerebral, aparentemente la BHE no es impenetrable. Como consecuencia, el tratamiento de desórdenes como el AD con inmunoterapia, que promueve la remoción de placas de amiloide mediante la unión de los anticuerpos a estas <sup>160</sup>, conlleva un riesgo secundario dado por el daño tisular mediado por la activación microglial

dependiente del receptor Fc, y la inflamación resultante <sup>159</sup>. De hecho, ensayos clínicos de fase II en pacientes con AD de leve a moderado fueron interrumpidos debido a que 6% de los pacientes inmunizados desarrollaron meningoencefalitis luego de la administración del anticuerpo AN1792 junto con el adyuvante QS-21 <sup>161</sup>. Evidencia reciente a partir de estudios pre-clínicos muestra que la pre-activación de la microglía y la subsecuente respuesta inflamatoria lleva al daño tisular exacerbado en modelos animales de la enfermedad priónica <sup>153</sup>, AD <sup>162</sup>, PD <sup>163</sup>, *stroke* <sup>155</sup> y esclerosis múltiple <sup>164</sup>.

Las vías moleculares por las cuales la inflamación sistémica lleva a la inflamación del SNC y al *sickness behaviour* han sido estudiadas extensivamente en modelos murinos, usando tanto el desafío periférico con LPS como la administración de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , tanto solas o en combinación <sup>165,166</sup>. Resultados de la mayoría de los estudios sostienen la idea de que la inflamación sistémica puede resultar en la activación microglial. Por ejemplo, el desafío periférico utilizando bajas dosis de LPS es suficiente para inducir la activación de la microglía y el *sickness behaviour* tanto en humanos como en primates no humanos <sup>167-169</sup>.

En la actualidad existe un aumento en los reportes asociando el deterioro cognitivo a enfermedades sistémicas o al funcionamiento fisiológico disminuido, tal como la debilidad física <sup>170</sup>, la enfermedad renal crónica <sup>171</sup> o la diabetes mellitus de tipo II <sup>172</sup>. En línea con esto, se ha observado en pacientes con AD que la inflamación sistémica y las infecciones agudas están asociadas con una tasa aumentada de deterioro cognitivo <sup>173</sup> y exacerbación de los síntomas del *sickness* <sup>174</sup>. En la población adulta, una proporción significativa de individuos tiene más de una enfermedad sistémica <sup>175</sup>, lo que significa que la inflamación sistémica tiene una alta importancia clínica como factor de riesgo para las enfermedades neurodegenerativas.

## El PD y el concepto de los priones

El PD es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente y el desorden motriz más común. Los pacientes exhiben bradiquinesia que empeora a lo largo del tiempo, en conjunto con una de tres características adicionales: rigidez, temblor durante el reposo y perturbación del andar <sup>176</sup>. El PD se caracteriza por una extensa degeneración de las estructuras subcorticales del cerebro, especialmente de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*. El PD acompañado de demencia y la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) forman parte también del espectro biológico del PD.

Fueron Fischer y Lewy quienes describieron las inclusiones patognomónicas del PD hace ya más de 100 años, pero fue en la década del '90 que fue identificada la proteína que las constituye: la alfa-sinucleína ( $\alpha$ -SYN) <sup>177</sup>. Además, se demostró que una mutación en el SNCA (el gen que codifica para la  $\alpha$ -SYN) era causante del PD esporádico. De hecho, evidencia reciente demuestra que el PD es causado por ensamblaje de proteínas que adoptan conformaciones alternativas y se convierten en auto-propagadoras como los priones <sup>178,179</sup>.

La  $\alpha$ -SYN es también el mayor componente de las inclusiones citoplasmáticas gliales <sup>180-182</sup>, o los cuerpos de Papp-Lantos <sup>183</sup>, inclusiones filamentosas que definen a la atrofia multisistémica (MSA), un desorden del movimiento caracterizado por la ataxia cerebelar, parkinsonismo y la disfunción autonómica. En la MSA, a diferencia del PD y la DLB, se encuentran muchas inclusiones de  $\alpha$ -SYN también en oligodendrocitos y células de Schwann <sup>184,185</sup>.



ESQUEMA 4 | Resumen ilustrado del PD. Esquema adaptado de Poewe y col., 2017 <sup>186</sup>.

La  $\alpha$ -SYN se ensambla en una conformación en hoja plegada  $\beta$  capaz de inducir la agregación de la  $\alpha$ -SYN soluble en células transfectadas <sup>187,188</sup>. Estudios neuropatológicos han demostrado que la patología de Lewy, que consiste de filamentos anormales compuestos de  $\alpha$ -SYN en las neuronas, se disemina a lo largo de vías neurales en el cerebro, comenzando en el núcleo motor dorsal de los nervios glossofaríngeo y vago, el bulbo olfatorio, y el bulbo olfatorio anterior <sup>189,190</sup>. Si bien las inclusiones de Lewy se pueden encontrar también en médula espinal, ganglios autonómicos y hasta en el sistema nervioso entérico <sup>177</sup>, no está del todo claro si esto es indicativo de una diseminación desde el cerebro hacia los intestinos o a la inversa <sup>191</sup>.

En las décadas del '70 y '80, algunos pacientes con PD idiopático recibieron injertos intraestriatales de neuronas fetales dopaminérgicas. Entre diez a veintidós años más tarde,

una proporción de las neuronas injertadas estaba afectada por la patología de Lewy<sup>192,193</sup>. No se sabe cómo estas neuronas jóvenes, de donantes genéticamente no relacionados a los hospedadores, adquirieron la patología. Sin embargo, una posibilidad es que la  $\alpha$ -SYN haya sido transferida desde el cerebro del hospedador hacia las células injertadas, donde se indujo la agregación de la  $\alpha$ -SYN soluble. Se ha sugerido que priones de la  $\alpha$ -SYN del cerebro con PD del hospedador, establecidos dentro de las células injertadas, favorecen la conversión de  $\alpha$ -SYN soluble<sup>194</sup>.

Se observó que ensamblados de  $\alpha$ -SYN recombinante inducen la agregación de la  $\alpha$ -SYN cerebral y síntomas de PD en ratones transgénicos que fueron inyectados en el músculo de la pata trasera<sup>195</sup>. Se ha demostrado también la diseminación de agregados de  $\alpha$ -SYN desde la periferia hacia el cerebro en ratas salvajes (WT)<sup>196,197</sup>. Sin embargo, todavía se debe demostrar que estos agregados son capaces de inducir la agregación de  $\alpha$ -SYN endógena. La inyección intraestriatal de ensamblados recombinantes murinos de  $\alpha$ -SYN a ratones WT dio origen a inclusiones de  $\alpha$ -SYN y a cierta disfunción cerebral<sup>198</sup>. Las fibras de  $\alpha$ -SYN indujeron la formación de inclusiones de  $\alpha$ -SYN en neuronas primarias corticales de ratones WT.

Se han descrito diferencias morfológicas entre filamentos de  $\alpha$ -SYN asociadas a la enfermedad<sup>181</sup>, reportándose polimorfismos de  $\alpha$ -SYN recombinante agregada en la forma de cintas o fibras<sup>196,199</sup>. Cuando se inyectaron en la *substantia nigra* de ratas, las cintas dieron origen a la patología de Lewy, mientras que las fibras, que no indujeron esta patología, llevaron a una pérdida de neuronas dopaminérgicas. Aún debe establecerse si las cintas y fibras tienen su homólogo en las enfermedades humanas<sup>196</sup>.

Muchos investigadores encuentran muy convincentes los paralelismos entre las enfermedades priónicas y las neurodegenerativas. Sin embargo, independientemente de

que la  $\alpha$ -SYN sea capaz de diseminarse o no, comprender aún más el rol que ejerce esta proteína, determinará un avance significativo en cuanto a un mejor entendimiento del PD.

---

---

# HIPÓTESIS & OBJETIVOS

---

---



El SNC está protegido por el sistema inmune, el cual consiste de células que residen directamente dentro del mismo SNC y garantizan una correcta función neural, así como de células que migran hacia este durante la neuroinflamación. Este sistema inmune residente está constituido principalmente por células inmunes innatas y opera bajo condiciones homeostáticas. Las células mieloides que se encuentran en el parénquima cerebral y en las interfases del SNC con la periferia, son altamente especializadas pero también muy plásticas y reaccionan frente a cambios volviéndose reactivas en el contexto de desórdenes neurodegenerativos tal como el AD y el PD. Sin embargo, cuando la BHE se encuentra vulnerada en ciertas enfermedades autoinmunes como en la EAE, los monocitos, neutrófilos y linfocitos T y B, células de la inmunidad innata y adaptativa periféricas, pueden ingresar al cerebro donde ejercen distintos efectos <sup>36</sup>.

A partir de lo mencionado anteriormente es que en el presente trabajo de tesis nos planteamos responder los siguientes interrogantes:

- ¿Se activa la microglía del parénquima luego de una inflamación periférica?
- ¿Existe reclutamiento leucocitario al SNC luego de una inflamación sistémica?
- ¿De qué modo participan las citocinas y los receptores quimiotácticos en estos dos eventos?

A partir de evidencia en la literatura, de resultados previos de nuestro grupo <sup>200-207</sup> y de los interrogantes planteados anteriormente, postulamos la **hipótesis** de que las citocinas pro-inflamatorias inducidas por ligandos de receptores de tipo Toll (TLRs), son capaces de regular el reclutamiento de leucocitos al SNC, contribuyendo a la activación de la microglía y a una respuesta neuroinflamatoria.

Nuestro **objetivo general** fue estudiar los efectos que ejercen las citocinas y moléculas pro-inflamatorias sobre la activación y la capacidad migratoria de fagocitos en el

SNC. Con el fin de evaluar estas funciones importantes para el desarrollo de las respuestas inflamatorias e inmunológicas en el tejido nervioso, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Examinar *in vivo* el efecto de un estímulo pro-inflamatorio periférico inducido con LPS sobre la activación de células gliales en el SNC.
- II. Estudiar *in vivo* el reclutamiento de leucocitos periféricos al SNC luego de la administración sistémica con LPS.
- III. Identificar *in vivo* el rol de los interferones de tipo I y II en la neuroinflamación y el reclutamiento leucocitario al SNC luego de un estímulo pro-inflamatorio sistémico inducido con LPS.
- IV. Evaluar *in vivo* el impacto de la inflamación sistémica inducida con LPS en la diseminación de  $\alpha$ -SYN administrada periféricamente.

---

---

# MATERIALES & MÉTODOS

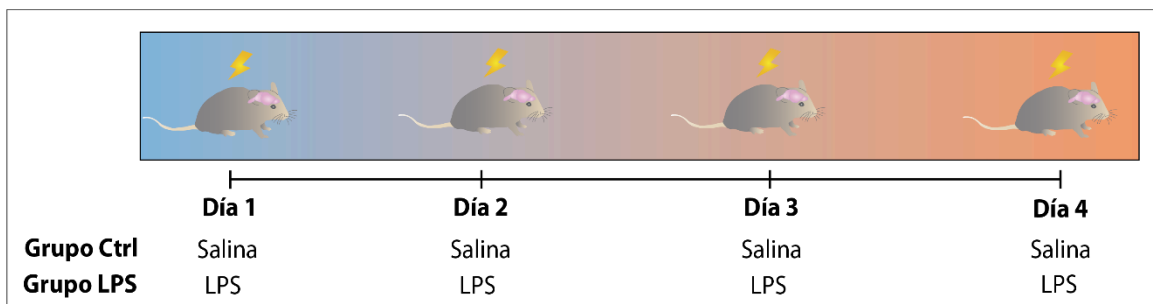
---

---

## Animales y administración de LPS o $\alpha$ -SYN

Los ratones WT C57BL/6 fueron originalmente obtenidos de la Escuela de Veterinaria de la Universidad de la Plata. Los ratones IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (de la cepa B6.129S7-Irfngtm1Ts/J) fueron obtenidos de *The Jackson Laboratory* y los IFNAR<sup>-/-</sup> (de la cepa Ifnar1tm1Ag) fueron gentilmente provistos por el *Institut Pasteur*. Ratones de entre 8 a 12 semanas de edad fueron mantenidos en el bioterio libre de patógenos de la Facultad de Ciencias Químicas, dónde todos los experimentos se realizaron en conformidad con el Consejo Departamental y el Comité de Bioseguridad y Ética de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

El LPS de *Escherichia coli* 055:B5 (purificado mediante cromatografía de filtración en gel) fue comprado a Sigma-Aldrich y reconstituido en *buffer* fosfato salino (PBS) estéril previo a su uso. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con PBS o 40  $\mu$ g de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos para inducir neuroinflamación, de acuerdo a un esquema de inyección modificado de Cardona y col. (2006) <sup>208</sup>.

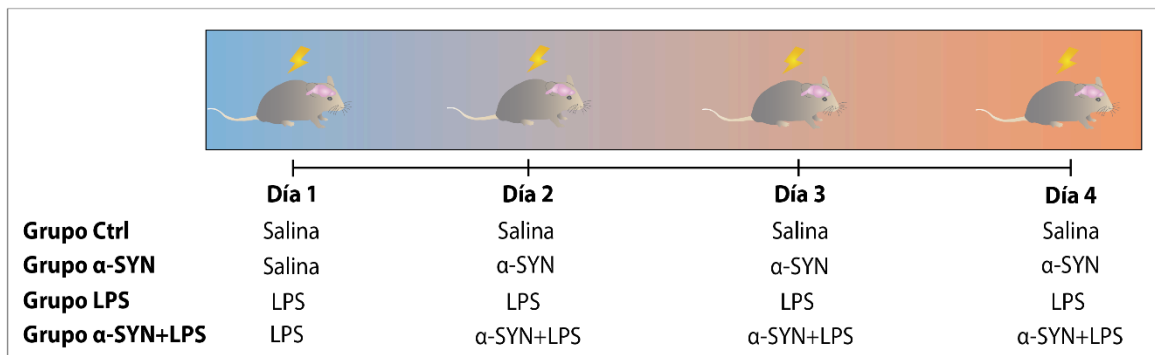


**ESQUEMA 1 | Modelo de neuroinflamación inducido por LPS.** Ratones WT C57/BL6, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> o IFNAR<sup>-/-</sup> de entre 8 a 12 semanas de edad, fueron inyectados i.p. con PBS o 40  $\mu$ g de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos para inducir neuroinflamación. Ctrl: control.

El recombinante humano de  $\alpha$ -SYN conjugado al fluorocromo Atto 488 fue gentilmente provisto por el Dr. Ronald Melki, del *Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales* perteneciente al CNRS de Francia, en el marco de su colaboración con la Prof. Dra. Veerle Baekelandt, del *Laboratory of Neurobiology and Gene Therapy* de la *KU Leuven*

de Bélgica. Los distintos polimorfismos de  $\alpha$ -SYN empleados para la inducción de neuroinflamación, fibras y cintas, fueron previamente caracterizados estructural y funcionalmente por el laboratorio del Dr. Ronald Melki <sup>199</sup>. Los ratones utilizados durante mi visita al laboratorio de la Prof. Dra. Veerle Baekelandt fueron WT C57BL/6 de entre 8 a 12 semanas de edad. Los mismos fueron inyectados i.p. al día 1 con PBS o con 20  $\mu$ g de LPS (0,8 mg/kg) y durante los 3 días siguientes con PBS, LPS, 5  $\mu$ g de  $\alpha$ -SYN (0,3 mg/kg) administrados por vía intravenosa por la vena de la cola (i.v.) o una combinación de LPS más  $\alpha$ -SYN, de acuerdo a un esquema de inyección modificado de Peelaerts y col. (2015)

196



**ESQUEMA 2 | Modelo de neuroinflamación inducido por  $\alpha$ -SYN.** Ratones WT C57/BL6 de entre 8 a 12 semanas de edad, fueron inyectados i.p. al día 1 con PBS o con 20  $\mu$ g de LPS (0,8 mg/kg) y durante los 3 días siguientes con PBS, LPS, 5  $\mu$ g de  $\alpha$ -SYN i.v. (0,3 mg/kg) o una combinación de LPS más  $\alpha$ -SYN. Ctrl: control.

## Purificación de células inmunes derivadas de cerebros o médula espinal de ratón

Doce horas luego de la última inyección, los ratones fueron pesados y anestesiados con una combinación de ketamina (106,5 mg/kg) y xilazina (10,6 mg/kg). Las células inmunes fueron purificadas de homogenatos de cerebro total o médula espinal, tal como se describe a continuación. Brevemente, los ratones fueron perfundidos intracardiácamente con PBS frío (Gibco) y los cerebros o médulas espinales fueron recolectados en DMEM

(Gibco) suplementado con sodio piruvato (Gibco) y una combinación de penicilina, estreptomicina y glutamina (Gibco); los cerebros o médulas espinales fueron luego cuidadosamente digeridos mecánicamente y resuspendidos en PBS conteniendo 3 mg/ml de colagenasa D (Roche Diagnostics) más 10  $\mu$ g/ml de DNAsa (Sigma-Aldrich) para su homogenización enzimática. Luego de esta incubación, los homogenatos fueron filtrados en *strainers* con un poro de 40  $\mu$ m (BD Biosciences), centrifugados a 1800 rpm, lavados con PBS y resuspendidos en 6 ml de Percoll<sup>®</sup> isotónico al 38% (GE Healthcare), previo a una centrifugación de 25 minutos a 800 G sin aceleración ni freno. La mielina y el debris fueron descartados. Los *pellet* de células conteniendo las células inmunes totales del cerebro o médulas espinales fueron recolectados, lavados con DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y la viabilidad celular fue determinada por exclusión con azul de Tripán usando una cámara de Neubauer. Finalmente, las células fueron marcadas para su adquisición mediante citometría de flujo o *cell sorting*.

### **Citometría de Flujo y *cell sorting***

La tinción de superficie de la suspensión de células inmunes derivadas de cerebro o médula espinal fue realizada usando protocolos estándar y analizada mediante un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) o fueron purificadas a través de un *sorter* FACS Aria III (BD Biosciences). Los *gates* para la purificación se definieron en función de la expresión de CD11b, CD45, Ly6C y Ly6G, tal como se detalla a continuación: microglía, CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>; neutrófilos, CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>; monocitos inflamatorios, CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>. El análisis de los datos se realizó mediante el FCS Express (De Novo Software). Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en el procedimiento: anticuerpo primario monoclonal contra ratón CD11b APC (BioLegend, clon M1/70), CD11b FITC (BD Pharmingen, clon M1/70), CD45 APC-Cy7 (BioLegend, clon 30-F11), CD11c PerCP (BD Pharmingen, clon N418), Ly6C PE-Cy7 (BD Pharmingen, clon AL-21), Ly6G PE (BD

Pharmingén, clon 1A8), I-A/I-E Alexa Fluor 647 (BioLegend, clon M5/114.15.2), Fc $\epsilon$ RI PE-Cy7 (eBioscience, clon MAR-1), CCR2 (Abcam, clon E68) o el anticuerpo primario policlonal contra ratón CX<sub>3</sub>CR1 (Abcam) más un anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) o anticuerpos para el control de isotipo (BD Pharmingén, APC, clon R35-95; PerCP/PE, clon A95-1; PE-Cy7, clon G155-178).

La evaluación de la expresión intracelular de los receptores de quimiocinas fue realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de fijación/permeabilización *Cytofix/Cytoperm*<sup>™</sup> (BD Biosciences). Brevemente, las células fueron marcadas en su superficie como se describió anteriormente. Luego, fueron fijadas y permeabilizadas por 20 minutos a 4°C con la solución de Fijación/Permeabilización y lavadas con el *buffer* BD de Permeabilización/Lavado<sup>™</sup>. Posteriormente, las células fueron incubadas con el *buffer* BD de Permeabilización/Lavado<sup>™</sup> conteniendo el anticuerpo monoclonal contra ratón CCR2 (Abcam, clon E68) o el anticuerpo policlonal contra ratón CX<sub>3</sub>CR1 (Abcam). Finalmente, las células fueron lavadas con el *buffer* BD de Permeabilización/Lavado<sup>™</sup> y resuspendidas en el mismo *buffer* conteniendo el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

### **Ensayos de supresión *ex vivo***

Microglía o monocitos inflamatorios purificados de ratones endotoxémicos, estimulados o no con una combinación de LPS (100 ng/ml) más interferón gamma (IFN- $\gamma$ , 20 ng/ml) (Peprotech), fueron co-cultivados con esplenocitos derivados de ratones control naïve y previamente marcados con éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE, 4  $\mu$ M) (Molecular Probes), en una relación 1:1 (1x10<sup>5</sup> células/ml). Para la proliferación celular, los co-cultivos fueron mantenidos durante 72 horas en placas *multi-well* de 96 con fondo en U en presencia o ausencia de concanavalina A (Con A, 5  $\mu$ g/ml) (Sigma-Aldrich) en RPMI (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco). Las células fueron luego levantadas,

marcadas con CD4 APC (BD Pharmingen, clon RM4-5) y CD8 PE (BD Pharmingen, clon 53-6.7) y analizadas como se describió anteriormente.

### **Transcripción reversa del mRNA y cuantificación mediante PCR en tiempo real**

Los homogenatos de cerebro total o las células purificadas fueron incubadas con TRIzol® (Invitrogen), luego se extrajo el RNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se conservó a -80°C. El RNA total fue cuantificado usando un espectrofotómetro Synergy HT (BioTek), del cual 1 µg fue tratado con DNAsa (Sigma-Aldrich) y sometido a retrotranscripción usando el *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR en tiempo real fue realizada en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems) usando la SYBR® *Green Real-Time PCR Master Mix* (Applied Biosystems). La cuantificación relativa (RQ) fue realizada a través del software StepOne™ V2.2.2, basado en la ecuación  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde el Ct es el ciclo umbral para detectar fluorescencia. Los datos del Ct fueron normalizados al estándar interno HPRT1. Las secuencias de *primers* se detallan a continuación: CCL2, *sense*: CCC ACT CAC CTG CTA CT, *anti-sense*: TCT GGA CCC ATT CCT TCT TG; CCR2, *sense*: GTG TGA TTG ACA AGC ACT TAG ACC, *anti-sense*: GGA GAG ATA CCT TCG GAA CTT CTC; CX<sub>3</sub>CL1, *sense*: CGA AAT GCG AAA TCA TGT GCG AC, *anti-sense*: GAC TCC TGG TTT AGC TGA TAG CG; CX<sub>3</sub>CR1: GGA CTC ACT ACC TCA GCC, *anti-sense*: TCC GGT TGT TCA TGG AGT TGG; CXCL1, *sense*: CAC CTC AAG AAC ATC CAG AGC, *anti-sense*: GGT CGC GAG GCT TGC CTT GA; CXCR2, *sense*: CTG GCA TGC CCT CTA TTC TGC, *anti-sense*: GCT GGT CAT CTT ATA CAA CGG G; IFN- $\beta$ , *sense*: TTA CAC TGC CTT TGC CAT CC, *anti-sense*: ACT GTC TGC TGG AGT TCA T; IFNAR, *sense*: CGA GGC GAA GTG GTT AAA A, *anti-sense*: ACG GAT CAA CCT CAT TCC AC; HPRT1, *sense*: TCA GTC AAC GGG GGA CAT AAA, *anti-sense*: GGG GCT GTA CTG CTT AAC CAG.



## Tinción con H&E e inmunofluorescencia

Doce horas luego de la última inyección, los animales fueron pesados y anestesiados con una combinación de ketamina (106,5 mg/kg) y xilazina (10,6 mg/kg). Los animales fueron perfundidos intracardiácamamente una vez con PBS frío (Gibco) y luego con paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron recolectados en paraformaldehído al 4% para una fijación adicional *overnight* e incubados en sucrosa al 30% hasta su procesamiento.

Para la tinción con hematoxilina y eosina (H&E), los cerebros fueron embebidos en parafina, cortados en secciones de 10  $\mu\text{m}$  de espesor usando un criostato Shandon Cryotome E (Thermo Scientific) y montados en portaobjetos adhesivos Starfrost® (Knitell Glass). Luego, las secciones fueron sumergidas en hematoxilina y lavadas en agua destilada. Posteriormente, los portaobjetos fueron sumergidos en eosina y lavados 3 veces con alcohol isopropílico al 95%. Seguidamente, las secciones fueron lavados de forma rápida una vez en una solución combinada de xilol y etanol y 2 veces en xilol. Finalmente, los portaobjetos fueron montados con una gota de bálsamo de Canadá y analizados bajo un microscopio TE 2000-Ulight (Nikon) con una cámara digital ACT-2U unida al mismo para capturar las imágenes.

Para la inmunofluorescencia, los cerebros fueron embebidos en el compuesto *Tissue-Tek® Optimal Cutting Temperature* (Sakura), cortados en secciones de 10  $\mu\text{m}$  de espesor usando un criostato Shandon Cryotome E (Thermo Scientific) y montados en portaobjetos adhesivos Starfrost® (Knitell Glass). Las secciones fueron rehidratadas con *buffer* de bloqueo compuesto por albúmina sérica bovina (BSA) al 10% y tritón al 0,3% en *buffer* tris salino (TBS), lavadas con TBS (Gibco) e incubadas *overnight* a 4°C con las correspondientes diluciones de los anticuerpos primarios CD45 (BioLegend, clon 30-F11), CD31 (Santa Cruz, clon M-20) o GFAP (Abcam, clon GF5) en solución de bloqueo. Luego de varios lavados, las secciones fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados

a los fluorocromos Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), Alexa Fluor 546 (Molecular Probes) o Alexa Fluor 633 (Molecular Probes) y contracolorados con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Los portaobjetos fueron analizados bajo un microscopio confocal de fluorescencia FV1000 (Olympus).

### **Análisis estadístico**

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  error estándar (s.e.m.). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el Prism<sup>®</sup> 7.0 (GraphPad Software). Las medias entre dos grupos se compararon mediante un test *t* no pareado. Las medias entre tres o más grupos se compararon con un análisis de la varianza a una o dos vías seguido del test *a posteriori* de Tukey. Los grados de significancia fueron determinados como se detalla a continuación: \* si  $p < 0.05$ , \*\* si  $p < 0.01$ , \*\*\* si  $p < 0.001$ .

---

---

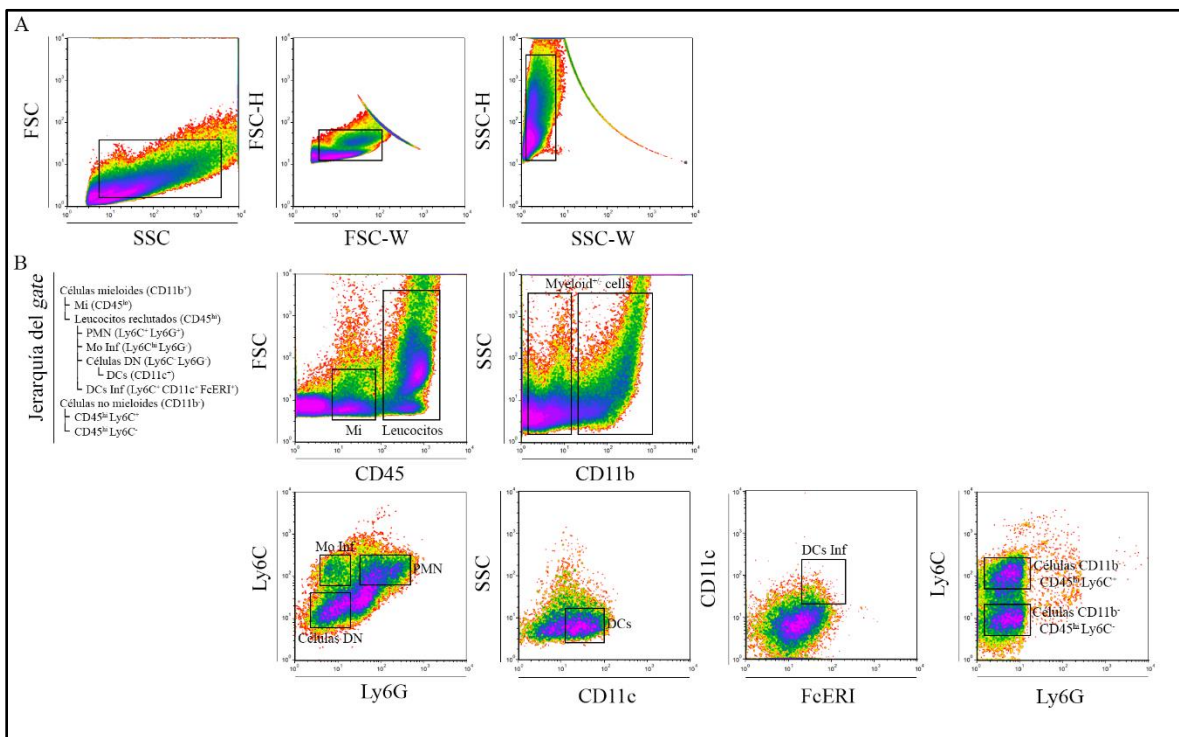
# RESULTADOS

---

---

## El desafío con LPS sistémico induce activación glial y reclutamiento de monocitos inflamatorios periféricos al SNC

La vigilancia inmunológica del SNC es dinámica, específica y está estrictamente regulada. En la inflamación sistémica, la BHE puede vulnerarse, permitiendo el acceso al parénquima cerebral de células inmunes <sup>36,209</sup>. Con el fin de evaluar la neuroinflamación y establecer qué células estarían involucradas en este proceso luego de un desafío sistémico con LPS, estudiamos la activación glial y el reclutamiento de células inmunes periféricas al sistema nervioso central a través de una estrategia de *gating* multiparamétrico mediante citometría de flujo (**Figura 1A y B**).

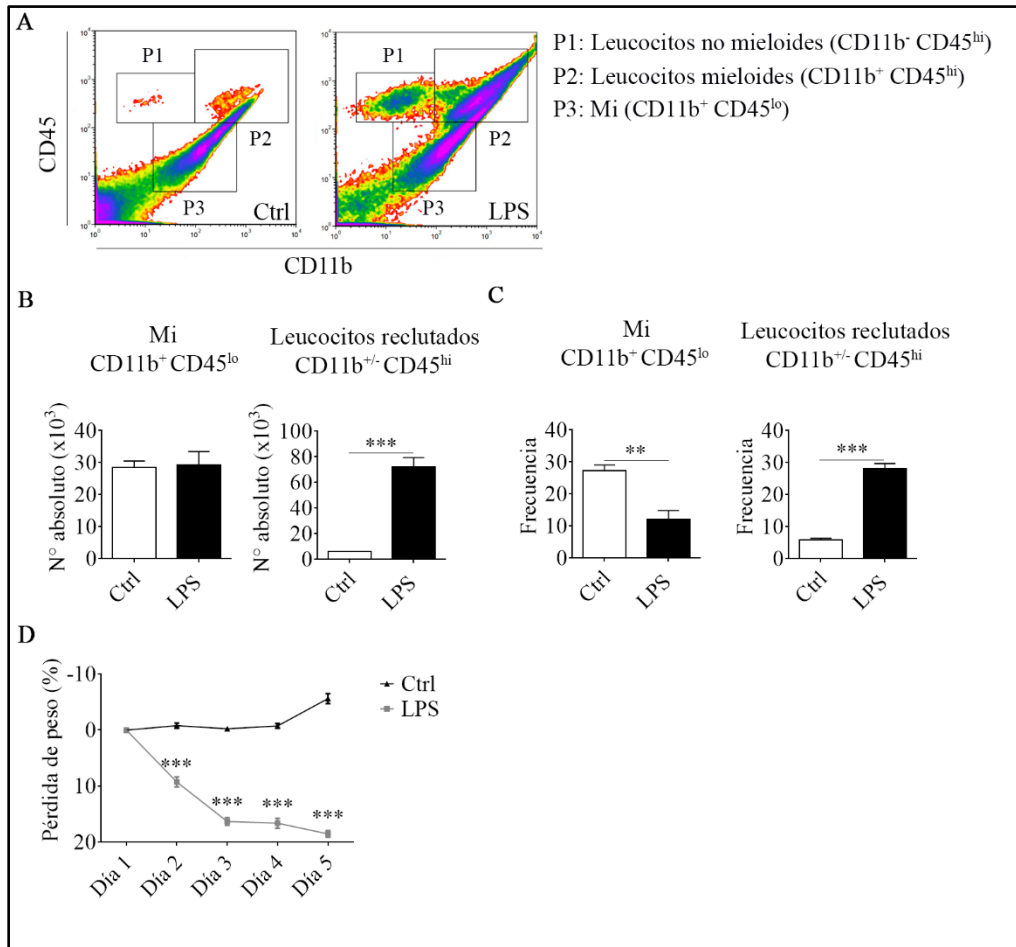


**FIGURA 1 | Secuencia de *gating* multiparamétrico empleada para el análisis por citometría de flujo y *cell sorting*.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total o médula espinal fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo o *cell sorting*. **(A)** Los *density-plots* FSC vs. SSC, FSC-W vs. FSC-H y SSC-W vs. SSC-H, ilustran la estrategia de análisis empleada para descartar los dobletes. **(B)** La jerarquía del *gate* representa la secuencia estratégica adoptada para evaluar las características fenotípicas de las células inmunes. Los *gates*

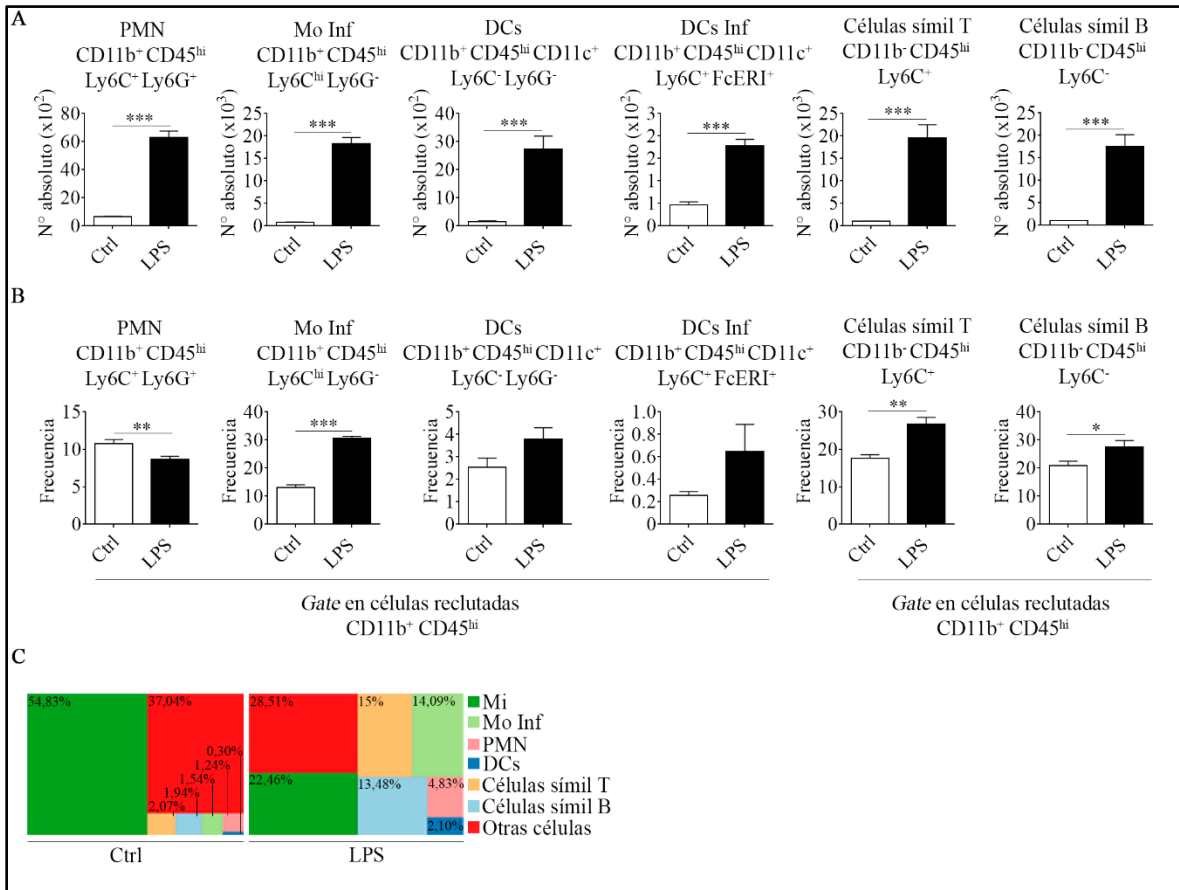
rectangulares fueron utilizados en todos los casos con un propósito estadístico más que para la selección de una población celular.

Para discriminar apropiadamente entre poblaciones inmunes residentes y periféricas, aprovechamos la expresión diferencial de la integrina CD11b y del marcador pan-leucocitario CD45 en la microglía (CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>) y en los leucocitos reclutados (CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>) (**Figura 2A, B y C**). Luego de la estimulación con LPS y basados en este criterio de selección, no encontramos cambios en el número absoluto pero sí en la frecuencia de la microglía debido al intenso reclutamiento de leucocitos periféricos. Este efecto fue acompañado de una notable pérdida de peso en los ratones, posiblemente como consecuencia del desarrollo de *sickness behaviour* (**Figura 2D**).

Para caracterizar fenotípicamente el tráfico leucocitario hacia el SNC, identificamos en ratones tratados con LPS, a los neutrófilos (CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>) y los monocitos inflamatorios (CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>) como las poblaciones de fagocitos más respondedoras asociadas al SNC, entre los leucocitos innatos mieloides CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> (**Figura 3A y B**). De la misma forma, notamos un incremento en el reclutamiento de células dendríticas, células presentadoras de antígeno profesionales CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup> y de una subpoblación distintiva, derivada de monocitos que se diferencian *in situ* bajo condiciones inflamatorias, denominada células dendríticas inflamatorias (CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup>). Además, encontramos células CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> con características similares a células T (Ly6C<sup>+</sup>) y B (Ly6C<sup>-</sup>) (**Figura 3A y B**).



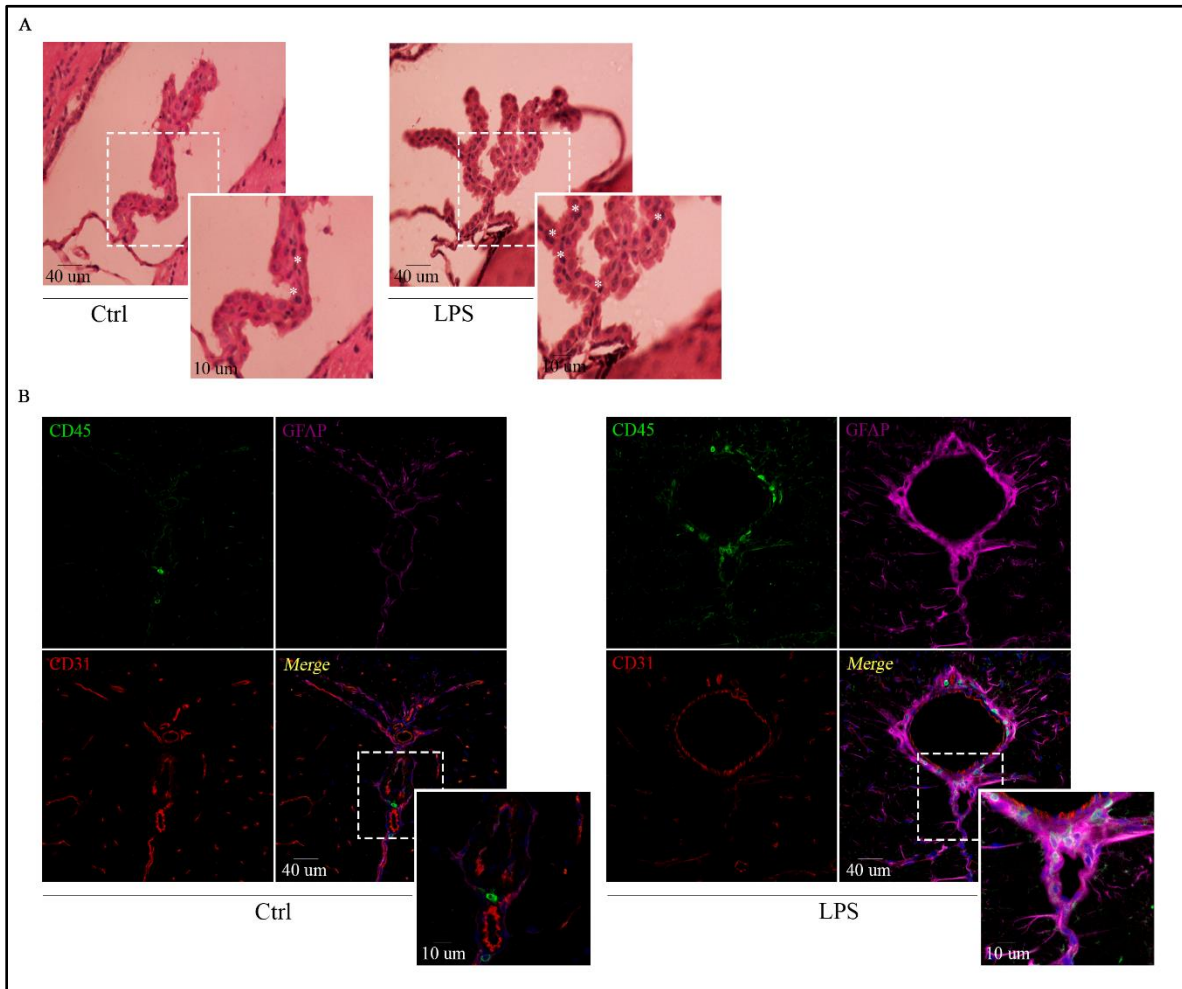
**FIGURA 2 | La estimulación con LPS induce el reclutamiento de células CD11b<sup>+/-</sup> CD45<sup>hi</sup> al SNC.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** *Density-plot* CD45 vs. CD11b representativo, ilustrando la estrategia de análisis empleada. P1: leucocitos no mieloides reclutados CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup>; P2: leucocitos mieloides reclutados CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>; P3: microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>. Los *gates* rectangulares fueron utilizados en todos los casos con un propósito estadístico más que para la selección de una población celular. **(B)** El número absoluto y **(C)** la frecuencia de la microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> y los leucocitos reclutados CD11b<sup>+/-</sup> CD45<sup>hi</sup>, fueron evaluados por citometría de flujo. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). **(D)** La pérdida de peso de los ratones fue determinada luego de la inyección i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes (n= 3-20 animales por grupo). Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía.



**FIGURA 3 | Características fenotípicas de las células inmunes involucradas en la neuroinflamación de cerebros de ratones endotoxémicos.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** El número absoluto y **(B)** la frecuencia de neutrófilos CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup>, monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>, células dendríticas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> Ly6G<sup>-</sup>, células dendríticas inflamatorias CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> FcεRI<sup>+</sup>, células símil T CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> y B CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>-</sup>, fueron evaluados por citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones corresponden al *gate* de células reclutadas CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>hi</sup>. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). **(C)** Se muestra un *tree map* jerárquico representativo comparando la frecuencia de las poblaciones residentes y periféricas en ratones control vs. endotoxémicos, analizadas previamente mediante citometría de flujo. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía; Mo Inf: monocitos inflamatorios; PMN: neutrófilos; DCs: células dendríticas; DCs Inf: células dendríticas inflamatorias; Otras células: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Nuestros resultados muestran claramente cómo una molécula pro-inflamatoria como el LPS, es capaz de promover la redistribución de las frecuencias de las distintas

poblaciones de leucocitos reclutados al SNC en comparación con la de poblaciones gliales o neuronales (**Figura 3C**).



**FIGURA 4 | El desafío con LPS induce activación glial y el reclutamiento de leucocitos a órganos circunventriculares.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 μg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y los cerebros recolectados. **(A)** Tinción con H&E del plexo coroideo. Barras de escala, 40 μm (paneles principales), 13 μm (recuadro). Los asteriscos indican los leucocitos reclutados. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). **(B)** Inmunofluorescencia confocal de órganos circunventriculares donde se muestra microglía CD45<sup>lo</sup> y leucocitos reclutados CD45<sup>hi</sup> (arriba a la izquierda, en verde), astrocitos positivos para la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) (arriba a la derecha, en magenta falsamente coloreado) y células endoteliales CD31<sup>+</sup> (abajo a la izquierda, en rojo). La contracoloración con DAPI (en azul) revela los núcleos. Barras de escala, 40 μm (paneles principales), 13 μm (recuadro). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). Ctrl: control.

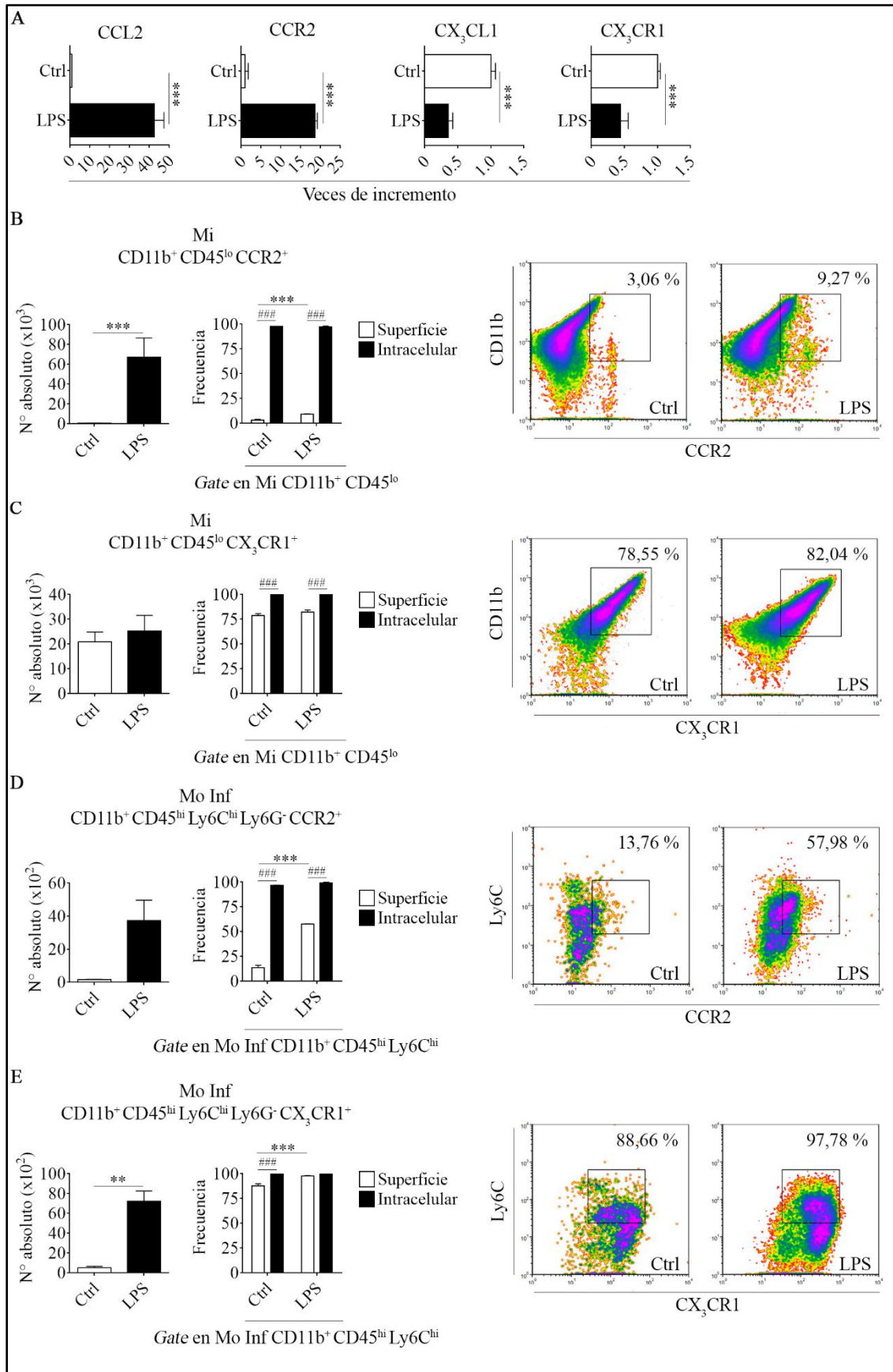


Hallazgos recientes han revelado un rol central para los órganos circunventriculares como sitios de acceso al SNC, durante el tráfico de los leucocitos periféricos. Por esta razón, evaluamos la neuroinflamación y determinamos la localización de los leucocitos reclutados al cerebro mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. La coloración con H&E reveló el reclutamiento de leucocitos en el plexo coroideo de ratones endotoxémicos (**Figura 4A**), confirmando así la relevancia de este sitio en la vigilancia inmunológica del cerebro. Cuando utilizamos microscopía confocal, aprovechamos tanto la morfología estrellada como la baja expresión del *cluster* de diferenciación CD45 en microglía, para distinguirlas de los leucocitos periféricos con forma redondeada y alta expresión de este marcador. De esta manera, el LPS sistémico indujo reactividad microglial y de astrocitos GFAP<sup>+</sup>, según se evidencia en el acortamiento y engrosado de los procesos gliales. Además, favoreció el reclutamiento de leucocitos inflamatorios particularmente próximo a células endoteliales CD31<sup>+</sup>, en órganos circunventriculares (**Figura 4B**).

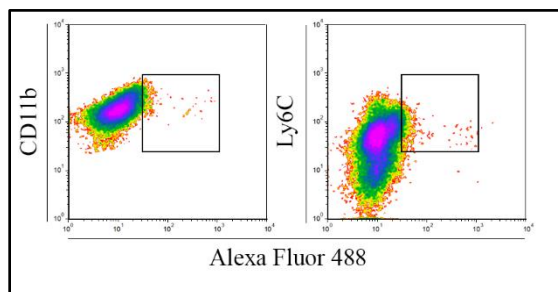
Nuestros resultados demuestran que las células inmunes se mantienen en el compartimento perivascular, sugiriendo al menos que bajo estas circunstancias no habría señales en el microambiente para infiltrar al parénquima cerebral.

### **La estimulación con LPS modula la expresión de CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1 en microglía residente y monocitos inflamatorios periféricos**

Las quimiocinas y sus receptores ejercen un rol activo induciendo el acceso de células mieloides al SNC <sup>210,211</sup>. Para comprender la activación de la microglía y la migración selectiva de monocitos inflamatorios luego de un desafío con LPS, evaluamos la relación CCL2/CCR2 y CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1.



**FIGURA 5 | Incremento de células residentes de cerebro CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> y periféricas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> con expresión de CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1 en animales tratados con LPS.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y el RNA extraído o las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** Análisis de la expresión génica de CCL2, CCR2 y CX<sub>3</sub>CL1, CX<sub>3</sub>CR1 en cerebro total por medio de PCR en tiempo real. El cálculo de la cuantificación relativa (RQ) fue basado en la ecuación  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde el Ct es el ciclo umbral para detectar fluorescencia. Los datos del Ct fueron normalizados al estándar interno HPRT1. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes (n = 3 animales por grupo). **(B y D)** El número absoluto y **(C y E)** la frecuencia de la microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> y los monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> expresando CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1, fueron evaluados mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones corresponden al *gate* de células CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> o CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup>, respectivamente. Los *density-plots* representativos ilustran la estrategia de análisis empleada mientras que los *gates* rectangulares fueron utilizados en todos los casos con un propósito estadístico más que para la selección de una población celular. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 3-6 animales por grupo). Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía; Mo Inf: monocitos inflamatorios.



**FIGURA 6 | Control de la marcación intracelular.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, los ratones endotoxémicos fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Los *density-plots* CD11b/Ly6C vs. Alexa Fluor 488 ilustran el control del anticuerpo secundario de la marcación intracelular de CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1. Los *gates* rectangulares fueron utilizados en todos los casos con un propósito estadístico más que para la selección de una población celular.

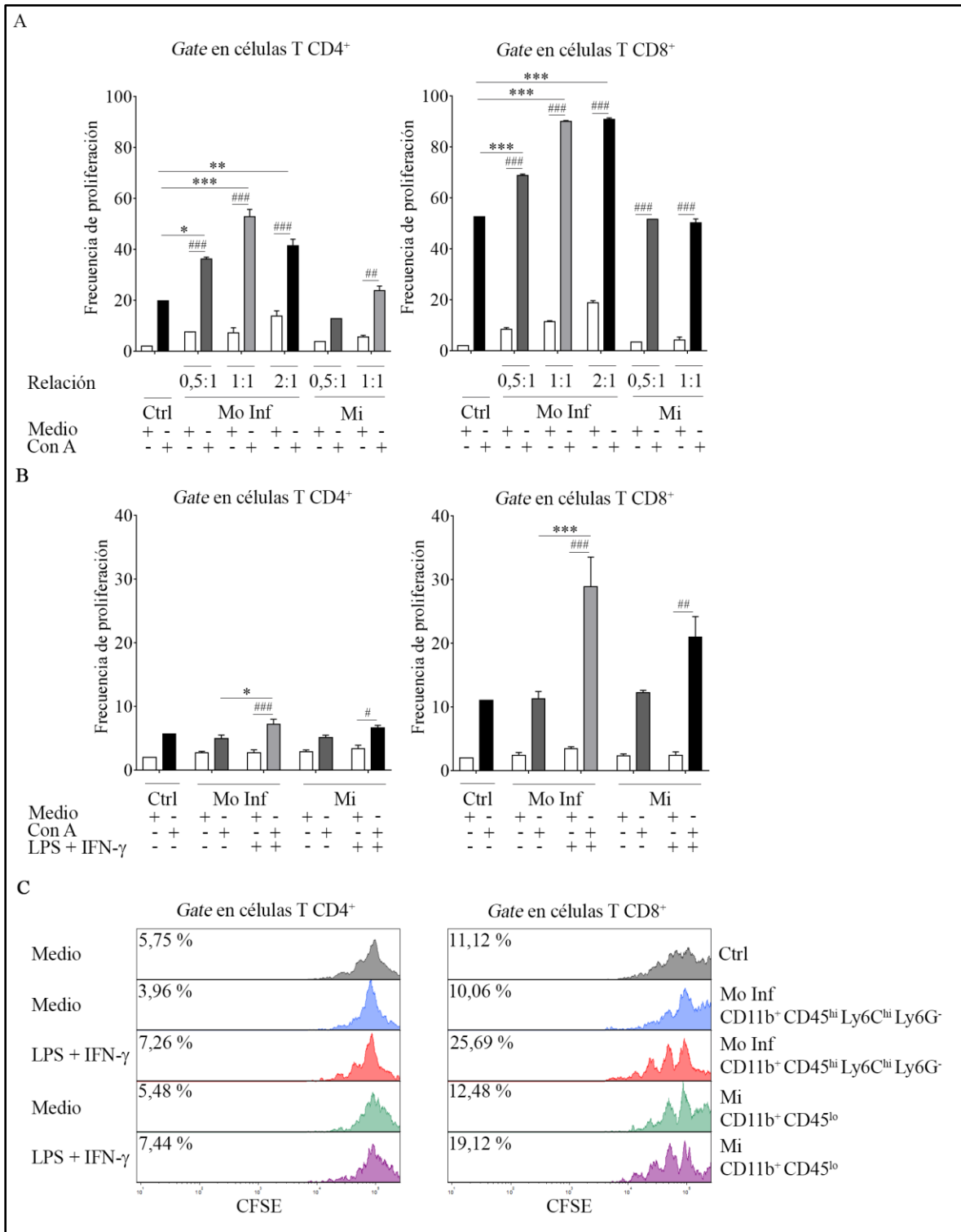
La administración sistémica de LPS moduló de forma inversa la relación quimiocina/receptor, tal como determinamos debido el incremento en los niveles de expresión génica de CCL2 y CCR2 y la disminución de CX<sub>3</sub>CL1 y CX<sub>3</sub>CR1 en cerebro total de ratones tratados con LPS (**Figura 5A**). Con el propósito de profundizar aún más en la caracterización de la respuesta dada por la estimulación con LPS en microglía residente y monocitos inflamatorios periféricos, realizamos la marcación de superficie e intracelular (ver

controles en **Figura 6**) de los receptores de quimiocinas CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1 en dichas poblaciones (**Figura 5**). Notamos un aumento en el número absoluto de microglía expresando CCR2 en su superficie (**Figura 5B**) y monocitos inflamatorios CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> (**Figura 5E**), luego de la administración sistémica de LPS.

Estos resultados insinúan un mecanismo de retroalimentación positiva entre el reclutamiento de células CCR2<sup>+</sup> y la exacerbación de la respuesta inflamatoria a través de la disminución de CX<sub>3</sub>CL1 y CX<sub>3</sub>CR1 inhibitorios, según se muestra mediante PCR cuantitativa en tiempo real. De manera similar, los ensayos a través de citometría de flujo demuestran que a pesar de no modular la expresión intracelular de CCR2 o CX<sub>3</sub>CR1 en la microglía o los monocitos inflamatorios, el LPS fue capaz de incrementar la expresión de ambos receptores de quimiocinas en estas poblaciones respectivamente.

### **Monocitos inflamatorios pre-activados *in vivo* con LPS regulan la proliferación de células T**

Al día de hoy, varios estudios han descrito a los monocitos como células altamente inflamatorias y con una gran capacidad migratoria, mientras que han caracterizado a la microglía como células mieloides del SNC que conforman la primera línea de defensa frente a patógenos y con una activa motilidad <sup>212</sup>. Con el fin de evaluar el perfil de estas células, abordamos la hipótesis de que los monocitos inflamatorios y la microglía podrían estar ejerciendo distintos roles funcionales en la neuroinflamación, promoviendo o suprimiendo la respuesta proliferativa de células T.



**FIGURA 7 | Función inmune de células inflamatorias CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> purificadas luego de un desafío sistémico con LPS.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 µg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior adquisición mediante *cell sorting*. **(A)** Monocitos

inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> o microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> pre-activados *in vivo* con LPS y purificados a través de *cell sorting* de un conjunto de cerebros de ratón, fueron co-cultivados en una relación 1:1 (1 x10<sup>5</sup> cél/ml) en presencia o ausencia de Con A (5 µg/ml), con esplenocitos naïve marcados con CFSE (4 µM). **(B)** Las células de ratones endotoxémicos fueron desafiadas o no *ex vivo* con una combinación de LPS (100 ng/ml) más IFN-γ (20 ng/ml) previo al co-cultivo. La frecuencia de proliferación de células T fue examinada luego de 72 horas mediante dilución del CFSE a través de citometría de flujo. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes (n = 17-20 animales). **(C)** Histogramas representativos muestran la dilución del CFSE. Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mo Inf: monocitos inflamatorios; Mi: microglía.

Para ello, realizamos un ensayo de proliferación en el que los monocitos inflamatorios o la microglía purificada del SNC fueron co-cultivados con esplenocitos *naïve* en presencia o no de Con A. Interesantemente encontramos que, a diferencia de la microglía, los monocitos inflamatorios pre-activados con LPS fueron capaces de inducir la proliferación de células T de manera dependiente a su relación **(Figura 7A)**. Para profundizar en este mecanismo, buscamos comprobar si los monocitos inflamatorios periféricos y la microglía residente podrían tener una plasticidad funcional diferencial. Con este objetivo, previo al co-cultivo con los esplenocitos, expusimos o no a estas células a un nuevo desafío *ex vivo* con una combinación de LPS más IFN-γ como una combinación de múltiples señales de activación. Sorprendentemente, la re-estimulación de las células evidenció una exacerbación de la proliferación de células T inducida por los monocitos inflamatorios **(Figura 7B)**, en comparación con la condición de LPS solo, tal como se evidencia mediante la dilución del CFSE en los histogramas **(Figura 7C)**. Es importante mencionar que si bien entre las **Figuras 7A y B** encontramos diferencias respecto a la magnitud de la frecuencia de proliferación de las células T, posiblemente esto se deba al decaimiento del efecto de la Con A, conservándose el patrón de respuesta de las células T.

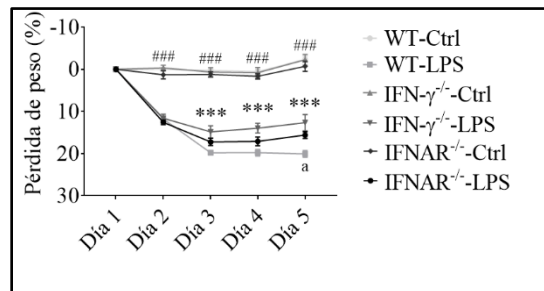
Estos resultados demuestran que los monocitos y la microglía son sensibles a la re-estimulación pro-inflamatoria y que, como sugiere la débil respuesta proliferativa T CD4<sup>+</sup> en comparación a la proliferación de células T CD8<sup>+</sup>, podrían regular diferencialmente la amplificación de subpoblaciones de células T.

## Los IFNs de tipo I son requeridos en el reclutamiento de monocitos inflamatorios al SNC en animales endotoxémicos

Estudios recientes han propuesto a los IFNs como mediadores cruciales en el funcionamiento del cerebro, aunque aún existen muchos interrogantes respecto al rol de estas moléculas en el SNC<sup>213-217</sup>. Para profundizar en la comprensión de la función de estas citocinas y evaluar si podrían estar participando en la modulación de la neuroinflamación, apelamos a nuestra estrategia de análisis mediante citometría de flujo, descrita previamente.

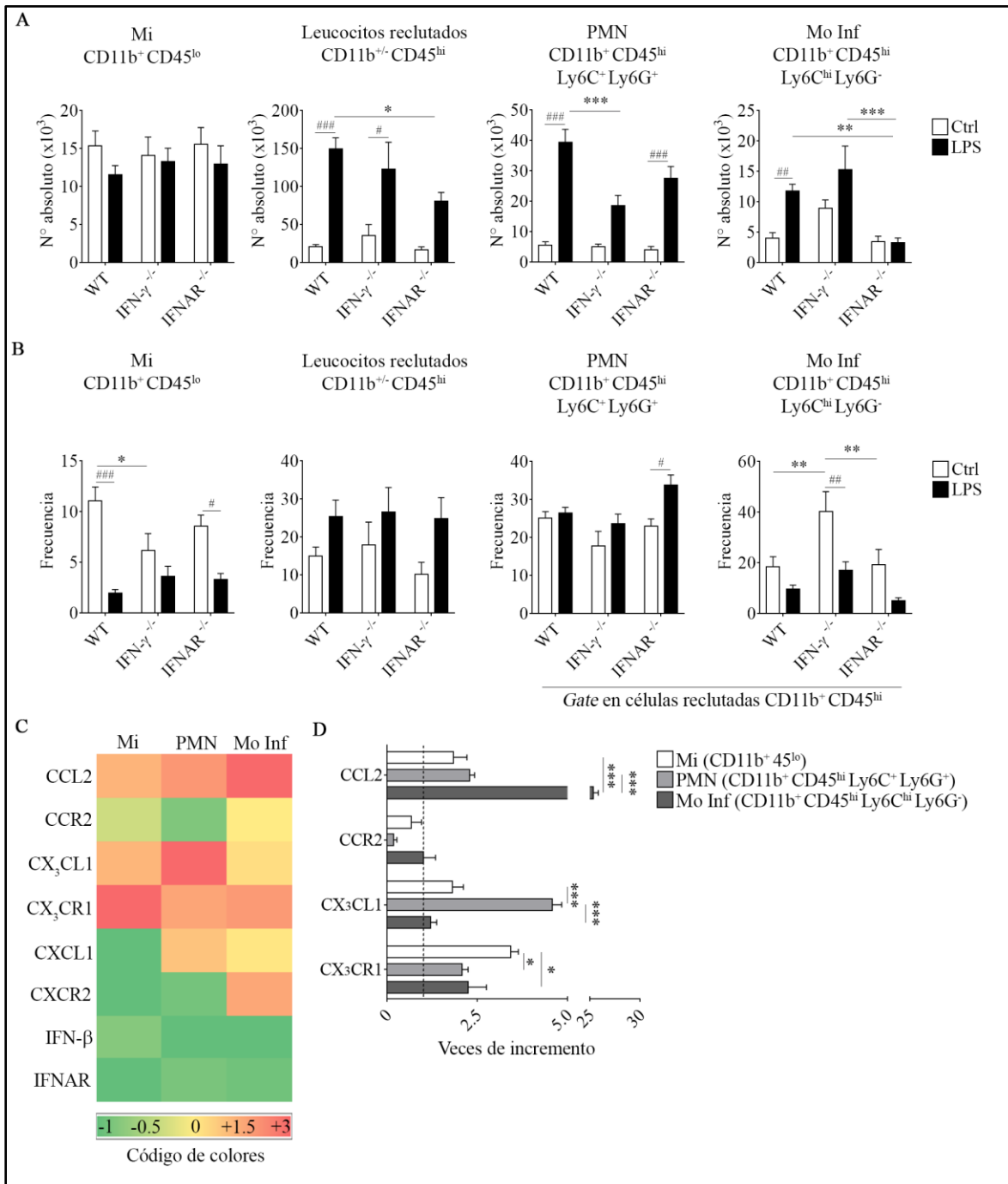
Luego del desafío sistémico con LPS en ratones deficientes en IFNs de tipo I o WT, no encontramos ninguna variación en el número absoluto de microglía pero sí una disminución en el número absoluto de leucocitos periféricos reclutados en ratones *knock-out* (KO) para el receptor de IFN- $\alpha/\beta$  (IFNAR<sup>-/-</sup>) en comparación con los WT (**Figura 9A**). Este efecto fue acompañado de una mejora en el peso (**Figura 8**), hecho que podría correlacionarse con la disminución en el reclutamiento de células inmunes a su SNC. De forma inesperada, encontramos que el LPS favoreció el reclutamiento de monocitos inflamatorios periféricos por sobre el de neutrófilos, en animales carentes de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Además los monocitos inflamatorios, al contrario de los neutrófilos, fueron reclutados al SNC de forma dependiente de los IFNs de tipo I, según se muestra a través de la reducción de su reclutamiento en cerebros derivados de ratones IFNAR KO (**Figura 9A y B**). En este sentido, únicamente los ratones WT desafiados con LPS mostraron un aumento en el reclutamiento de monocitos inflamatorios positivos para MHC II (**Figura 10**). Para aclarar el mecanismo subyacente por el cual los monocitos inflamatorios periféricos deficientes de IFNAR fueron incapaces de migrar efectivamente al SNC luego de la administración sistémica de LPS, nos propusimos identificar el mediador molecular involucrado en esta respuesta. De este modo, purificamos neutrófilos, monocitos

inflamatorios y microglía para determinar la expresión génica de varias relaciones quimiocina/receptor consideradas críticas en el tráfico de estas células al cerebro. Como se representa en la matriz de genes (**Figura 9C**), el incremento en los niveles de expresión génica de CCL2 en los monocitos inflamatorios sugiere una función redundante en el reclutamiento de estas células.



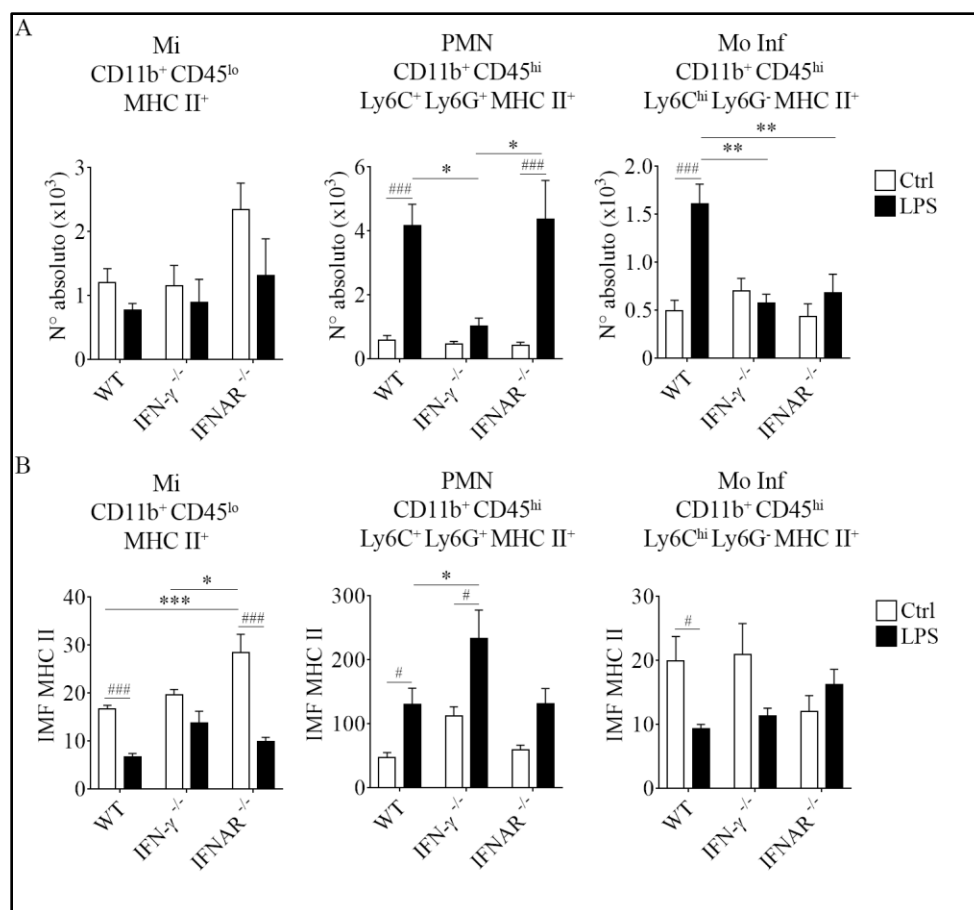
**FIGURA 8 | Comparación de la pérdida de peso entre ratones WT, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup> luego del estímulo con LPS.** La pérdida de peso fue evaluada en ratones WT, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup> luego de la inyección i.p. con PBS o 40  $\mu$ g de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes (n = 3-4 animales por grupo) por cada cepa *knock-out* de ratón. Los datos son expresados como la media  $\pm$  s.e.m. Los grados de significancia fueron determinados como se detalla a continuación: ### si  $p < 0.001$  (WT-Ctrl, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>-Ctrl e IFNAR<sup>-/-</sup>-Ctrl vs. WT-LPS, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>-LPS e IFNAR<sup>-/-</sup>-LPS); \*\*\* si  $p < 0.001$  (WT-LPS vs. IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>-LPS); a si  $p < 0.001$  (WT-LPS vs. IFNAR<sup>-/-</sup>-LPS). Ctrl: control.





**FIGURA 9 | Disminución del reclutamiento de células inflamatorias CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> en ratones endotoxémicos IFNAR<sup>-/-</sup>.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40  $\mu$ g de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo o purificación a través de *cell sorting*. **(A)** El número absoluto y **(B)** la frecuencia de microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>, leucocitos reclutados CD11b<sup>+/-</sup> CD45<sup>hi</sup>, neutrófilos CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> y monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> derivados de ratones WT, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup>, fueron evaluados por citometría de flujo. Los resultados representan el promedio de tres experimentos

independientes (n = 3-4 animales por grupo) por cada cepa *knock-out* de ratón. **(C)** Se muestra un *heat map* representando el análisis de la expresión génica (veces de incremento) mediante PCR en tiempo real de CCL2, CX<sub>3</sub>CL1, CXCL1, IFN-β y CCR2, CX<sub>3</sub>CR1, CXCR2, IFNAR en microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>, neutrófilos CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> y monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> pre-activados con LPS y purificados de un conjunto de cerebros de ratones endotoxémicos WT vs. IFNAR<sup>-/-</sup>. El cálculo de la cuantificación relativa (RQ) fue basado en la ecuación  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde el Ct es el ciclo umbral para detectar fluorescencia. Los datos del Ct fueron normalizados al estándar interno HPRT1. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes (n = 9-17 animales por grupo). **(D)** Comparación entre la expresión génica de CCL2, CX<sub>3</sub>CL1 y CCR2, CX<sub>3</sub>CR1 en microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>, neutrófilos CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> y monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> pre-activados con LPS de ratones WT (línea discontinua) vs. IFNAR<sup>-/-</sup>. Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía; PMN: neutrófilos; Mo Inf: monocitos inflamatorios.



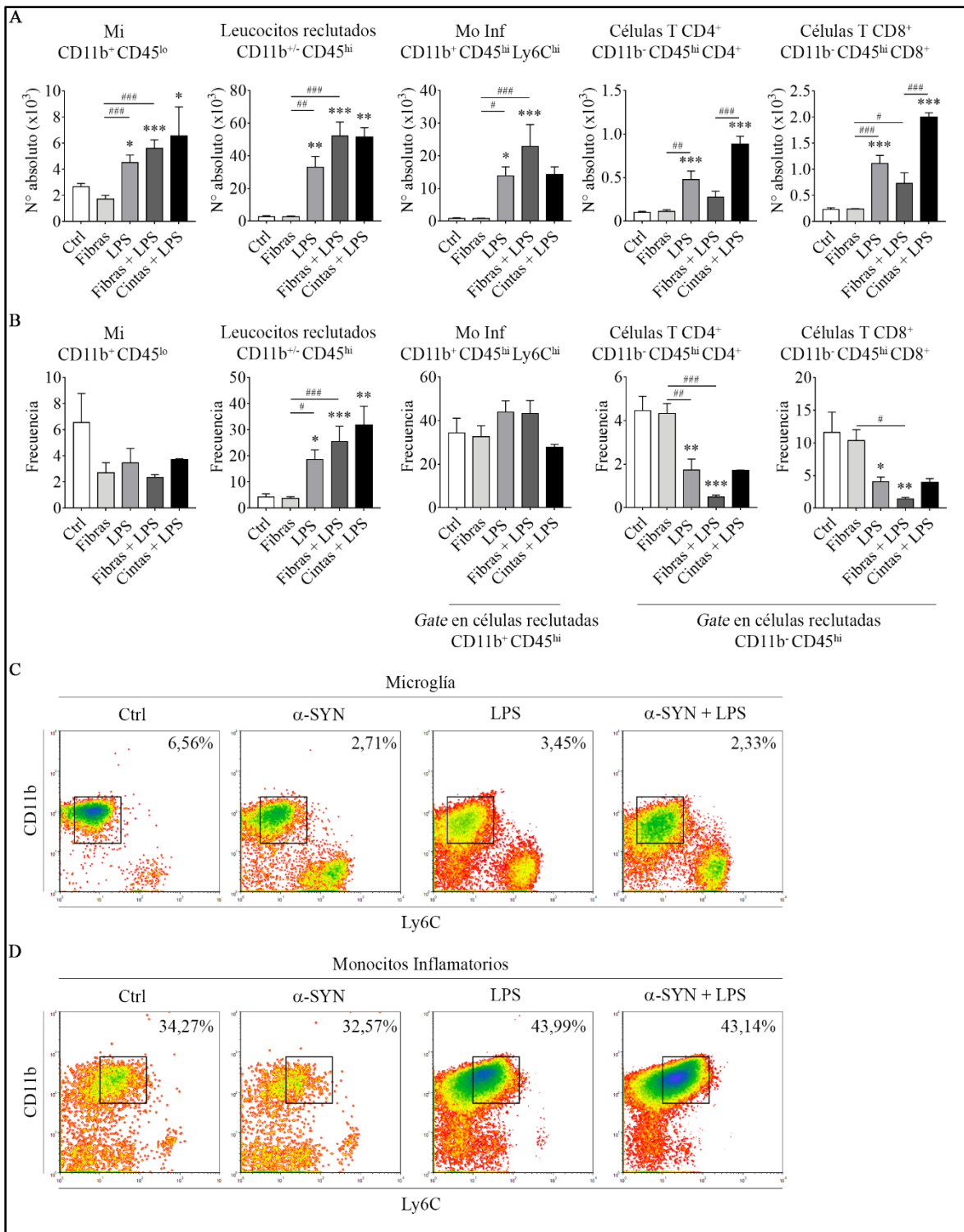
**FIGURA 10 | Comparación de la expresión de MHC II entre células residentes de cerebro CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> vs. periféricas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> en ratones WT, IFN-γ<sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup> tratados con LPS.** Los ratones fueron inyectados i.p. con PBS o 40 μg de LPS (1,6 mg/kg) durante 4 días consecutivos con el fin de inducir neuroinflamación. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** El número absoluto e **(B)** intensidad media de fluorescencia (IMF) de microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> MHC II<sup>+</sup>, neutrófilos CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> y monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup>

CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> MHC II<sup>+</sup> derivados de ratones WT, IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> e IFNAR<sup>-/-</sup>, fueron evaluados por citometría de flujo. Los resultados representan el promedio de tres experimentos independientes (n = 3-4 animales por grupo) por cada cepa *knock-out* de ratón. Los datos son expresados como la media  $\pm$  s.e.m. Ctrl: control.

En efecto, el aumento de CX<sub>3</sub>CL1 en los neutrófilos (**Figura 9C y D**) insinúa una interacción entre esta quimiocina y los IFNs de tipo I, así como el requerimiento de ambos mediadores para un apropiado acceso de las células inmunes al SNC, en circunstancias inflamatorias.

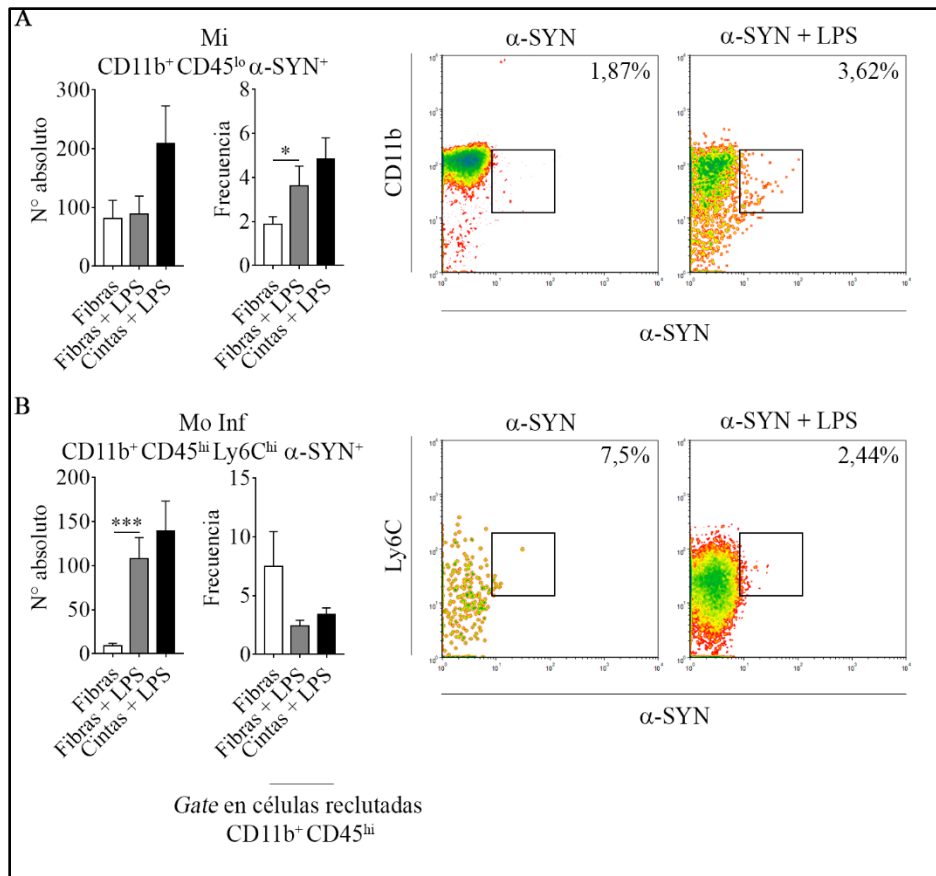
### **La inflamación sistémica inducida por LPS regula la vigilancia inmunológica del SNC a través del reclutamiento de monocitos inflamatorios luego de la administración de $\alpha$ -SYN**

El descubrimiento reciente de que los agregados incorrectamente plegados de la proteína  $\alpha$ -SYN son capaces de amplificarse de manera similar a los priones, ha llevado a la suposición de que el sistema inmune podría estar participando en la propagación de la  $\alpha$ -SYN en sinucleinopatías tales como el PD<sup>178,218,219</sup>. Para comprender el rol de la microglía y los monocitos inflamatorios en la progresión del PD, determinamos el impacto de la inflamación sistémica inducida por LPS en la diseminación de  $\alpha$ -SYN.



**FIGURA 11 | Características fenotípicas de las células inmunes reclutadas al SNC luego del desafío con  $\alpha$ -SYN.** Los ratones fueron inyectados i.p. al día 1 con PBS o con 20  $\mu$ g de LPS (0,8 mg/kg) y durante los 3 días siguientes con PBS, LPS, 5  $\mu$ g de  $\alpha$ -SYN conjugada al fluorocromo Atto 488 i.v. (0,3 mg/kg) o una combinación de LPS más  $\alpha$ -SYN. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron

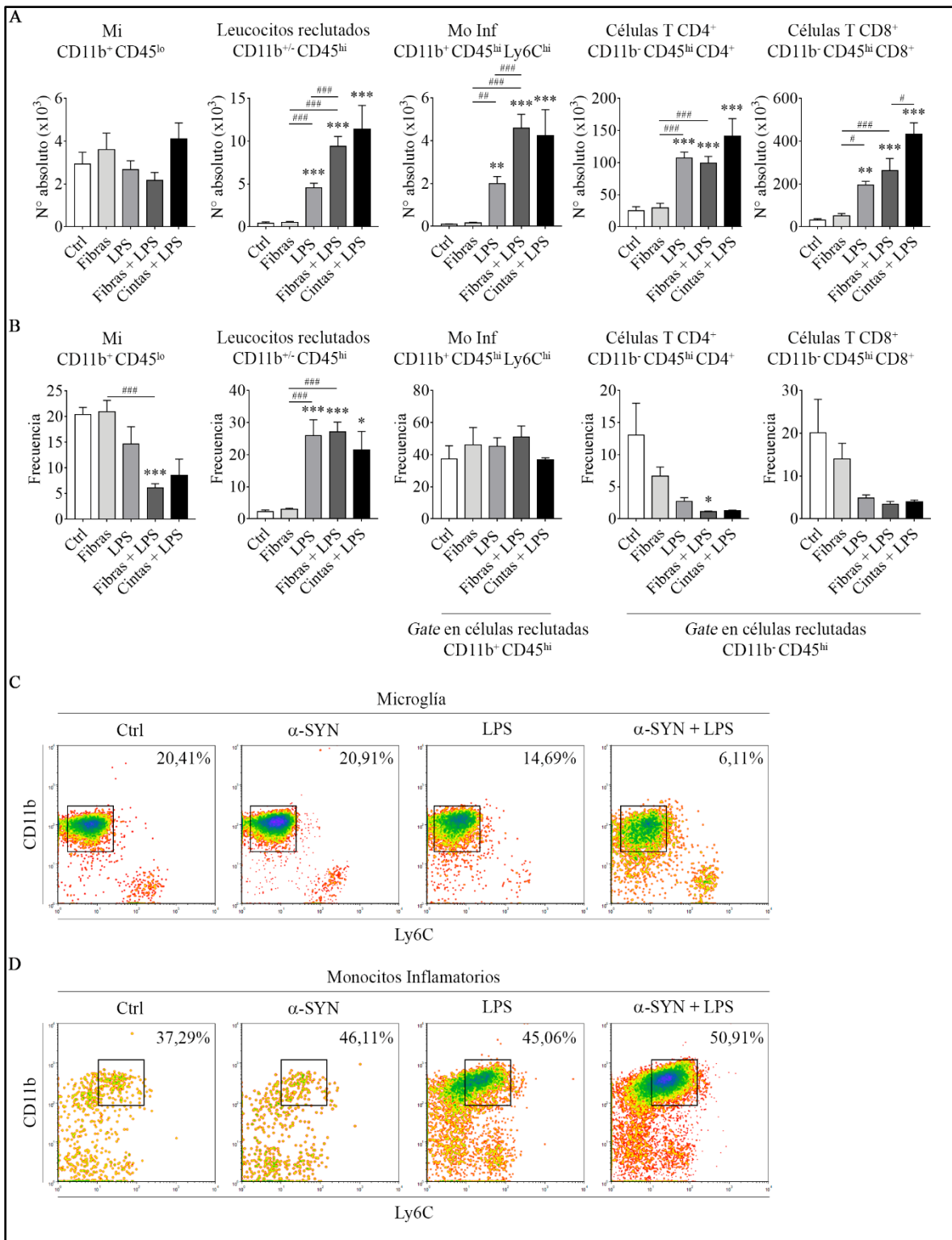
marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** El número absoluto y **(B)** la frecuencia de microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>, leucocitos reclutados CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>, monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup>, células T CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> CD8<sup>+</sup>, fueron evaluados mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones corresponden al *gate* de células reclutadas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>. Los asteriscos indican la comparación respecto al grupo Ctrl. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). **(C)** y **(D)** ilustran los *density-plots* representativos CD11b vs. Ly6C indicando la estrategia de análisis empleada para la microglía y los monocitos inflamatorios luego de posicionar el *gate* en las células residentes CD45<sup>lo</sup> o periféricas CD45<sup>hi</sup>, respectivamente. Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía; Mo Inf: monocitos inflamatorios.



**FIGURA 12 | Células pre-activadas *in vivo* CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> promueven la diseminación de α-SYN al cerebro.** Los ratones fueron inyectados i.p. al día 1 con PBS o con 20 µg de LPS (0,8 mg/kg) y durante los 3 días siguientes con PBS, LPS, 5 µg de α-SYN conjugada al fluorocromo Atto 488 i.v. (0,3 mg/kg) o una combinación de LPS más α-SYN. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de cerebro total fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** El número absoluto y la frecuencia de microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> o **(B)** monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> con α-SYN internalizada, fueron evaluados por citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones corresponden al *gate* de células reclutadas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). Los *density-plots* representativos CD11b vs. α-SYN y Ly6C vs. α-SYN ilustran la estrategia de análisis empleada para la microglía y los monocitos inflamatorios luego de posicionar el *gate* en las células residentes CD45<sup>lo</sup> o periféricas

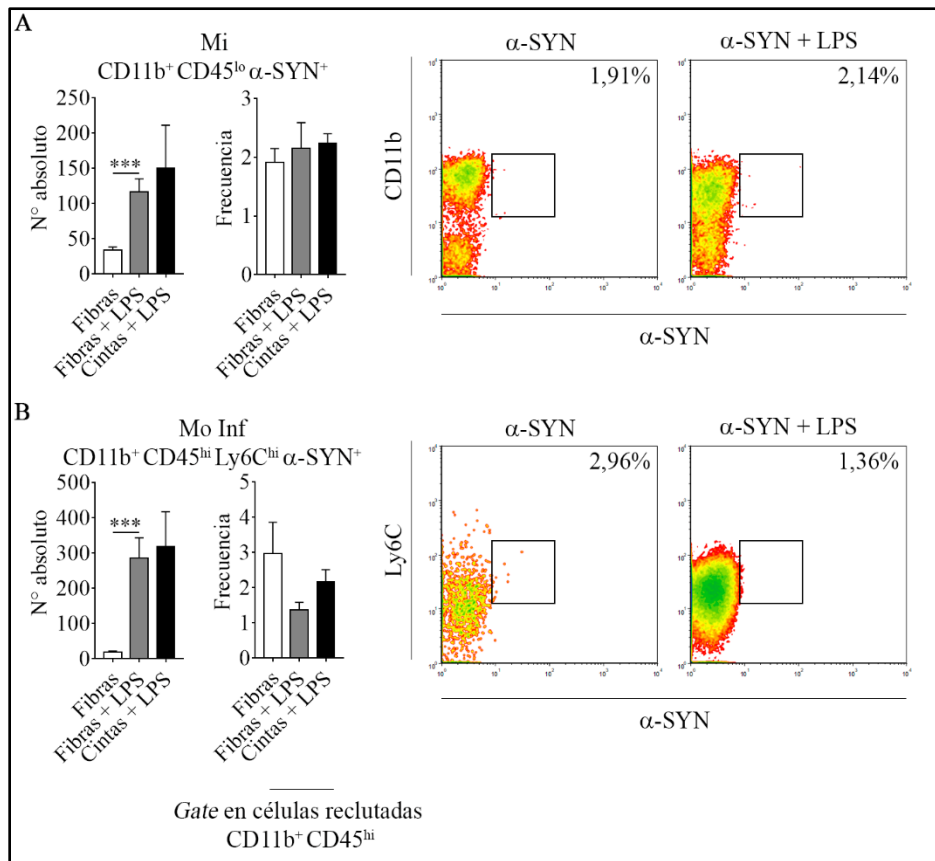
CD45<sup>hi</sup>, respectivamente. Los datos son expresados como la media  $\pm$  s.e.m. Ctrl: control, Mi: microglía; Mo Inf: monocitos inflamatorios.

La administración periférica del recombinante de  $\alpha$ -SYN combinado con LPS, promovió un aumento en el número absoluto de la microglía residente y de los leucocitos reclutados al SNC independientemente de la conformación de  $\alpha$ -SYN empleada, resultando la condición con cintas como un control adecuado de la respuesta inducida por las fibras **(Figura 11A, B; 13A, B)**. Si bien el estímulo con cintas de  $\alpha$ -SYN indujo una migración diferencial de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> al cerebro, los monocitos inflamatorios pre-activados con LPS resultaron ser la población de fagocitos que más respondió a la administración sistémica con fibras de  $\alpha$ -SYN **(Figura 11A,B; 13A, B)**. Notablemente, esta respuesta favoreció la diseminación de  $\alpha$ -SYN tanto en cerebro como en médula espinal, según se observa en el incremento del número absoluto de monocitos inflamatorios  $\alpha$ -SYN<sup>+</sup> **(Figura 12B, D; 14B, D)**.



**FIGURA 13 | La administración sistémica de  $\alpha$ -SYN induce la migración de células inmunes periféricas a la médula espinal.** Los ratones fueron inyectados i.p. al día 1 con PBS o con 20  $\mu$ g de LPS (0,8 mg/kg) y durante los 3 días siguientes con PBS, LPS, 5  $\mu$ g de  $\alpha$ -SYN conjugada al fluorocromo Atto 488 i.v. (0,3 mg/kg) o una combinación de LPS más  $\alpha$ -SYN. Doce horas luego de

la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de médula espinal fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** El número absoluto y **(B)** la frecuencia de microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup>, leucocitos reclutados CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>, monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup>, células T CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> CD4<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup> CD45<sup>hi</sup> CD8<sup>+</sup>, fueron evaluados mediante citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones corresponden al *gate* de células reclutadas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>. Los asteriscos indican la comparación respecto al grupo Ctrl. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). **(C)** y **(D)** ilustran los *density-plots* representativos CD11b vs. Ly6C indicando la estrategia de análisis empleada para la microglía y los monocitos inflamatorios luego de posicionar el *gate* en las células residentes CD45<sup>lo</sup> o periféricas CD45<sup>hi</sup>, respectivamente. Los datos son expresados como la media ± s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía; Mo Inf: monocitos inflamatorios.



**FIGURA 14 | Células pre-activadas *in vivo* CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> promueven la diseminación de α-SYN a la médula espinal.** Los ratones fueron inyectados i.p. al día 1 con PBS o con 20 µg de LPS (0,8 mg/kg) y durante los 3 días siguientes con PBS, LPS, 5 µg de α-SYN conjugada al fluorocromo Atto 488 i.v. (0,3 mg/kg) o una combinación de LPS más α-SYN. Doce horas luego de la última inyección, fueron sacrificados y las células inmunes purificadas de homogenatos de médula espinal fueron marcadas para su posterior análisis mediante citometría de flujo. **(A)** El número absoluto y la frecuencia de microglía CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>lo</sup> o **(B)** monocitos inflamatorios CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup> Ly6C<sup>hi</sup> con α-SYN internalizada, fueron evaluados por citometría de flujo. Los porcentajes de las poblaciones corresponden al *gate* de células reclutadas CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>hi</sup>. Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes (n= 3-4 animales por grupo). Los *density-plots* representativos CD11b vs. α-SYN y Ly6C vs. α-SYN ilustran la estrategia de análisis empleada para



la microglía y los monocitos inflamatorios luego de posicionar el *gate* en las células residentes CD45<sup>lo</sup> o periféricas CD45<sup>hi</sup>, respectivamente. Los datos son expresados como la media  $\pm$  s.e.m. Ctrl: control; Mi: microglía; Mo Inf: monocitos inflamatorios.

Nuestros resultados sugieren que la inflamación sistémica con LPS podría contribuir al reclutamiento de leucocitos al SNC, transformando a los monocitos inflamatorios de centinelas clave a potenciales células *carrier* dirigiendo la diseminación de  $\alpha$ -SYN.

---

---

# DISCUSIÓN & CONCLUSIONES

---

---

La microglía residente y los leucocitos periféricos tienen un rol esencial en el modelado de la respuesta inmune en el SNC. Nuestros resultados identifican a los monocitos inflamatorios como células protectoras a cargo de la vigilancia inmunológica en el SNC <sup>220</sup> luego del desafío con LPS periférico, tal como se determinó mediante el aumento en su reclutamiento comparado a otras poblaciones inmunes. Esto concuerda con Cazareth y col. <sup>221</sup>, quienes mostraron, por medio de una aproximación experimental similar a través de citometría de flujo, una migración exacerbada de monocitos inflamatorios aunque sin tráfico de neutrófilos ni células T y B al SNC, luego de una administración aguda y sistémica con LPS. Por el contrario, el hallazgo de un reclutamiento consistente de células T y B en nuestro diseño experimental, demuestra que el resultado varía de acuerdo al modelo propuesto dependiendo de la dosis y el esquema de administración con LPS. Varios estudios han diseñado modelos con LPS para evaluar el impacto de la inflamación central o periférica en el desarrollo de condiciones neurodegenerativas poco frecuentes tal como la enfermedad priónica <sup>147,150,222</sup> o incluso para inducir e imitar características distintivas de las enfermedades de Alzheimer <sup>223</sup> y Parkinson <sup>224</sup> en animales naïve. Notablemente, Ruiz-Valdepenas y col. <sup>225</sup> demostraron, mediante microscopía intravital, un incremento en la extravasación de dextrán luego de una única dosis moderada de LPS. Por lo cual, es ciertamente posible que en nuestro modelo de neuroinflamación esta molécula pro-inflamatoria esté accediendo a través de la ruptura de la barrera hematoencefálica, al parénquima nervioso para activar directamente a las células cerebrales.

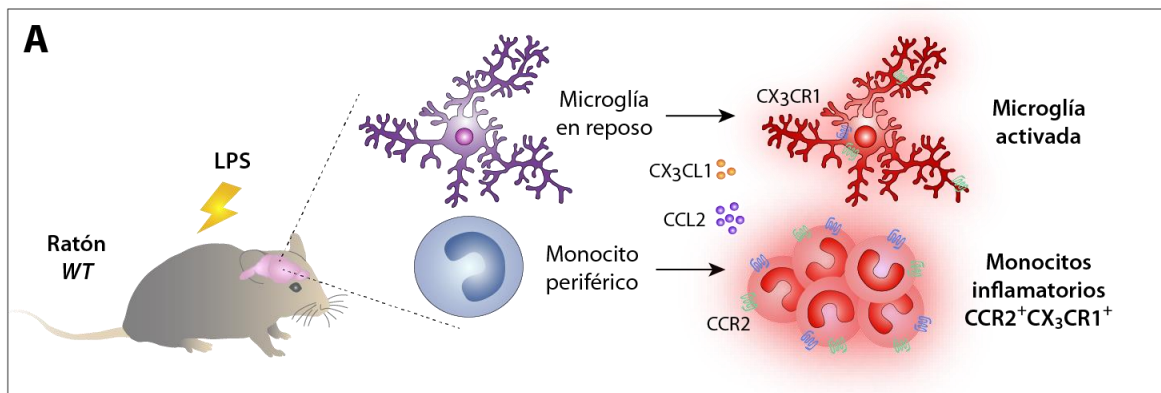
Al igual que en reportes previos focalizados en el estudio de la inflamación patogénica en la encefalomiелitis experimental autoinmune <sup>226,227</sup>, determinamos la presencia de una subpoblación peculiar de células dendríticas, denominado células dendríticas inflamatorias, en cerebros de ratones endotoxémicos. Sin embargo, en nuestro caso utilizamos el FcεRI para caracterizar a estas células, que representa el marcador fenotípico por excelencia para

distinguir a las células dendríticas inflamatorias de otras células mieloides y evitar así darles una identidad errónea <sup>228</sup>. Las células dendríticas inflamatorias se caracterizan por estar ausentes en tejidos que se encuentran en condiciones fisiológicas y se diferencian al igual que la microglía <sup>32,229</sup>, a partir de los monocitos durante la inflamación. Esto podría explicar en parte la presencia de estas células, tal como se demuestra en nuestro trabajo, a pesar que Rotta y col. <sup>230</sup> indican que el LPS podría bloquear la conversión de los monocitos inflamatorios a células dendríticas *in vivo*.

Hallazgos recientes sostienen la idea del tráfico leucocitario a través de órganos circunventriculares que funcionan como sitios de acceso al SNC <sup>47</sup>. Los plexos coroideos son un ejemplo de una interfase neuroinmunológica cuya función es integrar las señales que recibe del parénquima con aquellas provenientes de células inmunes circulantes <sup>38,215,231</sup>. En relación a lo mencionado, encontramos reclutamiento pero no infiltración de leucocitos en este sitio junto con reactividad microglial y astrocítica luego de la inflamación sistémica inducida por LPS, tal como se evidencia por la retracción y engrosamiento de los procesos así como el aumento de los somas celulares, todos estos rasgos característicos de activación glial <sup>54,208,232</sup>. Cabe mencionar que nuestro criterio para el uso del término “infiltrado” no fue el mismo que aquel dado por numerosos trabajos como sinónimo de reclutamiento, sino más bien nos referimos al fenómeno por el cual las células logran invadir el parénquima luego de su entrada a través de los vasos sanguíneos. Esto no es solamente una cuestión de semántica, dado que el uso e interpretación incorrectos del término puede llevar a la incomprensión de los resultados.

El reclutamiento de células mieloides al SNC es una característica compartida por varias enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Los receptores de quimiocinas CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1 son esenciales para el tráfico de células mieloides y la localización de los leucocitos reclutados <sup>96,233</sup> en el espacio perivascular <sup>36,210,211</sup>. En este sentido y en

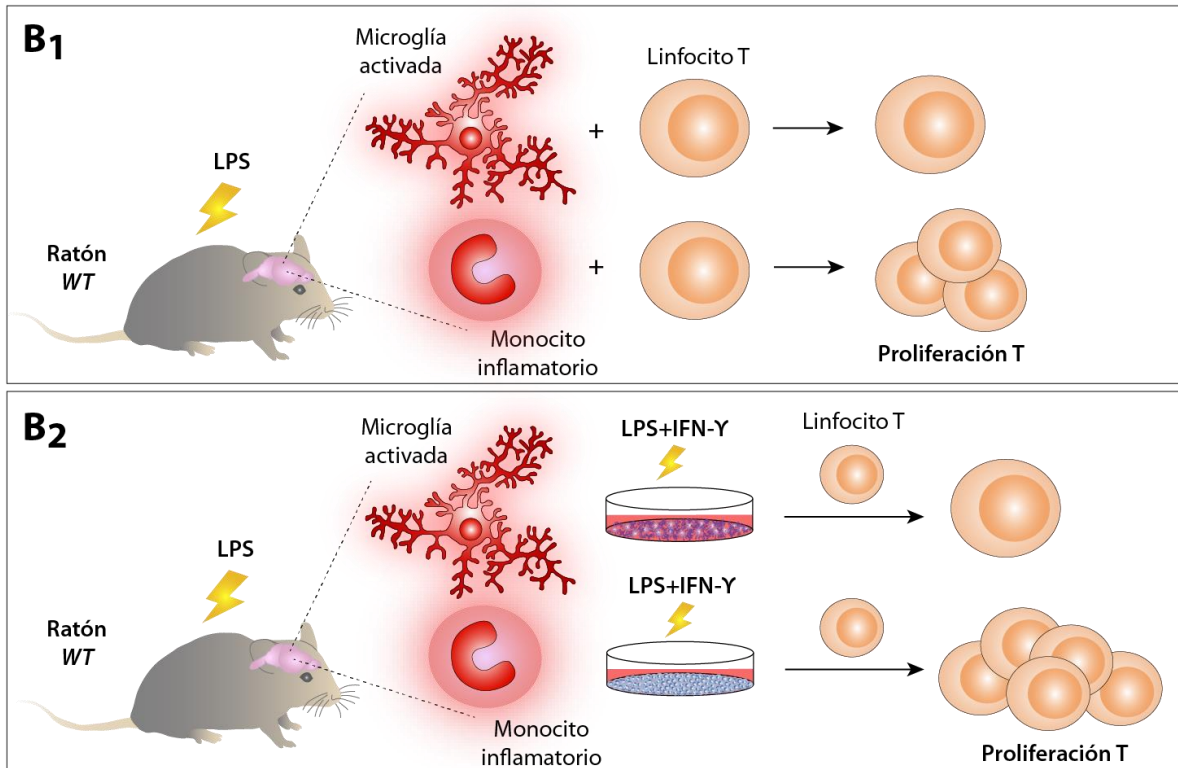
consistencia con observaciones previas <sup>221</sup>, encontramos que la producción de CCL2 junto con la expresión de CCR2 por los monocitos inflamatorios podría facilitar la migración selectiva de estas células al SNC <sup>229,234-236</sup> luego de un desafío con LPS. Además, la disminución de CX<sub>3</sub>CL1 cerebral y de su receptor CX<sub>3</sub>CR1 amplificaría esta respuesta, desencadenando el rol pro-inflamatorio de la microglía al eliminar la inhibición ejercida por CX<sub>3</sub>CL1 <sup>208,237,238</sup>.



**ESQUEMA A | La administración sistémica con LPS induce microgliosis y el reclutamiento de monocitos inflamatorios CCR2<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> al SNC.** La inyección periférica con LPS promueve la activación de la microglía junto con el incremento de CCL2 y la disminución de CX<sub>3</sub>CL1 en el cerebro, favoreciendo el tráfico de monocitos inflamatorios CCR2<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> al SNC mediante la generación de un mecanismo de retroalimentación positiva.

A diferencia de la microglía, la pre-activación con LPS de monocitos inflamatorios purificados llevó a la inducción de una respuesta proliferativa de células T <sup>239</sup>. A pesar de la re-estimulación *ex vivo* con LPS e IFN- $\gamma$ , un potente estímulo supresor de células T a través de la inducción de óxido nítrico <sup>240-242</sup>, los monocitos inflamatorios demostraron su capacidad de respuesta al exacerbar la proliferación de células T. Zhu y col. <sup>243</sup>, mostraron que los monocitos inflamatorios purificados del SNC pueden cambiar su función <sup>244</sup> de presentación antigénica a supresión de células T dependiendo de su estado de activación y por consiguiente, su habilidad para producir óxido nítrico. Al respecto, los monocitos inflamatorios tratados con LPS exhibieron un umbral de activación lo suficientemente alto como para no promover la supresión de células T pero sí de modular diferencialmente las

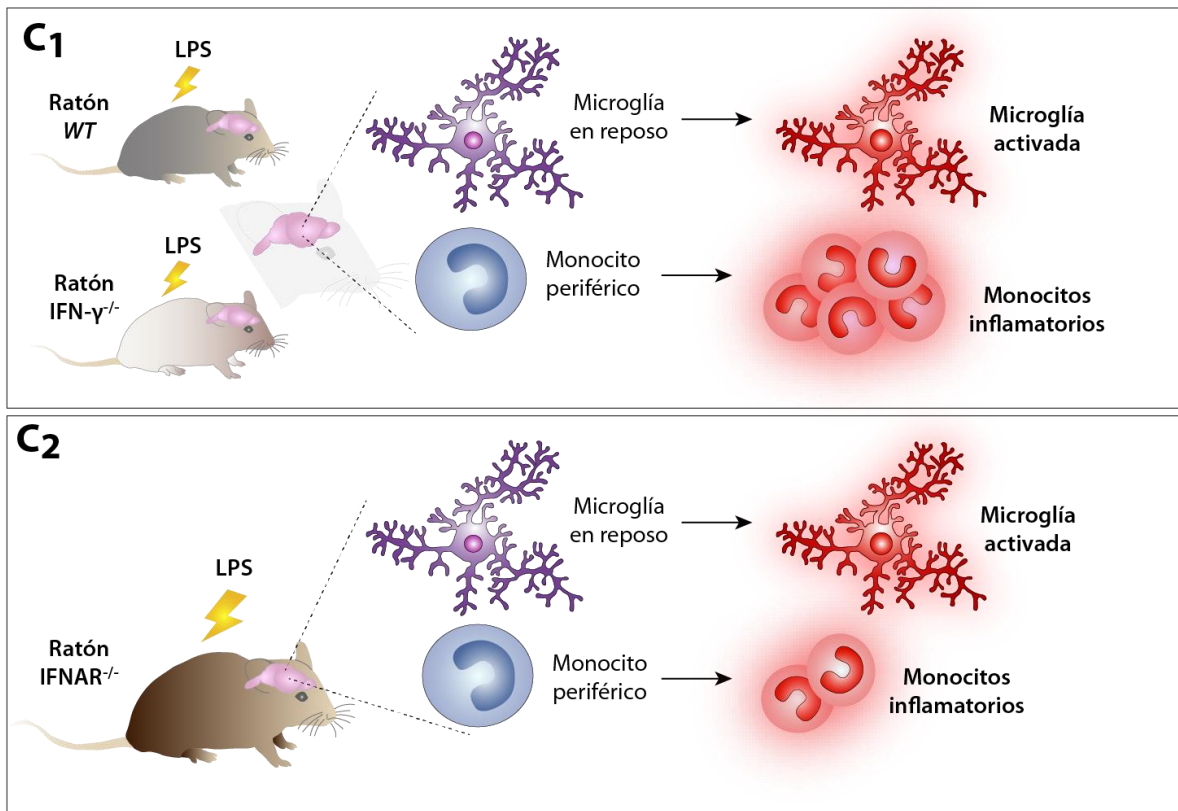
subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> <sup>245</sup> y CD8<sup>+</sup>. Además, la sorpresiva incapacidad de la microglía residente de favorecer la proliferación de células T, que contrasta con otros estudios realizados en EAE <sup>246</sup>, destaca el rol de los monocitos inflamatorios periféricos de promover una respuesta inmune adecuada dentro del SNC de ratones endotoxémicos.



**ESQUEMA B | Microglía y monocitos inflamatorios pre-activados con LPS y purificados de SNC, modulan diferencialmente la respuesta proliferativa T. (B<sub>1</sub>)** A diferencia de la microglía, los monocitos inflamatorios pre-activados con LPS y purificados de SNC, indujeron la proliferación de células T. **(B<sub>2</sub>)** La re-estimulación ex vivo con LPS más IFN-γ, de microglía y monocitos inflamatorios endotoxémicos purificados de SNC, exacerbó la respuesta proliferativa T.

El reclutamiento de monocitos inflamatorios mediado por IFNs tipo I confirma la importancia de estas citocinas para dirigir el tráfico de estas células <sup>247-250</sup> al SNC <sup>236,251,252</sup> y revela una interacción desconocida con CX<sub>3</sub>CL1. Janova y col. <sup>253</sup> describieron recientemente una función esencial para el co-receptor del receptor de tipo Toll 4, el CD14, en la detección microglial del daño en el SNC <sup>254,255</sup> y caracterizaron la retroalimentación por medio de la cual la señalización de IFN-β limita la producción excesiva de CXCL1, modulando de esta forma el reclutamiento mieloide. Si bien CXCL1 parece ser prescindible

para los neutrófilos <sup>256</sup>, este evento podría explicar parcialmente el por qué estas células aún son capaces de migrar al SNC en condiciones deficientes de IFNs de tipo I. De manera similar a otro reporte <sup>221</sup>, ni la microglía ni los monocitos inflamatorios pre-activados con LPS incrementan el MHC II, sugiriendo que estas células necesitarían estar completamente activadas para expresar dicho marcador independientemente del rol funcional antes descrito.



**ESQUEMA C | El reclutamiento de monocitos inflamatorios al SNC depende de IFNs de tipo I en ratones endotoxémicos. (C<sub>1</sub>)** Luego de la inyección con LPS, el IFN- $\gamma$  resultó no ser requerido para promover el tráfico de monocitos inflamatorios al cerebro. **(C<sub>2</sub>)** Sólo los IFNs de tipo I son necesarios para inducir la migración de monocitos inflamatorios desde la periferia al SNC, luego de la administración con LPS.

Evidencia creciente sostiene que la inmunidad innata tiene gran capacidad para adaptarse y montar una memoria inmune innata frente a un evento inflamatorio <sup>257,258</sup>. Pese a que un estudio *in vitro* previo afirma que la exposición a fibras de  $\alpha$ -SYN en combinación con LPS generaría una conformación distinta de la proteína con una menor capacidad de

diseminación y una débil habilidad de inducir una respuesta inflamatoria <sup>259</sup>, nuestros resultados claramente demuestran que la pre-activación con LPS y la posterior administración sistémica del recombinante humano de  $\alpha$ -SYN, inducen el aumento del número absoluto de la microglía residente y facilitan el reclutamiento de leucocitos periféricos al SNC. Este hallazgo concuerda con reportes previos en los que el estímulo con agonistas de TLRs fue capaz de amplificar la inflamación en el SNC y exacerbar la progresión de enfermedades neurodegenerativas <sup>150,152,260</sup>. Si bien Peelaerts y col. <sup>196</sup> prueban la capacidad de la  $\alpha$ -SYN de atravesar la barrera hematoencefálica y distribuirse en el SNC luego de su administración sistémica, nuestro modelo representa la primera evidencia de que la  $\alpha$ -SYN es internalizada preferentemente por los monocitos inflamatorios pre-activados con LPS, los cuales favorecerían su diseminación al cerebro y médula espinal en animales WT. Se desconoce aún el mecanismo por el que la  $\alpha$ -SYN se disemina, aunque se ha identificado a LAG3 como un receptor presente en neuronas capaz de unir a fibras con alta afinidad e iniciar su endocitosis y posterior transmisión <sup>261,262</sup>. Si bien Harms y col. <sup>263</sup> también observan el reclutamiento de células inmunes periféricas al SNC luego del tratamiento con fibras de  $\alpha$ -SYN, el efecto descrito es desarrollado en un esquema de inyección intracraneal.

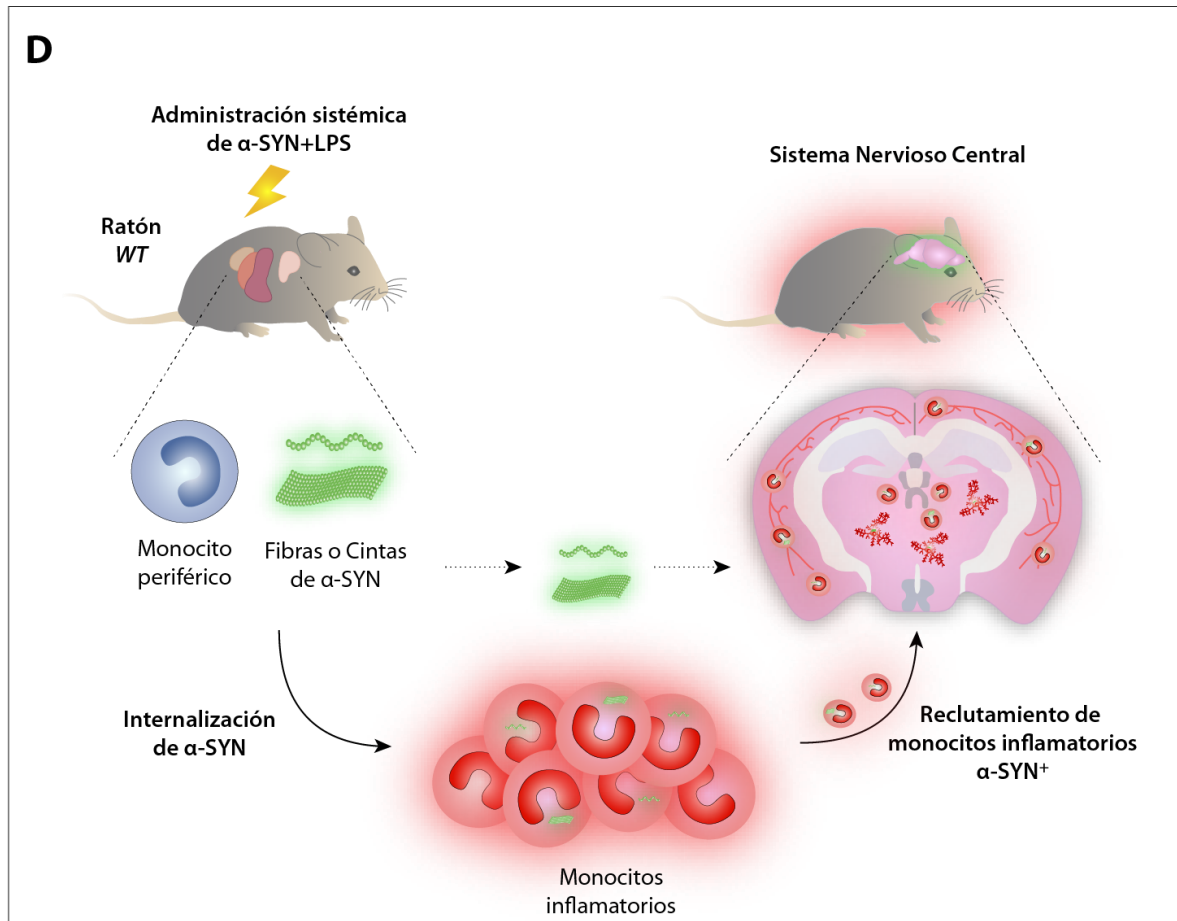
Otros autores han aprovechado el uso de modelos murinos de la enfermedad de Parkinson inducidos por una sobreexpresión de  $\alpha$ -SYN, mediante la transfección en la *substantia nigra* con el recombinante viral adeno-asociado (rAAV) 2/7 <sup>264,265</sup> o han administrado  $\alpha$ -SYN de manera sistémica en animales *knock-in* de la proteína para favorecer su sobreexpresión <sup>195</sup>. Los modelos animales que recapitulan la patología clínica de ciertas enfermedades humanas, resultan indispensables para comprender los mecanismos moleculares y avanzar hacia estudios pre-clínicos. Sin embargo, es importante mencionar que los modelos transgénicos en los que se sobreexpresan proteínas asociadas



al PD o al AD, pueden causar otros fenotipos no relacionados a estas enfermedades neurodegenerativas <sup>266</sup>. A diferencia de los modelos transgénicos en los que la patología en la periferia no necesariamente precede a aquella en el cerebro, y a los inducidos por vectores adenovirales en los que la neurodegeneración está restringida a la región inyectada, el modelo de transmisión permite determinar la neurodegeneración más allá del sitio de administración, convirtiéndose en el más adecuado para evaluar la diseminación y propagación de  $\alpha$ -SYN así como su progresiva acumulación en forma de agregados <sup>267</sup>. Más aún, los modelos que intentan reproducir la propagación de la  $\alpha$ -SYN de forma similar a los priones permiten abordar la teoría actual de que la patología del Parkinson se inicia en el sistema nervioso periférico, dispersándose desde allí hacia el SNC <sup>268</sup>. Este concepto también incluye al amiloide beta y a tau, las proteínas distintivas de la enfermedad de Alzheimer <sup>218,269,270</sup>. Resulta muy interesante que luego del tratamiento con fibras o cintas de  $\alpha$ -SYN, las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> pre-activadas con LPS sean diferencialmente reclutadas al cerebro debido a que se ha descubierto recientemente que las células T derivadas de pacientes con la enfermedad de Parkinson, reconocen a péptidos de la  $\alpha$ -SYN <sup>271</sup>. Si bien los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> también expresan el receptor LAG3 de alta afinidad para fibras de  $\alpha$ -SYN, su estudio en estas células está asociado a su regulación inmunológica como receptor co-inhibitorio en terapias frente al cáncer <sup>272</sup>. Además, las diferencias estructurales descritas para las fibras y las cintas de  $\alpha$ -SYN <sup>199,273</sup> explicarían los distintos niveles de toxicidad, capacidad de diseminación y propagación *in vivo* <sup>196</sup> junto con el reclutamiento de una población celular particular.

Habiendo descrito un nuevo rol para los monocitos inflamatorios como potenciales caballos de Troya que participarían en la diseminación sistémica de  $\alpha$ -SYN hacia el SNC, sería interesante profundizar en el mecanismo de internalización y transmisión de la

proteína así como en la contribución de otras conformaciones y esquemas de administración en el desarrollo del PD.



**ESQUEMA D | Modelo propuesto en el que la inflamación sistémica inducida con LPS regula la diseminación de  $\alpha$ -SYN al SNC.** Luego de la administración sistémica con LPS, los monocitos inflamatorios pre-activados internalizaron fibras o cintas de  $\alpha$ -SYN conjugada al fluorocromo Atto 488, facilitando su diseminación desde la periferia hacia el cerebro y médula espinal de ratones WT. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la  $\alpha$ -SYN sea capaz acceder al SNC por otra vía.

Aunque los procedimientos experimentales para estudiar con alto grado de pureza a la microglía y los monocitos en el SNC son complejos y dificultosos debido a la escasez de estos tipos celulares en el tejido nervioso, en el presente trabajo de tesis logramos comparar las características fenotípicas y funcionales de células residentes y/o periféricas reclutadas en un modelo de neuroinflamación inducido por LPS y/o  $\alpha$ -SYN, identificando a los

monocitos inflamatorios como centinelas clave del SNC y potenciales blanco para la inmunoterapia.

---

---

# ABREVIATURAS

---

---

<b>ALS</b>	esclerosis lateral amiotrófica (del inglés, <i>amyotrophic lateral sclerosis</i> )
<b>ATP</b>	adenosín trifosfato (del inglés, <i>adenosine triphosphate</i> )
<b>BHE</b>	barrera hematoencefálica
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina (del inglés, <i>bovine serum albumin</i> )
<b>CD</b>	<i>cluster</i> de diferenciación (del inglés, <i>cluster of differentiation</i> )
<b>cDNA</b>	DNA complementario (del inglés, <i>complementary DNA</i> )
<b>CFSE</b>	éster de succinimidil-carboxifluoresceína (del inglés, <i>carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i> )
<b>CJD</b>	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (del inglés, <i>Creutzfeldt-Jakob disease</i> )
<b>Con A</b>	concanavalina A
<b>CSF</b>	líquido cefalorraquídeo (del inglés, <i>cerebrospinal fluid</i> )
<b>CSF-1</b>	factor estimulante de colonias de tipo 1 (del inglés, <i>colony stimulating factor 1</i> )
<b>Ctrl</b>	control
<b>DAMPs</b>	patrones moleculares asociados al daño (del inglés, <i>damage-associated molecular patterns</i> )
<b>DAPI</b>	4', 6-diamino-2-fenilindol (del inglés, <i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i> )
<b>DCs Inf</b>	DCs inflamatorias
<b>DCs</b>	células dendríticas (del inglés, <i>dendritic cells</i> )
<b>dim</b>	tenue (del inglés, <i>dim</i> )
<b>DLB</b>	demencia con cuerpos de Lewy (del inglés, <i>dementia with Lewy bodies</i> )
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico (del inglés, <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNAsa</b>	desoxirribonucleasa
<b>EAE</b>	encefalomielitis experimental autoinmune (del inglés, <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i> )
<b>GFAP</b>	proteína ácida fibrilar glial (del inglés, <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>GPI</b>	glicosilfosfatidilinositol (del inglés, <i>glycosylphosphatidylinositol</i> )
<b>H&amp;E</b>	hematoxilina y eosina
<b>HD</b>	enfermedad de Huntington (del inglés, <i>Huntington disease</i> )
<b>hi</b>	alto (del inglés, <i>high</i> )
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v.</b>	intravenoso

<b>IFNAR</b>	receptor de interferón alfa/beta (del inglés, <i>interferon alpha/beta receptor</i> )
<b>IFNs</b>	interferones (del inglés, <i>interferons</i> )
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferón gamma (del inglés, <i>interferon gamma</i> )
<b>IMF</b>	intensidad media de fluorescencia
<b>KO</b>	deficiente (del inglés, <i>knock-out</i> )
<b>LBP</b>	proteína ligando de LPS (del inglés, <i>LPS binding protein</i> )
<b>lo</b>	bajo (del inglés, <i>low</i> )
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>MHC II</b>	complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (del inglés, <i>major histocompatibility complex class II</i> )
<b>Mi</b>	microglía
<b>Mo Inf</b>	monocitos inflamatorios
<b>mRNA</b>	RNA mensajero (del inglés, <i>messenger RNA</i> )
<b>MSA</b>	atrofia multisistémica (del inglés, <i>multiple system atrophy</i> )
<b>PAMPs</b>	patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino (del inglés, <i>phosphate-buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PD</b>	enfermedad de Parkinson (del inglés, <i>Parkinson disease</i> )
<b>PI(4,5)P2</b>	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PMN</b>	polimorfonucleares
<b>poli I:C</b>	ácido poliinosínico-policitidílico
<b>rAAV</b>	recombinante viral adeno-asociado (del inglés, <i>recombinant adeno-associated virus</i> )
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico (del inglés, <i>ribonucleic acid</i> )
<b>s.e.m.</b>	error estándar (del inglés, <i>standard error of the mean</i> )
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SNC</b>	sistema nervioso central
<b>TBS</b>	buffer tris salino (del inglés, <i>tris-buffered saline</i> )
<b>TIR</b>	Toll/IL-1R
<b>TLR4</b>	receptor de tipo Toll 4 (del inglés, <i>Toll-like receptor 4</i> )

**vs.**        *versus*

**WT**        salvaje (del inglés, *wild type*)

**$\alpha$ -SYN**    alfa-sinucleína (del inglés, *alpha-synuclein*)

---

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

---



- 1 Foldi, M. *et al.* New contributions to the anatomical connections of the brain and the lymphatic system. *Acta anatomica* **64**, 498-505 (1966).
- 2 Aspelund, A. *et al.* A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med* **212**, 991-999, doi:10.1084/jem.20142290 (2015).
- 3 Goldmann, J. *et al.* T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. *J Leukoc Biol* **80**, 797-801, doi:10.1189/jlb.0306176 (2006).
- 4 Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337-341, doi:10.1038/nature14432 (2015).
- 5 Engelhardt, B., Vajkoczy, P. & Weller, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol* **18**, 123-131, doi:10.1038/ni.3666 (2017).
- 6 Whedon, J. M. & Glassey, D. Cerebrospinal fluid stasis and its clinical significance. *Alternative therapies in health and medicine* **15**, 54-60 (2009).
- 7 Reboldi, A. *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. *Nat Immunol* **10**, 514-523, doi:10.1038/ni.1716 (2009).
- 8 Ransohoff, R. M. & Engelhardt, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **12**, 623-635, doi:10.1038/nri3265 (2012).
- 9 Kivisakk, P., Tucky, B., Wei, T., Campbell, J. J. & Ransohoff, R. M. Human cerebrospinal fluid contains CD4+ memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy. *BMC immunology* **7**, 14, doi:10.1186/1471-2172-7-14 (2006).
- 10 Weller, R. O. Microscopic morphology and histology of the human meninges. *Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes* **89**, 22-34 (2005).
- 11 Galea, I., Bechmann, I. & Perry, V. H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* **28**, 12-18, doi:10.1016/j.it.2006.11.004 (2007).
- 12 Kamphuis, W., Kooijman, L., Schettters, S., Orre, M. & Hol, E. M. Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* **1862**, 1847-1860, doi:10.1016/j.bbadis.2016.07.007 (2016).
- 13 Proding, C. *et al.* CD11c-expressing cells reside in the juxtavascular parenchyma and extend processes into the glia limitans of the mouse nervous system. *Acta Neuropathol* **121**, 445-458, doi:10.1007/s00401-010-0774-y (2011).
- 14 Greter, M. *et al.* Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nature medicine* **11**, 328-334, doi:10.1038/nm1197 (2005).
- 15 Dando, S. J., Naranjo Golborne, C., Chinnery, H. R., Ruitenber, M. J. & McMenamin, P. G. A case of mistaken identity: CD11c-eYFP(+) cells in the normal mouse brain parenchyma and neural retina display the phenotype of microglia, not dendritic cells. *Glia* **64**, 1331-1349, doi:10.1002/glia.23005 (2016).
- 16 Herz, J., Johnson, K. R. & McGavern, D. B. Therapeutic antiviral T cells noncytopathically clear persistently infected microglia after conversion into antigen-presenting cells. *J Exp Med* **212**, 1153-1169, doi:10.1084/jem.20142047 (2015).
- 17 Prinz, M. & Priller, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 300-312, doi:10.1038/nrn3722 (2014).
- 18 Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841-845, doi:10.1126/science.1194637 (2010).
- 19 Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86-90, doi:10.1126/science.1219179 (2012).
- 20 Kierdorf, K. *et al.* Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* **16**, 273-280, doi:10.1038/nn.3318 (2013).
- 21 Goldmann, T. *et al.* Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* **17**, 797-805, doi:10.1038/ni.3423 (2016).
- 22 Hagemeyer, N. *et al.* Transcriptome-based profiling of yolk sac-derived macrophages reveals a role for Irf8 in macrophage maturation. *Embo j* **35**, 1730-1744, doi:10.15252/embj.201693801 (2016).
- 23 Xu, J. *et al.* Temporal-Spatial Resolution Fate Mapping Reveals Distinct Origins for Embryonic and Adult Microglia in Zebrafish. *Developmental cell* **34**, 632-641, doi:10.1016/j.devcel.2015.08.018 (2015).

- 24 Shemer, A., Erny, D., Jung, S. & Prinz, M. Microglia Plasticity During Health and Disease: An Immunological Perspective. *Trends Immunol* **36**, 614-624, doi:10.1016/j.it.2015.08.003 (2015).
- 25 Anandasabapathy, N. *et al.* Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain. *J Exp Med* **208**, 1695-1705, doi:10.1084/jem.20102657 (2011).
- 26 Kivisakk, P. *et al.* Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* **65**, 457-469, doi:10.1002/ana.21379 (2009).
- 27 Brendecke, S. M. & Prinz, M. Do not judge a cell by its cover--diversity of CNS resident, adjoining and infiltrating myeloid cells in inflammation. *Seminars in immunopathology* **37**, 591-605, doi:10.1007/s00281-015-0520-6 (2015).
- 28 Fantin, A. *et al.* Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**, 829-840, doi:10.1182/blood-2009-12-257832 (2010).
- 29 Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S. S. & Ransohoff, R. M. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat Neurosci* **14**, 1227-1235, doi:10.1038/nn.2923 (2011).
- 30 Wolburg, H. & Paulus, W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 75-88, doi:10.1007/s00401-009-0627-8 (2010).
- 31 Goldmann, T. *et al.* A new type of microglia gene targeting shows TAK1 to be pivotal in CNS autoimmune inflammation. *Nat Neurosci* **16**, 1618-1626, doi:10.1038/nn.3531 (2013).
- 32 Mildner, A. *et al.* Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* **10**, 1544-1553, doi:10.1038/nn2015 (2007).
- 33 Hashimoto, D. *et al.* Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792-804, doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004 (2013).
- 34 Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M. & Rossi, F. M. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* **14**, 1142-1149, doi:10.1038/nn.2887 (2011).
- 35 Bruttger, J. *et al.* Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* **43**, 92-106, doi:10.1016/j.immuni.2015.06.012 (2015).
- 36 Prinz, M. & Priller, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci* **20**, 136-144, doi:10.1038/nn.4475 (2017).
- 37 Mohle, L. *et al.* Ly6C(hi) Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Cell Rep* **15**, 1945-1956, doi:10.1016/j.celrep.2016.04.074 (2016).
- 38 Baruch, K., Kertser, A., Porat, Z. & Schwartz, M. Cerebral nitric oxide represses choroid plexus NFkappaB-dependent gateway activity for leukocyte trafficking. *EMBO J* **34**, 1816-1828, doi:10.15252/embj.201591468 (2015).
- 39 Obermeier, B., Daneman, R. & Ransohoff, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine* **19**, 1584-1596, doi:10.1038/nm.3407 (2013).
- 40 Carrithers, M. D., Visintin, I., Viret, C. & Janeway, C. S., Jr. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol* **129**, 51-57 (2002).
- 41 Kivisakk, P. *et al.* T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking. *Clinical and experimental immunology* **129**, 510-518 (2002).
- 42 Qing, Z. *et al.* Inhibition of antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system via blocking PECAM1/CD31 molecule. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **60**, 798-807 (2001).
- 43 Hickey, W. F. & Kimura, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**, 290-292 (1988).
- 44 Hickey, W. F. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Seminars in immunology* **11**, 125-137, doi:10.1006/smim.1999.0168 (1999).
- 45 Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K. & Hickey, W. F. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* **7**, 19-24, doi:10.1002/glia.440070106 (1993).

- 46 Kerfoot, S. M. & Kubes, P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **169**, 1000-1006 (2002).
- 47 Ransohoff, R. M., Kivisakk, P. & Kidd, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **3**, 569-581, doi:10.1038/nri1130 (2003).
- 48 Meyer-Luehmann, M. & Prinz, M. Myeloid cells in Alzheimer's disease: culprits, victims or innocent bystanders? *Trends Neurosci* **38**, 659-668, doi:10.1016/j.tins.2015.08.011 (2015).
- 49 Togo, T. *et al.* Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *J Neuroimmunol* **124**, 83-92 (2002).
- 50 Brochard, V. *et al.* Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest* **119**, 182-192, doi:10.1172/jci36470 (2009).
- 51 Heneka, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* **14**, 388-405, doi:10.1016/s1474-4422(15)70016-5 (2015).
- 52 Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* **353**, 777-783, doi:10.1126/science.aag2590 (2016).
- 53 Davalos, D. *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 752-758, doi:10.1038/nn1472 (2005).
- 54 Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-1318, doi:10.1126/science.1110647 (2005).
- 55 Salter, M. W. & Stevens, B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature medicine* **23**, 1018-1027, doi:10.1038/nm.4397 (2017).
- 56 Gomez Perdiguero, E. *et al.* Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* **518**, 547-551, doi:10.1038/nature13989 (2015).
- 57 Sheng, J., Ruedl, C. & Karjalainen, K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* **43**, 382-393, doi:10.1016/j.immuni.2015.07.016 (2015).
- 58 Hoeffel, G. *et al.* C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **42**, 665-678, doi:10.1016/j.immuni.2015.03.011 (2015).
- 59 Gosselin, D. *et al.* Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* **159**, 1327-1340, doi:10.1016/j.cell.2014.11.023 (2014).
- 60 Minten, C., Terry, R., Deffrasnes, C., King, N. J. & Campbell, I. L. IFN regulatory factor 8 is a key constitutive determinant of the morphological and molecular properties of microglia in the CNS. *PLoS One* **7**, e49851, doi:10.1371/journal.pone.0049851 (2012).
- 61 Grabert, K. *et al.* Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* **19**, 504-516, doi:10.1038/nn.4222 (2016).
- 62 Pannell, M. *et al.* The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **221**, 1157-1172, doi:10.1007/s00429-014-0962-y (2016).
- 63 Wlodarczyk, A. *et al.* Pathologic and Protective Roles for Microglial Subsets and Bone Marrow- and Blood-Derived Myeloid Cells in Central Nervous System Inflammation. *Front Immunol* **6**, 463, doi:10.3389/fimmu.2015.00463 (2015).
- 64 Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K. & Pollard, J. W. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* **6**, e26317, doi:10.1371/journal.pone.0026317 (2011).
- 65 Tremblay, M. E., Lowery, R. L. & Majewska, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology* **8**, e1000527, doi:10.1371/journal.pbio.1000527 (2010).
- 66 Schafer, D. P. *et al.* Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **74**, 691-705, doi:10.1016/j.neuron.2012.03.026 (2012).
- 67 Paolicelli, R. C. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* **333**, 1456-1458, doi:10.1126/science.1202529 (2011).
- 68 Hong, S., Dissing-Olesen, L. & Stevens, B. New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Current opinion in neurobiology* **36**, 128-134, doi:10.1016/j.conb.2015.12.004 (2016).

- 69 Stevens, B. *et al.* The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* **131**, 1164-1178, doi:10.1016/j.cell.2007.10.036 (2007).
- 70 Lui, H. *et al.* Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell* **165**, 921-935, doi:10.1016/j.cell.2016.04.001 (2016).
- 71 van Lookeren Campagne, M., Wiesmann, C. & Brown, E. J. Macrophage complement receptors and pathogen clearance. *Cellular microbiology* **9**, 2095-2102, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.00981.x (2007).
- 72 Marin-Teva, J. L., Cuadros, M. A., Martin-Oliva, D. & Navascues, J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron glia biology* **7**, 25-40, doi:10.1017/s1740925x12000014 (2011).
- 73 Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* **15**, 209-216, doi:10.1038/nrn3710 (2014).
- 74 Fourgeaud, L. *et al.* TAM receptors regulate multiple features of microglial physiology. *Nature* **532**, 240-244, doi:10.1038/nature17630 (2016).
- 75 Marin-Teva, J. L. *et al.* Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* **41**, 535-547 (2004).
- 76 Frade, J. M. & Barde, Y. A. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* **20**, 35-41 (1998).
- 77 Sedel, F., Bechade, C., Vyas, S. & Triller, A. Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci* **24**, 2236-2246, doi:10.1523/jneurosci.4464-03.2004 (2004).
- 78 Wakselman, S. *et al.* Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* **28**, 8138-8143, doi:10.1523/jneurosci.1006-08.2008 (2008).
- 79 Schafer, D. P. & Stevens, B. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020545, doi:10.1101/cshperspect.a020545 (2015).
- 80 Abiega, O. *et al.* Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling. *PLoS biology* **14**, e1002466, doi:10.1371/journal.pbio.1002466 (2016).
- 81 Robbins, C. S. *et al.* Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* **125**, 364-374, doi:10.1161/circulationaha.111.061986 (2012).
- 82 Cros, J. *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**, 375-386, doi:10.1016/j.immuni.2010.08.012 (2010).
- 83 Etzrodt, M. *et al.* Regulation of monocyte functional heterogeneity by miR-146a and Relb. *Cell Rep* **1**, 317-324, doi:10.1016/j.celrep.2012.02.009 (2012).
- 84 Ingersoll, M. A. *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* **115**, e10-19, doi:10.1182/blood-2009-07-235028 (2010).
- 85 Mildner, A. *et al.* Mononuclear phagocyte miRNome analysis identifies miR-142 as critical regulator of murine dendritic cell homeostasis. *Blood* **121**, 1016-1027, doi:10.1182/blood-2012-07-445999 (2013).
- 86 Cecchini, M. G. *et al.* Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development (Cambridge, England)* **120**, 1357-1372 (1994).
- 87 Dai, X. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111-120 (2002).
- 88 Wiktor-Jedrzejczak, W. & Gordon, S. Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Physiol Rev* **76**, 927-947, doi:10.1152/physrev.1996.76.4.927 (1996).
- 89 van Furth, R. & Sluiter, W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med* **163**, 474-479 (1986).
- 90 Swirski, F. K. *et al.* Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* **325**, 612-616, doi:10.1126/science.1175202 (2009).
- 91 van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **128**, 415-435 (1968).

- 92 Yona, S. *et al.* Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91, doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001 (2013).
- 93 Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527-2534 (1989).
- 94 Jakubzick, C. *et al.* Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* **39**, 599-610, doi:10.1016/j.immuni.2013.08.007 (2013).
- 95 Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Molecular and cellular biology* **20**, 4106-4114 (2000).
- 96 Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **19**, 71-82, doi:10.1016/s1074-7613(03)00174-2 (2003).
- 97 Palframan, R. T. *et al.* Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* **194**, 1361-1373 (2001).
- 98 Varol, C. *et al.* Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 171-180, doi:10.1084/jem.20061011 (2007).
- 99 Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666-670, doi:10.1126/science.1142883 (2007).
- 100 Carlin, L. M. *et al.* Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* **153**, 362-375, doi:10.1016/j.cell.2013.03.010 (2013).
- 101 Ziegler-Heitbrock, L. & Hofer, T. P. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* **4**, 23, doi:10.3389/fimmu.2013.00023 (2013).
- 102 Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A. & Pamer, E. G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70 (2003).
- 103 Drevets, D. A. *et al.* The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports *Listeria monocytogenes* into the brain during systemic infection of mice. *J Immunol* **172**, 4418-4424 (2004).
- 104 Tobias, P. S., Soldau, K. & Ulevitch, R. J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* **164**, 777-793 (1986).
- 105 Gioannini, T. L. *et al.* Isolation of an endotoxin-MD-2 complex that produces Toll-like receptor 4-dependent cell activation at picomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4186-4191, doi:10.1073/pnas.0306906101 (2004).
- 106 Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. & Mathison, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433 (1990).
- 107 Ulevitch, R. J. & Tobias, P. S. Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling. *Current opinion in immunology* **6**, 125-130 (1994).
- 108 Akashi, S. *et al.* Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* **198**, 1035-1042, doi:10.1084/jem.20031076 (2003).
- 109 Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191-1195, doi:10.1038/nature07830 (2009).
- 110 Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
- 111 Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D. T. & Triantafilou, K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science* **115**, 2603-2611 (2002).
- 112 Fitzgerald, K. A. *et al.* Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* **413**, 78-83, doi:10.1038/35092578 (2001).
- 113 Horng, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2**, 835-841, doi:10.1038/ni0901-835 (2001).
- 114 Bonham, K. S. *et al.* A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell* **156**, 705-716, doi:10.1016/j.cell.2014.01.019 (2014).
- 115 Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* **125**, 943-955, doi:10.1016/j.cell.2006.03.047 (2006).

- 116 Kagan, J. C., Magupalli, V. G. & Wu, H. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nat Rev Immunol* **14**, 821-826, doi:10.1038/nri3757 (2014).
- 117 Gay, N. J., Gangloff, M. & O'Neill, L. A. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* **32**, 104-109, doi:10.1016/j.it.2010.12.005 (2011).
- 118 Lin, S. C., Lo, Y. C. & Wu, H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* **465**, 885-890, doi:10.1038/nature09121 (2010).
- 119 Motshwene, P. G. *et al.* An oligomeric signaling platform formed by the Toll-like receptor signal transducers MyD88 and IRAK-4. *J Biol Chem* **284**, 25404-25411, doi:10.1074/jbc.M109.022392 (2009).
- 120 Bryant, C. E., Symmons, M. & Gay, N. J. Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. *Mol Immunol* **63**, 162-165, doi:10.1016/j.molimm.2014.06.033 (2015).
- 121 Zanoni, I. *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* **147**, 868-880, doi:10.1016/j.cell.2011.09.051 (2011).
- 122 Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643, doi:10.1126/science.1087262 (2003).
- 123 Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753-766, doi:10.1016/j.cell.2004.11.038 (2004).
- 124 Rathinam, V. A. *et al.* TRIF licenses caspase-11-dependent NLRP3 inflammasome activation by gram-negative bacteria. *Cell* **150**, 606-619, doi:10.1016/j.cell.2012.07.007 (2012).
- 125 Tan, Y., Zanoni, I., Cullen, T. W., Goodman, A. L. & Kagan, J. C. Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity* **43**, 909-922, doi:10.1016/j.immuni.2015.10.008 (2015).
- 126 Zanoni, I. *et al.* CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature* **460**, 264-268, doi:10.1038/nature08118 (2009).
- 127 Chiang, C. Y., Veckman, V., Limmer, K. & David, M. Phospholipase Cgamma-2 and intracellular calcium are required for lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and interferon regulatory factor 3 (IRF3) activation. *J Biol Chem* **287**, 3704-3709, doi:10.1074/jbc.C111.328559 (2012).
- 128 Kagan, J. C. *et al.* TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* **9**, 361-368, doi:10.1038/ni1569 (2008).
- 129 Lin, Y. C., Huang, D. Y., Chu, C. L., Lin, Y. L. & Lin, W. W. The tyrosine kinase Syk differentially regulates Toll-like receptor signaling downstream of the adaptor molecules TRAF6 and TRAF3. *Science signaling* **6**, ra71, doi:10.1126/scisignal.2003973 (2013).
- 130 Ling, G. S. *et al.* Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. *Nat Commun* **5**, 3039, doi:10.1038/ncomms4039 (2014).
- 131 Plociennikowska, A. *et al.* Contribution of CD14 and TLR4 to changes of the PI(4,5)P2 level in LPS-stimulated cells. *J Leukoc Biol* **100**, 1363-1373, doi:10.1189/jlb.2VMA1215-577R (2016).
- 132 Plociennikowska, A., Zdioruk, M. I., Traczyk, G., Swiatkowska, A. & Kwiatkowska, K. LPS-induced clustering of CD14 triggers generation of PI(4,5)P2. *Journal of cell science* **128**, 4096-4111, doi:10.1242/jcs.173104 (2015).
- 133 Botelho, R. J. *et al.* Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *The Journal of cell biology* **151**, 1353-1368 (2000).
- 134 Kagan, J. C. Lipopolysaccharide Detection across the Kingdoms of Life. *Trends Immunol* **38**, 696-704, doi:10.1016/j.it.2017.05.001 (2017).
- 135 Nair-Gupta, P. *et al.* TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell* **158**, 506-521, doi:10.1016/j.cell.2014.04.054 (2014).
- 136 Husebye, H. *et al.* The Rab11a GTPase controls Toll-like receptor 4-induced activation of interferon regulatory factor-3 on phagosomes. *Immunity* **33**, 583-596, doi:10.1016/j.immuni.2010.09.010 (2010).
- 137 Husebye, H. *et al.* Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *Embo j* **25**, 683-692, doi:10.1038/sj.emboj.7600991 (2006).
- 138 Hagar, J. A., Powell, D. A., Aachoui, Y., Ernst, R. K. & Miao, E. A. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science* **341**, 1250-1253, doi:10.1126/science.1240988 (2013).

- 139 Kayagaki, N. *et al.* Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* **341**, 1246-1249, doi:10.1126/science.1240248 (2013).
- 140 Jorgensen, I., Rayamajhi, M. & Miao, E. A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol* **17**, 151-164, doi:10.1038/nri.2016.147 (2017).
- 141 Shi, J. *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187-192, doi:10.1038/nature13683 (2014).
- 142 Kayagaki, N. *et al.* Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature* **526**, 666-671, doi:10.1038/nature15541 (2015).
- 143 Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660-665, doi:10.1038/nature15514 (2015).
- 144 Ding, J. *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**, 111-116, doi:10.1038/nature18590 (2016).
- 145 Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153-158, doi:10.1038/nature18629 (2016).
- 146 Wang, S. *et al.* Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell* **92**, 501-509 (1998).
- 147 Cunningham, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia* **61**, 71-90, doi:10.1002/glia.22350 (2013).
- 148 Perry, V. H. & Holmes, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **10**, 217-224, doi:10.1038/nrneurol.2014.38 (2014).
- 149 Combrinck, M. I., Perry, V. H. & Cunningham, C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. *Neuroscience* **112**, 7-11 (2002).
- 150 Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Campion, S., Lunnon, K. & Perry, V. H. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* **25**, 9275-9284, doi:10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005 (2005).
- 151 Cunningham, C. *et al.* Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biological psychiatry* **65**, 304-312, doi:10.1016/j.biopsych.2008.07.024 (2009).
- 152 Field, R., Campion, S., Warren, C., Murray, C. & Cunningham, C. Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFN $\alpha$ / $\beta$  and IL-1 $\beta$  responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration. *Brain Behav Immun* **24**, 996-1007, doi:10.1016/j.bbi.2010.04.004 (2010).
- 153 Perry, V. H. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol* **120**, 277-286, doi:10.1007/s00401-010-0722-x (2010).
- 154 Ohmoto, Y. *et al.* Variation in the immune response to adenoviral vectors in the brain: influence of mouse strain, environmental conditions and priming. *Gene therapy* **6**, 471-481, doi:10.1038/sj.gt.3300851 (1999).
- 155 McColl, B. W., Rothwell, N. J. & Allan, S. M. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *J Neurosci* **27**, 4403-4412, doi:10.1523/jneurosci.5376-06.2007 (2007).
- 156 Maitra, U. *et al.* Molecular mechanisms responsible for the selective and low-grade induction of proinflammatory mediators in murine macrophages by lipopolysaccharide. *J Immunol* **189**, 1014-1023, doi:10.4049/jimmunol.1200857 (2012).
- 157 Khalif, I. L., Quigley, E. M., Konovitch, E. A. & Maximova, I. D. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* **37**, 838-849, doi:10.1016/j.dld.2005.06.008 (2005).
- 158 Khoo, T. K. *et al.* The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology* **80**, 276-281, doi:10.1212/WNL.0b013e31827deb74 (2013).
- 159 Lunnon, K. *et al.* Systemic inflammation modulates Fc receptor expression on microglia during chronic neurodegeneration. *J Immunol* **186**, 7215-7224, doi:10.4049/jimmunol.0903833 (2011).
- 160 Boche, D., Denham, N., Holmes, C. & Nicoll, J. A. Neuropathology after active Abeta42 immunotherapy: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol* **120**, 369-384, doi:10.1007/s00401-010-0719-5 (2010).

- 161 Gilman, S. *et al.* Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology* **64**, 1553-1562, doi:10.1212/01.wnl.0000159740.16984.3c (2005).
- 162 Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T. R., Green, K. N. & LaFerla, F. M. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **25**, 8843-8853, doi:10.1523/jneurosci.2868-05.2005 (2005).
- 163 Pott Godoy, M. C., Ferrari, C. C. & Pitossi, F. J. Nigral neurodegeneration triggered by striatal AdIL-1 administration can be exacerbated by systemic IL-1 expression. *J Neuroimmunol* **222**, 29-39, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.02.018 (2010).
- 164 Moreno, B. *et al.* Systemic inflammation induces axon injury during brain inflammation. *Ann Neurol* **70**, 932-942, doi:10.1002/ana.22550 (2011).
- 165 Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W. & Kelley, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* **9**, 46-56, doi:10.1038/nrn2297 (2008).
- 166 Andersson, U. & Tracey, K. J. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* **30**, 313-335, doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075015 (2012).
- 167 Brydon, L., Harrison, N. A., Walker, C., Steptoe, A. & Critchley, H. D. Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans. *Biological psychiatry* **63**, 1022-1029, doi:10.1016/j.biopsych.2007.12.007 (2008).
- 168 Harrison, N. A. *et al.* Inflammation causes mood changes through alterations in subgenual cingulate activity and mesolimbic connectivity. *Biological psychiatry* **66**, 407-414, doi:10.1016/j.biopsych.2009.03.015 (2009).
- 169 Hannestad, J. *et al.* Endotoxin-induced systemic inflammation activates microglia: [(1)(1)C]JPBR28 positron emission tomography in nonhuman primates. *NeuroImage* **63**, 232-239, doi:10.1016/j.neuroimage.2012.06.055 (2012).
- 170 Boyle, P. A., Buchman, A. S., Wilson, R. S., Leurgans, S. E. & Bennett, D. A. Physical frailty is associated with incident mild cognitive impairment in community-based older persons. *Journal of the American Geriatrics Society* **58**, 248-255, doi:10.1111/j.1532-5415.2009.02671.x (2010).
- 171 Anand, S., Johansen, K. L. & Kurella Tamura, M. Aging and chronic kidney disease: the impact on physical function and cognition. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **69**, 315-322, doi:10.1093/gerona/glt109 (2014).
- 172 Marioni, R. E. *et al.* Association between raised inflammatory markers and cognitive decline in elderly people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes* **59**, 710-713, doi:10.2337/db09-1163 (2010).
- 173 Holmes, C. *et al.* Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology* **73**, 768-774, doi:10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95 (2009).
- 174 Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Culliford, D. & Perry, V. H. Proinflammatory cytokines, sickness behavior, and Alzheimer disease. *Neurology* **77**, 212-218, doi:10.1212/WNL.0b013e318225ae07 (2011).
- 175 Barnett, K. *et al.* Epidemiology of multimorbidity and implications for health care, research, and medical education: a cross-sectional study. *Lancet (London, England)* **380**, 37-43, doi:10.1016/s0140-6736(12)60240-2 (2012).
- 176 Jenner, P. *et al.* Parkinson's disease--the debate on the clinical phenomenology, aetiology, pathology and pathogenesis. *J Parkinsons Dis* **3**, 1-11, doi:10.3233/jpd-130175 (2013).
- 177 Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K. & Braak, H. 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* **9**, 13-24, doi:10.1038/nrneurol.2012.242 (2013).
- 178 Jucker, M. & Walker, L. C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**, 45-51, doi:10.1038/nature12481 (2013).
- 179 Goedert, M., Falcon, B., Clavaguera, F. & Tolnay, M. Prion-like mechanisms in the pathogenesis of tauopathies and synucleinopathies. *Current neurology and neuroscience reports* **14**, 495, doi:10.1007/s11910-014-0495-z (2014).
- 180 Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. & Takahashi, H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neuroscience letters* **249**, 180-182 (1998).
- 181 Spillantini, M. G. *et al.* Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neuroscience letters* **251**, 205-208 (1998).



- 182 Tu, P. H. *et al.* Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann Neurol* **44**, 415-422, doi:10.1002/ana.410440324 (1998).
- 183 Papp, M. I., Kahn, J. E. & Lantos, P. L. Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *Journal of the neurological sciences* **94**, 79-100 (1989).
- 184 Fanciulli, A. & Wenning, G. K. Multiple-system atrophy. *The New England journal of medicine* **372**, 1375-1376, doi:10.1056/NEJMc1501657 (2015).
- 185 Nakamura, K. *et al.* Filamentous aggregations of phosphorylated alpha-synuclein in Schwann cells (Schwann cell cytoplasmic inclusions) in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun* **3**, 29, doi:10.1186/s40478-015-0208-0 (2015).
- 186 Poewe, W. *et al.* Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17013, doi:10.1038/nrdp.2017.13 (2017).
- 187 Nonaka, T., Watanabe, S. T., Iwatsubo, T. & Hasegawa, M. Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* **285**, 34885-34898, doi:10.1074/jbc.M110.148460 (2010).
- 188 Luk, K. C. *et al.* Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20051-20056, doi:10.1073/pnas.0908005106 (2009).
- 189 Braak, H. *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 197-211 (2003).
- 190 Braak, H. & Del Tredici, K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* **201**, 1-119 (2009).
- 191 Svensson, E. *et al.* Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* **78**, 522-529, doi:10.1002/ana.24448 (2015).
- 192 Li, J. Y. *et al.* Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature medicine* **14**, 501-503, doi:10.1038/nm1746 (2008).
- 193 Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B. & Olanow, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nature medicine* **14**, 504-506, doi:10.1038/nm1747 (2008).
- 194 Olanow, C. W. & Prusiner, S. B. Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12571-12572, doi:10.1073/pnas.0906759106 (2009).
- 195 Sacino, A. N. *et al.* Intramuscular injection of alpha-synuclein induces CNS alpha-synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 10732-10737, doi:10.1073/pnas.1321785111 (2014).
- 196 Peelaerts, W. *et al.* alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* **522**, 340-344, doi:10.1038/nature14547 (2015).
- 197 Holmqvist, S. *et al.* Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. *Acta Neuropathol* **128**, 805-820, doi:10.1007/s00401-014-1343-6 (2014).
- 198 Luk, K. C. *et al.* Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* **338**, 949-953, doi:10.1126/science.1227157 (2012).
- 199 Bousset, L. *et al.* Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun* **4**, 2575, doi:10.1038/ncomms3575 (2013).
- 200 Chen, K. *et al.* Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *J Biol Chem* **281**, 3651-3659, doi:10.1074/jbc.M508125200 (2006).
- 201 Iribarren, P. *et al.* CpG-containing oligodeoxynucleotide promotes microglial cell uptake of amyloid beta 1-42 peptide by up-regulating the expression of the G-protein-coupled receptor mFPR2. *FASEB J* **19**, 2032-2034, doi:10.1096/fj.05-4578fje (2005).
- 202 Soria, J. A. *et al.* Interleukin 4 induces the apoptosis of mouse microglial cells by a caspase-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* **43**, 616-624, doi:10.1016/j.nbd.2011.05.010 (2011).
- 203 Iribarren, P. *et al.* IL-4 Inhibits the Expression of Mouse Formyl Peptide Receptor 2, a Receptor for Amyloid 1-42, in TNF-Activated Microglia. *The Journal of Immunology* **175**, 6100-6106, doi:10.4049/jimmunol.175.9.6100 (2005).

- 204 Iribarren, P. *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. *The Journal of Immunology* **171**, 5482-5488, doi:10.4049/jimmunol.171.10.5482 (2003).
- 205 Iribarren, P. *et al.* Interleukin 10 and TNFalpha synergistically enhance the expression of the G protein-coupled formylpeptide receptor 2 in microglia. *Neurobiol Dis* **27**, 90-98, doi:10.1016/j.nbd.2007.04.010 (2007).
- 206 Chen, K. *et al.* Induction of the formyl peptide receptor 2 in microglia by IFN-gamma and synergy with CD40 ligand. *J Immunol* **178**, 1759-1766 (2007).
- 207 Le, Y. *et al.* TGF-beta1 disrupts endotoxin signaling in microglial cells through Smad3 and MAPK pathways. *J Immunol* **173**, 962-968 (2004).
- 208 Cardona, A. E. *et al.* Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* **9**, 917-924, doi:10.1038/nn1715 (2006).
- 209 Ousman, S. S. & Kubes, P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci* **15**, 1096-1101, doi:10.1038/nn.3161 (2012).
- 210 Prinz, M. & Priller, J. Tickets to the brain: role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS. *J Neuroimmunol* **224**, 80-84, doi:10.1016/j.jneuroim.2010.05.015 (2010).
- 211 Ransohoff, R. M. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* **31**, 711-721, doi:10.1016/j.immuni.2009.09.010 (2009).
- 212 Yamasaki, R. *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med* **211**, 1533-1549, doi:10.1084/jem.20132477 (2014).
- 213 Deczkowska, A., Baruch, K. & Schwartz, M. Type I/II Interferon Balance in the Regulation of Brain Physiology and Pathology. *Trends Immunol* **37**, 181-192, doi:10.1016/j.it.2016.01.006 (2016).
- 214 Kunis, G. *et al.* IFN-gamma-dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain* **136**, 3427-3440, doi:10.1093/brain/awt259 (2013).
- 215 Baruch, K. *et al.* Aging. Aging-induced type I interferon response at the choroid plexus negatively affects brain function. *Science* **346**, 89-93, doi:10.1126/science.1252945 (2014).
- 216 Blank, T. & Prinz, M. Type I interferon pathway in CNS homeostasis and neurological disorders. *Glia* **65**, 1397-1406, doi:10.1002/glia.23154 (2017).
- 217 Rothhammer, V. *et al.* Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nature medicine* **22**, 586-597, doi:10.1038/nm.4106 (2016).
- 218 Goedert, M. NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Aβeta, tau, and alpha-synuclein. *Science* **349**, 1255555, doi:10.1126/science.1255555 (2015).
- 219 Peelaerts, W. & Baekelandt, V. a-Synuclein strains and the variable pathologies of synucleinopathies. *J Neurochem* **139 Suppl 1**, 256-274, doi:10.1111/jnc.13595 (2016).
- 220 Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762-774, doi:10.1038/nri3070 (2011).
- 221 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. *J Neuroinflammation* **11**, 132, doi:10.1186/1742-2094-11-132 (2014).
- 222 Perry, V. H., Newman, T. A. & Cunningham, C. The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* **4**, 103-112, doi:10.1038/nrn1032 (2003).
- 223 Lee, J. W. *et al.* Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation* **5**, 37, doi:10.1186/1742-2094-5-37 (2008).
- 224 Qin, L. *et al.* Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* **55**, 453-462, doi:10.1002/glia.20467 (2007).
- 225 Ruiz-Valdepenas, L. *et al.* Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study. *J Neuroinflammation* **8**, 5, doi:10.1186/1742-2094-8-5 (2011).
- 226 Greter, M. *et al.* GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* **36**, 1031-1046, doi:10.1016/j.immuni.2012.03.027 (2012).

- 227 Ji, Q., Castelli, L. & Goverman, J. M. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nat Immunol* **14**, 254-261, doi:10.1038/ni.2513 (2013).
- 228 Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* **34**, 440-445, doi:10.1016/j.it.2013.06.001 (2013).
- 229 Getts, D. R. *et al.* Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *J Exp Med* **205**, 2319-2337, doi:10.1084/jem.20080421 (2008).
- 230 Rotta, G. *et al.* Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **198**, 1253-1263, doi:10.1084/jem.20030335 (2003).
- 231 Shechter, R. *et al.* Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity* **38**, 555-569, doi:10.1016/j.immuni.2013.02.012 (2013).
- 232 Dickens, A. M. *et al.* Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to inflammatory brain lesions. *Science signaling* **10**, doi:10.1126/scisignal.aai7696 (2017).
- 233 Dal-Secco, D. *et al.* A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med* **212**, 447-456, doi:10.1084/jem.20141539 (2015).
- 234 D'Mello, C., Le, T. & Swain, M. G. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factoralpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* **29**, 2089-2102, doi:10.1523/JNEUROSCI.3567-08.2009 (2009).
- 235 Saederup, N. *et al.* Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* **5**, e13693, doi:10.1371/journal.pone.0013693 (2010).
- 236 Hammond, M. D. *et al.* CCR2+ Ly6C(hi) inflammatory monocyte recruitment exacerbates acute disability following intracerebral hemorrhage. *J Neurosci* **34**, 3901-3909, doi:10.1523/JNEUROSCI.4070-13.2014 (2014).
- 237 Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* **468**, 253-262, doi:10.1038/nature09615 (2010).
- 238 Limatola, C. & Ransohoff, R. M. Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Front Cell Neurosci* **8**, 229, doi:10.3389/fncel.2014.00229 (2014).
- 239 Braun, M. *et al.* Activation of Myeloid TLR4 Mediates T Lymphocyte Polarization after Traumatic Brain Injury. *J Immunol* **198**, 3615-3626, doi:10.4049/jimmunol.1601948 (2017).
- 240 Gabrilovich, D. I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174, doi:10.1038/nri2506 (2009).
- 241 Condamine, T. & Gabrilovich, D. I. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol* **32**, 19-25, doi:10.1016/j.it.2010.10.002 (2011).
- 242 Veglia, F., Perego, M. & Gabrilovich, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* **19**, 108-119, doi:10.1038/s41590-017-0022-x (2018).
- 243 Zhu, B. *et al.* Plasticity of Ly-6C(hi) myeloid cells in T cell regulation. *J Immunol* **187**, 2418-2432, doi:10.4049/jimmunol.1100403 (2011).
- 244 Shalova, I. N. *et al.* Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Immunity* **42**, 484-498, doi:10.1016/j.immuni.2015.02.001 (2015).
- 245 Waschbisch, A. *et al.* Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *J Immunol* **196**, 1558-1567, doi:10.4049/jimmunol.1501960 (2016).
- 246 Wlodarczyk, A., Lobner, M., Cedile, O. & Owens, T. Comparison of microglia and infiltrating CD11c(+) cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *J Neuroinflammation* **11**, 57, doi:10.1186/1742-2094-11-57 (2014).
- 247 Jia, T., Leiner, I., Dorothee, G., Brandl, K. & Pamer, E. G. MyD88 and Type I interferon receptor-mediated chemokine induction and monocyte recruitment during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **183**, 1271-1278, doi:10.4049/jimmunol.0900460 (2009).
- 248 Uyangaa, E. *et al.* Distinct Upstream Role of Type I IFN Signaling in Hematopoietic Stem Cell-Derived and Epithelial Resident Cells for Concerted Recruitment of Ly-6Chi Monocytes and NK Cells via CCL2-CCL3 Cascade. *PLoS Pathog* **11**, e1005256, doi:10.1371/journal.ppat.1005256 (2015).

- 249 Sammicheli, S. *et al.* Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses. *Science immunology* **1**, doi:10.1126/sciimmunol.aah6789 (2016).
- 250 Lee, A. J. *et al.* Inflammatory monocytes require type I interferon receptor signaling to activate NK cells via IL-18 during a mucosal viral infection. *J Exp Med* **214**, 1153-1167, doi:10.1084/jem.20160880 (2017).
- 251 Prinz, M. *et al.* Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* **28**, 675-686, doi:10.1016/j.immuni.2008.03.011 (2008).
- 252 Wolf, Y. *et al.* Autonomous TNF is critical for in vivo monocyte survival in steady state and inflammation. *J Exp Med* **214**, 905-917, doi:10.1084/jem.20160499 (2017).
- 253 Janova, H. *et al.* CD14 is a key organizer of microglial responses to CNS infection and injury. *Glia* **64**, 635-649, doi:10.1002/glia.22955 (2016).
- 254 Zhou, H., Lapointe, B. M., Clark, S. R., Zbytniuk, L. & Kubes, P. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* **177**, 8103-8110 (2006).
- 255 Melief, J. *et al.* Phenotyping primary human microglia: tight regulation of LPS responsiveness. *Glia* **60**, 1506-1517, doi:10.1002/glia.22370 (2012).
- 256 Reber, L. L. *et al.* Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med* **214**, 1249-1258, doi:10.1084/jem.20161238 (2017).
- 257 Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* **352**, aaf1098, doi:10.1126/science.aaf1098 (2016).
- 258 Netea, M. G. & van der Meer, J. W. Trained Immunity: An Ancient Way of Remembering. *Cell Host Microbe* **21**, 297-300, doi:10.1016/j.chom.2017.02.003 (2017).
- 259 Kim, C. *et al.* Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of alpha-synuclein fibril. *Sci Rep* **6**, 30891, doi:10.1038/srep30891 (2016).
- 260 Murray, C. L., Skelly, D. T. & Cunningham, C. Exacerbation of CNS inflammation and neurodegeneration by systemic LPS treatment is independent of circulating IL-1beta and IL-6. *J Neuroinflammation* **8**, 50, doi:10.1186/1742-2094-8-50 (2011).
- 261 Mao, X. *et al.* Pathological alpha-synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* **353**, doi:10.1126/science.aah3374 (2016).
- 262 Jucker, M. & Heikenwalder, M. Immune receptor for pathogenic alpha-synuclein. *Science* **353**, 1498-1499, doi:10.1126/science.aai9377 (2016).
- 263 Harms, A. S. *et al.* alpha-Synuclein fibrils recruit peripheral immune cells in the rat brain prior to neurodegeneration. *Acta Neuropathol Commun* **5**, 85, doi:10.1186/s40478-017-0494-9 (2017).
- 264 Van der Perren, A. *et al.* FK506 reduces neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in an alpha-synuclein-based rat model for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **36**, 1559-1568, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.01.014 (2015).
- 265 Oliveras-Salva, M. *et al.* rAAV2/7 vector-mediated overexpression of alpha-synuclein in mouse substantia nigra induces protein aggregation and progressive dose-dependent neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **8**, 44, doi:10.1186/1750-1326-8-44 (2013).
- 266 Sasaguri, H. *et al.* APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *Embo j* **36**, 2473-2487, doi:10.15252/emboj.201797397 (2017).
- 267 Koprach, J. B., Kalia, L. V. & Brotchie, J. M. Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nat Rev Neurosci* **18**, 515-529, doi:10.1038/nrn.2017.75 (2017).
- 268 Visanji, N. P. *et al.* alpha-Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends Neurosci* **39**, 750-762, doi:10.1016/j.tins.2016.09.003 (2016).
- 269 Goedert, M., Masuda-Suzukake, M. & Falcon, B. Like prions: the propagation of aggregated tau and alpha-synuclein in neurodegeneration. *Brain* **140**, 266-278, doi:10.1093/brain/aww230 (2017).
- 270 Eisele, Y. S. *et al.* Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science* **330**, 980-982, doi:10.1126/science.1194516 (2010).
- 271 Sulzer, D. *et al.* T cells from patients with Parkinson's disease recognize alpha-synuclein peptides. *Nature* **546**, 656-661, doi:10.1038/nature22815 (2017).

- 272 Anderson, A. C., Joller, N. & Kuchroo, V. K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* **44**, 989-1004, doi:10.1016/j.immuni.2016.05.001 (2016).
- 273 Melki, R. How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol Dis* **109**, 201-208, doi:10.1016/j.nbd.2017.03.011 (2018).

---

---

# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

---

---

## Publicaciones científicas

- Arroyo DS, Gaviglio EA, Peralta Ramos JM, Bussi C, Avalos MP, Cancela LM e Iribarren P. ***“PI3K inhibitors regulate peptidoglycan-induced myeloid leukocyte recruitment, inflammation and neurotoxicity in mouse brain”***. Publicado en `Frontiers in Immunology´ (2018). DOI: 10.3389/fimmu.2018.00770.
- Peralta Ramos JM, Bussi C, Gaviglio EA, Arroyo DS, Báez N, Rodríguez-Galán MC e Iribarren P. ***“Type I IFNs are required to promote CNS immune surveillance through the recruitment of inflammatory monocytes upon systemic inflammation”***. Publicado en `Frontiers in Immunology´ (2017). DOI: 10.3389/fimmu.2017.01666.
- Bussi C, Peralta Ramos JM, Arroyo DS, Gaviglio EA, Gallea JI, Celej MS, Wang JM e Iribarren P. ***“Autophagy modulates pro-inflammatory mediators in BV2 microglial cells and rescues both LPS and alpha-synuclein induced neuronal cell-death”***. Publicado en `Scientific Reports´ (2016). DOI: 10.1038/srep43153.
- Arroyo DS, Gaviglio EA, Peralta Ramos JM, Bussi C, Rodríguez-Galán MC e Iribarren P. ***“Autophagy in inflammation, infection, neurodegeneration and cancer”***. Publicado en `International Immunopharmacology´ (2014). DOI: 10.1016/j.intimp.2013.11.001.

## Presentaciones a congresos internacionales

- Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, Bussi C e Iribarren P. ***“Tissue-resident microglia and recruited monocytes: relevance in neuroinflammation after peripheral lipopolysaccharide challenge”***. Keystone joint Symposia “Microglia in the brain” & “Common mechanisms in neurodegeneration”. Keystone (Estados Unidos), 12-16 de Junio de 2016.
- Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, Bussi C e Iribarren P. ***“Phenotypic and functional features of microglia and monocytes in CNS after systemic***

***lipopolysaccharide challenge***". FENS Featured Regional Meeting 2015 (FFRM).  
Tsalónica (Grecia), 7-10 de Octubre de 2015.

### **Presentaciones en formato oral a congresos nacionales**

- Peralta Ramos JM, Bussi C, Arroyo DS e Iribarren P. ***"Participation of type I-II IFNs in the regulation of the CNS immune surveillance after systemic inflammation"***. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), VII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Nanomedicina (NANOMEDAR), V Congreso Nacional de la Asociación Argentina de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio (AACYTAL). Mar del Plata, 15-19 de Noviembre de 2016.

### **Presentaciones en formato póster a congresos nacionales**

- Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, Bussi C e Iribarren P. ***"Phenotypic and functional features of microglia and monocytes in CNS after systemic lipopolysaccharide challenge"***. IV Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias (LASID), II Congreso Franco-Argentino de Inmunología (FAIC) y LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Buenos Aires, 18-21 de Noviembre de 2015.
- Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, Bussi C e Iribarren P. ***"Lipopolysaccharide modulates the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 and induces recruitment of leukocytes to the Central Nervous System"***. LVIX Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, 19-22 de Noviembre de 2014.



- Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, Bussi C, Rodríguez-Galán MC e Iribarren P. **“Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces recruitment of leukocytes to the Central Nervous System and modulates the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1”**. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Los Cocos, 7-9 de Noviembre de 2013.
- Peralta Ramos JM, Gaviglio EA, Arroyo DS, Bussi C, Rodríguez-Galán MC e Iribarren P. **“Modulación de receptores quimiotácticos en células microgliales por receptores semejantes a Toll”**. LVII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Mar del Plata, 14-17 de Noviembre de 2012.

### **Becas internacionales otorgadas**

- Beca otorgada por la **IBRO** (*International Brain Research Organization*) para asistir a la *Gordon Research Conference “Neurobiology of Brain Disorders”*. Castelldefels (España), 5-10 de Agosto de 2018.
- Beca otorgada por la **IBRO** (*International Brain Research Organization*) para realizar una pasantía corta, en el marco del **YITP (Young Investigator Training Programme)**, en el grupo de investigación de “Neurodegeneración y Neuroinmunología” de la Prof. Dra. Seija Lehnardt en Berlín (Alemania), 12-26 de Julio de 2018.
- Beca otorgada por la **FENS** (*Federation of European Neuroscience Societies*) - **IBRO** (*International Brain Research Organization*) para asistir al *FENS Forum in Neuroscience*. Berlín (Alemania), 7-11 de Julio de 2018.
- Beca otorgada por la **EMBO** (*European Molecular Biology Organization*) para realizar una pasantía corta en el grupo de investigación de “Neurobiología y Terapia Génica” de

la Prof. Dra. Veerle Baekelandt en Leuven (Bélgica) desde el 29 de Junio al 26 de Septiembre de 2017.

- Beca otorgada por la **DMM** (*Disease Models & Mechanisms*), una revista de The Company of Biologists, para realizar una pasantía corta en el grupo de investigación de “Neurobiología y Terapia Génica” de la Prof. Dra. Veerle Baekelandt en Leuven (Bélgica) desde el 29 de Junio al 26 de Septiembre de 2017.
- Beca otorgada por la **FENS** (*Federation of European Neuroscience Societies*) para asistir al *FRM* (*FENS Regional Meeting*). Pécs (Hungría), 20-23 de Septiembre de 2017.
- Beca otorgada por la **ISN** (*International Society for Neurochemistry*) para asistir al *Keystone Symposium “Microglia in the brain”* 2016. Keystone (Estados Unidos), 12-16 de Junio de 2016.
- Beca otorgada por la **ISNI** (*International Society of Neuroimmunology*) para asistir al *ASNI* (*Americas School of Neuroimmunology*) 2015. Calgary (Canadá), 1 y 2 de Octubre de 2015.
- Beca otorgada por la **FENS** (*Federation of European Neuroscience Societies*) para asistir al *FFRM* (*FENS Featured Regional Meeting*) 2015. Tesalónica (Grecia), 7-10 de Octubre de 2015.

### **Becas nacionales otorgadas**

- Apoyo económico otorgado por la **SECyT** (Secretaría de Ciencia y Técnica) para realizar una pasantía corta en el grupo de investigación de “Neurobiología y Terapia Génica” de la Prof. Dra. Veerle Baekelandt en Leuven (Bélgica) desde el 29 de Junio al 26 de Septiembre de 2017.
- Beca de Finalización de Doctorado otorgada por el **CONICET** (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). Tema: “Regulación de la migración y de la

activación de células gliales y células mieloides por citoquinas y moléculas pro-inflamatorias”.

- Beca inicial de Doctorado otorgada por el **FONCyT** (Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica). Tema: “Regulación de la función de receptores quimiotácticos por citoquinas de tipo 2 en macrófagos”.