



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Rol de los astrocitos proliferativos luego de la lesión de la corteza cerebral murina

Tesista: *Jesica Frik*

Director: *Ricardo Martín Gómez*

Codirectora: *Magdalena Götz*

Año: *2018*

Tesis doctoral

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TITULO:

Rol de los astrocitos proliferativos luego de la lesión de la corteza cerebral murina

.

DOCTORANDO: JESICA FRIK

DIRECTOR: RICARDO MARTÍN GÓMEZ

CODIRECTORA: MAGDALENA GÖTZ

2017 - LA PLATA - BUENOS AIRES – ARGENTINA

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) perteneciente a la UNLP - CONICET y en el Instituto de Fisiología de la Universidad Ludwig Maximilian de Munich (LMU), bajo la dirección de los Dres Ricardo M. Gómez y Magdalena Götz y la tutoría de la Dra. Swetlana Sirko.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Facultad de Ciencias Exactas, al Departamento de Ciencias Biológicas; al IBBM y a la LMU, por brindarme el ámbito para realizar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al DAAD/ME por las becas para poder llevar a cabo el presente trabajo.

Al Dr. Ricardo Gómez, por alentar el inicio de mi trayectoria en la investigación de los astrocitos reactivos, permitirme trabajar en su laboratorio en las primeras instancias del proyecto, dirigir este trabajo de tesis con la flexibilidad que el proyecto de colaboración demandaba. Por la orientación a lo largo del doctorado, la disponibilidad constante y la valiosa ayuda para la escritura de este trabajo.

A la Dra. Magdalena Götz, por integrarme a su maravilloso equipo de investigación, por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme acceso ilimitado a todos los recursos y reactivos que este hermoso proyecto y nuestra imaginación demandaban. Por alentar las discusiones científicas en todos los ámbitos posibles. Por permitirme presentar este trabajo en numerosos congresos internacionales. Por garantizar el bienestar de mi familia durante la estadía en Munich. Pero lo más importante, por alentarme a desarrollar mis ideas, inspirarme y mantener el entusiasmo en todos los estadios del proyecto, mi más profundo agradecimiento

A la Dra. Svetlana Sirko, por transferirme sus habilidades técnicas con excelencia docente. Por inspirarme a explorar un poco más cada cosa. Por acompañarme los días buenos y los más difíciles. Porque juntas formamos el equipo de cirujías más eficiente que existirá en el laboratorio en toda la historia. Por ayudarme a corregir todos los pequeños detalles. Por estar disponible cualquier día, a cualquier hora. Por su afecto y amistad. ¡Lana, muchas gracias!

A Sophia Bardehle, por transferirme todas las habilidades necesarias para continuar con su proyecto con paciencia y afecto.

A la Dra. Leda Dimou, por la supervisión y asesoramiento en los experimentos con animales y por excelentes sugerencias a lo largo del proyecto.

A todos los miembros presentes y pasados del *Reactive Gliosis Club* del grupo de Magdalena Götz por numerosas sugerencias y comentarios durante el avance del proyecto.

A nuestros colaboradores en Munich, Stefanie Hauck y Juliane Merl-Pham por la colaboración y los recursos para los experimentos de proteómica y a Nikolaus Plesnila por proveer los animales para los estudios de isquemia cerebral.

A Nicola Mattugini, Jonas Kraska y a mi amigo Jacob Kjell por su trabajo en los experimentos posteriores a la revisión del *paper* principal de este trabajo.

A Gabi Jäger por su invaluable asistencia técnica con los preparados histológicos en momentos de gran necesidad.

A Detlef Franzen, por asistencia técnica para las genotipificaciones y por la paciencia en épocas de trabajo intenso.

A Tatiana por la ayuda con los experimentos con astrocitos *in vitro*, y a todo el equipo de técnicos: Ines, Carmen y Majia, la ayuda diaria.

A Inès Potdevin por su gran ayuda en los experimentos durante su pasantía con nosotros y a Carmen Denecke por la ayuda en las inmunotinciones de los ratones SMOM2.

A todo el equipo del *Tierhaus* de la LMU por su imprescindible asistencia técnica para la manutención de las líneas de ratones transgénicos.

A Sergio Banchemo por la realización de innumerables PCRs de genotipificación de ratones y ayuda en las inmunomarcaciones.

A Axel von Streitberg por la orientación para la realización de las cirugías y los experimentos de microscopía *in vivo*.

A las *astro-ladys*: Luisa Canhos y Daisy Paiva por sugerencias y discusiones sobre astrocitos proliferativos

A Sofía Grade por la supervisión en cirugías, el café y su amistad.

A Lana Polero por su invaluable ayuda en el mundo de los formularios en alemán, por su ayuda administrativa cargada de humor y su tolerancia, y a Swada, por su afectuosa ayuda.

A todos y cada uno de los miembros del laboratorio de Magdalena, por las sugerencias y comentarios durante los *labmeetings*, y especialmente a los miembros del laboratorio de la LMU por ser un grupo de trabajo tan agradable, por el compañerismo y la amistad.

Al Dr. Victor Romanowski, por permitirme trabajar en su laboratorio en los inicios de mi doctorado y a los miembros presentes y pasados de su laboratorio, en especial a Leticia Ferrelli, Santiago Hasse y Matias Pidre por su compañerismo en los inicios de este doctorado.

A las chicas del grupo de Ricardo, especialmente a Carolina Jaquenod de Giusti por transferirme todas sus habilidades técnicas y a Lucrecia Alberdi por su colaboración al momento de dar los primeros pasos del doctorado. Pero también a Emilia Scharrig, Florencia Ferrer, Gabriela Pretre, Noelia Olivera y Maia Cédola por estar día a día en esos inicios.

Mi profundo agradecimiento a mis queridos compañeros de oficina de la LMU, a Stefanie Ohlig, Elisa Murenu y Sergio Gascón por estar todos los días acompañándome a transitar un camino lleno de nuevos desafíos, por el café y los *Gummibärchen* compartidos. Por ayuda en innumerables situaciones, comentarios, sugerencias y soluciones. ¡Muchas gracias!

A mis amigas en La Plata, por acompañarme al transitar el camino del posgrado y sus visisitudes.

A mi familia: los Borgert, Constantini, Banchemo y anexos, Frik y Gómez-Frik por estar incondicionalmente. Especialmente a mi mamá, por todo, y a mi hermano Andrés Vanerio, por los numerosos viajes al aeropuerto en todos los climas, que también hicieron posible este proyecto.

A mi esposo Sergio Banchemo, de nuevo, por acompañarme a donde la vida nos lleve, incluyendo pasar años en Alemania, por su afectuosa contención y sus mates que hicieron este doctorado posible.

Resumen

En este trabajo se estudiaron los astrocitos proliferativos en dos modelos distintos de lesión del sistema nervioso central: la lesión traumática de la corteza cerebral y la isquemia como resultado de la oclusión de la arteria cerebral media. Los astrocitos proliferativos se encuentran ubicados principalmente en posiciones adyacentes a los vasos sanguíneos cerebrales. Con el objetivo de elucidar el rol de esta subpoblación astrocitaria mediante la manipulación genética de ratones, se crearon modelos para alterar la respuesta astrocitaria proliferativa y se estudió el comportamiento de células gliales e infiltrados inflamatorios en la corteza cerebral lesionada. Los resultados muestran que una disminución en la proliferación de los astrocitos resulta en un aumento del número de monocitos infiltrados mientras que un aumento de la proliferación astrocitaria reduce su número. Se estudió también la evolución de la lesión en ratones deficientes en CCR2, un receptor de quimioquinas involucrado en la extravasación de los monocitos. En este modelo se investigó la respuesta glial en ausencia de las señales generadas por monocitos infiltrados y se encontró un aumento de la proliferación de la macroglia en estas condiciones. Estos resultados muestran una regulación inversa cruzada entre astrocitos y monocitos. Se encontró, además, que la disminución del número de monocitos infiltrados tiene consecuencias positivas durante la cicatrización glial resultando en menor deposición de matriz extracelular, un incremento en el área ocupada por neuronas y una disminución del área ocupada por GFAP. Estos resultados sientan bases para un nuevo enfoque terapéutico en medicina regenerativa en el que se module la proliferación glial y la infiltración de monocitos para lograr una mejor cicatrización del tejido nervioso lesionado.

INDICE

Agradecimientos	4
Resumen.....	6
INDICE.....	7
INTRODUCCION GENERAL	11
Células del tejido nervioso	11
Neurogénesis y gliogénesis	12
Astrocitos.....	13
La respuesta glial a una lesión de la corteza cerebral.....	14
La heterogeneidad de los astrocitos reactivos	14
El nicho yuxtavascular	15
Objetivos del Proyecto	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos.....	18
1) Caracterización molecular y funcional de astrocitos proliferativos.	18
2) Estudio de la proliferación de los astrocitos luego de lesión aguda producida por la oclusión de la arteria cerebral media (oACM).....	18
Capítulo 1.....	19
Características de los astrocitos proliferativos.....	19
La subpoblación de astrocitos proliferativos.....	19
Modelos experimentales para estudiar la reacción astrocitaria	21
Modelo in vitro: Cultivos primarios de astrocitos (scratch assay).....	22
Lesión por objeto penetrante (<i>stab wound injury</i>)	22
Lesión por oclusión de la arteria cerebral media	23
Inmunomarcación de los astrocitos yuxtavasculares	23
GFAP (proteína ácida fibrilar glial).....	23
S100 β	24
CD31.....	25
Resultados.....	25
Sox 2 (sex determining region Y-box 2)	26
BLBP (<i>brain lipid-binding protein</i>)	26
EGFR (<i>epithelial growth factor receptor</i>).....	29

Discusión.....	30
Conclusiones.....	30
Capítulo 2	32
La dinámica de la proliferación astrocitaria en distintos modelos de lesión	32
Detección de astrocitos proliferativos.....	32
Resultados	33
Dinámica de la proliferación astrocitaria en el modelo de lesión cortical punzante	33
Proliferación astrocitaria en el modelo de isquemia por obstrucción de la arteria cerebral media	36
Discusión.....	40
Conclusiones.....	41
Capítulo 3	41
Efectos de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico sobre la proliferación astrocitaria.....	41
Resultados	43
Discusión.....	44
Conclusiones.....	45
Capítulo 4	46
Infiltración de células inmunes periféricas.....	46
La reacción de los macrófagos.....	47
Resultados	50
Análisis temporal de la infiltración de células inmunes	50
Discusión.....	52
Conclusiones.....	53
Capítulo 5	54
Función de los astrocitos proliferativos	54
Hipótesis de trabajo.....	54
Capítulo 6	58
Pérdida de la función de los astrocitos proliferativos.....	58
Resultados	58
Reducción de la proliferación astrocitaria en ratones Cdc42 cKO.....	58
La infiltración de células inmunes periféricas está aumentada en ratones Cdc42 cKO	58
Reducción de la proliferación por delección del receptor Smo.....	60
Discusión.....	61
Conclusión	61
Capítulo 7	62
Ganancia en la función astrocitaria	62
Resultados	62

Consecuencias del aumento de la proliferación astrocitaria por tratamiento con SAG 62

Aumento de la proliferación astrocitaria en ratones SMOM2 63

Reducción de la infiltración de células CD45⁺ Iba1⁻ en ratones SMOM2 64

Respuesta de otras células gliales 66

Acumulación perivascular de células CD45^{high} Iba1⁻ en ratones SmoM2 68

Discusión 68

Conclusiones 68

Capítulo 8 69

Composición de los infiltrados inflamatorios 69

Señales capaces de desencadenar la actividad proliferativa en astrocitos 69

Necesidad de las células infiltradas para desencadenar el proceso proliferativo 70

Resultados 71

La mayoría de las células infiltradas en la corteza cerebral lesionada son monocitos CCR2⁺ 71

Discusión 73

Conclusión 74

Capítulo 9 75

Efectos de las señales derivadas de monocitos infiltrados sobre la proliferación astrocitaria ... 75

Resultados 75

La infiltración de monocitos en ratones CCR2^{RFP/RFP} está impedida severamente 75

La disminución del número de monocitos infiltrados resulta en un aumento de la proliferación de la macroglia 75

Discusión 79

Conclusiones 79

Capítulo 10 80

Efectos a largo plazo: la formación de la cicatriz glial 80

Resultados 80

Mejora en la cicatrización de la sustancia gris lesionada en ratones CCR2 KO 80

Efectos de un aumento de la proliferación astrocitaria sobre la formación de la cicatriz glial 85

Discusión 87

Conclusiones 89

Proteómica de la lesión 90

Resultados 90

Diferencias en la expresión de proteínas en la corteza cerebral lesionada entre ratones WT y CCR2 KO a 5 dpi 90

Análisis funcional 91

Discusión 99

Conclusiones 99

Discusión general	100
La proliferación de astrocitos reactivos regula el número de monocitos invasores	100
Los monocitos infiltrados regulan la proliferación de la macroglia y la formación de la cicatriz glial.....	101
Perspectivas de la línea de investigación.....	104
Microscopía intravital de dos fotones.....	104
Conclusiones finales	109
Materiales y Métodos	110
Modelos experimentales.....	110
Recombinación mediada por tamoxifeno.....	111
Procedimientos quirúrgicos	112
Implantación de ventana craneal y microscopía de dos fotones	113
Cultivos de astrocitos y ensayos de lesión por raspado de la <i>monocapa (scratch wound assay)</i>	113
Inmunohistoquímica	115
Cuantificación de imágenes.....	117
Colecta de muestra para análisis proteómicos	117
LC-MSMS y análisis cuantitativo	117
Análisis de red de proteínas	118
Análisis de enriquecimiento de vías de señalización	119
Análisis estadístico.....	119
Software utilizado	120
Referencias bibliográficas	121

INTRODUCCION GENERAL

Células del tejido nervioso

El tejido del sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos está compuesto por una compleja red de neuronas y células gliales. Las neuronas son las unidades funcionales del sistema nervioso. Su interacción mediante sinapsis conduce a respuestas complejas, relacionadas al control de todos los sistemas del organismo, la inteligencia y la memoria. Las células gliales forman una extensa matriz interneuronal que provee soporte estructural y funcional a las neuronas. Entre las mismas es posible diferenciar las células de la macroglia, que derivan del neuroectodermo, de las células de la microglia, de origen mesenquimal. La macroglia puede clasificarse en tres tipos celulares principales: astrocitos o astroglia, oligodendroglía (compuesta por oligodendrocitos y sus precursores) y células ependimales. (Figura I1).

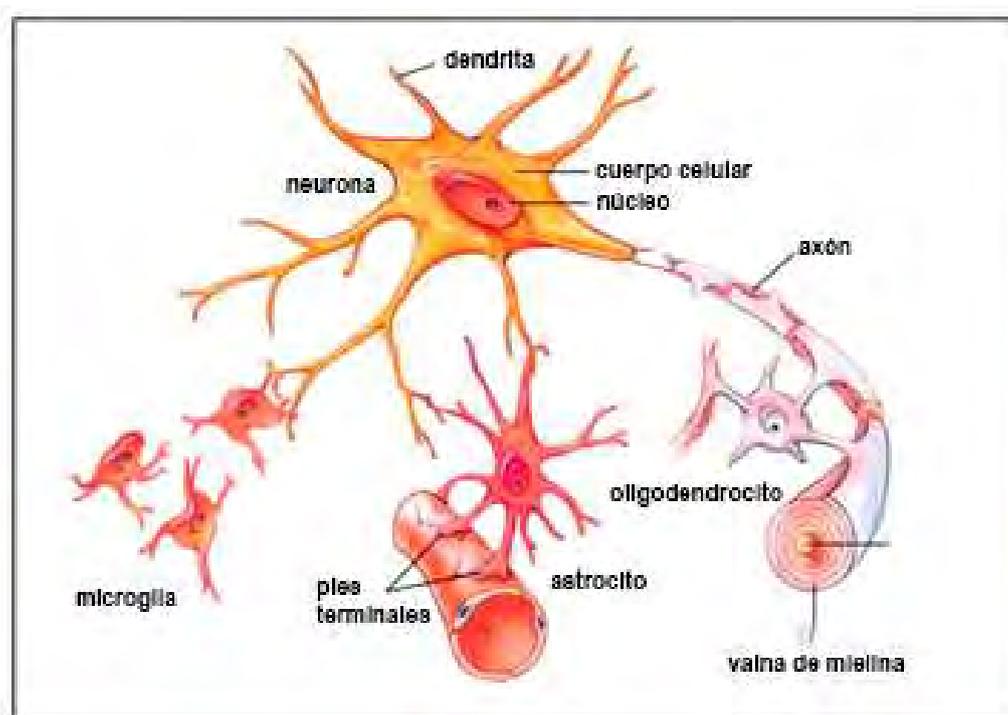


Figura I1. Células del tejido nervioso y sus interacciones. Se muestra una neurona cuyo axón está rodeado por una vaina de mielina generada por un oligodendrocito. Se muestran células de la microglia contactando dendritas para ilustrar su rol en el mantenimiento de las sinapsis y un astrocito que contacta tanto un vaso sanguíneo como a la neurona para ilustrar su rol de intermediario entre ambas estructuras.

Neurogénesis y gliogénesis

Durante el desarrollo del SNC de todos los vertebrados, las primeras células en aparecer son las células neuroepiteliales que inicialmente amplifican el conjunto de células progenitoras (Gao et al., 2014; Götz and Huttner, 2005; Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) y son la base de todos los tipos celulares de SNC incluyendo neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimales (Figura I2) (Götz, M., Sirko, S., Beckers, J., & Irmeler, M., Glía 2015).

Las células progenitoras del estadio embrionario se diferencian a células de la glía radial, las cuales por división asimétrica generan tanto neuronas como células gliales (Alvarez-Buylla et al., 2001; Götz and Huttner, 2005; Götz et al., 2016). Alrededor del período perinatal, las células de la glía radial adquieren características similares a los astrocitos, a pesar de que siguen generando tanto astrocitos como neuronas en la zona subventricular.

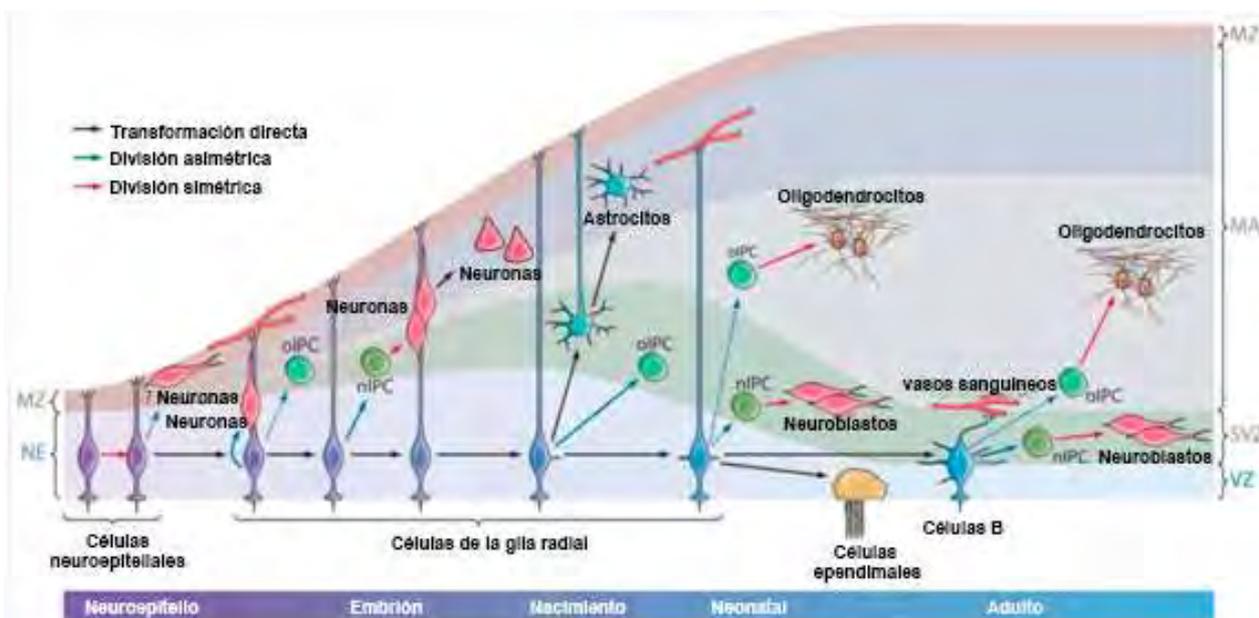


Figura I2. Generación de las células del sistema nervioso de mamífero que derivan de progenitores neurales durante los estadios embrional, neonatal y adulto. Adaptado de (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

La neurogénesis en el estadio adulto es muy limitada y se restringe a determinados nichos. En ratas y ratones los dos nichos de neurogenesis constitutiva son la zona subependimal del ventrículo lateral (SEZ, del inglés *subependymal zone*) también denominada zona subventricular (SVZ, del inglés *subventricular zone*) y la zona subgranular del giro dentado del hipocampo (SGZ, *subgranular zone*) (Figura I3). Ambas zonas contienen una población heterogénea de células progenitoras endógenas dominada por células astrogiales. Aunque ha sido demostrado que estas células

pueden activarse para actuar como precursores neuronales en el caso de una lesión, estas originan principalmente células gliales y no neuronas (Götz et al., 2016; Robel et al., 2011b). Dada la importancia que tendría la posibilidad de reemplazar neuronas dañadas en medicina regenerativa, una mejor comprensión de la lógica molecular que gobierna el comportamiento de estas células podría permitir encontrar formas de mejorar la diferenciación de las células madre neurales en neuronas funcionales incluso en el microambiente gliogénico del sistema nervioso adulto (Götz et al., 2016).



Figura 13. Zonas de neurogenesis adulta en roedores. La figura muestra un esquema de un corte sagital en ratones donde se han coloreado con rojo las zonas de neurogénesis en el ratón adulto: el giro dentado del hipocampo (DG) y la zona subventricular del ventrículo lateral (LV). La vía rostral migratoria (RMS) también se encuentra coloreada de rojo. Los neuroblastos migran a través de esta vía para convertirse luego en interneuronas en el bulbo olfatorio (OB) (Ming and Song, 2011).

Astroцитos

Los astrocitos son las células más numerosas del SNC y tienen diversas funciones tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Contribuyen a la formación de la barrera hematocefálica y forman la *glia limitans*, la capa más externa del tejido neural.

Los astrocitos intervienen en la homeostasis de neurotransmisores, el balance extracelular de iones y el soporte metabólico neuronal.

Tradicionalmente se clasifican en dos tipos: astrocitos protoplasmáticos y fibrosos. Los primeros se encuentran principalmente en la sustancia gris y los segundos en la sustancia blanca. Un tercer tipo de astrocito es la glía radial que está presente durante el desarrollo embrionario y constituye la población de células progenitoras capaces de generar todas las demás del tejido neural. Debido a la similitud en la expresión de marcadores en astrocitos maduros y en la glía radial y por la plasticidad que los astrocitos muestran en condiciones de cultivo celular, sería hipotéticamente posible que los mismos actúen como células progenitoras neuronales en el cerebro adulto. Sin

embargo, este comportamiento no se observa debido al microambiente gliogénico de la corteza cerebral adulta mencionado previamente (Götz et al., 2016; Robel et al., 2011b). En las distintas regiones del cerebro del ratón pueden encontrarse astrocitos con características particulares y diversos grados de plasticidad (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Robel et al., 2011b).

La respuesta glial a una lesión de la corteza cerebral

En caso de producirse algún tipo de daño en la corteza cerebral, se desencadena una respuesta de las células gliales que incluye microgliosis, astrogliosis y una reacción aguda de células progenitoras de oligodendrocitos. La microgliosis se manifiesta primero y los otros tipos celulares reaccionan con posterioridad (Simon et al., 2011). La astrogliosis se caracteriza por cambios moleculares y morfológicos en los astrocitos que se encuentran en los bordes de la lesión, entre los que se destacan hipertrofia, polarización celular en dirección a la lesión, aumento de la expresión de las proteínas de los filamentos intermedios como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), nestina, vimentina y expresión de diversas proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria (Bardehle et al., 2013a; Robel et al., 2011b; Sofroniew, 2009; Sofroniew and Vinters, 2010). Como concepto clave para la interpretación de este trabajo, es importante destacar que los astrocitos en la corteza cerebral de ratones adultos normalmente no se dividen. Sin embargo, en respuesta a señales que se producen durante una lesión aguda, son capaces de reanudar su actividad proliferativa (Sirko et al., 2013a). Este hecho es muy interesante, ya que como estas células no son capaces de migrar hacia la zona de la lesión (Bardehle et al., 2013a), la proliferación es la única manera de incrementar el número de astrocitos que pueden contribuir a la reparación del tejido dañado.

La heterogeneidad de los astrocitos reactivos

Cuando se produce una lesión aguda invasiva, como es el caso de una pequeña lesión punzante (*stab wound injury*) de la corteza cerebral, los astrocitos reaccionan en forma heterogénea. Es decir, en algunas subpoblaciones se observa hipertrofia, polarización de las células en dirección a la lesión, expresión de proteínas características del estado activado y en algunos casos proliferación celular (Figura I4 A-D, Bardehle, Kruger et al, 2013). Los astrocitos que reanudan su actividad proliferativa representan una fracción pequeña de la población total.

Aún no se conoce si la subpoblación proliferativa tiene características intrínsecas que los hacen diferentes de las células que permanecen estáticas, o si son el entorno y las señales que se producen en determinados nichos los que conducen a la reanudación del ciclo celular. La comprensión de estas señales y la caracterización de los distintos subtipos astrocitarios son indispensables para la comprensión del proceso de reparación luego de la lesión cerebral aguda.

Los astrocitos proliferativos tienen características especiales que han sido objeto de numerosos estudios. Las mismas se ponen en manifiesto *in vitro*. Cuando se genera un cultivo celular a partir de tejido del cerebro lesionado de un ratón adulto. Si se obtiene material de la zona reactiva que rodea a la lesión y se lo pone en las condiciones adecuadas, los astrocitos no solo sobreviven y proliferan sino que además son capaces de generar estructuras llamadas neurosféricas que a su vez, en un medio adecuado para su diferenciación, pueden generar todos los tipos celulares del linaje neural, incluidas las neuronas (Simon et al., 2011; Sirko et al., 2013b). Esto indica que los astrocitos reactivos corticales son multipotentes, aunque esta característica no se observa *in vivo* en la corteza cerebral adulta donde un astrocito que se divide genera dos células hijas del linaje astrocitario.

El nicho yuxtavascular

En trabajos previos de esta línea de investigación (Bardehle, Kruger et al, 2013) se realizó el seguimiento de la reacción astrocitaria luego de la lesión de la corteza cerebral utilizando microscopía intravital de dos fotones. Gracias a que las características particulares de esta técnica permiten la visualización de células modificadas para expresar proteínas fluorescentes en especímenes vivos, fue posible estudiar los astrocitos de la zona reactiva del borde de la lesión mediante la implantación de una ventana craneal y la obtención de imágenes de la misma área a distintos tiempos posteriores a la lesión. Para este fin se utilizó una línea de ratones transgénicos que expresa una forma inducible de la recombinasa Cre bajo el promotor del transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST) y una construcción reportera con el gen de eGFP. Cuando se administra tamoxifeno por vía oral en estos ratones en el estadio adulto, la recombinasa Cre puede acceder al núcleo y escindir una señal de STOP que permite la expresión de eGFP en los astrocitos en los cuales se produjo la recombinación. En estos experimentos se realizó la marcación de los vasos sanguíneos mediante la inyección intravenosa de un dextrano fluorescente rojo. Los vasos sanguíneos marcados de esta manera son una estructura relativamente

constante que permite orientar al operador para tomar imágenes de la misma región a medida que evoluciona la lesión. Un análisis detallado de la subpoblación de astrocitos que atravesó el proceso de división celular durante el tiempo de estudio, reveló que la mayoría de estas células tienen el cuerpo celular en contacto con los vasos sanguíneos cerebrales. Estos astrocitos se estudiaron en profundidad utilizando también microscopía electrónica para establecer su localización respecto a la membrana basal de las células endoteliales. Se pudo determinar que los mismos se ubicaban del lado parenquimal de la membrana basal del endotelio y no en el espacio perivascular, por lo que se les otorgó la denominación de astrocitos yuxtavasculares que describe con exactitud su posición anatómica (Bardehle et al., 2013a).

El descubrimiento de que la mayoría de los astrocitos que proliferan tienen el cuerpo celular directamente en contacto con los vasos sanguíneos podría inferir un rol directo de la proliferación yuxtavascular en la limitación del ingreso de células provenientes de la sangre. Esto es consistente con los resultados de trabajos en los que se estudiaron los efectos de la ablación de astrocitos reactivos que atravesaban el proceso de división celular luego de una lesión traumática cerebral moderada (Bush et al., 1999; Myer et al., 2006). En los mismos se utilizó una línea de ratones en la que se expresó la timidina kinasa (TK) herpética bajo el promotor de GFAP y tratamiento con ganciclovir luego de la lesión que desencadenaba la proliferación astrocitaria. Lo que se observó es que este tratamiento resulta en una mayor infiltración de células inflamatorias en el tejido nervioso. Sin embargo, para la interpretación de este resultado es necesario considerar que en este sistema se induce la muerte celular en los astrocitos que expresan la enzima herpética. La muerte inducida de un gran número de astrocitos reactivos introduce una variable que no se observaría normalmente luego de la lesión, y puede desencadenar una respuesta inflamatoria accesoria y muerte neuronal secundaria que genere un aumento en la infiltración de las células inmunes periféricas. Para investigar la función de los astrocitos yuxtavasculares, en este trabajo se propuso relacionar la proliferación astrocitaria con la infiltración de células inmunes periféricas observada después de una lesión de la corteza cerebral en distintos modelos murinos. En estos modelos, la división de los astrocitos reactivos se encuentra impedida por la delección de genes involucrados en el ciclo celular (Cdc42, (Robel et al., 2011a) o mediadores de la señalización de la vía del morfógeno Sonic Hedgehog (Shh), necesaria para la proliferación astrocitaria luego de la lesión (Sirko et al., 2013a).

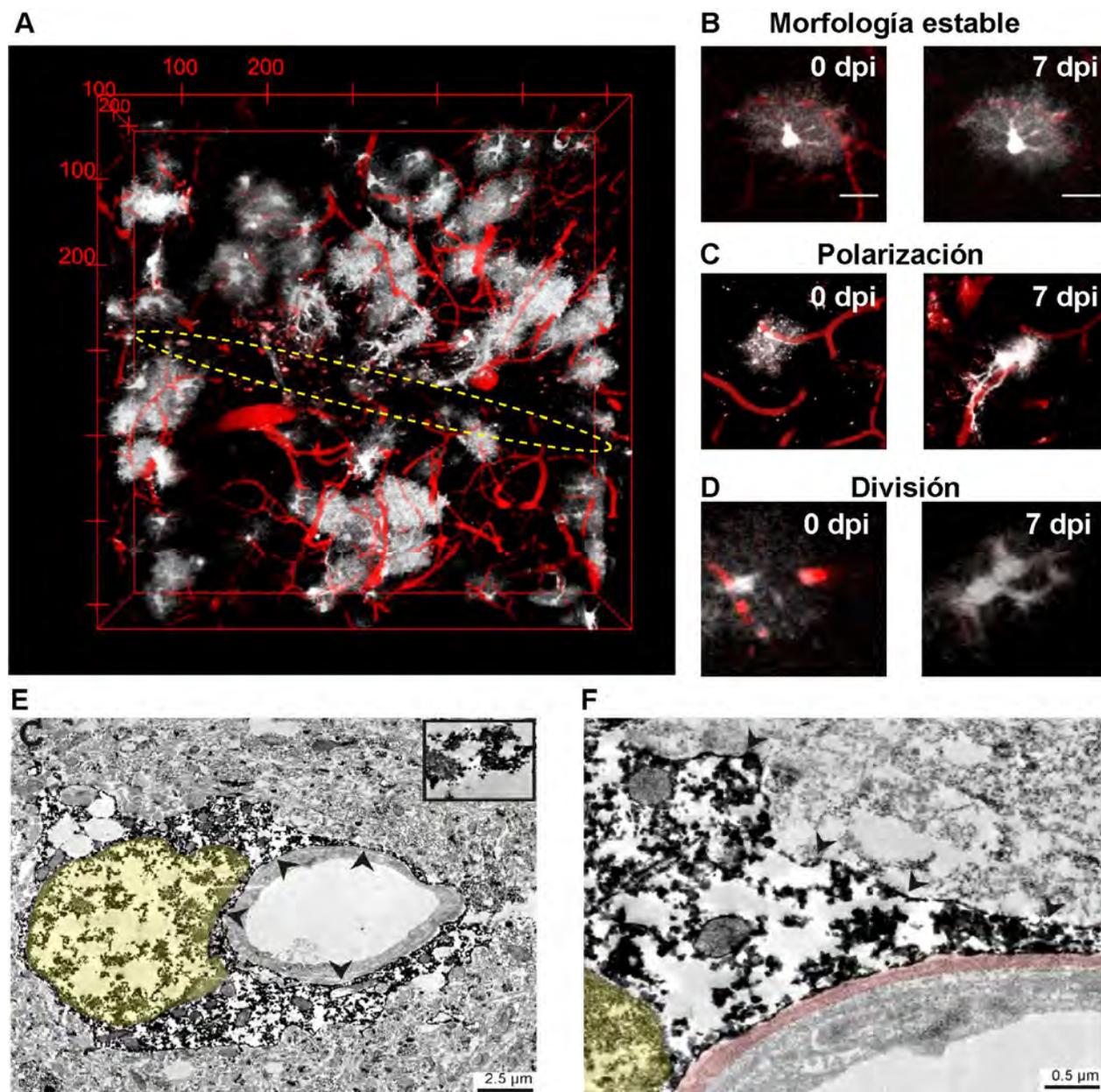


Figura 14: Localización yuxtavascular de los astrocitos proliferativos. **A)** Imagen del volumen escaneado utilizando microscopia intravital de dos fotones de la corteza cerebral de un ratón transgénico lesionado en el que algunos astrocitos expresan la proteína fluorescente verde (línea transgénica GLAST-CreERT2xGFP) y los vasos sanguíneos fueron marcados por administración intravenosa de un dextrano fluorescente rojo. **B-D)** Ejemplos de los distintos tipos de reacción que pueden observarse en astrocitos. Nótese la localización del soma celular junto al capilar cerebral del astrocito que atravesó el proceso de división celular en **(D)**. **E -F)** Imágenes de microscopía electrónica que muestran los detalles de la ultraestructura de la zona de contacto de un astrocito proliferativo **(E)**. El núcleo coloreado de amarillo muestra aglomeración de complejos del anticuerpo utilizado para la inmunomarcación de Ki67, un marcador de proliferación celular. **F)** Microfotografía mostrando el detalle del contacto del astrocito con la membrana basal de células endoteliales (color rosado). Todas las imágenes son cortesía de Sophia Bardehle y corresponden a la publicación Bardehle, Kruger et al, 2013.

Objetivos del Proyecto

Objetivo general

Estudiar la proliferación de los astrocitos reactivos en distintos modelos murinos de lesión cerebral aguda con el fin de determinar características celulares, función y vías de señalización involucradas en la regulación de la proliferación de estas células.

Objetivos específicos

1) Caracterización molecular y funcional de astrocitos proliferativos.

Para identificar las características especiales de esta subpoblación astrocitaria se propone:

- a) Identificar marcadores específicos para astrocitos yuxtavasculares que podrían permitir su aislamiento usando técnicas de separación celular y posterior análisis de expresión génica.
- b) Estudiar la infiltración de células características de la respuesta inflamatoria en el modelo de herida cortical punzante utilizando ratones mutantes o tratados farmacológicamente, en los cuales la respuesta proliferativa está disminuida o ausente, con el fin de determinar un posible rol de los astrocitos proliferativos.
- c) Estudiar el rol de la vía de señalización del óxido nítrico (NO), una vía que podría mediar la interacción entre los astrocitos y las células endoteliales en astrocitos reactivos.

2) Estudio de la proliferación de los astrocitos luego de lesión aguda producida por la oclusión de la arteria cerebral media (oACM).

Para comprender mejor el efecto que esta lesión produce sobre la actividad proliferativa de los astrocitos reactivos se propone:

- a) Comparar el comportamiento de los astrocitos corticales en este modelo con el observado en el modelo de herida cortical punzante (Bardehle et al., 2013a; Buffo et al., 2008; Robel et al., 2011a).
- b) Estudiar la proliferación en función del tiempo.

Capítulo 1

Características de los astrocitos proliferativos

Las células madre del cerebro durante el desarrollo embrionario, la glia radial, son células del linaje astrogliar similares a astrocitos. En el cerebro del ratón adulto, las células madre de la zona subventricular también expresan marcadores astrocitarios. Sin embargo, los astrocitos de la corteza cerebral del ratón adulto son quiescentes respecto a la división celular. Cuando ocurre una lesión, se produce un cambio en este aspecto, ya que además de reaccionar con hipertrofia y aumentar la expresión de proteínas de los filamentos intermedios, los astrocitos comienzan a expresar marcadores de células más indiferenciadas (Robel et al., 2011b). Cuando se aíslan astrocitos de la zona lesionada de la corteza cerebral del ratón y se colocan en un medio de cultivo adecuado, estas células son capaces de generar cúmulos de células progenitoras indiferenciadas llamadas neuroesferas (Figura 1.1), que luego generan todos los tipos celulares del tejido neural, incluyendo neuronas (Sirko et al 2013, Robel et al 2011). Sin embargo, no son todos los astrocitos aislados los que responden de esta manera. Solo una pequeña subpoblación muestra actividad proliferativa *in vivo* y un porcentaje similar manifiesta el comportamiento de célula progenitora *in vitro* (Bardehle et al., 2013a). Desde el punto de vista de la medicina regenerativa esta subpoblación celular es de gran interés porque permitiría reemplazar las neuronas perdidas por nuevas a partir de células que ya se encuentran en el lugar de la lesión. Lamentablemente, *in vivo* esto no ocurre. Los astrocitos que se dividen generan dos células hijas iguales de linaje astrogliar. No se conocen los mecanismos que gobiernan la desdiferenciación astrocitaria *in vitro* y la restringen *in vivo* aunque si se conoce que solo las lesiones que implican ruptura de la barrera hematocefálica y una reacción glial aguda despiertan el potencial de célula madre de los astrocitos y que los astrocitos de la corteza intacta no demuestran este potencial en las mismas condiciones de cultivo (Moore and Jessberger, 2013; Sirko et al., 2013a).

La subpoblación de astrocitos proliferativos

Como ya se mencionó, en un trabajo previo de esta línea investigación se realizó un seguimiento de la reacción astrocitaria luego de la lesión de la corteza cerebral utilizando microscopia multifotónica intravital (Bardehle, Kruger et al, 2013). Los

resultados mostraron que la mayoría (84%) de los astrocitos que se dividen se encuentran con su soma celular ubicado en contacto con los capilares cerebrales.

Como estudios previos confirmaron una correlación entre la actividad proliferativa de los astrocitos y la capacidad de formar neuroesferas *in vitro*, y por lo tanto neuronas, sería de interés poder aislar esta población de astrocitos juxtavasculares por técnicas de separación celular, para realizar análisis de expresión génica que permitan explicar las causas de su mayor plasticidad. Para esto son necesarios marcadores específicos que hasta el momento no se conocen. Por este motivo se planteó como primer objetivo específico de este proyecto, explorar la expresión en astrocitos juxtavasculares de una serie de marcadores candidatos que son conocidos por estar presentes tanto en astrocitos reactivos como en células más indiferenciadas (Robel et al., 2011b).

En este Capítulo se presentan los modelos de lesión utilizados para estudiar la reacción astrocitaria, se describen los marcadores utilizados para la identificación de astrocitos y se muestran los resultados obtenidos en las inmunotinciones con los marcadores seleccionados como posibles candidatos para la identificación específica de los astrocitos juxtavasculares.

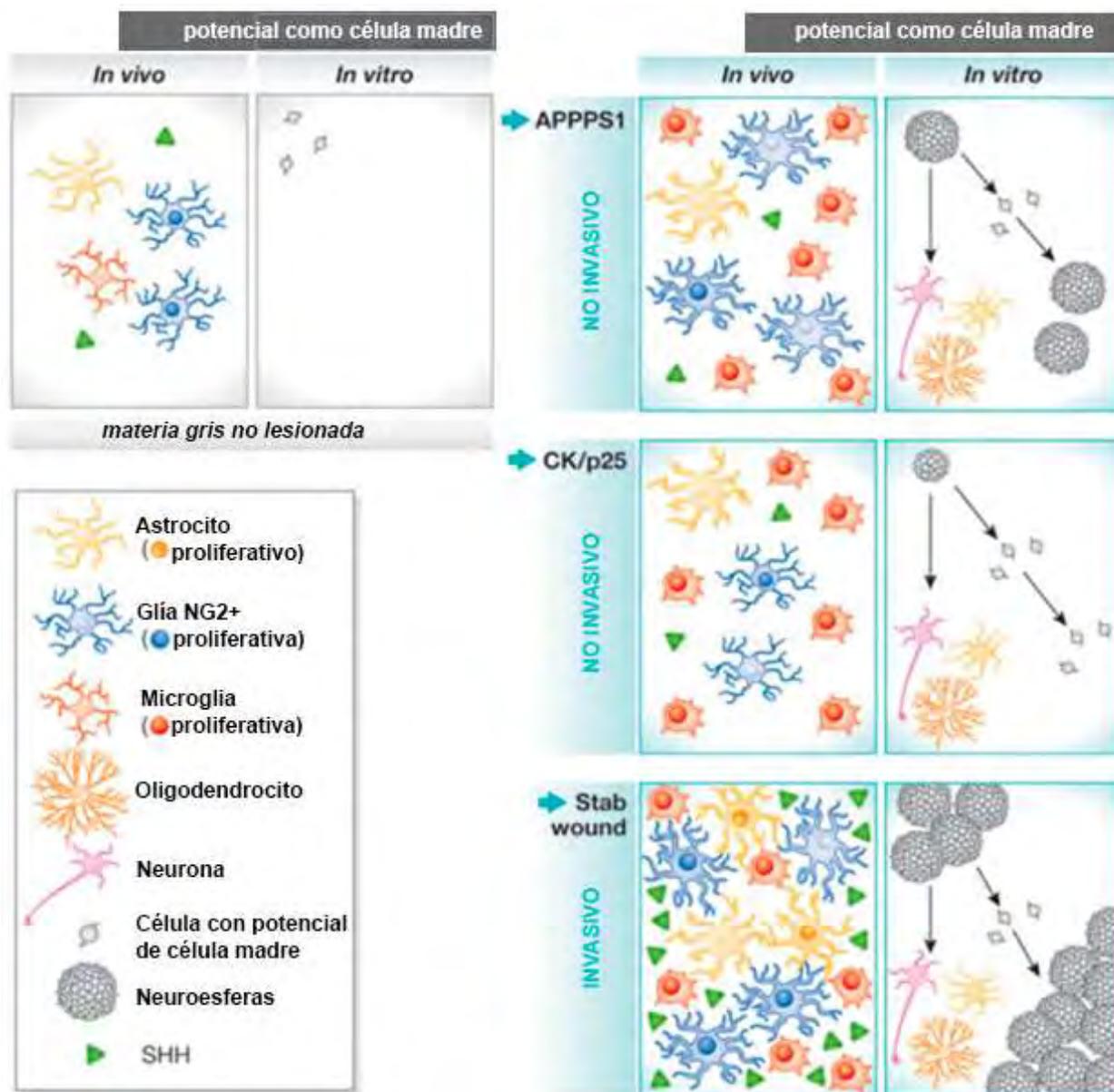


Figura 1.1. Esquema que muestra las condiciones en que se obtienen neuroesferas a partir de cultivos astrocitarios. Los modelos de lesión no invasiva son la deposición de placas amiloides (APPSS1) y la muerte neuronal inducida genéticamente (CK/p25). El modelo de lesión invasiva es la lesión por un objeto penetrante (Stab wound). La respuesta proliferativa (núcleos resaltados) de las células gliales se correlaciona con la capacidad de formar neuroesferas. Los triángulos verdes representan la proteína Sonic hedgehog (SHH) que se encuentra en plasma y líquido cefalorraquídeo y es un potencial desencadenante de la respuesta proliferativa. Modificado de Moore y Jessberger 2013.

Modelos experimentales para estudiar la reacción astrocitaria

Para poder estudiar el estado reactivo de los astrocitos y sus marcadores, es necesario modelar un daño en el tejido capaz de desencadenar la reacción glial incluyendo la respuesta proliferativa. Para que esto ocurra *in vivo* se requiere que el mecanismo de la lesión implique una ruptura de la barrera hematocefálica. En este trabajo se utilizaron

modelos *in vitro* e *in vivo* para estudiar la respuesta glial. Los detalles técnicos se explican en la sección de materiales y métodos.

Modelo *in vitro*: Cultivos primarios de astrocitos (scratch assay)

El modelo consiste en la realización de una línea (scratch) con un objeto con punta (por ejemplo, una punta de pipeta) sobre un cultivo confluyente de astrocitos primarios. luego de una semana, el cultivo confluyente está compuesto principalmente por astrocitos que tienen un estado quiescente y no proliferan. Al realizar el scratch se induce la actividad proliferativa a lo largo de la interrupción de la monocapa, que se cierra luego gracias a las nuevas células generadas por división de los astrocitos del borde y restaura la confluencia.

Lesión por objeto penetrante (*stab wound injury*)

La lesión por un objeto penetrante o punzante comúnmente denominada en inglés *stab wound* es un pequeño insulto invasivo en la materia gris cortical (corteza somatosensorial) que se utiliza como modelo de lesión traumática. La misma se puede realizar en condiciones controladas para lograr que solo afecte a la sustancia gris (Figura 1.2). Esta lesión desencadena gliosis en una zona del parenquima de hasta aproximadamente 700 μm desde el trayecto del objeto penetrante sin mayores efectos en el hemisferio contralateral que puede ser utilizado como control.

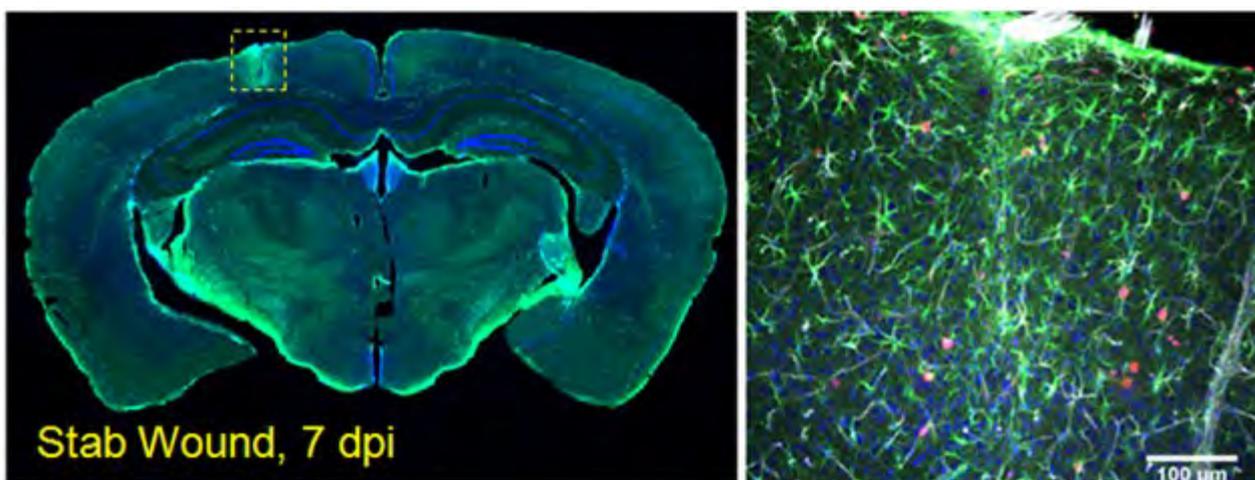
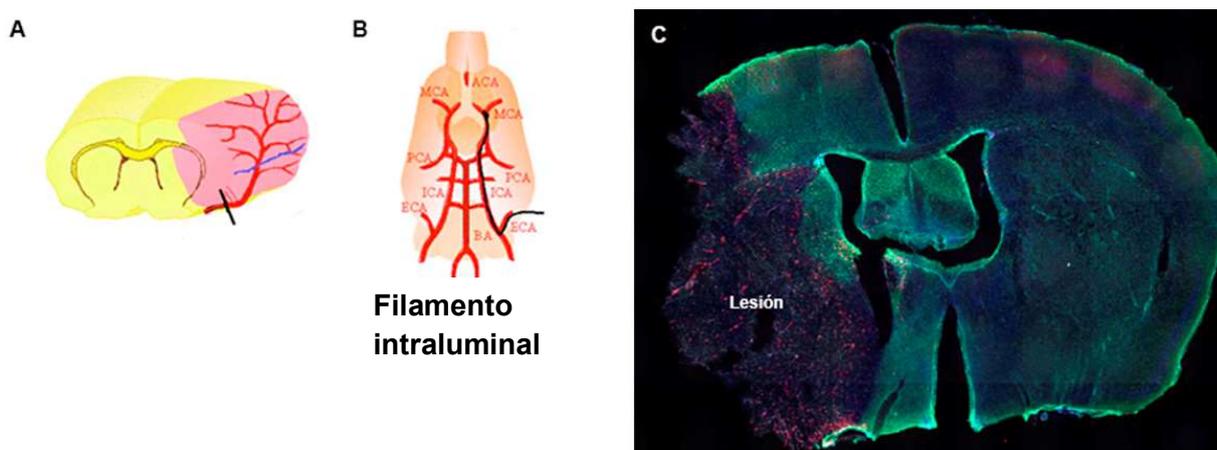


Figura 1.2. Corte de cerebro de ratón marcado con DAPI, GFAP y S100 β donde se observa la zona de gliosis rodeando la lesión causada por un objeto penetrante o *stab wound* (línea de puntos). Nótese el aspecto intacto de la corteza contralateral. El segundo panel muestra una imagen de la zona de la lesión ampliada donde se han marcado simultáneamente los vasos sanguíneos y un marcador de proliferación celular (núcleos rojos). Los marcadores utilizados se explicarán en detalle en los capítulos posteriores.

Lesión por oclusión de la arteria cerebral media

Este modelo experimental consiste en la oclusión de la arteria cerebral media mediante una cirugía en la que se inserta un filamento a través de la carótida impidiendo el flujo sanguíneo que irriga un hemisferio cerebral. Este filamento luego se retira para permitir la reperfusión del tejido luego de un tiempo determinado (30- 60 minutos). La extensión de la lesión generada por la isquemia cerebral depende de la duración de la oclusión. La misma consta de un centro o “core” necrótico y una zona reactiva en el margen de este denominado zona de penumbra (Figura 1.3).



Los tres modelos explicados anteriormente desencadenan la respuesta proliferativa astrocitaria y son por lo tanto adecuados para el estudio de la población celular de interés.

Inmunomarcación de los astrocitos yuxtavasculares

Para identificar todos los astrocitos de la corteza cerebral, se utilizó una combinación de los marcadores GFAP y S100β.

GFAP (proteína ácida fibrilar glial)

La GFAP (del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*) es una proteína ampliamente usada como marcadora de astrocitos. Es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular. Está expresada en células astrogliales durante el desarrollo y en subpoblaciones de células indiferenciadas en algunas regiones del SNC adulto (von Bohlen und Halbach, 2011). En la corteza cerebral está expresada en los

astrocitos de la sustancia blanca y en los que forman la *glia limitans*, las capas más externas, pero no está presente en astrocitos de la sustancia gris. Ante una lesión, los astrocitos reactivos regulan positivamente su expresión en respuesta a citoquinas y factores producidos durante la respuesta inflamatoria (Figura 1.4 A y 1.5).

S100 β

S100 β es un miembro de la familia de proteínas S100 cuyo nombre fue obtenido porque son 100% solubles en soluciones de persulfato de amonio. Es una proteína que une calcio y se expresa en astrocitos posmitóticos (Seri et al. 2001; Ehninger and Kempermann 2008) y en células de Schwann del sistema nervioso periférico. Es uno de los marcadores astrocitarios más específicos y confiables (Savchenko et al. 2000). En la zona subventricular, la expresión de S100 β define un estado en el cual las células que expresan GFAP pierden su potencial de célula madre neural y adquiere un estado más maduro (Raponi et al. 2007). En la corteza cerebral se expresa en todos los astrocitos independientemente de su estado reactivo (Figura 1.4 B).

Sin embargo en su forma extracelular que se encuentra presente en casos de daño tisular, esta proteína tiene un gran efecto sobre la reactividad de numerosas células, incluyendo los astrocitos, debido a su capacidad de actuar como patrón molecular asociado al daño (DAMP: *Damage Associated Molecular Pattern*). Se ha demostrado que el tratamiento con S100 β extracelular activa la vía de NF κ B de forma dosis dependiente en cultivos de astrocitos (Villarreal et al., 2014) actuando como inductora de la respuesta inflamatoria y promoviendo el fenotipo reactivo asociado a esta.

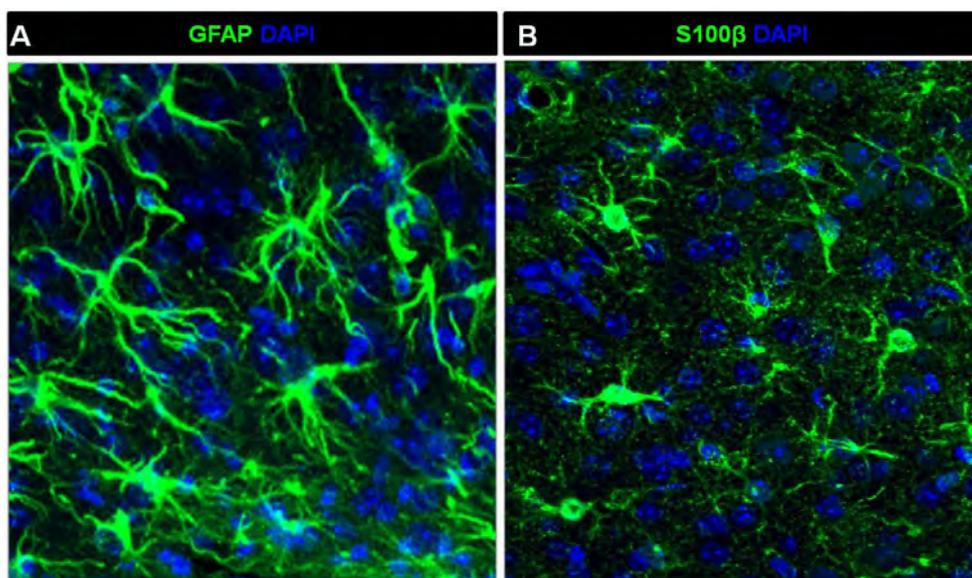


Figura 1.4: Marcadores astrocitarios. Imágenes de microscopía confocal de la corteza cerebral de ratones lesionados en los que se ha realizado la inmunomarcación de astrocitos con GFAP (A) y S100 β (B).

CD31

Para realizar la inmunomarcación de los vasos sanguíneos se utilizó el marcador CD31, también conocido como PECAM-1 (*Platelet Endotelial Cell Adhesion Molecule*). Esta proteína está expresada en las uniones célula-célula endoteliales, donde funciona como una proteína adhesiva de respuesta al estrés para mantener la integridad vascular. Además tiene un rol como receptor inhibitor en plaquetas circulantes y leucocitos (Albelda et al., 1990; Lertkiatmongkol et al., 2016). En condiciones normales se encuentra expresada en todos los vasos cerebrales a niveles fácilmente detectables por inmunofluorescencia. Este marcador se utilizó en tinciones dobles o triples con los marcadores astrocitarios antes mencionados y otros de interés, para detectar astrocitos yuxtavasculares.

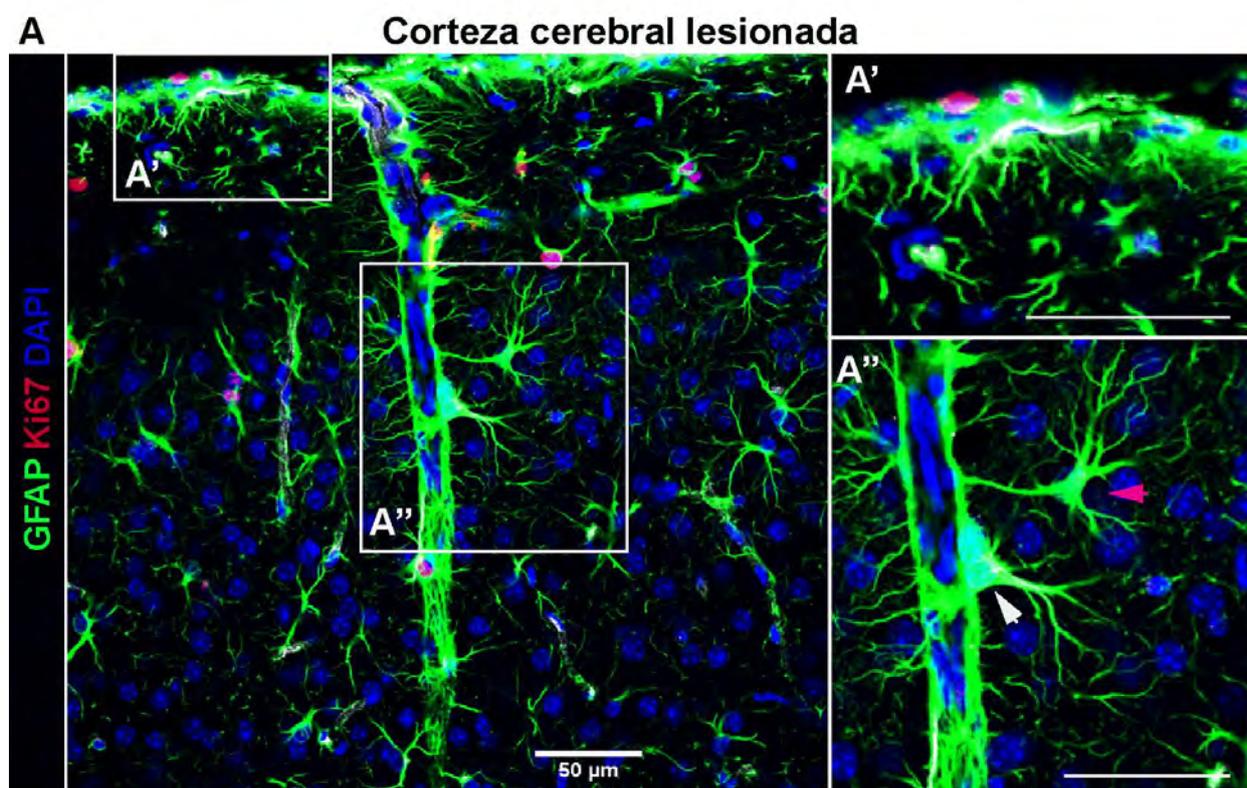


Figura 1.5: A) Imagen de microscopía confocal mostrando una estructura vascular penetrante en la corteza cerebral de un ratón al que se ha realizado una lesión de tipo *stab wound*. En este corte se han marcado simultáneamente GFAP y Ki67 (un marcador de proliferación celular, véase Capítulo 2). El área escaneada corresponde a una zona relativamente alejada del lugar de aplicación del corte (mayor a 500 μm) por lo que la capa más superficial del tejido está intacta. Nótese que por tratarse de una región distante a la lesión no todos los astrocitos de la sustancia gris expresan GFAP. A') Detalle de la *glía limitans* donde se observan altos niveles de expresión de GFAP. A''). La ampliificación muestra dos astrocitos haciendo contacto con el vaso sanguíneo. Uno muestra una proyección larga o pie terminal (flecha magenta) y el otro tiene el cuerpo celular en contacto con el vaso (flecha blanca). Barras 50 μm .

Resultados

Sox 2 (sex determining region Y - box 2)

Sox2 es un factor de transcripción expresado durante la neurogenesis embrionaria y en precursores neuronales del estadio adulto (Suh et al., 2007). Para evaluar si este factor de transcripción se expresaba específicamente en astrocitos juxtavasculares se realizaron inmunomarcaciones simultáneas para GFAP/ S100 β (para marcar todos los astrocitos), CD31 y Sox2, en cortes de cerebros de ratones sometidos a una lesión del tipo *stab wound* (Figura 1.6). La gran mayoría de los astrocitos corticales mostró marcación positiva para Sox2. Debido a que se observaron distintos niveles de expresión, es posible que incluso los que resultaron negativos expresen este factor de transcripción aunque en un nivel que no resultó detectable. No solo los astrocitos reactivos fueron positivos para Sox2 sino también los de la corteza cerebral contralateral a la lesión. La proporción de astrocitos juxtavasculares entre los astrocitos que expresan Sox2 es la misma que si se determina respecto al total de astrocitos. Estos resultados muestran que si bien los astrocitos expresan Sox2, este marcador no tiene ninguna utilidad para la marcación específica de astrocitos juxtavasculares.

BLBP (brain lipid - binding protein)

BLBP es una pequeña proteína nucleocitoplasmática expresada en las células de la glia radial durante en desarrollo del cerebro y en células gliales neurogénicas adultas (Pinto and Götz 2007). BLBP normalmente se considera como un marcador de células similares a células de la glia radial ya que normalmente no está expresado simultáneamente con el marcador S100 β o con marcadores del linaje neuronal (Brunne et al. 2010). La glia radial positiva para BLBP tiene la capacidad de dividirse y por esto también resulta positiva para el marcador Ki-67 (Hartfuss et al. 2001). BLBP puede ser utilizada para monitorear el proceso de gliogenesis en el giro dentado del hipocampo (DG). En determinadas circunstancias este marcador puede ser expresado en astrocitos (Pinto and Götz 2007) como es el caso de astrocitos corticales reactivos (Robel et al, 2011). Con el fin de evaluar si este marcador estaba presente preferencialmente en astrocitos juxtavasculares luego de una lesión del tipo *stab wound*, se realizaron inmunomarcaciones simultáneamente del marcador CD31 y los marcadores astrocitarios descritos previamente. Los resultados mostraron que solo el 42% de los astrocitos de la zona de la lesión era positivo para BLBP (Figura 1.7 A-C). El 57% de estos astrocitos positivos para BLBP estaban ubicados en posiciones juxtavasculares. Esto muestra un ligero enriquecimiento en la expresión de BLBP en los astrocitos que tienen su soma junto a los vasos, pero no permite su utilización como marcador específico.

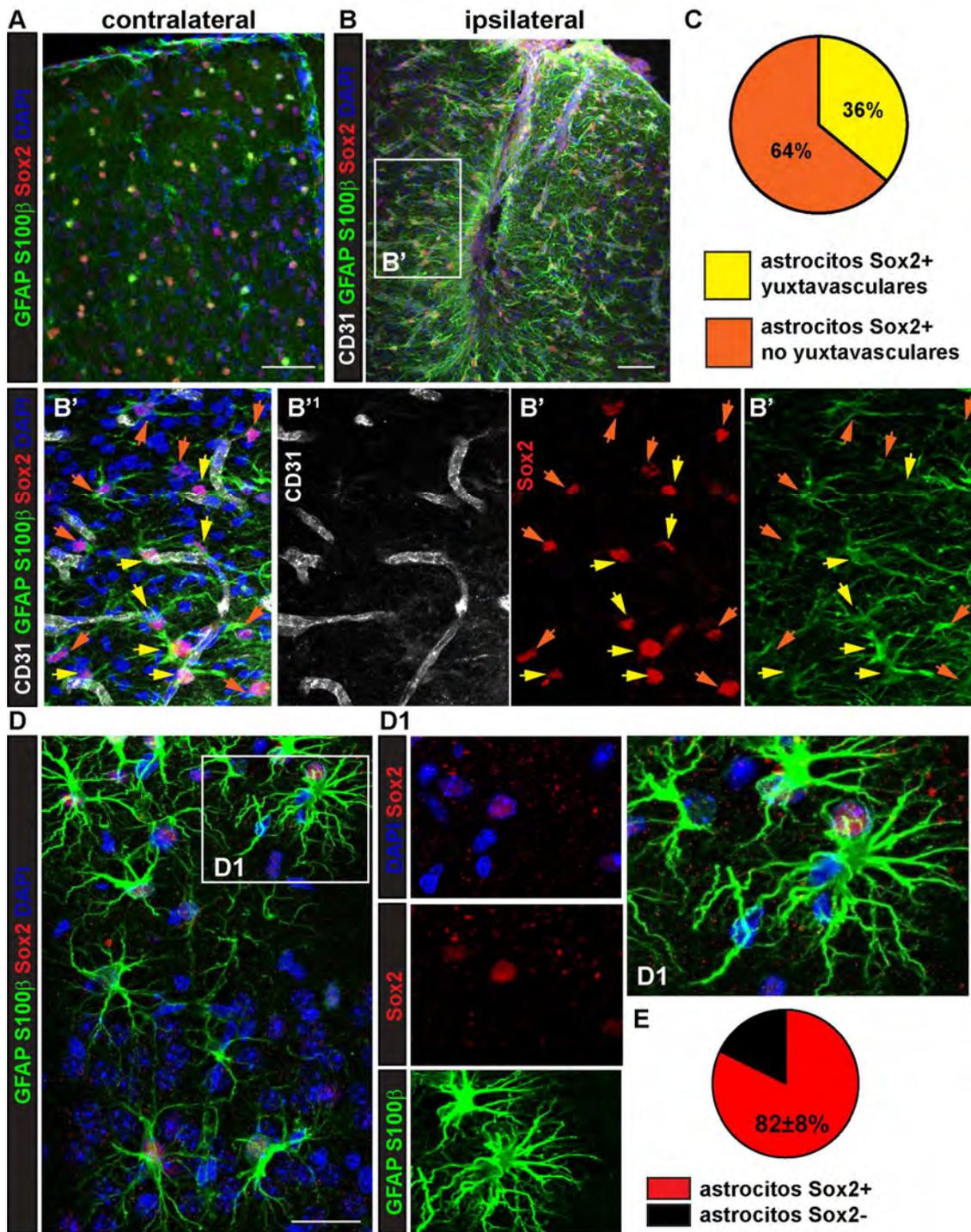


Figura 1.6. **A)** Imágenes de microscopía confocal de la corteza cerebral con inmunomarcación de Sox2, GFAP/S100β y CD31. En **(A)** se muestra la corteza del hemisferio contralateral a la una lesión (*stab wound*) y en **(B)** la corteza lesionada. B' muestra una magnificación donde se observan astrocitos yuxtavasculares (flechas amarillas) y no yuxtavasculares (flechas anaranjadas). Adyacentes, los canales individuales. **C)** Gráfico que muestra la proporción de astrocitos yuxtavasculares y no yuxtavasculares que expresan Sox2. **D)** Magnificaciones de astrocitos positivos para Sox2. Obsérvese la localización nuclear de Sox2. **E)** El gráfico muestra la proporción de astrocitos que expresan Sox2 respecto a los astrocitos totales. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Barras 100 μ m en A,B y 25 μ m en D.

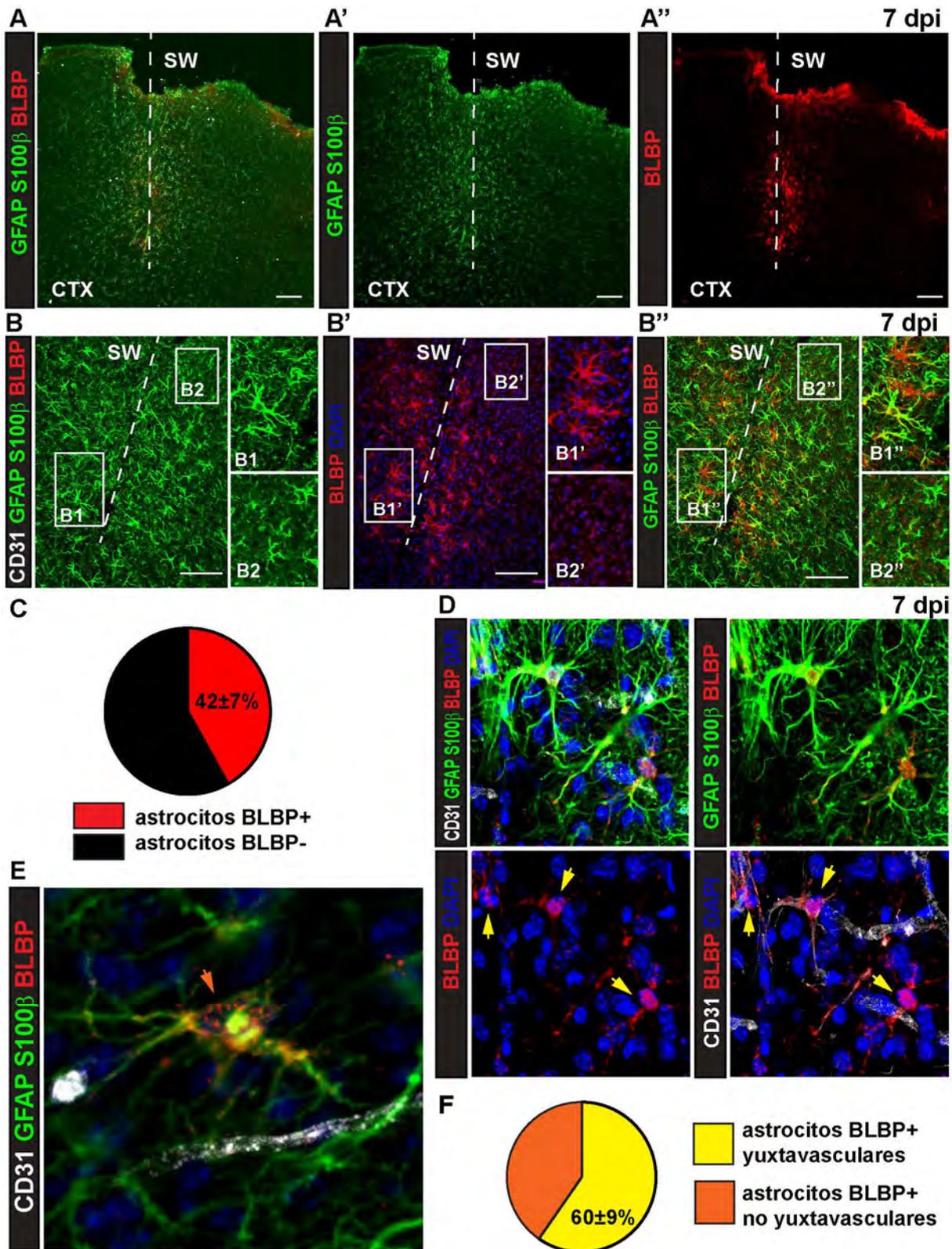


Figura 1.7. **A)** Imágenes de microscopía confocal mostrando inmunomarcación para BLBP, CD31, GFAP S100 β y DAPI. **B)** Centro de la lesión donde se observa la mayoría de los astrocitos positivos para BLBP. **C)** Porcentajes de astrocitos BLBP positivos. **D)** Detalles de astrocitos yuxtavasculares (Flechas celestes) y no yuxtavasculares (flechas magenta) que son BLBP+. **E)** cuantificación de la proporción de astrocitos yuxtavasculares calculada entre los astrocitos que expresan BLBP (izquierda) y entre los astrocitos totales (derecha). Barras 100 μ m

EGFR (*epithelial growth factor receptor*)

Esta proteína es el receptor para el factor de crecimiento epitelial (EGF) y el factor transformante del crecimiento (*Transforming Growth factor alpha*, TGF α). Es un receptor necesario para la neurogenesis adulta y se describió que está expresado en astrocitos reactivos (Chojnacki et al, 2012, Robel et al. 2011). Se evaluó su expresión en astrocitos en la corteza cerebral lesionada a 7 dpi. Se confirmó el éxito de la inmunomarcación del receptor debido a que la zona subventricular puede ser usada como control interno ya que algunas células de esta región son positivas para el mismo (Figura 1.8 A). Sin embargo, en estas circunstancias no se encontraron astrocitos positivos para este factor en la corteza cerebral. También pudo observarse que una pequeña población de células corticales no astrogliales expresa bajos niveles del receptor, pero las mismas no pudieron ser identificadas por su morfología. Estos resultados muestran que el marcador no tiene utilidad identificar astrocitos yustavasculares. No se indagaron las causas de la discrepancia con los datos reportados en la bibliografía sobre la expresión de este receptor en astrocitos reactivos. Posiblemente se exprese en otro momento de la respuesta a la lesión o no se exprese en astrocitos en este modelo de lesión cortical.

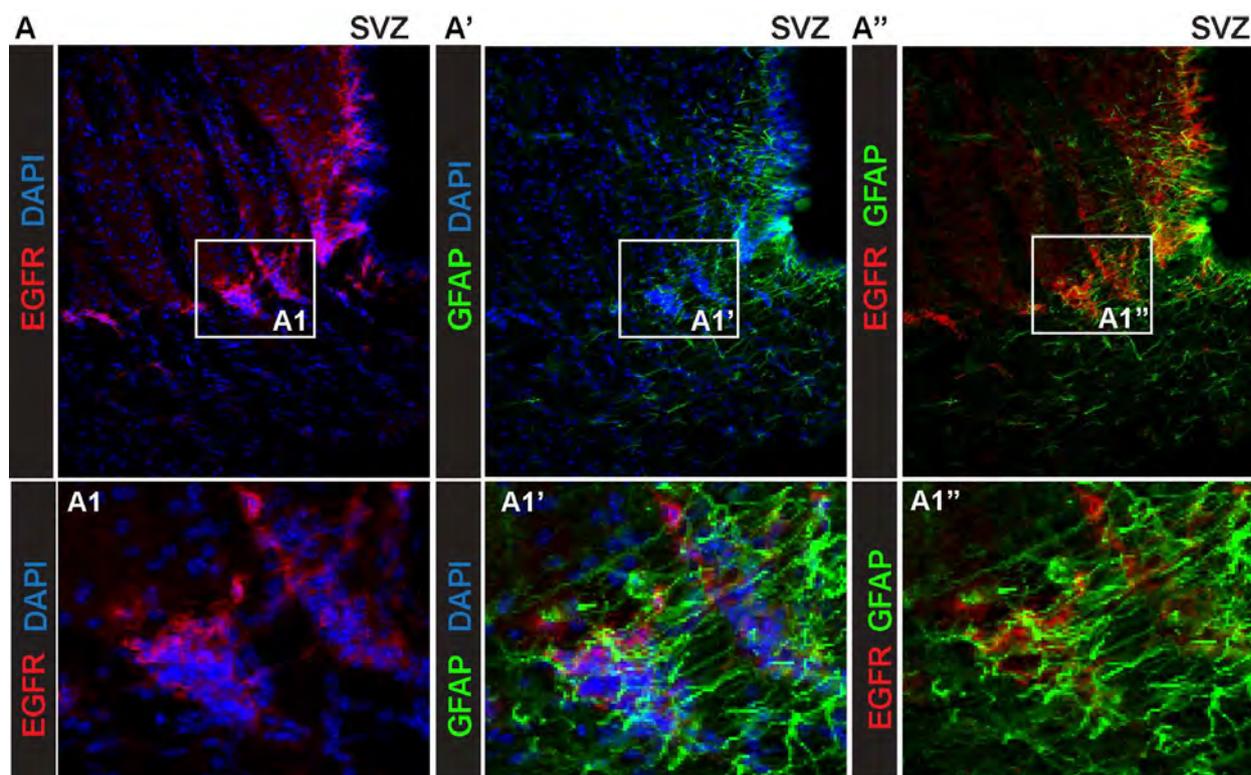


Figura 1.8. A Imágenes de microscopía confocal del ventrículo lateral que se utilizó como control positivo interno para la inmunomarcación de EGFR, con marcación simultánea de GFAP.

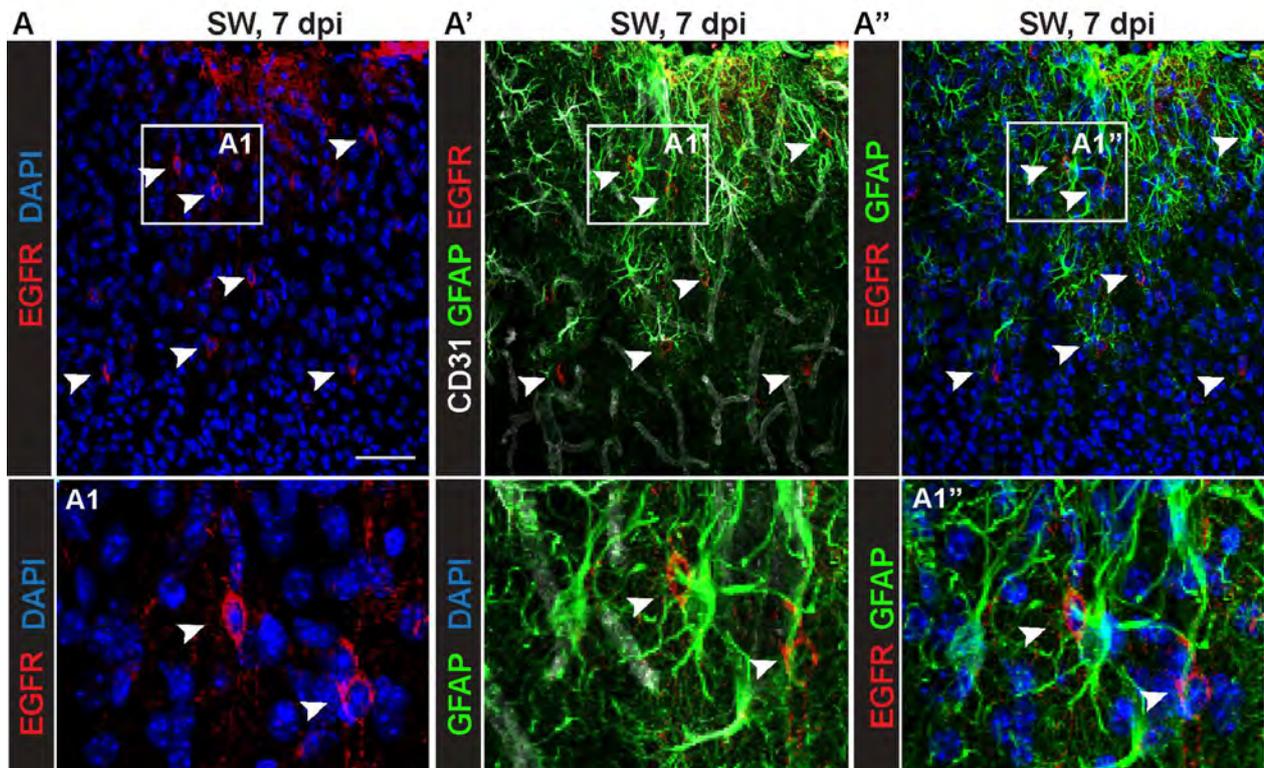


Figura 19 A) Imágenes de la sustancia gris de la corteza lesionada donde se observaron células positivas para EGFR (flechas blancas) que no son astrocitos. Barra 100 μ m.

Discusión

El descubrimiento de un marcador que permita discriminar la población de astrocitos yuxtavasculares sería de gran utilidad para poder purificar esta población mediante las técnicas de *sorting* celular. Las proteínas seleccionadas como marcadores candidatos en este trabajo no permitieron la discriminación de la población de interés respecto a otros astrocitos. Hasta el momento, los astrocitos yuxtavasculares solo pueden identificarse realizando una inmunomacación simultanea de astrocitos, núcleos y vasos sanguíneos en cortes de cerebro que se analizan por microscopía confocal, aplicando los criterios publicados por Bardehele et al. en 2013: el soma del astrocito debe estar en contacto con el vaso sanguíneo en algún plano de la serie adquirida (*stack*).

Conclusiones

Los astrocitos yuxtavasculares no mostraron la expresión de proteínas específicas o características de células más indiferenciadas y presentaron un perfil antigénico similar a los astrocitos no yuxtavasculares para los marcadores estudiados. Sox2 estaba presente en la mayoría de los astrocitos corticales y EGFR no se detectó en astrocitos corticales en este modelo de lesión. Se encontró que el 58% de los astrocitos que expresaban BLBP son yuxtavasculares. Considerando que el porcentaje normal de

astrocitos yuxtavasculares en la corteza es entre 36 y 41% (Bardehle et al 2013 y este trabajo), 58% muestra un leve enriquecimiento de BLBP en la población de astrocitos yuxtavasculares.

Capítulo 2

La dinámica de la proliferación astrocitaria en distintos modelos de lesión

Como se mencionó previamente, el descubrimiento de que los astrocitos que más proliferan son los del tipo yuxtavascular fue realizado utilizando el modelo de lesión de tipo *stab wound* (Bardehle et al 2013). En este modelo de lesión se produce una ruptura mecánica del tejido de la corteza cerebral y la consecuente ruptura de la barrera hematocefálica. Si bien se estudió tanto el comportamiento *in vivo* de esta población como su ultraestructura, no se conocía aún la dinámica de la proliferación de astrocitos yuxtavasculares, es decir, cuando proliferan la mayoría de los astrocitos y si lo hacen siempre preferentemente junto a los vasos. El conocimiento de los tiempos en los que se observa el mayor porcentaje de células en división permite correlacionar las mismas con procesos fisiológicos simultáneos, tales como la proliferación de otras células gliales, la infiltración de células de sistema inmune y el cierre de la barrera hematocefálica. El estudio de la proliferación astrocitaria en función del tiempo fue uno de los objetivos específicos de este proyecto y los resultados se muestran en este Capítulo.

Además, uno de los objetivos generales de este trabajo fue averiguar si el comportamiento de los astrocitos observado en la lesión de tipo *stab wound* es específico para este modelo de lesión o si es una característica general de la reacción astrocitaria en la corteza cerebral ante cualquier tipo de insulto. Para responder este interrogante se comparó la respuesta proliferativa de los astrocitos observada en la lesión tipo *stab wound* con el modelo de isquemia por obstrucción transitoria de la arteria cerebral mediao MCAo (del inglés, *Middle Cerebral Artery occlusion*), seguida de perfusión. En este modelo también se produce una ruptura de la barrera hematocefálica como consecuencia de la muerte celular por hipoxia en las zonas que pierden la irrigación sanguínea temporalmente.

Detección de astrocitos proliferativos

Para detectar astrocitos atravesando el proceso de división celular, en este trabajo se utilizó el marcador Ki67. El nombre de la proteína Ki67 deriva de la ciudad de origen (Kiel, Alemania) y el número del clon original de la placa de 96 pocillos (Gerdes et al. 1983). Es una proteína nuclear, expresada en células en división durante toda la duración de su proceso mitótico (Kee et al., 2002). Ki67 se expresa en todas las fases

del ciclo celular excepto en la fase G0 (debido a su corta vida media) y el principio de la fase G1, no se detecta durante los procesos de reparación celular ni en células quiescentes (Zacchetti et al., 2003). A diferencia de BrdU, el análogo de timidina que se usa frecuentemente para detectar división celular in vivo, Ki67 es un marcador endógeno que no tiene ningún efecto adverso en las células vivas. Aunque se desconoce la función de Ki67, es un marcador confiable de mitosis ya que su vida media es muy corta (Kee et al., 2002; von Bohlen und Halbach, 2011).

Resultados

Dinámica de la proliferación astrocitaria en el modelo de lesión cortical punzante

Para monitorear la proliferación celular se utilizó la inmunomarcación de Ki67 a 1, 3 y 5 y 7 días posteriores a la lesión o dpi (del inglés, *days post-injury*). Los astrocitos se detectaron utilizando simultáneamente los marcadores S100 β y GFAP. Los vasos sanguíneos se marcaron con CD31 para identificar astrocitos yuxtavasculares.

En la lesión de herida cortical punzante a 1 dpi, luego de la marcación simultánea de GFAP y S100 β se observó solo marcación de S100 β , ya que los astrocitos aun no presentaban su estado reactivo caracterizado por la expresión de GFAP. Además, pudo observarse la presencia de esta proteína formando un halo que rodea al trayecto de la lesión (Figura 2.1. A, C) que genera un background elevado. Esto se debe a que S100 β es secretada y se encuentra en el espacio extracelular cuando hay ruptura de la barrera hematocefálica. De hecho, en la clínica la presencia de S100 β en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) es un indicador de ruptura de la barrera hematocefálica.

A este tiempo, los astrocitos mostraron escasa actividad proliferativa ya que solo el 4% resultaron positivos para Ki67 (Figura 2.2 C). La mayoría de las células positivas para Ki67 son probablemente células de la microglia ya que está descrito que proliferan a tiempos más tempranos (Simon et al., 2011). La escasa cantidad de astrocitos proliferativos detectados no permitió detectar una preferencia específica por la proliferación de astrocitos yuxtavasculares en este estadio, aunque se observaron ejemplos de astrocitos proliferativos tanto adyacentes a los vasos como no adyacentes (Figura 2.1 B).

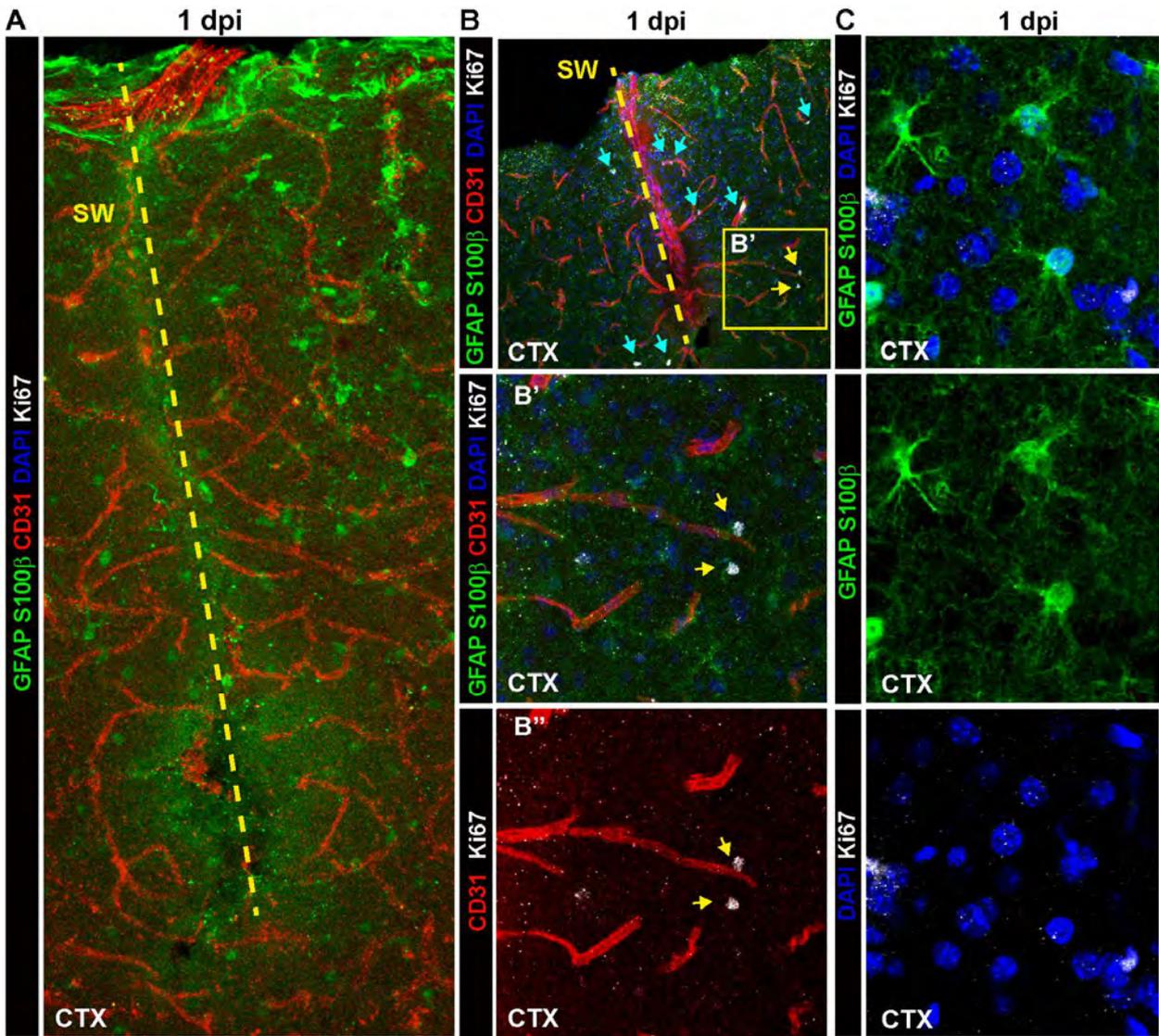


Figura 2.1: **A)** Microfotografía de los bordes de la lesión a 1 dpi mostrando zonas de secreción de S100β. **B)** Microfotografía de la zona de la lesión. Las flechas celestes indican células positivas para Ki67 que no son astrocitos y las flechas amarillas muestran astrocitos proliferativos a 1dpi. **C)** Astrocitos marcados con GFAP y S100β en verde, negativos para Ki67.

A 3 dpi la actividad proliferativa fue mucho mayor. Está descrito que en este punto de tiempo ocurre el pico de actividad proliferativa de la microglía y de las células progenitoras de oligodendrocitos (células NG2, Simon et al. 2011). El porcentaje de astrocitos corticales que proliferaba en los bordes de la lesión fue del 17%(Figura 2.2, C-G). También pudo distinguirse la expresión de GFAP en la morfología fibrosa de los astrocitos reactivos. La cuantificación de la proporción de astrocitos proliferativos yuxtavasculares mostró que no hay mayor actividad proliferativa de los astrocitos adyacentes a los vasos en este punto de tiempo (Figura 2.2 D).

A 5 dpi se detectó el máximo de proliferación astrocitaria. El 25% de los astrocitos prolifera en este punto. Además, el 67% de los astrocitos proliferativos eran astrocitos yuxtavasculares (Figura 2.2 A-E, H-I).

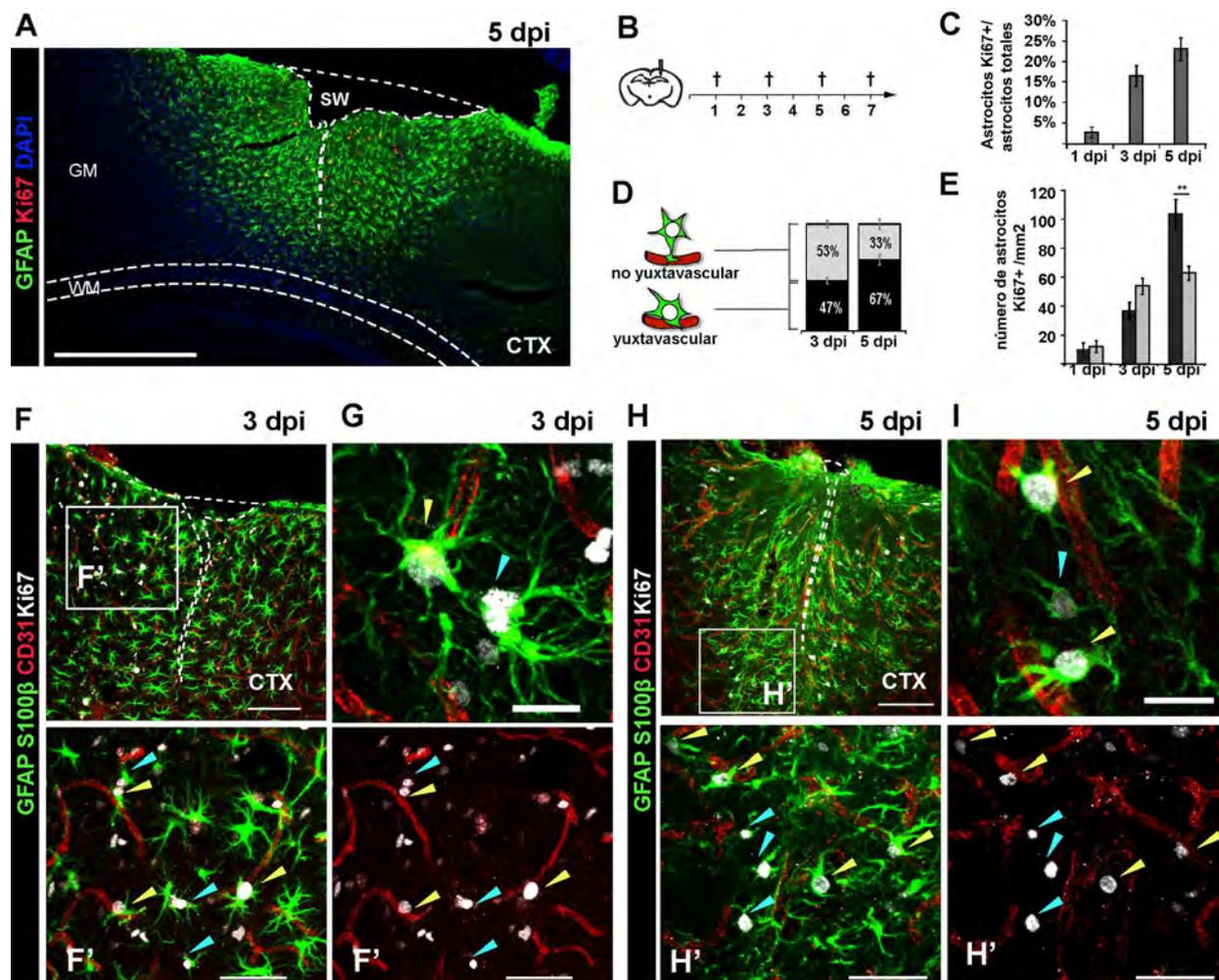


Figura 2.2. **A)** Proyecciones de imágenes de microscopía confocal de cortes de cerebro con inmunomarcación simultánea de astrocitos (GFAP), células proliferativas (Ki67) y núcleos (DAPI) mostrando el borde reactivo de la lesión de la sustancia gris (GM) de la corteza cerebral (CTX) a 5 dpi (barra= 500µm; WM: sustancia blanca). **B)** Esquema del diseño experimental. **C)** Cuantificación de la proporción de astrocitos proliferativos respecto a astrocitos totales detectados (GFAP+S100β+) por cada 0,25mm² de corteza lesionada. **D)** porcentaje de astrocitos proliferativos ubicados en posiciones juxtavasculares a 3, 5 y 7 dpi. **E)** Número de astrocitos proliferando en posiciones yuxtavasculares (barras negras) y no yuxtavasculares (barras grises) a los distintos puntos de tiempo. Los gráficos muestran el valor de la media ± Error Estandar de la Media (SEM). **F-I)** Imágenes de microscopía con de inmunomarcaciones para GFAP y S100β (en el mismo canal para marcar astrocitos), Ki67 y vasos sanguíneos (CD31) a 3 dpi (F, G) y 5 dpi (H,I). Las flechas amarillas muestran astrocitos yuxtavasculares y las flechas color celeste los no yuxtavasculares. Barras de escala: 100 µm (F,H), 25 µm (F',H'), 10 µm (G,I).

En estudios previos de esta línea de investigación se había determinado que a 7 dpi el porcentaje de astrocitos proliferativos es del 14% y alrededor de un 80% de esta

subpoblación proliferativa es yuxtavascular. Luego de este punto la proliferación astrocitaria disminuyó significativamente (9 ± 4 astrocitos proliferativos por mm^2 (0,9%) a 10 dpi; 5 ± 3 astrocitos proliferativos por mm^2 (0.1%) a 28 dpi (Simon et al., 2011).

Proliferación astrocitaria en el modelo de isquemia por obstrucción de la arteria cerebral media

En el modelo de isquemia se observó una respuesta levemente mayor a la anterior. El núcleo isquémico estaba privado de astrocitos a todos los tiempos estudiados (Figura 2.3 A, B) aunque se observó un gran número de células Ki67+ a lo largo de los vasos afectados por la lesión. Una gran cantidad de estas células Ki67+ mostraron inmunomarcación positiva con CD31, lo que sugiere una intensa actividad proliferativa de células endoteliales. Con frecuencia se observaron zonas con morfología de los vasos alterada y células Ki67+ asociadas (Figura 2.3 C)

La proliferación astrocitaria estaba presente principalmente en la zona de la penumbra en todas las regiones del cerebro rodeando el núcleo isquémico. Las cuantificaciones se realizaron en la sustancia gris de la corteza cerebral en la zona de la penumbra, a una distancia máxima del borde de la lesión de 300 μm , con el fin de seleccionar una región que permita una comparación de los resultados con los obtenidos para la corteza en la lesión de tipo *stab wound* (Figura 2.4 A-D). A 1 dpi prácticamente no se observó proliferación astrocitaria. Se observaron altos niveles de S100 β extracelular en la penumbra (Figura 2.4 B'). A 3 dpi proliferaban el 17% de los astrocitos y a 5 dpi ascendió a 29%. Estos porcentajes no tienen diferencias estadísticamente significativas con los observados para el modelo de lesión penetrante por lo que puede afirmarse que la respuesta proliferativa de los astrocitos corticales es independiente del tipo de daño que la causa y de las dimensiones de la lesión. Respecto a la posición de los astrocitos proliferativos, a 3 dpi ya se pudo observar que los astrocitos yuxtavasculares proliferaban preferentemente y el mismo comportamiento se observó a 5 dpi (Figura 2.4 C-D, F-G).

Los resultados sugieren que las señales que inducen la proliferación de astrocitos yuxtavasculares están presentes antes o en mayor medida en el modelo de isquemia consistente con una lesión mucho mayor.

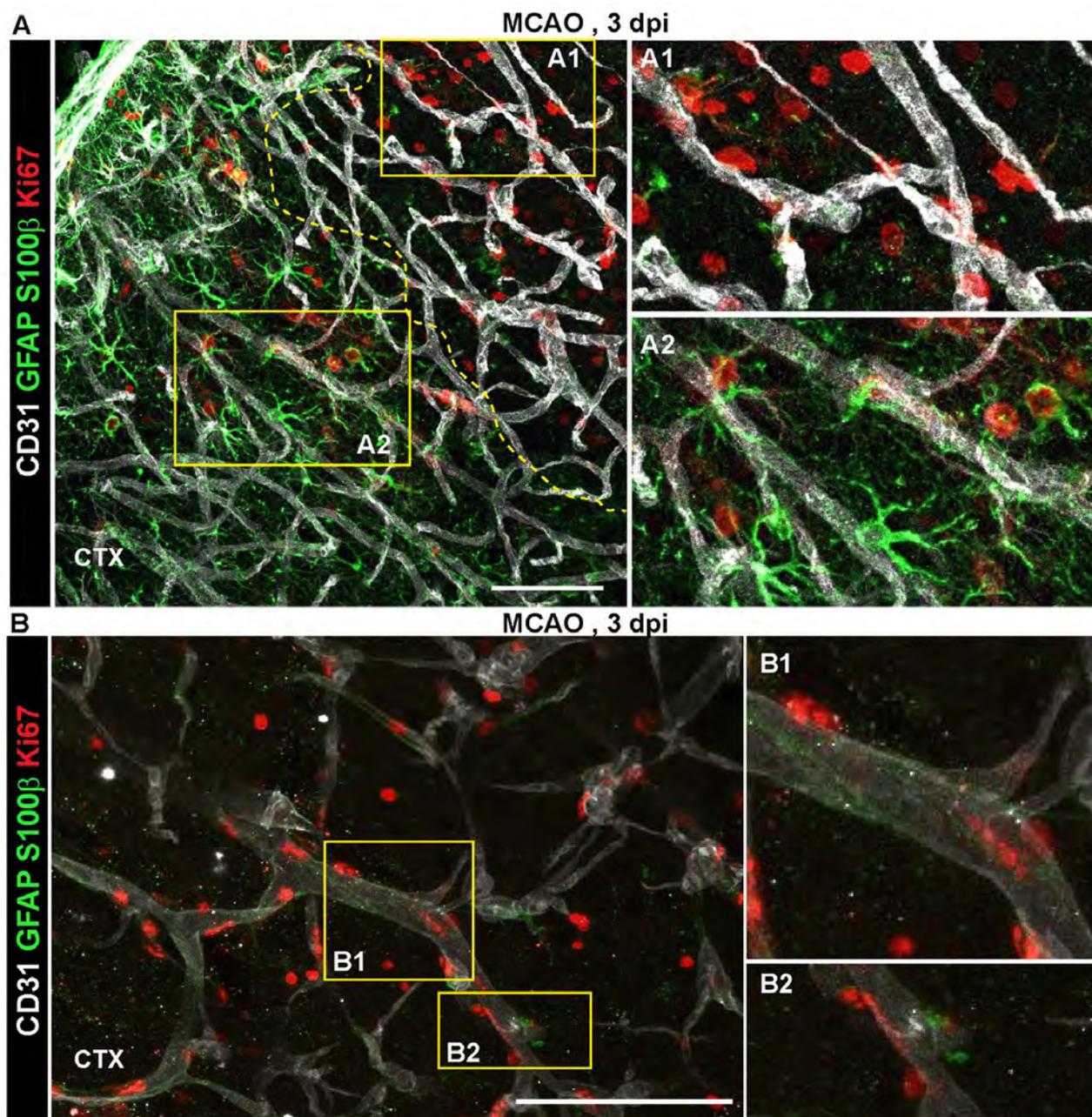


Figura 2.3: **A)** Imagen de microscopía confocal donde se muestra inmunomarcación para CD31, GFAP/S100 β y Ki67 en la zona del borde del núcleo isquémico. Obsérvese la ausencia de astrocitos en la zona del núcleo de la lesión (A1) y la presencia de astrocitos proliferativos en la zona de penumbra (A2). **B)** El núcleo isquémico mostraba un gran número de células Ki67+ asociadas a células endoteliales. Nótese que se observan rastros de inmunomarcación para GFAP en las áreas amplificadas en B1 y B2, aunque no se detectan astrocitos. Barras 100 μ m en A y 50 μ m en B.

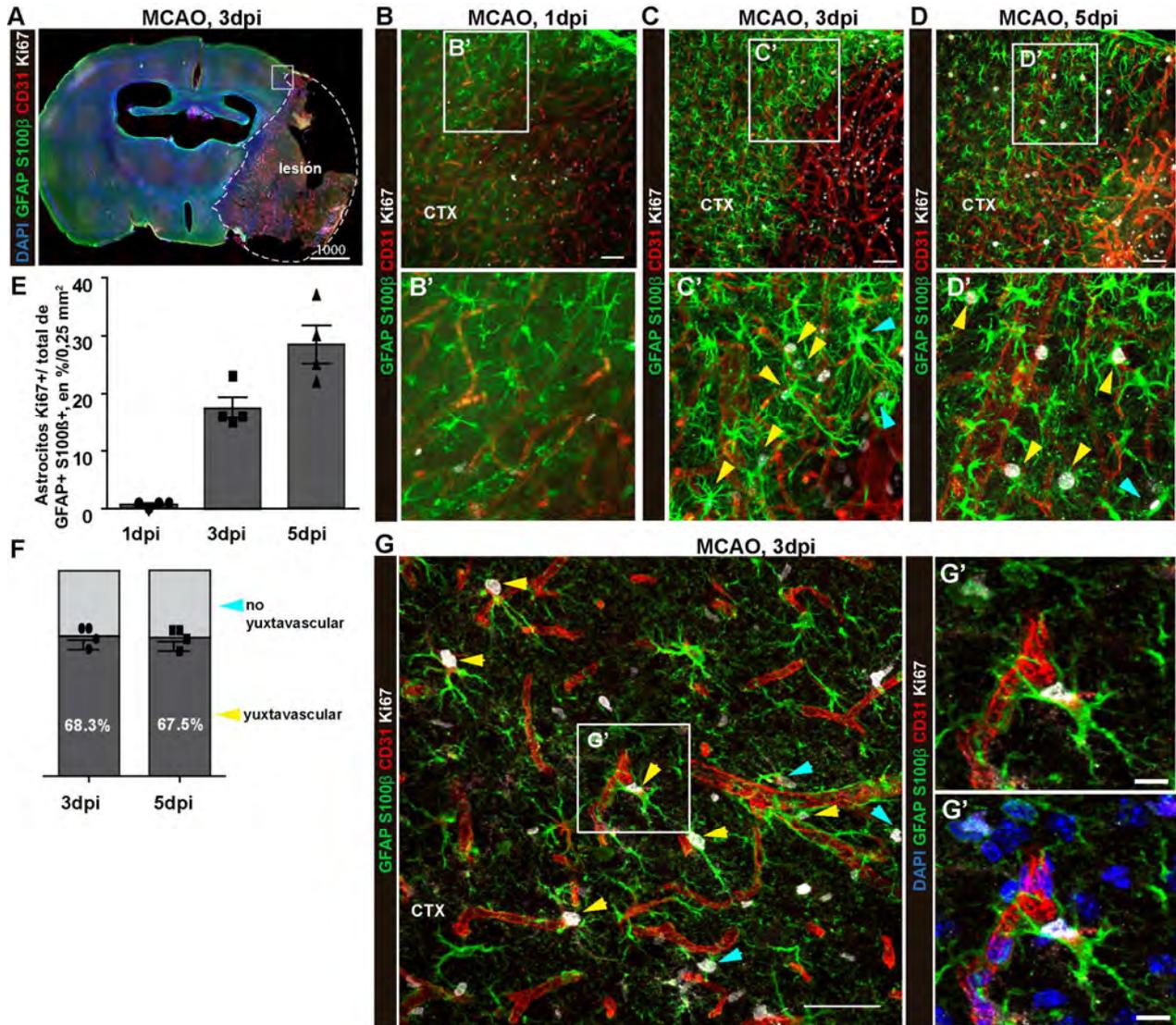


Figura 2.4. **A)** Composición de microfotografías de epifluorescencia de corte de cerebro representativo a 3dpi post MCAO. El núcleo (core) de la lesión está demarcado con una línea discontinua. El cuadrado marcado muestra la región de interés para las cuantificaciones. Barra 1000 μ m. **B-D)** Imágenes de microscopía confocal de inmunotinción para GFAP y S100 β , Ki67 y vasos sanguíneos (CD31) de la penumbra de la lesión isquémica a 1, 3 y 5 dpi. Las flechas señalan astrocitos proliferativos en posiciones yuxtavasculares (amarillo) y en posiciones no yuxtavasculares (cian). **E)** Cuantificación de la proporción de astrocitos proliferativos entre todos los astrocitos detectados (GFAP+ S100 β +) en% por 0,25 mm² de corteza lesionada. **F)** Proporción de astrocitos proliferando en posiciones yuxtavasculares a 3 y 5dpi. **G)** Micrografías de confocal de alta potencia que muestran astrocitos yuxtavasculares proliferativos (flechas amarillas) . Barras 25 μ m.

De estos datos surge como interrogante si el número total de astrocitos en esta posición aumenta, o si su proliferación preferencial compensa una pérdida predominante de astrocitos en la interfase vascular. En concordancia con reportes previos sobre la muerte de astrocitos poslesión (Zhao et al., 2003), en el modelo de stab wound se observó que el número de astrocitos se redujo significativamente a 3dpi, pero se recuperó a 5dpi, (Figura 2.5). La proporción de astrocitos yuxtavasculares es comparable al hemisferio contralateral de 1-3 dpi (38%, Figura 2.6 A-B), lo que sugiere que la muerte celular afecta a ambas fracciones de astrocitos por igual. Sin embargo, a los 7 dpi, después de que se incrementó la proliferación de astrocitos en las posiciones yuxtavasculares (Figura 2.6 B), la proporción de astrocitos yuxtavasculares aumentó a 45% (Figura 2.6 B). Por lo tanto, la división preferencial de los astrocitos yuxtavasculares comienza alrededor de 4 dpi en la sustancia gris lesionada, contribuye a reponer el número de astrocitos totales a niveles comparables con la corteza contralateral intacta y resulta además en un aumento del porcentaje de astrocitos ubicados junto a los vasos.

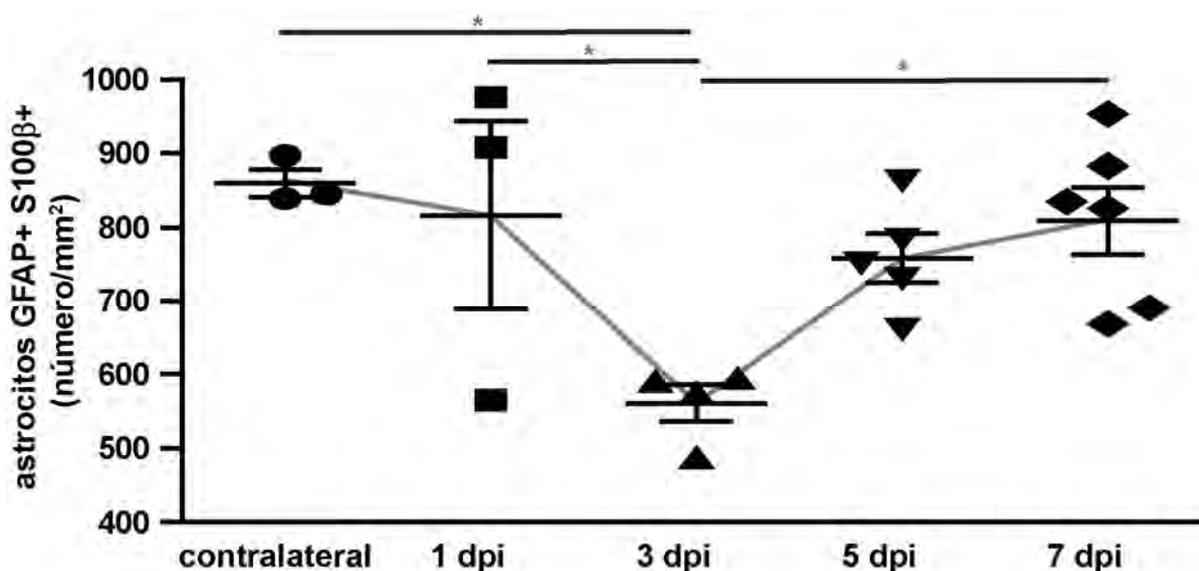


Figura 2.5. A) Número de astrocitos totales por mm^2 de corteza cerebral lesionada (proyección de una sección de $10 \mu\text{m}$ de alto). Los datos se representan como media \pm SEM por experimentos independientes. Las marcas representan valores de la cuantificación obtenidos para animales individuales. La significancia de las diferencias entre medias se analizó usando ANOVA de una vía ($p = 0,0129$, seguido del post test de Tukey y se indica en función del valor de p ($* p < 0.05$).

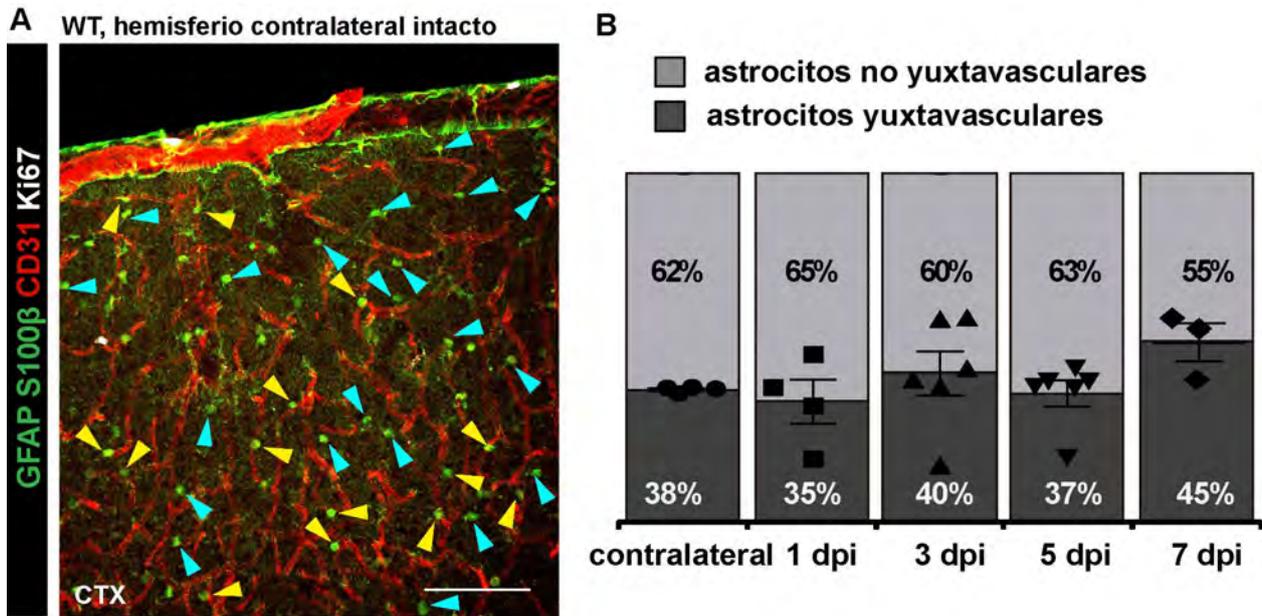


Figura 2.6. A) Imagen de microscopía confocal de inmunofluorescencia de S100 β de GFAP marcando todos los astrocitos de la sustancia gris cortical (CTX) de un ratón C57BL6 *wild type* (WT). La imagen corresponde al hemisferio contralateral a la lesión, por lo que el tejido está intacto y representa el número normal de astrocitos del parénquima cortical. Se muestra simultáneamente inmunomarcación para CD31 (vasculatura) y Ki67 (células proliferativas). **C)** Porcentajes de astrocitos yuxtavasculares entre todos los astrocitos marcados con GFAP S100 β a distintos puntos de tiempo poslesión. Las barras muestran la Media \pm SEM.

Discusión

Se estudiaron dos modelos distintos de lesión de la corteza cerebral y se determinó la dinámica de proliferación astrocitaria. En ambos pudo observarse que la proliferación astrocitaria ocurre mayormente a 5 dpi. Los astrocitos proliferan preferencialmente en posiciones yuxtavasculares en ambos casos, aunque en el modelo de isquemia esta tendencia preferencial se observa previamente. Esto podría ocurrir porque en el modelo de MCAo la lesión involucra una respuesta mayor de las células endoteliales que en la lesión de tipo *stab wound*, donde el daño vascular está limitado a los capilares que fueron afectados por el corte y no hay daño en vasos principales. Además, la isquemia incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, permitiendo la acumulación extracelular de fluidos en una gran área del hemisferio afectado (Fluri et al., 2015; Godoy et al., 2016). Si bien esto ocurre en ambos modelos, la extensión de la zona afectada por hipoxia en la lesión de tipo *stab wound* es muy pequeña, limitada a las zonas del borde de la lesión, en cambio en el modelo de MCAo involucra casi la totalidad del hemisferio cerebral (véase la magnitud del área del infarto marcada en la Figura 2.4 A). Es posible que el remodelamiento de los vasos que ocurre luego de la

isquemia se inicie de manera temprana a través de vías de señalización que puedan tener efectos en la proliferación de astrocitos adyacentes a los vasos. Está reportado que la extensa proliferación de células endoteliales en el modelo de MCAo transitoria aumenta rápidamente a 4 dpi y alcanza su pico alrededor de 7 dpi (Huang et al., 2015). En el mismo trabajo se describió la proliferación astrocitaria en la penumbra de la lesión, la cual mostró una dinámica similar a la de las células endoteliales. Aunque los tiempos estudiados no se superponen exactamente, los resultados son consistentes con los obtenidos en esta tesis.

En ambos modelos se observó un halo de inmunomarcación positiva dado a la detección de la proteína S100 β extracelular a 1 dpi. Es probable que los altos niveles de S100 β extracelular generados en el modelo de MCAO en el hemisferio dañado contribuyan a la mayor reactividad de los astrocitos en este modelo comparado con la lesión de tipo *stab wound*.

Se encontró además que la proliferación astrocitaria junto a los vasos en la lesión de tipo *stab wound* no ocurre para compensar una muerte celular incrementada en estas posiciones, ya que el porcentaje de astrocitos yuxtavasculares se mantiene relativamente constante a lo largo del tiempo y aumenta levemente a 7 dpi. La proliferación logra restaurar los números de astrocitos totales observados antes de la lesión a 5 dpi, luego de que disminuyeran a 3 dpi por muerte celular resultante de la lesión.

Conclusiones

En los modelos de lesión estudiados la proliferación astrocitaria ocurre mayormente a 5 dpi.

Los astrocitos proliferan mayormente en posiciones yuxtavasculares en ambos modelos, aunque en el modelo de isquemia esta tendencia se observa previamente. A través de la actividad proliferativa se restauran los números de astrocitos totales alrededor de 5 dpi.

Capítulo 3

Efectos de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico sobre la proliferación astrocitaria.

La vía del óxido nítrico o NO (del inglés, nitric oxide) regula numerosas funciones fisiológicas en el SNC. En los mamíferos, el NO endógeno se forma a partir de L-arginina y de oxígeno molecular mediante la acción de tres NO sintasas (NOS) con un alto nivel de homología: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS) (Moncada et al., 1997).

En el cerebro sano, el NO se produce principalmente por la nNOS en subpoblaciones de neuronas y por la NOS endotelial. También hay reportes de que la nNOS se puede encontrar en niveles bajos en astrocitos y que la eNOS se puede encontrar en un subconjunto de neuronas y astrocitos (Brown, 2010). A diferencia de la nNOS y eNOS que son expresadas constitutivamente, se detecta muy bajos niveles de iNOS en células quiescentes (Zhang et al., 2013). Sin embargo, en distintas patologías del SNC, la expresión de la iNOS se regula positivamente en numerosos tipos celulares, entre los que se destacan las células con función inmune, como la microglia, los astrocitos y las células periféricas infiltradas (Liu et al., 2015). La iNOS puede ser inducida por mediadores inflamatorios, citoquinas y por la actividad fagocítica (Gomez et al., 2004; Hua et al., 2002; Zhou et al., 2013).

La observación de que la mayoría de los astrocitos proliferativos se encuentran en contacto con vasos sanguíneos sugiere un papel importante del nicho vascular donde el óxido nítrico podría ser una molécula de señalización clave. Como las fuentes principales de NO están enriquecidas en los alrededores de los vasos sanguíneos, tanto el NO como las vías que se activan por el mismo podrían tener un papel en la señalización que conduce a la proliferación yuxtavascular.

Para determinar un posible efecto de la inhibición de la síntesis de óxido nítrico sobre la proliferación de astrocitos se usó un modelo de lesión *in vitro*, conocido como ensayo de *scratch wound* (Robel et al., 2011a) en cultivos de astrocitos aislados de la corteza cerebral posnatal. Este ensayo consiste en raspar una monocapa confluyente de astrocitos con un objeto (punta de pipeta) para interrumpir los contactos celulares y desencadenar la actividad proliferativa. Mediante esta actividad proliferativa de los astrocitos del borde se logra el cierre de la brecha entre los dos sectores de la monocapa. Para evaluar la influencia de la vía del NO en el proceso de cierre de la brecha se realizó un tratamiento de los cultivos con el inhibidor no específico de las NO sintasas L-Nitroarginina (L-NNA) a distintas concentraciones. En la figura 3.1 se muestra el diseño experimental.

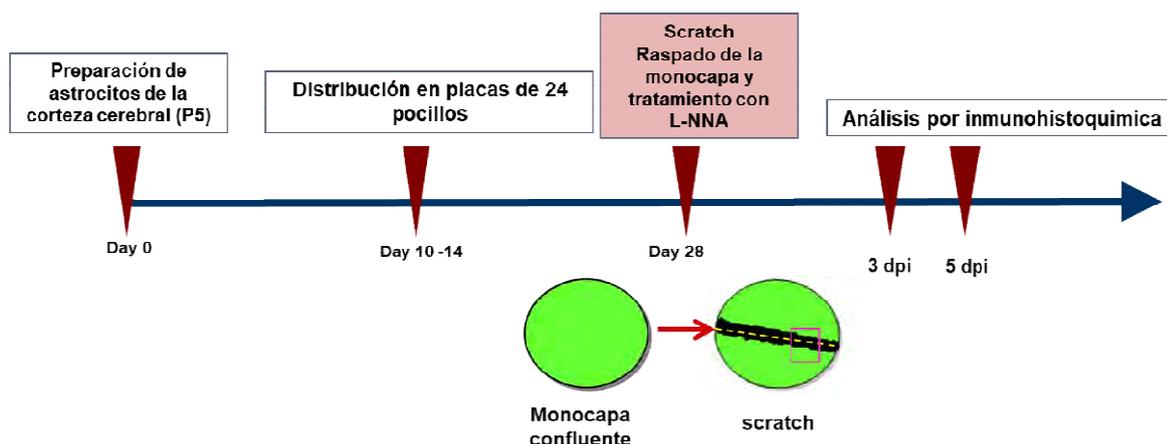


Figura 3.1. Diseño experimental del ensayo de lesión por raspado de la monocapa donde se muestran los tiempos a los que se iniciaron los tratamientos y colectaron las muestras. Los círculos verdes representan los pocillos de las placas y la forma en que se realizó el raspado. El recuadro rojo muestra el área en la que se cuantificó la proliferación.

Resultados

Se estudió la proliferación mediante una inmunomarcación simultánea de GFAP/S100 β y Ki67 (Figura 3.2, A-C). La proliferación astrocitaria se detectó principalmente en los astrocitos del borde de la brecha realizada en la monocapa y fue prácticamente nula en los márgenes alejados. Se evaluaron 3 concentraciones del inhibidor: 10, 100 y 1000 μ M. Los resultados se expresaron como el porcentaje de astrocitos que expresaban Ki67 respecto al total de astrocitos el área evaluada a 3 y 5 dpi (Figura 3.2, D). La evaluación del porcentaje medio para cada punto sugiere una tendencia hacia una menor proliferación dependiendo de la dosis de L-NNA utilizada en el tratamiento. Sin embargo, la diferencia estadística respecto a los astrocitos no tratados solo fue significativa para los cultivos a los que se les suministró L-NNA 1000 μ M (Figura 3.2, D). También se pudo observar un retraso en el cierre de la brecha que era evidente a la observación a 5 dpi (Figura 3.2 A-B).

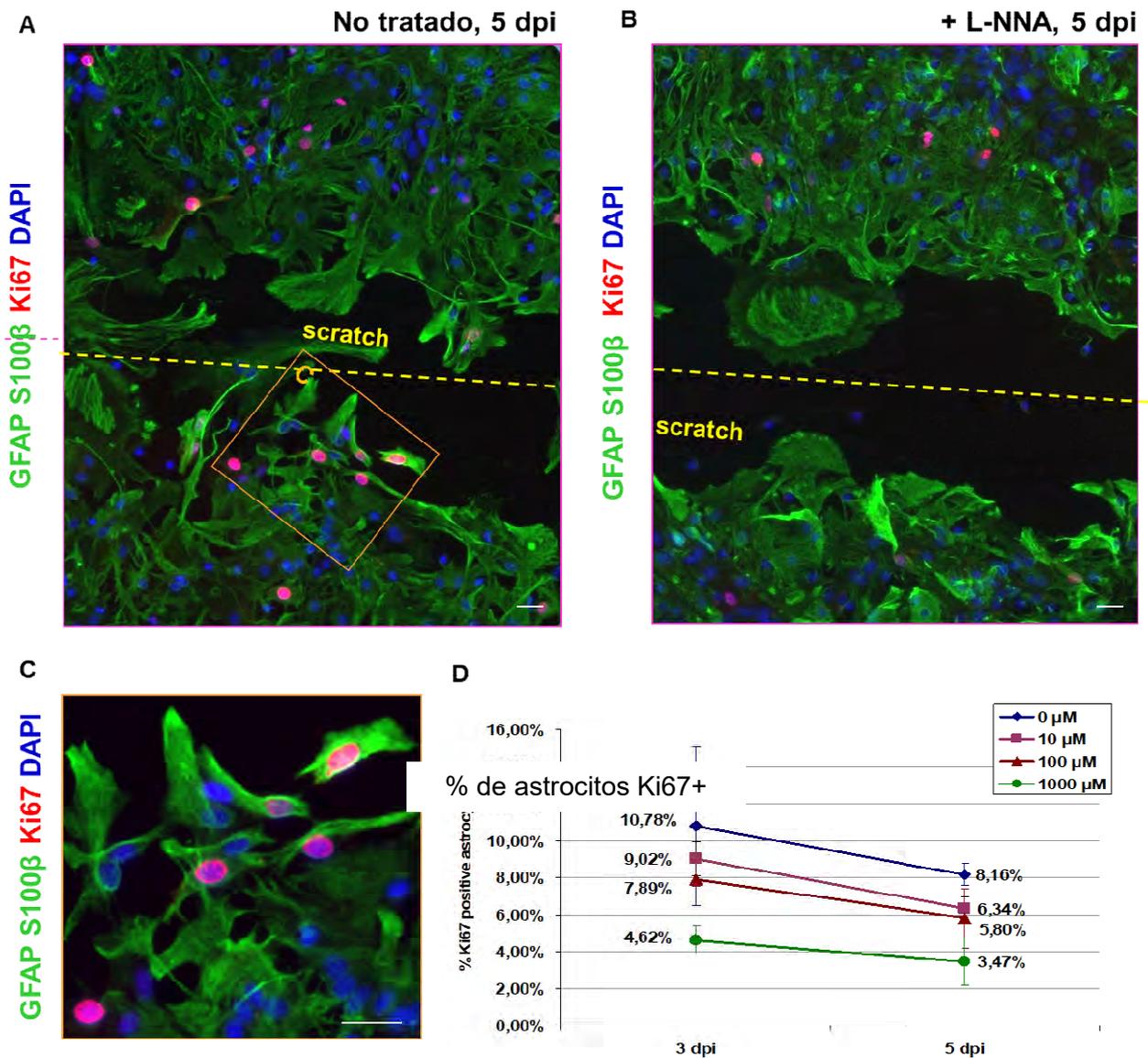


Figura 3.2: **A)** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de los cultivos de astrocitos sometidos a la interrupción por raspado y fijados a 5 dpi, sin tratamiento y **B)** luego de la aplicación diaria de 1000 μM de L-NNA. Se realizó una marcación por inmunofluorescencia para GFAP/S100β (astrocitos), Ki67 (células proliferativas y contratiñencia nuclear con DAPI. **C)** Sección ampliada de la imagen mostrada en (A) donde se observan en detalle los astrocitos que proliferan en el borde de la lesión. **D)** Porcentaje de astrocitos proliferativos a 3 y 5 dpi para cada concentración del inhibidor L-NNA evaluada. La línea azul (0 μM) corresponde a los astrocitos no tratados.

Discusión

Los resultados de estos experimentos muestran que la inhibición de la síntesis de NO en cultivos de astrocitos resulta en una menor proliferación inducida por el raspado de la monocapa. La dosis menor a la que este efecto adquirió significancia estadística fue de 1 mM de L-NNA.

Utilizando inhibidores de la síntesis de NO se ha demostrado que la señalización por esta vía es mediadora de la reactividad astrocitaria en condiciones de inflamación del SNC (Brahmachari et al., 2006; Gomez et al., 2003). En estos estudios se monitoreó la reactividad astrocitaria por los niveles de expresión de GFAP. Ya que en los modelos *in vivo* se observa que las zonas de expresión de GFAP y proliferación astrocitaria coinciden, es probable que ambos procesos sean causados por vías comunes relacionadas con el proceso inflamatorio, entre las cuales podría incluirse la del NO.

La reactividad y proliferación astrocitarias generalmente se asocian a un efecto neuroprotector. Considerando esto, los resultados de estos experimentos son consistentes con otros estudios en los que el bloqueo de la vía NO en el SNC resulta en lesiones más severas (Bayir et al., 2005; Steinert et al., 2010). Para indagar con más profundidad en los mecanismos de acción del NO sobre los astrocitos luego una lesión del SNC es necesario disponer de mutantes específicos para las distintas isoformas o formas más específicas de eliminar la actividad una isoforma de NOS, ya que los inhibidores, aunque presentan cierto grado de selectividad, no son específicos y por lo tanto no permiten determinar el origen del mismo, lo que permitiría proponer mecanismos vía arriba que serían los desencadenantes de la actividad proliferativa.

Conclusiones

El tratamiento de cultivos de astrocitos primarios con el inhibidor de la síntesis del NOL-NNA resulta en una menor proliferación de los mismos que demora el cierre de la brecha por raspado en este modelo de lesión *in vitro*.

La vía del NO podría tener un rol en la regulación de la proliferación astrocitaria juxtavascular.

Capítulo 4

Infiltración de células inmunes periféricas

El daño tisular y la liberación subsiguiente de mediadores inflamatorios conducen a cambios en la función de las células residentes del cerebro y al reclutamiento de células periféricas.

Las células residentes activadas expresan varias quimioquinas y citoquinas que inducen la expresión de moléculas de adhesión específicas en las células endoteliales, lo cual desencadena el proceso de adhesión y migración transendotelial de las células inmunes en circulación sanguínea.

Está descrito en otros modelos de lesión por traumatismo cerebral que los niveles de la mayoría de las citoquinas y quimioquinas alcanzan su valor máximo dentro de 4-12 hpi y que la mayoría de las quimioquinas están presentes en niveles más altos en el LCR que en el plasma, lo que indica producción local por células residentes del cerebro (Helmy et al., 2012; Helmy et al., 2011).

Tipicamente en las lesiones del SNC, las primeras células que invaden el parénquima lesionado son los neutrófilos siendo máxima la infiltración a las 24 hs (Easton, 2013; Hsieh et al., 2013; Soares et al., 1995)). Mientras que el reclutamiento de neutrófilos en los tejidos es esencial en las respuestas a las infecciones y daños periféricos, estas células liberan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que dañan el parénquima cerebral (Gyoneva and Ransohoff, 2015). La presencia de neutrófilos en el cerebro se reduce considerablemente a 3-5 dpi cuando predomina la acumulación de leucocitos mononucleares (Holmin et al., 1995; Rhodes, 2011; Soares et al., 1995). La identificación por inmunohistoquímica y citometría de flujo indica que la mayoría de las células reclutadas son monocitos inflamatorios, con una pequeña contribución de linfocitos T, NK y células dendríticas (Herrmann et al., 2008; Holmin et al., 1995; Hsieh et al., 2013).

Los monocitos se extravasan en la zona lesionada y se diferencian en macrófagos. Se ha propuesto que luego de residir durante algunos días en el parénquima cerebral, los macrófagos pueden adquirir las propiedades fenotípicas de los macrófagos locales (en el caso del cerebro células microgliales) aunque experimentalmente solo se ha observado este comportamiento en modelos que implican la irradiación para depletar la médula ósea (Mildner et al., 2007).

Las células microgliales del parénquima cerebral son también de origen mieloide y muestran propiedades comunes de los macrófagos tisulares. La microglía reactiva asume una morfología ameboidea, secreta factores inflamatorios, realiza fagocitosis y es en gran medida indistinguible de macrófagos infiltrados derivados de monocitos (Gyoneva and Ransohoff, 2015).

En este capítulo se muestran los resultados de los experimentos realizados para estudiar la respuesta de células inmunes luego de una lesión cortical punzante (*stab wound*) de la sustancia gris de la corteza cerebral con el fin de identificar los tiempos en que ocurre este proceso y correlacionarlo con el proceso de proliferación astrocitaria estudiado en capítulos anteriores.

La reacción de los macrófagos

Las células de la microglía son los macrófagos residentes del cerebro. En condiciones fisiológicas intervienen en la homeostásis de las sinapsis. Estas células son muy similares a otros tipos de macrófagos y expresan los mismos marcadores. Pueden visualizarse claramente utilizando una inmunomarcación para la proteína Iba1 (Figura 4.1. A).

La reacción de la microglía es la primera en manifestarse luego de una lesión de la corteza cerebral. La ruptura de la barrera hematoencefálica permite el ingreso de factores del plasma y de LCR que inducen un estado reactivo. Las células migran hacia el foco de la lesión y regulan positivamente marcadores característicos de la respuesta inmune innata asociados a la fagocitosis como CD68. A 1 dpi, en la zona de la lesión ya puede observarse un cambio de morfología denominado estado ameboide que se diferencia de la forma ramificada normal de las células microgliales (Figura 4.1. B), caracterizado por hipertrofia y aumento de la capacidad fagocítica. Normalmente la proliferación de la microglía es escasa, pero ante una lesión se desencadena una fuerte respuesta proliferativa. Simultáneamente se produce el ingreso de monocitos de sangre periférica que se diferencian a macrófagos y expresan marcadores prácticamente idénticos a los de las células de la microglía. Estas células residentes de origen mieloide, al igual que los leucocitos periféricos, expresan el marcador CD45 (D'Mello et al., 2009; Thomas, 1989), también conocido como antígeno común de leucocitos (LCA).

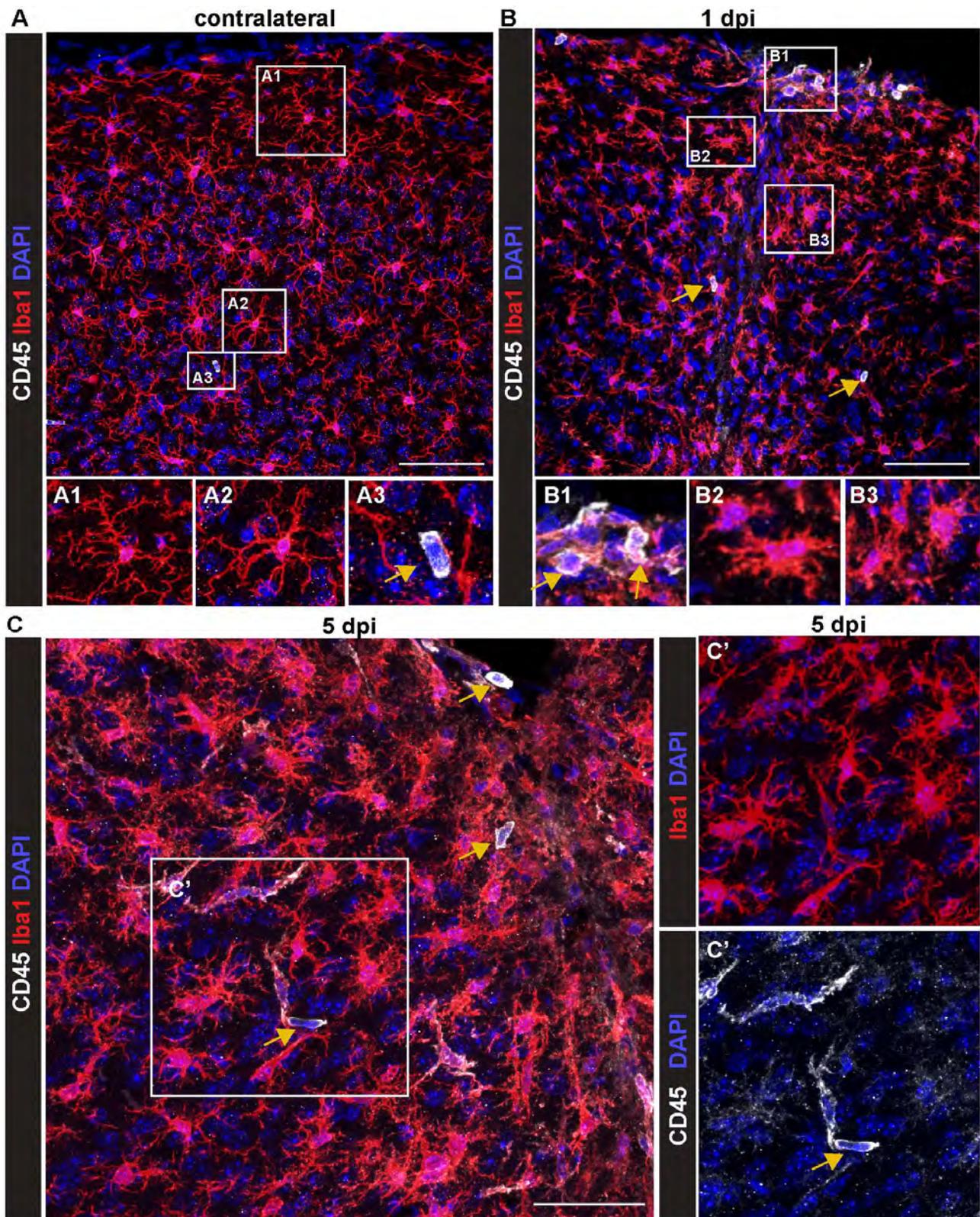


Figura 4 .1: A) Corteza cerebral del hemisferio contralateral a una lesión de tipo *stab wound* con inmunomarcación de Iba1 y CD45. Células inmunes infiltradas que expresan altos niveles de CD45 y no Iba1 (CD45^{high}, flechas naranjas) y células microgliales que presentan hipertrofia leve a 1 dpi. C) corteza cerebral lesionada a 5 dpi donde puede observarse una intensa reacción de la microglia y algunas células CD45^{high}. Barras 100 μ m.

CD45 es una proteína tirosina fosfatasa unida a receptores que está presente en todas las células hematopoyéticas diferenciadas, y que juega un papel crucial en la función de estas células (Altin and Sloan, 1997). En condiciones fisiológicas, las células de la microglía expresan niveles bajos de CD45 pero aumentan su expresión como respuesta a la lesión. La discriminación entre microglía y macrófagos derivados de monocitos es entonces difícil debido a la falta de marcadores específicos. Sin embargo, una combinación de los marcadores CD45 e Iba1 permite la distinción de monocitos recién infiltrados [niveles altos de CD45 (CD45^{high}) e Iba1 negativo] y microglía activada [niveles bajos de CD45 (CD45^{low}) e Iba1 positivo] (Figura 4.1, ver también Figura 4 2). Para esto se analizaron imágenes de microscopía confocal del tejido marcado por inmunofluorescencia, considerando además las diferencias en la morfología, ya que la microglía posee una morfología dendrítica que los macrófagos no adquieren (Torres-Platas et al., 2014). Utilizado el análisis de los marcadores propuesto no es posible elucidar el origen de las células CD45^{high} Iba1⁺, que aparecen raramente a tiempos poslesión mayores a 3 dpi. Se ha sugerido que los macrófagos infiltrados podrían permanecer en el tejido y adquirir características de la microglía una vez resuelta la lesión, pero algunos estudios sugieren que este evento es muy raro (Mildner et al, 2007).

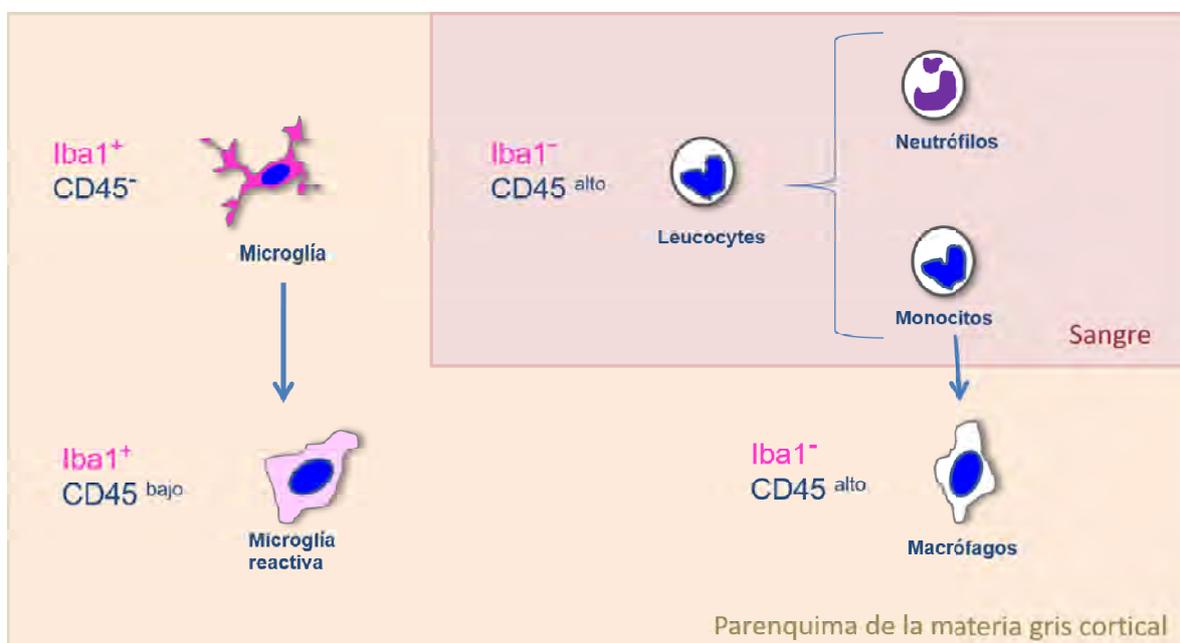


Figura 4.2. Esquema que muestra la expresión de marcadores de las distintas células de origen mielóide. Se muestran dos compartimentos, uno correspondiente a la sangre periférica (Blood) y otro correspondiente al parénquima de la sustancia gris cortical (GM). Los monocitos recién egresados de los vasos e infiltrados en el parénquima expresan altos niveles de CD45 (CD45^{alto}). Todas las demás células de origen mielóide expresan niveles detectables de CD45, incluida la microglía que expresa niveles muy bajos (CD45^{bajo}).

Resultados

Análisis temporal de la infiltración de células inmunes

Para comprender mejor los fenómenos que ocurren simultáneamente en la activación astrocitaria luego de la lesión, se cuantificaron las células infiltradas en el parénquima de la sustancia gris cortical a distintos tiempos. Para ello, se obtuvo tejido cerebral de ratones sacrificados a 1, 3, 5 y 7 dpi. Utilizando inmunofluorescencia de cortes de tejido con la combinación de marcadores mencionados previamente y microscopía confocal se evaluó la colocalización de los mismos. Los leucocitos CD45^{high} pudieron ser detectados a las 24 hpi. Las células microgliales mostraron cuerpos hipertróficos y polarización hacia el núcleo de la lesión (Fig. 4.1 B y 4.3 A). El mayor número de células infiltradas se pudo detectar a 3 dpi junto con la reactividad microglial más fuerte (Figura 4.3 B y 4.4 A). Las células microgliales también mostraron en este momento los niveles más altos de CD45 (Figura 4.3 B). Durante los días siguientes se puede observar una disminución en las células inmunitarias infiltradas que es detectable a 5 dpi (Figura 4.3 C y 4.4 B). A partir de 7 dpi la lesión generalmente se encontró completamente sellada y sólo unas pocas células cerca de la superficie pial pudieron ser detectadas (Figura 4.3 D). La cuantificación del número de células infiltradas por mm² de parénquima lesionado se resume en la Figura 4.5. Estos resultados en su conjunto muestran un patrón temporal que es 24 hs más lento que el observado en otros estudios que utilizaron el modelo de impacto cortical controlado, un modelo cinético de lesión traumática de cráneo que involucra el hipocampo (Morganti et al., 2015).

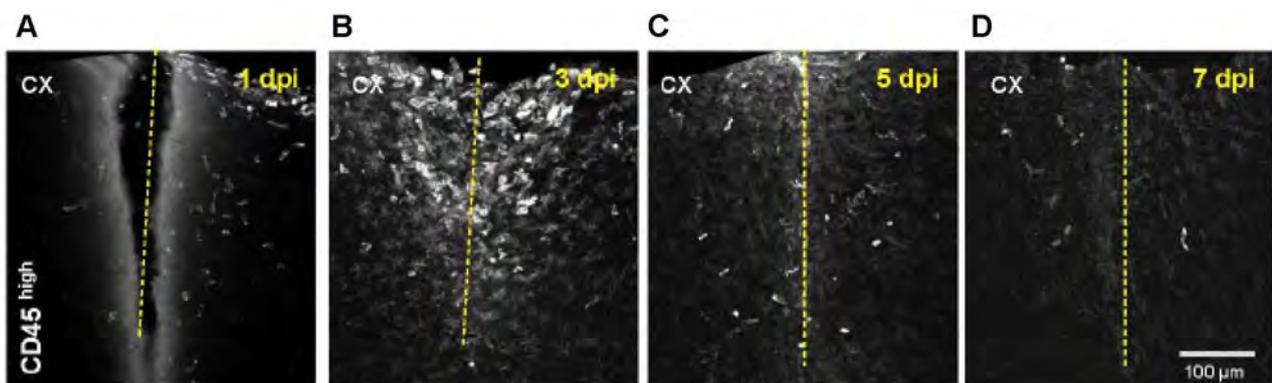


Figura 4.3. A-D) Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia para CD45 a los distintos tiempos pos lesión (dpi).

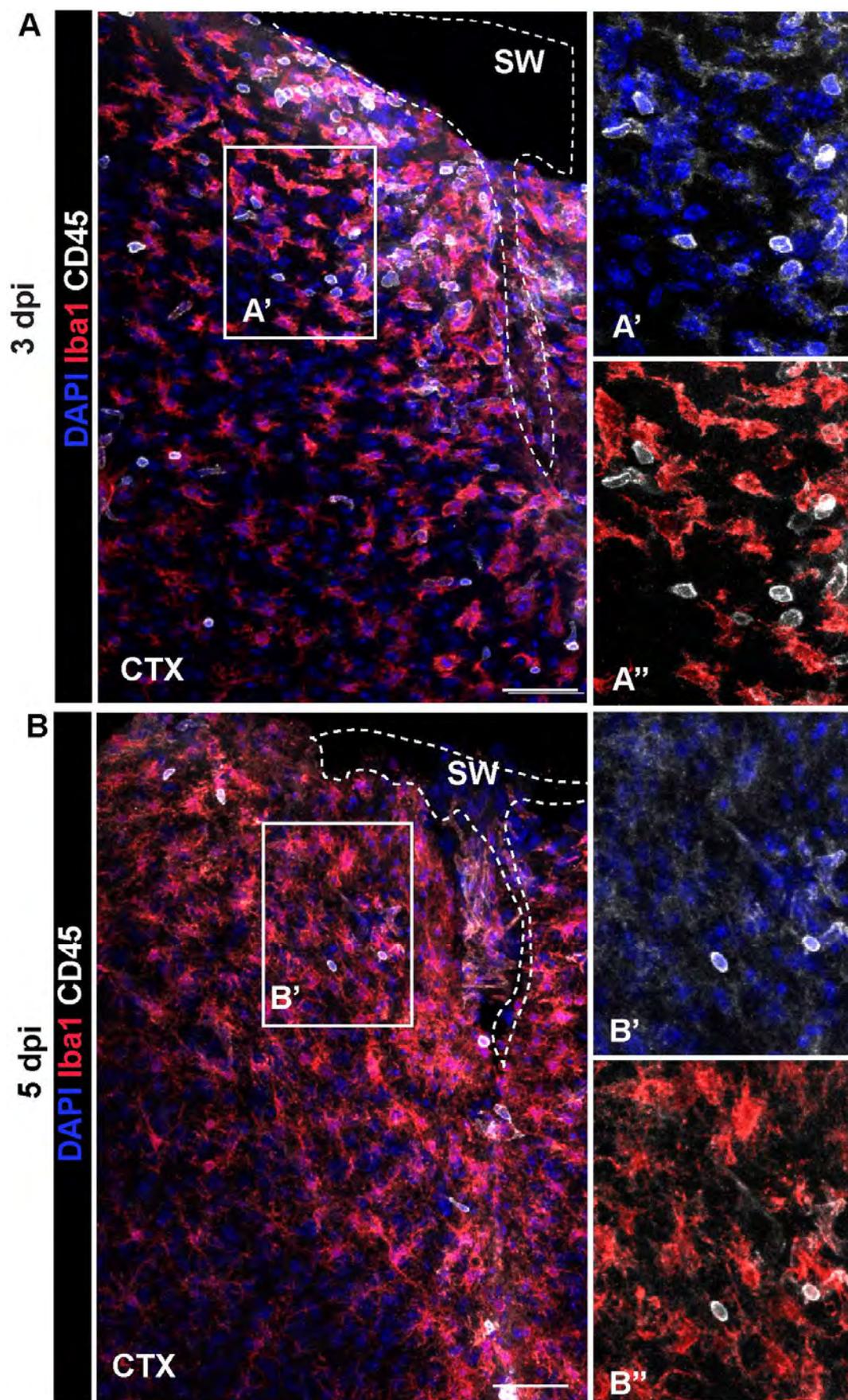


Figura 4.4. Microfotografías de inmunofluorescencia simultánea para ambos marcadores estudiados a 3 dpi (A) y 5 dpi (B).

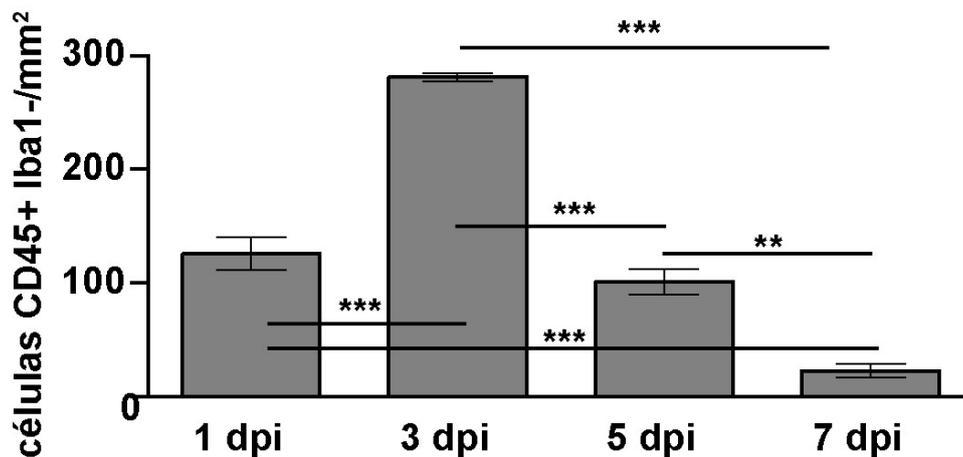


Figura 4.5: Número de células con niveles altos de CD45 e Iba1 negativas por mm^2 de materia gris cortical a los distintos dpi. El gráfico muestra el valor de la Media \pm SEM, La significancia estadística fue analizada con test ANOVA ($p < 0.0001$) de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni; *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.001$.

Discusión

Los resultados de la cuantificación de la infiltración de células inmunitarias periféricas mostrados en este capítulo permitieron correlacionar este fenómeno con el proceso de proliferación astrocitaria expuesto en el Capítulo 2. Si se grafica simultáneamente el número de astrocitos yuxtavasculares proliferativos y el número de células inmunitarias infiltradas para los tiempos estudiados se observa que existe una correlación inversa a partir de 3 dpi. Al principio, los astrocitos no proliferan y un gran número de células CD45+ se extravasan de la microvasculatura cerebral. La proliferación de los astrocitos, que comienza a partir de 3 dpi, se correlaciona con una disminución de las células inmunes infiltradas que se pone en evidencia luego de alcanzar el pico de infiltración a 3 dpi (Figura 4.6).

Esta correlación inversa puede interpretarse de distintas maneras y origina las hipótesis principales que llevaron a los experimentos subsiguientes de este trabajo. Una interpretación posible es la atribución de la función de restauración de la integridad de la barrera hematocefálica a los astrocitos proliferativos yuxtavasculares, que luego resulta en una disminución del reclutamiento de células inmunitarias periféricas. También es posible que los astrocitos proliferativos expresen proteínas inmunomoduladoras que terminen con las señales de reclutamiento de células inmunitarias. Otra interpretación posible es que las células infiltradas produzcan citoquinas o factores capaces de desencadenar la respuesta proliferativa astrocitaria.

Estas hipótesis y los experimentos que permitieron testearlas se exponen en detalle en el siguiente Capítulo.

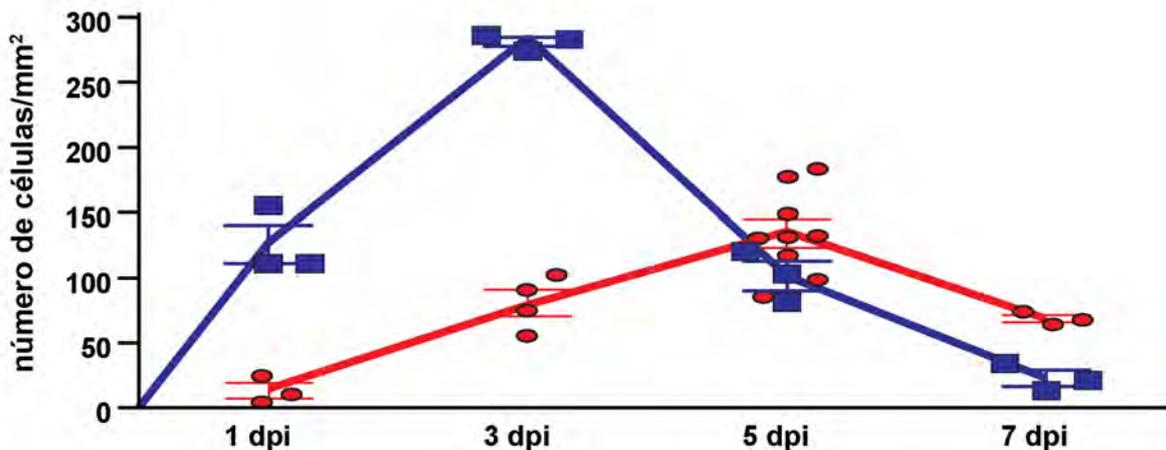


Figura 4.6. Correlación inversa entre la infiltración de células inmunitarias y la proliferación de astrocitos. El número de células inmunitarias infiltradas (CD45⁺Iba1⁻, azul) alcanza un máximo de 3 dpi y disminuye cuando la proliferación de astrocitos (rojo) alcanza su pico a 5 dpi. Todos los datos se representan como media \pm SEM por experimentos independientes. Los círculos y cuadrados representan puntos de datos individuales (animales).

Conclusiones

La infiltración de células inmunitarias en el parénquima cortical lesionado aumenta desde el momento de la lesión, observándose un pico en el número de células CD45⁺Iba1⁻ a 3 dpi. A partir de 3 dpi su número disminuye.

La dinámica de infiltración de células inmunitarias infiltradas muestra una correlación inversa con la dinámica de proliferación astrocitaria a partir de 3 dpi.

Capítulo 5

Función de los astrocitos proliferativos

En numerosos trabajos se han informado funciones beneficiosas de los astrocitos reactivos (Anderson et al., 2016; Benner et al., 2013; Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; Frisen, 2016; Sabelström et al., 2013) pero a la vez se ha sugerido que la proliferación astrocitaria es la que contribuye a la formación de cicatrices gliales persistentes en las zonas de lesión del SNC y por lo tanto la inhibición de las conexiones axonales (Anderson et al., 2016; Wanner et al., 2013). En otros trabajos con modelos de lesión similares a los estudiados en este estudio se ha observado que la ablación de astrocitos proliferativos tiene como consecuencia un aumento del infiltrado inflamatorio y un retraso en la restauración de la barrera hematoencefálica (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004). Sin embargo, en estos trabajos se indujo la muerte de los astrocitos proliferativos utilizando el sistema de expresión de la timidina quinasa herpética en astrocitos proliferativos, con la consecuencia de la muerte astrocitaria luego del tratamiento con ganciclovir. Como los procesos de muerte celular desencadenan procesos inflamatorios y liberan mediadores capaces de inducir el reclutamiento de células del sistema inmune, no es posible asignar a los astrocitos proliferativos la función de limitar la respuesta inflamatoria en el contexto de los trabajos mencionados.

Hipótesis de trabajo

Los resultados del capítulo anterior sugieren que los astrocitos yuxtavasculares proliferativos tendrían como función la limitación del ingreso de las células inmunitarias periféricas al parénquima cerebral lesionado.

De ser así, la reducción de la actividad proliferativa de los astrocitos tendría como consecuencia una mayor infiltración de células inmunitarias, mientras que un aumento de la misma, resultaría en una disminución del número de células infiltradas (Figura 5.1).

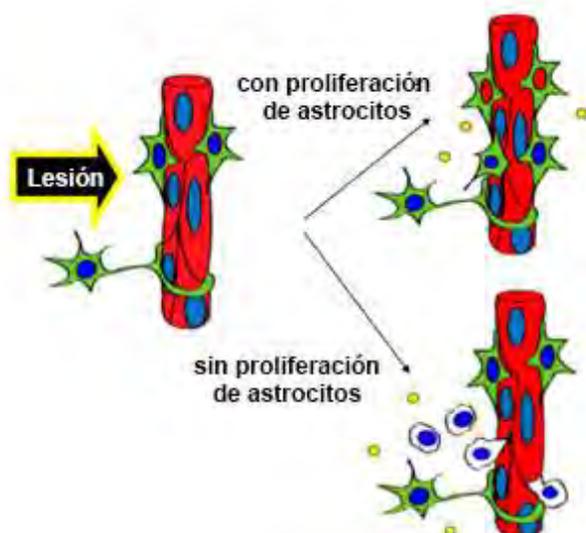


Figura 5.1. La lesión desencadena la infiltración de células inmunitarias. Si los astrocitos proliferan junto a los vasos se limita el reclutamiento de estas células y si los astrocitos no pueden proliferar se verá aumentada la infiltración de células inmunes.

Para comprobar esta hipótesis se dispuso de modelos de ratones transgénicos en los que es posible manipular específicamente la actividad proliferativa de los astrocitos.

Para inducir una pérdida en la función astrocitaria se utilizaron ratones que permiten, en forma inducible y específicamente en astrocitos, la delección de la proteína Cdc42 (Bardehle et al., 2013a; Robel et al., 2011a). Esta proteína es una pequeña Rho GTPasa que está involucrada en la separación de cromosomas durante la división celular. La delección inducible en astrocitos en el estado adulto impide la división de los mismos, cuando la lesión induce esta actividad. Esto se logra con la expresión de la recombinasa Cre inducible por tamoxifeno (Cre^{ERT2}) bajo el promotor del transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST) (Figura 5.2), en ratones mutantes para el locus de *cdc42*, en los cuales el gen se encuentra rodeado de sitios lox (este sistema de delección inducible se detalla en la sección Materiales y Métodos). Estos ratones también poseen un cassette con el gen reportero de eGFP bajo el promotor de CAG (Bardehle et al., 2013b; Robel et al., 2011a). En trabajos previos se encontró que luego de una lesión cortical en este ratón, la proliferación astrocitaria se reduce a un 40% de los valores normales (Bardehle, Kruger et al 2013). Por lo mencionado, se analizaron los infiltrados inflamatorios en este modelo para comprobar la hipótesis postulada.

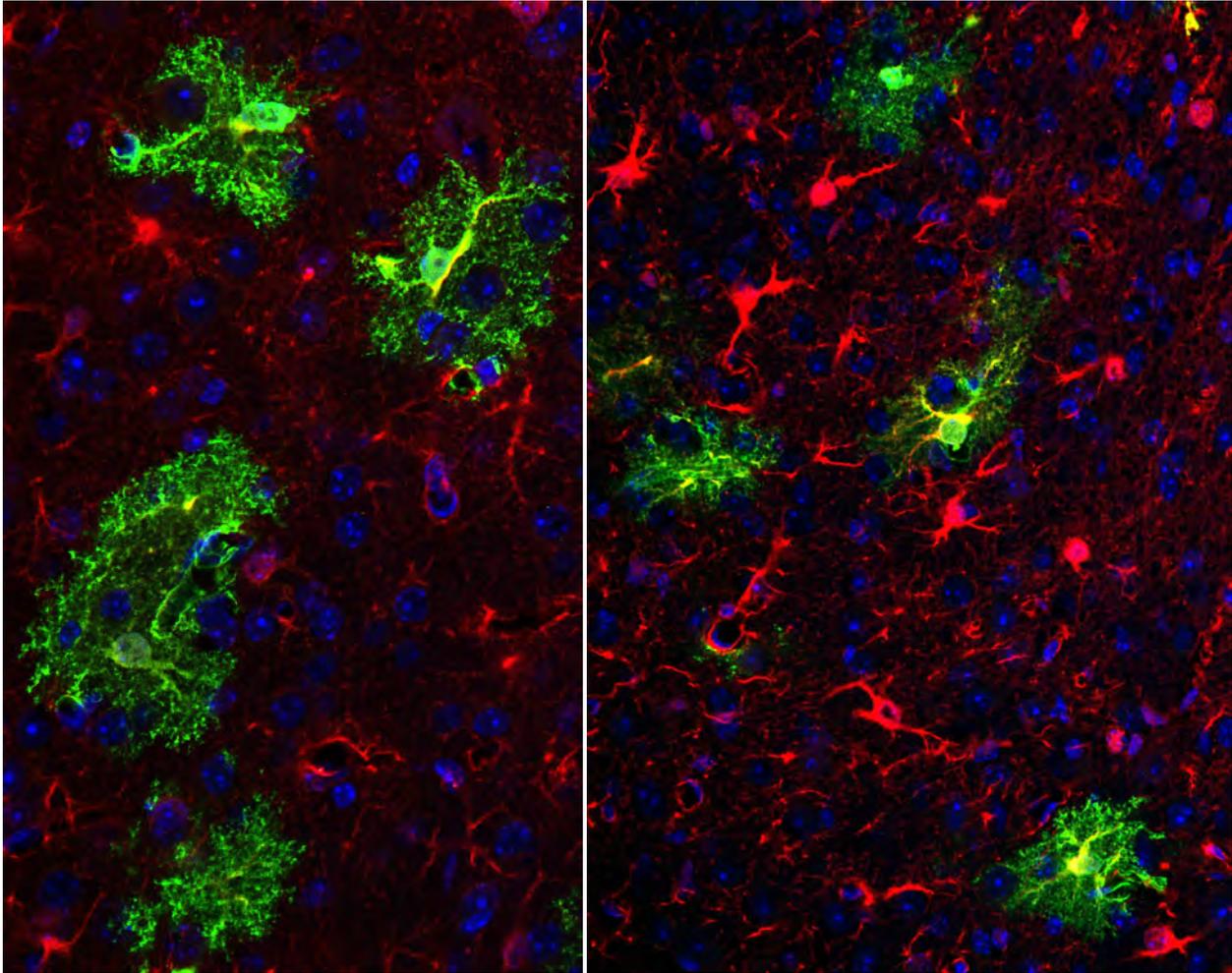


Figura 5.2 Astrocitos recombinados en la línea GLAST-CreERT2xGFP. Las microfotografías muestran inmunomarcación de GFP (verde) expresada bajo el promotor GLAST mediante el sistema inducible GLAST-CreERT2. A la izquierda se muestra la sustancia gris de la corteza cerebral del hemisferio contralateral a una lesión de tipo stab wound. Nótese los bajos niveles de expresión de GFAP (rojo) en comparación con la corteza lesionada (derecha). La tasa de recombinación para estos animales oscila alrededor del 30% (astrocitos recombinados respecto a astrocitos totales).

Otra forma de disminuir la proliferación astrocitaria luego de una lesión es mediante la utilización del mismo sistema de delección inducible mediado por la recombinasa Cre pero en este caso para deleccionar el receptor Smoothened (Smo) de la vía del morfogen Sonic hedgehog (Shh). Esta vía es responsable de desencadenar la proliferación astrocitaria (Sirko et al., 2013a) y su delección también resulta en una reducción de aproximadamente un tercio de la proliferación astrocitaria normal luego de la lesión tipo *stab wound* (Sirko et al., 2013a). Este sistema también se utilizó en este trabajo para modelar la pérdida de función astrocitaria evaluándose el número de células infiltradas en la sustancia gris.

Por el contrario, también puede modelarse una ganancia de la función astrocitaria estimulando la proliferación de los astrocitos por métodos genéticos y farmacológicos. En el contexto de la hipótesis de trabajo planteada, esto resultaría en una disminución del número de células inmunitarias infiltradas.

El método farmacológico seleccionado fue el uso del agonista del receptor Smo de la vía de Shh, SAG. Este agonista administrado en forma oral luego de la lesión estimula la proliferación celular, incluyendo la proliferación astrocitaria (Sirko et al 2013). En los experimentos se analizó el número de células periféricas infiltradas en animales lesionados y tratados con SAG.

Como método genético se utilizó la expresión constitutiva de una versión activada del receptor Smoothened debido a una mutación genética (SmoM2). Como ya se mencionó, esta vía de señalización está involucrada en la proliferación astrocitaria. La expresión constitutiva de la versión activada podría llevar a una mayor proliferación. La forma mutada del receptor se expresó fusionada a la proteína YFP exclusivamente en astrocitos utilizando una línea transgénica disponible comercialmente (SMOM2-YFP) luego de cruzarla con ratones GLAST-Cre^{ERT2}.

Los experimentos propuestos responden a uno de los objetivos específicos de este proyecto de trabajo que propone estudiar la infiltración de células características de la respuesta inflamatoria en el modelo de lesión cortical punzante utilizando ratones mutantes o tratados farmacológicamente, en los cuales la respuesta proliferativa está disminuida o ausente, con el fin de determinar un posible rol de los astrocitos proliferativos.

Capítulo 6

Pérdida de la función de los astrocitos proliferativos

Para estudiar en qué medida la alteración de la respuesta proliferativa astrocitaria normal puede afectar la invasión de leucocitos circulantes, se utilizó la delección condicional específica en astrocitos de la proteína Cdc42 (ratones Cdc42 cKO) (Bardehle et al., 2013b; Robel et al., 2011a) o la delección condicional del receptor Smo de la vía de Shh (ratones Smo cKO) (Sirko et al., 2013a) y el modelo de lesión tipo *stab wound*. En ambos sistemas se evaluó la infiltración de células CD45⁺ de la manera explicada en el Capítulo 4.

Resultados

Reducción de la proliferación astrocitaria en ratones Cdc42 cKO

Se suministró tamoxifeno por vía oral a ratones adultos de 8 semanas de edad portadores del gen de *cdc42* rodeados de sitios lox (*cdc42^{fl/fl}*) y a los ratones control, que no poseen sitios lox en el locus de *cdc42*. El tamoxifeno induce en los astrocitos (GLAST⁺) la recombinación mediada por Cre que lleva a la delección del *cdc42* y a la expresión de GFP. Los ratones se sometieron a cirugía para la aplicación de la lesión luego de una espera de tres semanas con el objetivo de que se elimine el tamoxifeno sistémico.

La recombinación observada en astrocitos corticales fue de aproximadamente un 35% de los astrocitos totales (Figura 6.1, células GFP⁺), consistente con el rendimiento de la recombinación obtenido previamente por este método (Bardehle et al., 2013b; Robel et al., 2011a). En este sistema se reduce la proliferación a un 40% de los valores normales a 5 y 7 dpi (Figura 6.1 A-C).

La infiltración de células inmunes periféricas está aumentada en ratones Cdc42 cKO

A 5 dpi el número de células CD45⁺Iba1⁻ en el parénquima de la sustancia gris lesionada resultó 4 veces mayor en ratones Cdc42 cKO que en el control (Figura 6.2 A-C). Este incremento no se observó a 3 dpi, pero persistió hasta 7 dpi, momento en el cual el número de células infiltradas en ratones Cdc42 cKO fue \cong 3 veces mayor (22,67 \pm 6,12 células CD45⁺/mm² en WT vs. 77,00 \pm 14,50 células CD45⁺/mm² en Cdc42 cKO).

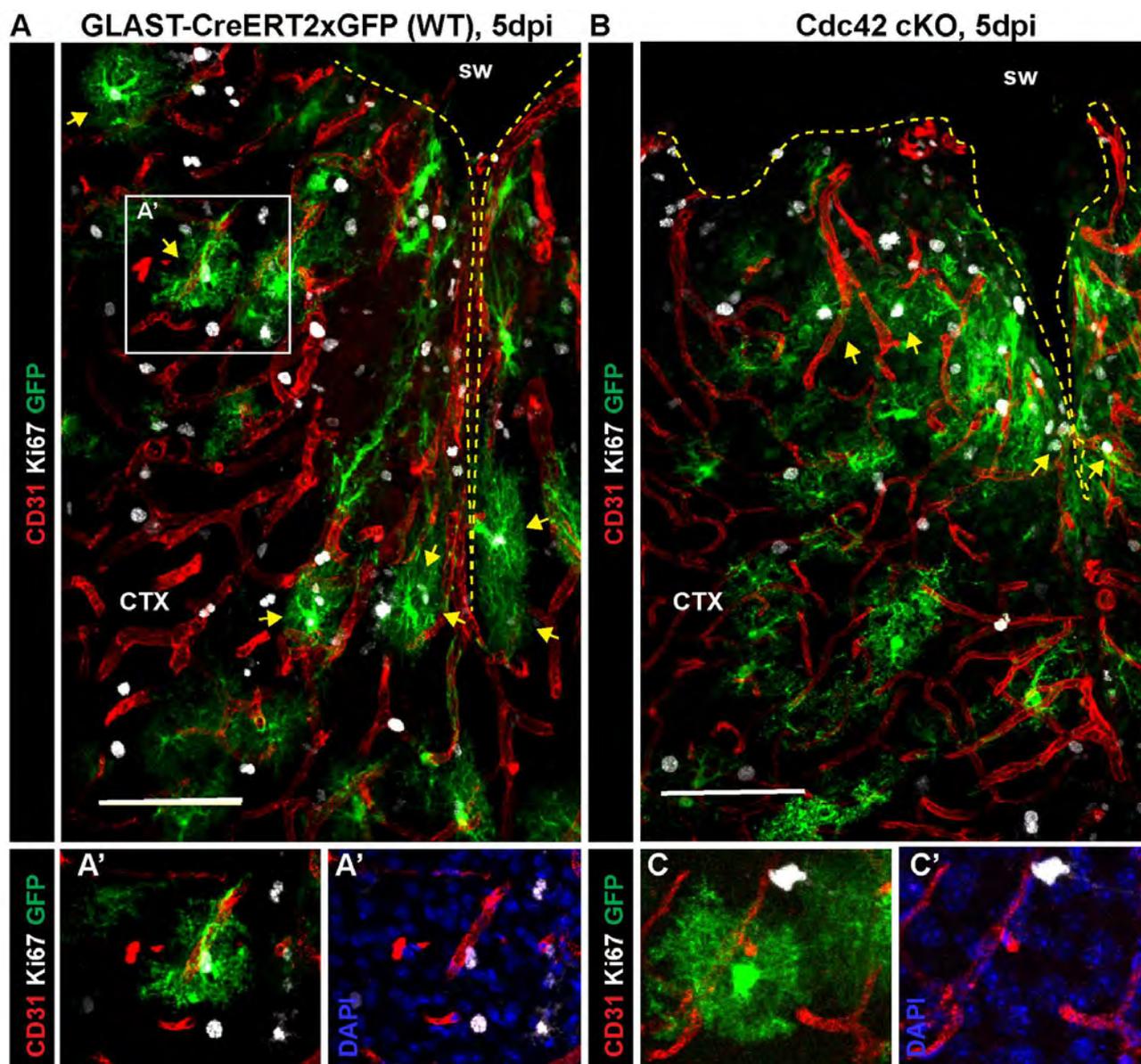


Figura 6.1.A) Imágenes de microscopía confocal de la corteza cerebral lesionada de ratones cuyos astrocitos (células GFP⁺) son *knock out* condicionales para *Cdc42* (*Cdc42* cKO) (**B**) y controles GLAST-Cre^{ERT2}xCAG-eGFP (**A**) a 5 dpi. La inmunomarcación con Ki67 muestra una reducción de la proliferación que fue reportada en trabajos anteriores. Los astrocitos proliferativos se indican con flechas amarillas. A') Detalle de astrocito proliferativo yuxtavascular expresando GFP y Ki67 junto a un vaso sanguíneo marcado con CD31. Barras 100 μ m. C) Detalle de astrocito recombinado en la línea *Cdc42* cKO en la cual se observa menor proliferación en las células recombinadas.

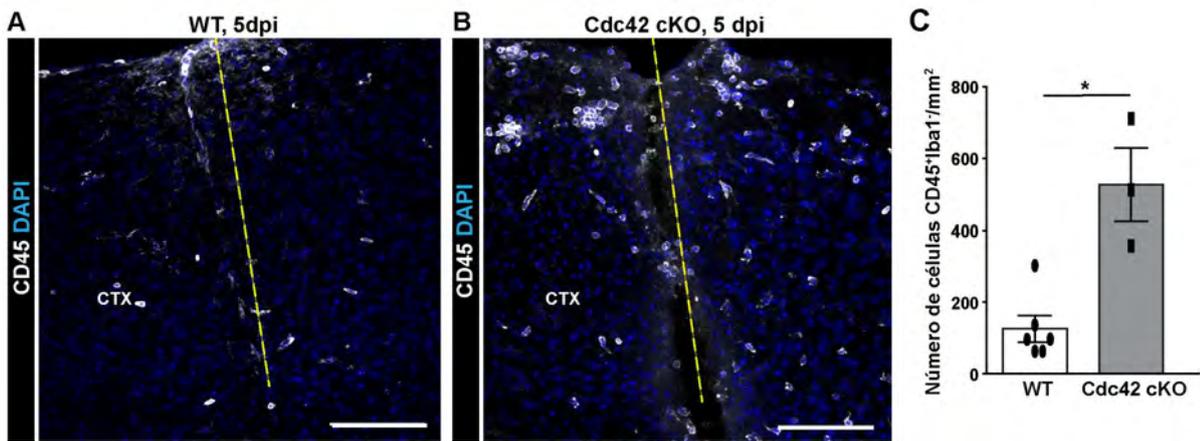


Figura 6.2. imágenes de la corteza lesionada de ratones control **(A)** y *Cdc42* cKO **(B)** con inmunomarcación para CD45. **(C)** El gráfico de barras muestra la cuantificación del número de células CD45+ por mm² de corteza cerebral analizada (Área de 0,25 mm² con centro en la lesión). Los círculos y cuadrados negros corresponden a los valores obtenidos para cada animal experimental. La diferencia entre las medias fue analizada con el test de Mann-Whitney, *p=0.0275, n=6 para WT and n=3 para *Cdc42* cKO. Barras de escala 100 µm.

Reducción de la proliferación por delección del receptor *Smo*

Otro modo utilizado para reducir la proliferación astrocitaria luego de la lesión fue la delección condicional del receptor *smoothened* (*smo*) de la vía de *Shh* en astrocitos en el estadio adulto utilizando una línea de ratones *GLAST^{CreERT2}/smo^{fl/fl}* (*Smo* cKO). En trabajos anteriores de esta línea de investigación pudo comprobarse que la delección de este receptor resulta en una reducción al 40% de la proliferación astrocitaria normal (Sirko et al., 2013a) luego de una lesión realizada 3 semanas después de la última dosis de tamoxifeno. En esta línea de ratones pudo confirmarse el efecto observado a 5 dpi en ratones *Cdc42* cKO ya que se observó un aumento de aproximadamente 3 veces el número normal de células inmunitarias infiltradas. (Figura 6.3A-C).

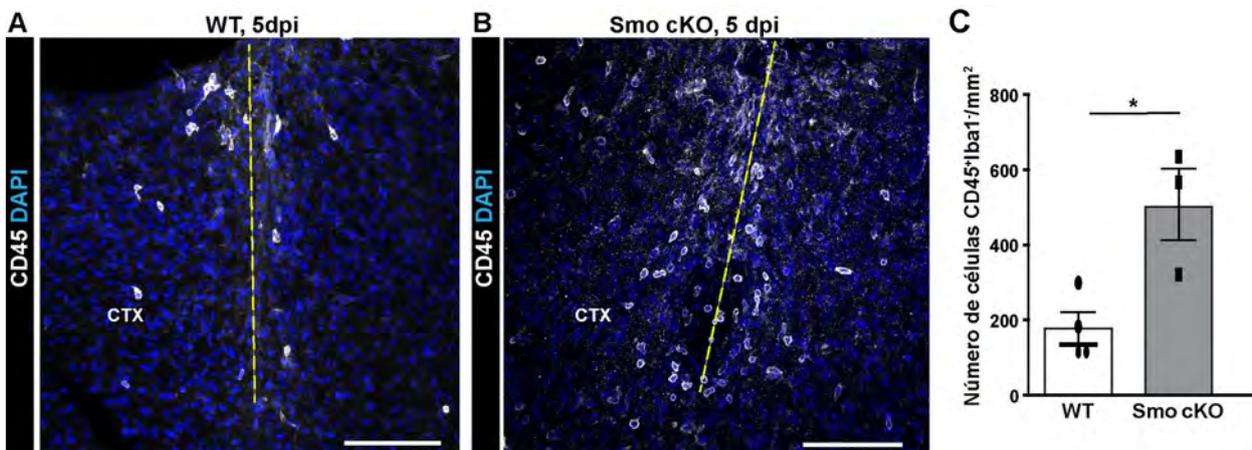


Figura 6.3. imágenes de la corteza lesionada de ratones control **(A)** y *Smo* cKO. **(B)** con inmunomarcación para CD45. Barras de escala 100 µm. El gráfico de barras muestra la cuantificación del número de células CD45+ por mm² de corteza cerebral analizada (Área de 0,25 mm² con centro en la lesión). Los círculos y cuadrados negros corresponden a los valores

obtenidos para cada animal experimental. La diferencia entre las medias fue analizada con el test de Mann-Whitney, $*p=0.0498$, $n=4$ para WT y $n=3$ para Smo cKO . Barras $100\mu\text{m}$.

Discusión

Estos resultados muestran que la proliferación astrocitaria es necesaria para reducir la infiltración de células del sistema inmune.

Es interesante destacar que la recombinación mediada por tamoxifeno en ratones GLAST-Cre^{ERT2} afecta solo a la mitad de los astrocitos (Bardehle et al., 2013b; Robel et al., 2011a). En estas condiciones, a pesar de que los cambios en la proliferación son sutiles, el número de células inmunitarias infiltradas fue 4 veces mayor. Esto implica que la infiltración de células inflamatorias es un proceso muy sensible a la proliferación astrocitaria, independientemente de cuál sea el gen deletado en cada condición (*cdc42*, *smo*).

Conclusión

Una pequeña reducción en la proliferación de los astrocitos resulta en un aumento del número de células del sistema inmune en el parénquima cortical durante la respuesta aguda a la lesión sugiriendo un rol de los astrocitos proliferativos en la limitación de la infiltración de células periféricas.

Capítulo 7

Ganancia en la función astrocitaria

Para estudiar los efectos de un aumento de la proliferación astrocitaria sobre la infiltración de células del sistema inmune se utilizaron dos aproximaciones. La primera consiste en el tratamiento oral de los ratones con el agonista de Smo SAG, luego de la lesión y la segunda es un modelo genético en el que se indujo la expresión astrocitaria de una versión mutada de Smo (SmoM2) utilizando el sistema de recombinación inducible en ratones GLAST-Cre^{ERT2}. En ambos modelos se realizó la lesión y se cuantificó el número de células con altos niveles de CD45 a 5 dpi.

Resultados

Consecuencias del aumento de la proliferación astrocitaria por tratamiento con SAG

Para determinar los efectos de una mayor división celular en astrocitos se utilizó este diseño experimental que ya había mostrado en trabajos previos su efecto incrementador de la proliferación astrocitaria (Sirko et al., 2013a). Brevemente, se realizó el procedimiento quirúrgico para la aplicación de la lesión de tipo *stab wound* en ratones C57BL/6J. Durante los próximos días se les suministró una dosis diaria del agonista SAG por vía oral hasta su sacrificio a 5 dpi. Los ratones control fueron tratados de la misma manera, pero se les administró solución fisiológica.

El análisis cuantitativo de las células CD45⁺Iba1⁻ mostro que en algunos animales el tratamiento con SAG resultó en niveles menores de infiltración. Sin embargo, en el grupo estudiado las diferencias no fueron significativas (Test de Mann Whitney, valor P=0,2571; Figura 7.1. A-C). En algunos animales tratados con SAG se observó que en algunos vasos grandes superficiales las células CD45⁺Iba1⁻ se acumulaban en el espacio perivascular (Figura 7.1 D) pero no pudo determinarse la causa de su acumulación, que podría estar relacionada con el aumento de la proliferación astrocitaria yuxtavascular.

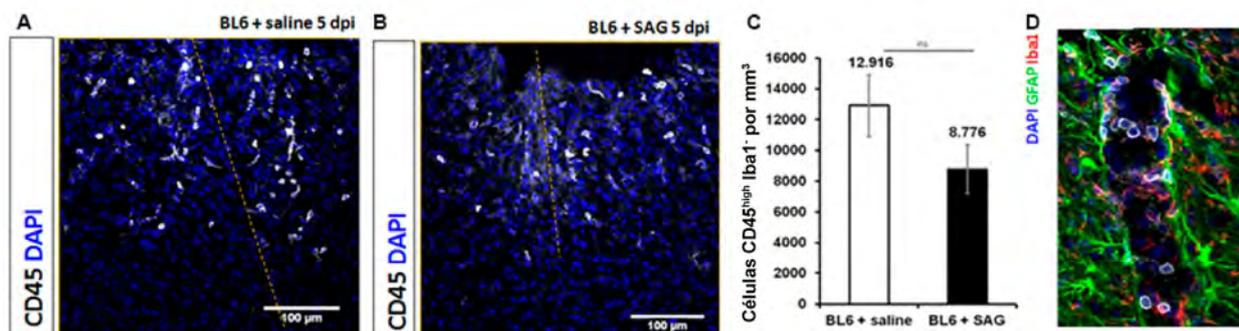


Figura 7.1. Imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia para CD45 en ratones BL6 controles **(A)** y tratados con SAG **(C)**. **B)** Cuantificación del número de células CD45⁺Iba1⁻ por mm³ de sustancia gris de la corteza cerebral. **D)** Agregados perivasculares de células CD45⁺Iba1⁻.

Aumento de la proliferación astrocitaria en ratones SMOM2

Considerando las observaciones anteriores en ratones genéticamente modificados con proliferación astrocitaria reducida es posible predecir que un aumento en la proliferación de astrocitos reactivos debería resultar en una menor infiltración de leucocitos. Para demostrar esto, se indujo la expresión de SMOM2-YFP, una forma constitutivamente activa de Smo (Jeong et al., 2004; Xie et al., 1998) selectivamente en astrocitos adultos mediante recombinación mediada por GLAST-Cre^{ERT2} que resulta en la eliminación de un *cassette* de *Stop* (Jeong, Mao et al. 2004). La lesión se realizó 3 semanas después de la aplicación de tamoxifeno. A 5dpi, se detectaron astrocitos en la sustancia gris de los ratones GLAST-Cre^{ERT2}-SMOM2 fueron YFP+ (Figura 7.2). La mayoría de las células YFP+ resultaron también positivas para Ki67 luego de la lesión (Figura 7.2 B). El número de células Ki67+ se incrementó aproximadamente 3 veces y la proliferación de astrocitos en más de 4 veces (Figura 7.3 A-F). Como consecuencia de este aumento de la proliferación se observó un aumento general de los números de astrocitos a 5 dpi (Figura 7.3 F) la mayoría de los cuales eran yuxtavasculares (57%).

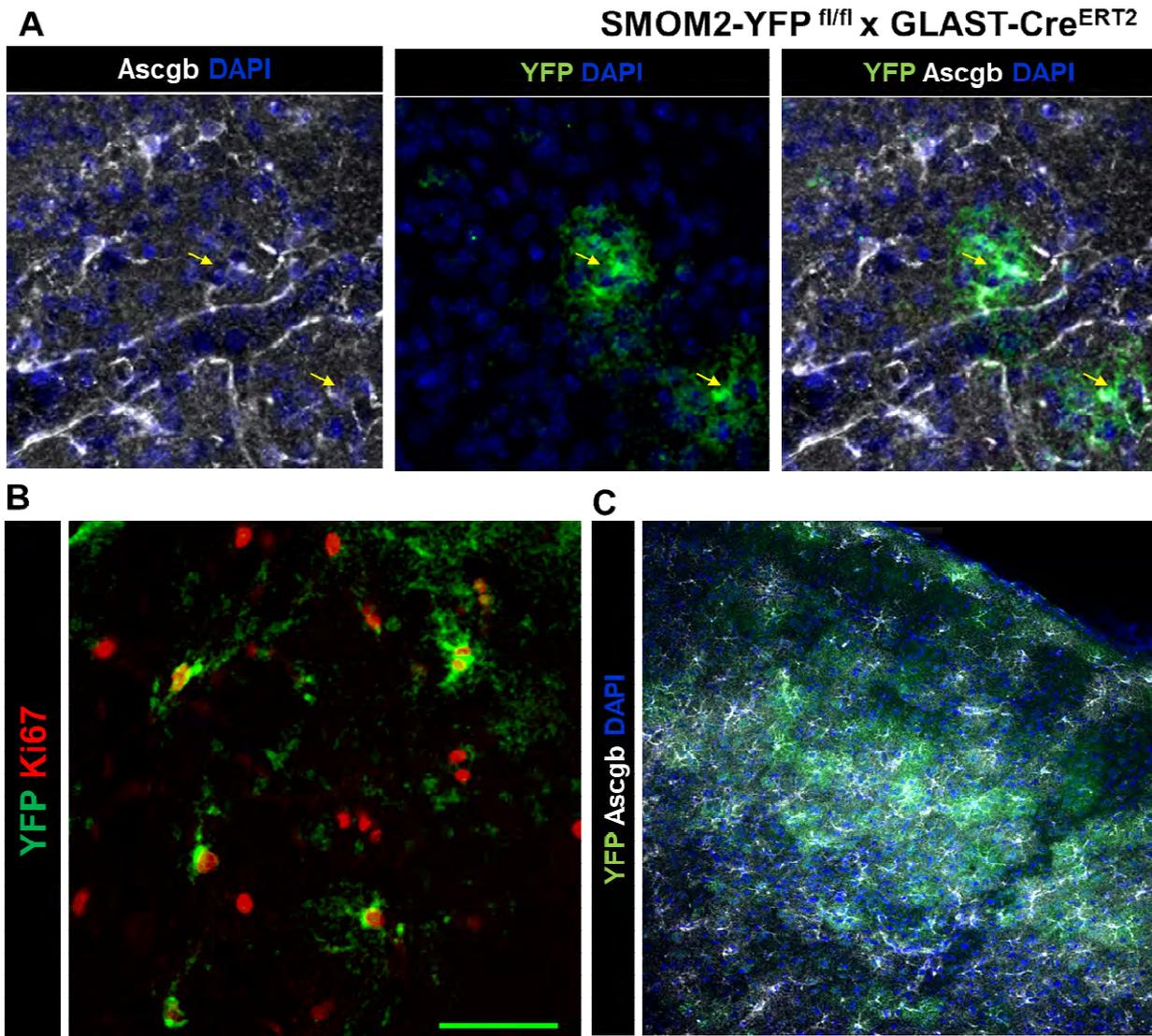


Figura 7.2. A) Imágen de microscopia confocal de inmunofluorescencia de la corteza cerebral de ratones SMOM2-YFP donde se observa la colocalización del marcador astrocitario Ascgb y YFP en astrocitos que sufrieron recombinación. **B)** Imágenes de la inmunomarcación de YFP y Ki67 en la corteza lesionada a 5 dpi. Barra 50 μ m. **C)** Imagen de la corteza cerebral contralateral intacta mostrando un gran número de astrocitos recombinados.

Reducción de la infiltración de células CD45⁺Iba1⁻ en ratones SMOM2

El número de células CD45⁺Iba1⁻ en el sitio de lesión de ratones SmoM2-YFP se redujo significativamente a aproximadamente la mitad del número observado en ratones control (Figura 6.3 G-K), lo que indica que el aumento de la proliferación de astrocitos resulta en una reducción del número de células CD45⁺Iba1⁻ en la sustancia gris lesionada.

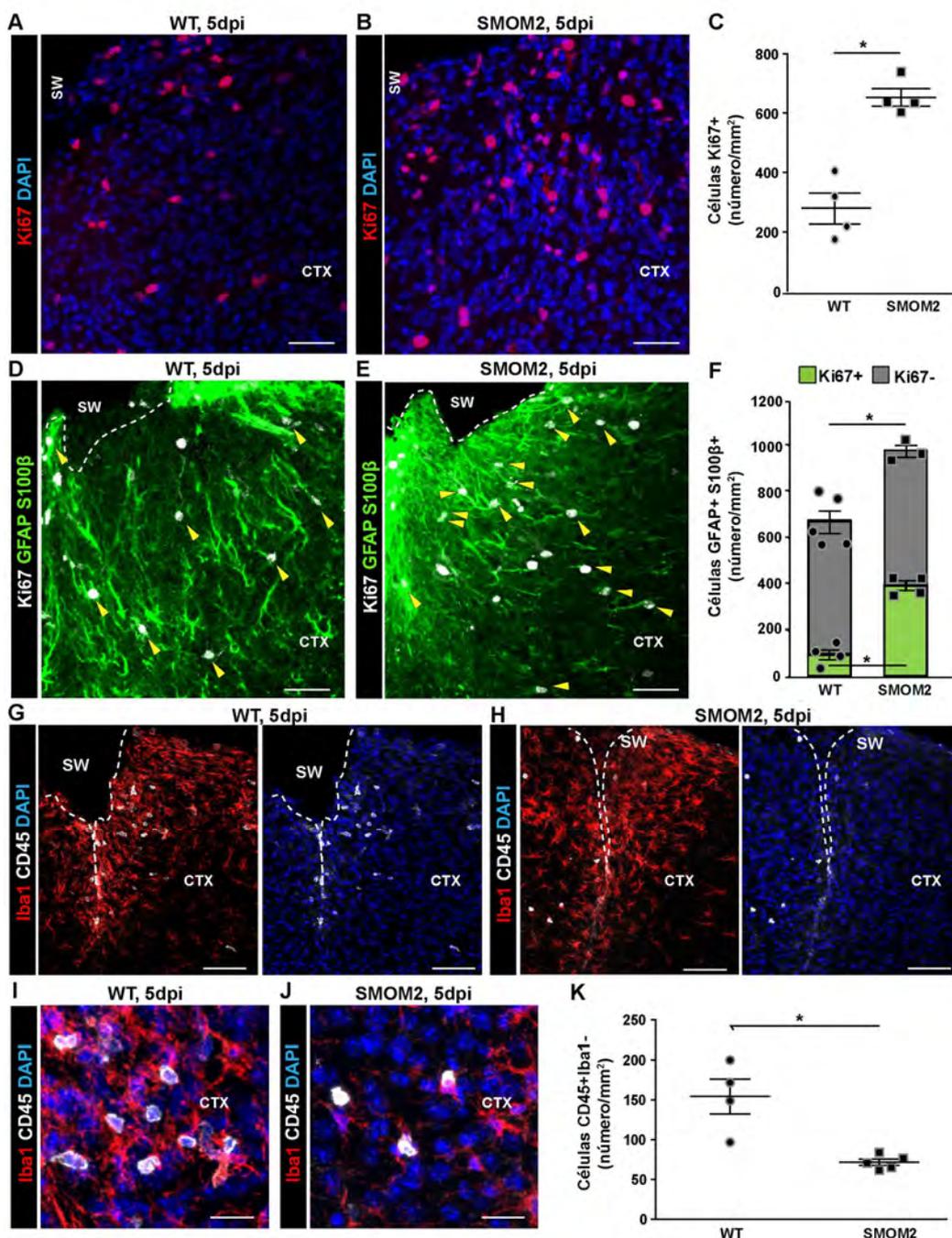


Figura 7.3. El aumento de la proliferación de astrocitos se correlaciona con la reducción de la infiltración de células inmunes en ratones SMOM2 a 5 dpi. Distribución de las células Ki67⁺ en la sustancia gris (GM) lesionada de los ratones WT (A) y SMOM2 (B) a 5 dpi. (C) Gráficos de barras que representan la cuantificación de células Ki67⁺ en el parénquima a 5 dpi (*p=0.0498, n=4). Micrografías representativas de secciones corticales obtenidas de ratones WT (D) o SMOM2 (E) e inmunomarcadas para GFAP, S100β y Ki67 a 5 dpi. El número de astrocitos proliferativos (barras verdes, *p=0.027, n=4) y astrocitos no proliferativos (barras grises, *p=0.029, n=4) por área de sustancia gris cortical lesionada se muestran en (F). Nótese que los números totales de astrocitos en la zona de la lesión son significativamente diferentes entre los ratones WT y SMOM2 (*p=0,036, n=5 para WT y n=3 para SMOM2). Las micrografías muestran ejemplos de doble marcación para Iba1 y CD45 en la sustancia gris cortical de ratones WT (G, I) y SMOM2 (H, J) a 5 dpi. (K) Análisis cuantitativo que muestra los números de células CD45^{high}Iba1⁻ en la corteza lesionada de ratones WT y SMOM2 a 5 dpi (*p=0.016, n=4 para WT

y $n=5$ para SMOM2). Todos los datos se representan como $\text{media} \pm \text{SEM}$ (error estándar de la media). La significación de las diferencias entre las medias se analizó mediante la prueba de Mann-Whitney y se indica en función del valor p ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). Las líneas punteadas indican el sitio de la lesión. Los núcleos celulares se marcaron por contratinción con DAPI. Barras de escala: 50 μM (A, B, D, E, G, H), 20 μM (I, J).

Respuesta de otras células gliales

En los ratones SMOM2-YFP se observó mayor actividad proliferativa incluso excluyendo la contribución de los astrocitos proliferativos (Figura 7.3 F, barra gris). Para investigar la naturaleza de estas células que estaban atravesando el proceso de división celular se realizó inmunomarcación simultánea de Ki67 y el marcador NG2 que identifica células progenitoras de oligodendrocitos. Las células positivas para Ki67 que no eran de naturaleza astrocitaria resultaron ser mayoritariamente células progenitoras de oligodendrocitos (células NG2, Figura 7.4 A,B). Se observó que las células de esta población con actividad proliferativa eran un poco más del doble que las observadas en ratones control (Figura 7.4 C). Mediante inmunomarcación de YFP pudo detectarse que las únicas células que recombinaron en la corteza cerebral luego de la inducción de la recombinasa Cre con Tamoxifeno fueron astrocitos, con lo cual no se espera que las células NG2 tengan actividad constitutiva de SmoM2. Sin embargo, es posible que la activación continua de esta vía en astrocitos estimule actividades celulares que desencadenen la secreción de factores capaces de estimular la división de células vecinas de naturaleza no astrocitaria.

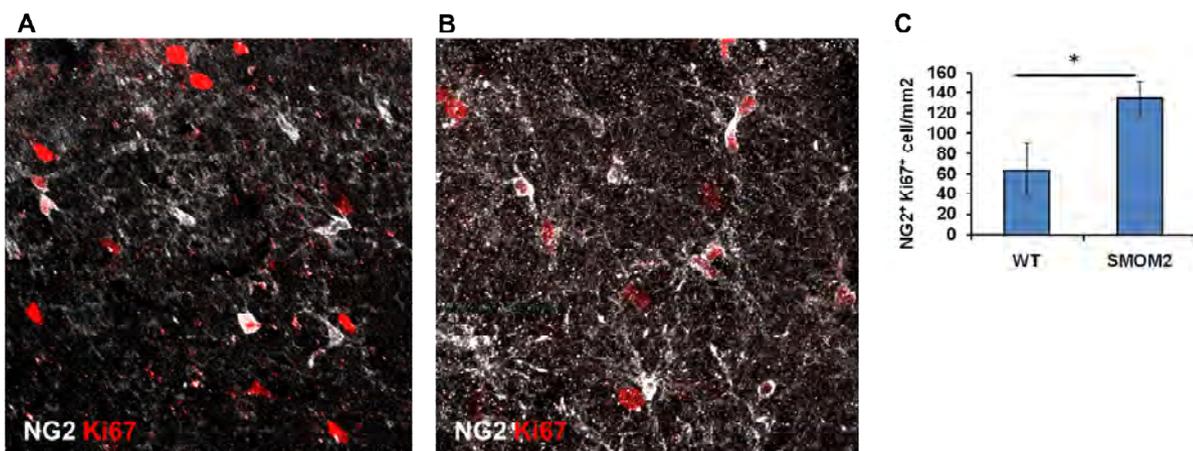


Figura 7.4. Proliferación de células NG2 en ratones SmoM2. Las imágenes muestran fotografías de microscopía confocal de la corteza cerebral lesionada de ratones control (A) y SmoM2 (B) a 5 dpi con inmunomarcación para NG2 y Ki67. C) Gráfico de barras mostrando el número de células positivas para NG2 y Ki67 por mm² de corteza lesionada.

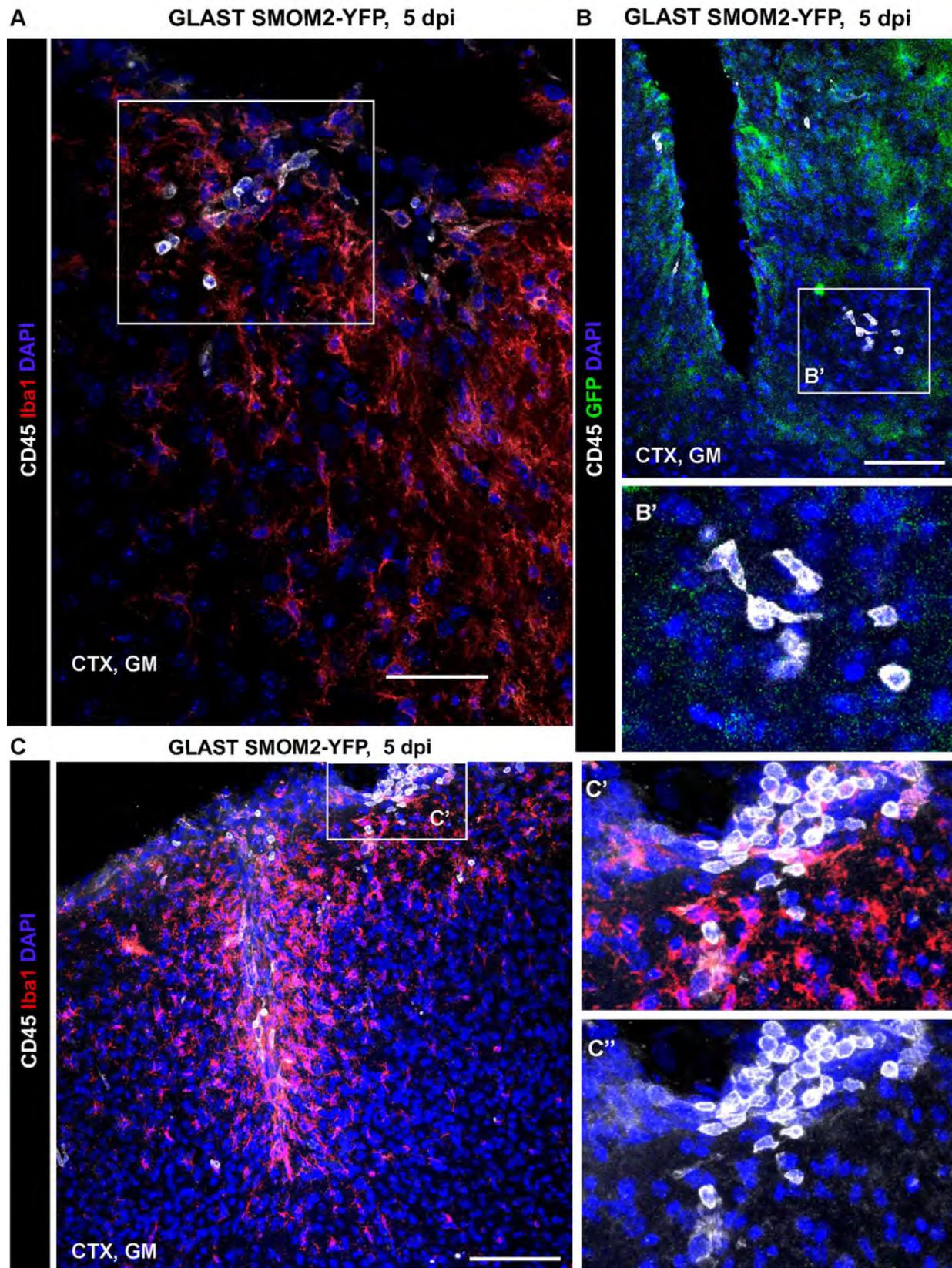


Figura 7.5. A-C) Imágenes de microscopía Confocal de la corteza lesionada de ratones SMOM2 mostrando cúmulos de células CD45^{high}. Estas acumulaciones perivasculares se detectaron en cortes donde no se había hecho inmunomarcación de vasos sanguíneos (CD31); sin embargo, se pudo confirmar la ubicación perivascular por microscopía de contraste de fase y observación simultánea de la misma región por epifluorescencia (datos no mostrados).

Acumulación perivascular de células CD45^{high}Iba1⁻ en ratones SmoM2

En los ratones SmoM2 pudo observarse un efecto similar al observado en los ratones tratados con SAG: las células CD45⁺ periféricas infiltradas se detectaron frecuentemente en la zona perivascular. Esto se observó principalmente en los vasos superficiales de mayor diámetro cercanos a la pía (Figura 7.5 A, C) pero también en capas más profundas de la corteza cerebral (Figura 7.5 B).

Discusión

Los experimentos que se muestran en este Capítulo tuvieron como objetivo lograr un aumento de la proliferación astrocitaria en la corteza cerebral para ver una eventual ganancia en la función astrocitaria que hipotéticamente restringiría el ingreso de células periféricas a la zona lesionada. El tratamiento con SAG resultó en un aumento de la función astrocitaria (Sirko et al 2013). Sin embargo, este aumento solo produjo una tendencia a menor número de células infiltradas que no es estadísticamente significativa. Dado que el tratamiento con SAG se realiza por aplicación oral y por lo tanto actúa en forma sistémica, es posible que sus efectos no sean exclusivos sobre la proliferación astrocitaria ya que otras células podrían tener los receptores para esta vía. Los experimentos en ratones SmoM2, donde se estimuló la vía de Shh específicamente en astrocitos, resultaron en un aumento de la proliferación astrocitaria. Simultáneamente se observó una disminución en la infiltración de células inmunes sugiriendo que la hipótesis de trabajo es válida.

Conclusiones

Los resultados de este capítulo muestran que un aumento de la proliferación astrocitaria, ya sea por un tratamiento farmacológico de un agonista de la vía de Shh, como por la expresión específica en astrocitos de una versión constitutivamente activa del receptor Smo (SmoM2), resultan en una disminución de la infiltración de células periféricas infiltradas.

La expresión de SmoM2 en astrocitos es suficiente para aumentar su actividad proliferativa pero además desencadena la proliferación de otro tipo de célula de la macroglía, las células NG2.

Estos resultados confirman la hipótesis de trabajo utilizada para elucidar la función astrocitaria que proponía una reducción de la infiltración ante un aumento de la actividad proliferativa en astrocitos.

Capítulo 8

Composición de los infiltrados inflamatorios

Señales capaces de desencadenar la actividad proliferativa en astrocitos

En la gráfica que correlaciona la proliferación astrocitaria con la infiltración de células inmunitarias periféricas (Figura 4.3), se observa que el pico de infiltración a 3 dpi coincide con un gran aumento de la proliferación astrocitaria que alcanza su máximo a 5 dpi. Los resultados mostrados en los Capítulos anteriores confirman que la proliferación de los astrocitos es necesaria para limitar el proceso de infiltración, validando la hipótesis de trabajo principal utilizada para determinar la función de los astrocitos yuxtavasculares proliferativos. Sin embargo, estos experimentos no permiten concluir si las señales y factores generados por las células infiltradas *in situ* son necesarias para desencadenar el proceso proliferativo.

En la Introducción general se mencionó que los astrocitos proliferativos son de gran interés para la medicina regenerativa, debido a su potencial como células madre neuronales que demuestran *in vitro*. De ahí que identificar las señales capaces de desencadenar el proceso de proliferación astrocitaria luego de una lesión sea altamente relevante.

Es posible suponer que el proceso esté regulado en forma intrínseca en la célula. Es decir, determinados programas genéticos se ponen en marcha en algunos astrocitos pero otros no responden de la misma manera. Diversos estudios han mostrado que existe heterogeneidad en los astrocitos (Bardehle et al 2013) así como también existe en otras células progenitoras gliales más indiferenciadas (Rushing and Ihrie, 2016), Figura 8.1 A).

Otra posibilidad es que cambios en el microambiente sean los que desencadenan la proliferación en los astrocitos que estén expuestos a los mismos en mayor medida (Figura 8.1 B).

Una tercera posibilidad es que otros tipos celulares influyan mediante interacciones directas o indirectas de modo que se desencadene la división celular en los astrocitos (Figura 8.1 C).

La alta complejidad de las estructuras de la corteza cerebral y el gran número de factores que se modifican en las distintas fases de la respuesta inflamatoria que desencadena el daño tisular permiten suponer que todas estas posibilidades podrían también ocurrir simultáneamente.

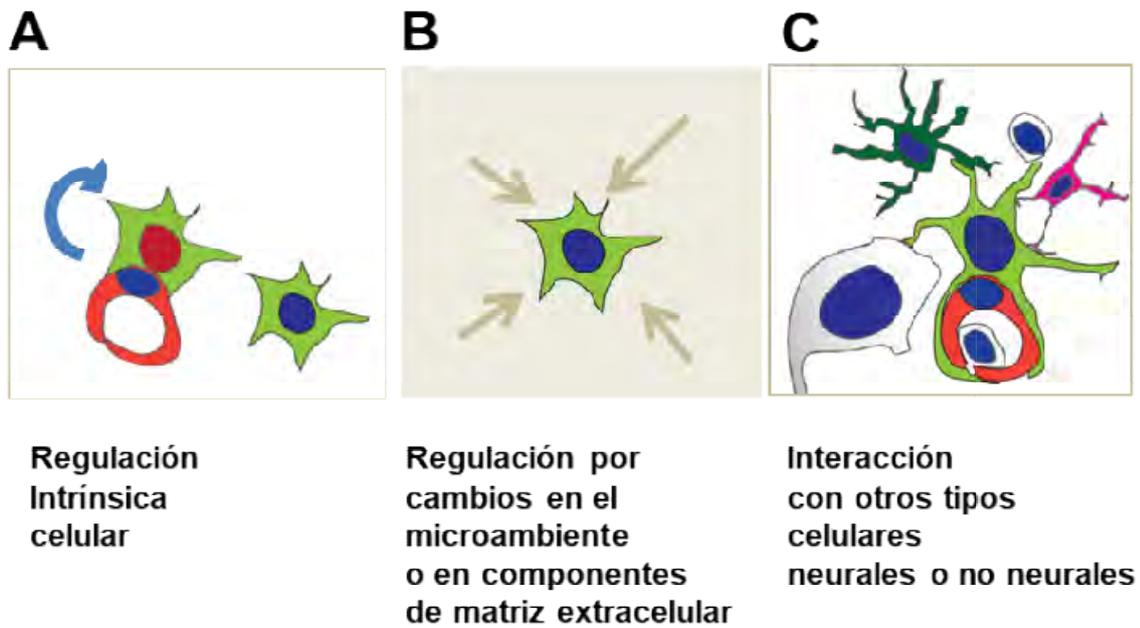


Figura 8.1. Posibles formas de regulación de la proliferación astrocitaria.

Necesidad de las células infiltradas para desencadenar el proceso proliferativo

En el contexto de estas hipótesis sobre la regulación del proceso proliferativo, puede plantearse que el pico de infiltración que ocurre a 3 dpi en la corteza lesionada, es una fuente de células que pueden tanto modificar el entorno como establecer interacciones celulares capaces de estimular la proliferación, y que son necesarias para que esto ocurra.

Para verificar esta hipótesis se dispuso de una línea de ratones mutantes *knock in* para el receptor de quimioquina CCR2, donde el locus del mismo está reemplazado por la proteína fluorescente roja (RFP). Este receptor se expresa en niveles altos principalmente en monocitos, aunque también está descrito que está presente en otras células de origen mieloide (Geissmann et al., 2003). Respecto a su expresión en la microglía hay reportes tanto de que está expresado como que no (Saederup et al., 2010), pero las evidencias más recientes utilizando esta línea de ratones reportera sugieren que la microglía no lo expresa a niveles detectables. Esta línea de ratones es una valiosa herramienta, ya que en su forma heterocigota ($CCR2^{RFP/WT}$) permite diferenciar entre poblaciones diferentes de células periféricas con niveles altos de CD45 y en su forma homocigota ($CCR2^{RFP/RFP}$ o CCR2 KO), carece del receptor CCR2 que es necesario para la extravasación de monocitos desde la circulación periférica al parénquima del tejido lesionado (Sunderkotter et al., 2004)(Figura 8.2).

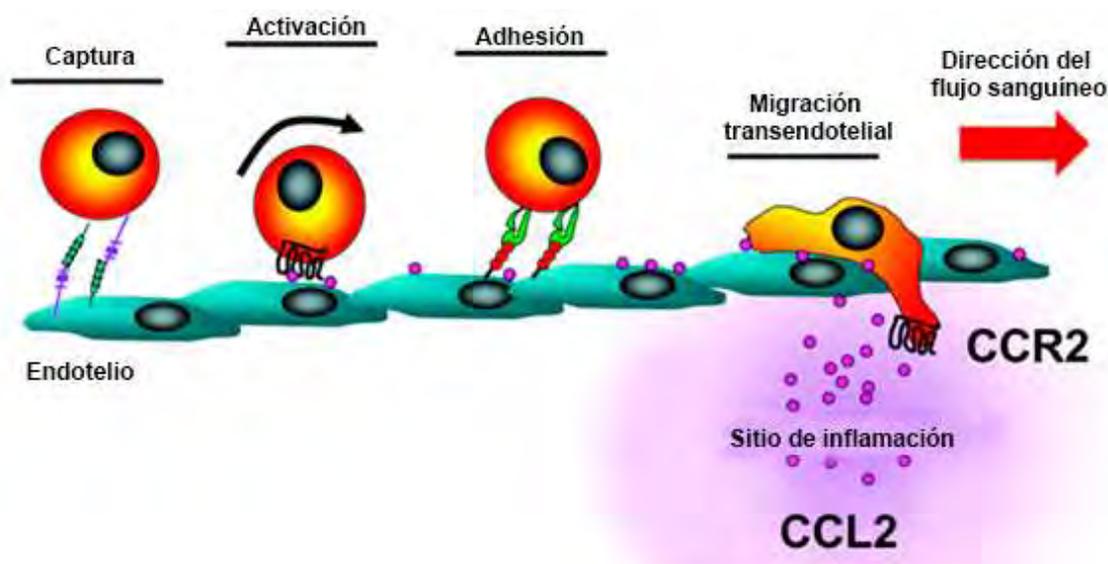


Figura 8.2. Esquema que muestra la extravasación de monocitos y la etapa en que se requiere el receptor CCR2. Modificado de (McNeill et al., 2010)

Resultados

La mayoría de las células infiltradas en la corteza cerebral lesionada son monocitos CCR2⁺

Se analizó la composición celular cualitativa de las poblaciones infiltradas en el parénquima de la corteza cerebral lesionada de ratones CCR2^{RFP/WT} a 3 dpi y 5 dpi. El 81±7% de las células CD45⁺Iba1⁻ son RFP⁺ a 3 dpi y a 5 dpi esta población asciende al 88±3% (Figura 8.3 A-C).

No se detectaron linfocitos CD3e⁺ a 3 ni 5 dpi (datos no mostrados), pero si en el timo y bazo que fueron utilizados como controles de la tinción. Los linfocitos CD45⁺ CD3e⁺ en el bazo y el timo de ratones CCR2^{RFP/WT} no expresan RFP (Figura 8.4).

No se observaron células RFP⁺ que no sean CD45⁺. Es decir, que ninguna de las células residentes expresa niveles detectables de CCR2.

Los números totales de células CD45⁺ presentes en el parénquima cerebral en el ratón CCR2^{RFP/WT} no difirieron significativamente del control WT pero se observó una tendencia a números menores.

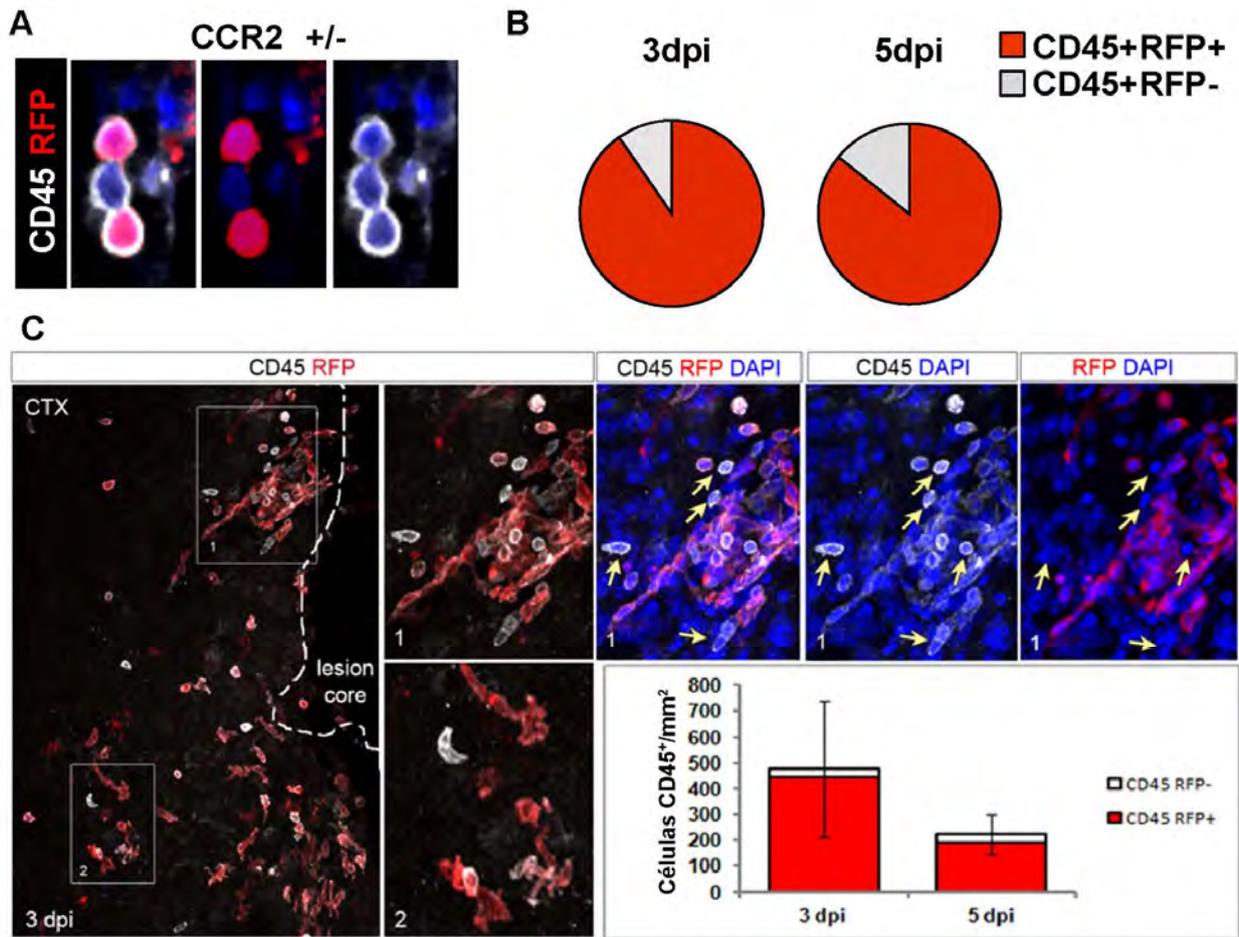


Figura 8.3. Composición de las poblaciones de células CD45⁺ infiltradas a 3 y 5 dpi en ratones heterocigotas CCR2^{RFP/WT}. **A)** imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencia de CD45 y RFP. **B)** Los gráficos muestran en rojo el % de células CD45⁺ que son RFP⁺ y en blanco el porcentaje de células CD45⁺RFP⁻. **C)** imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencia de CD45 y RFP a 3 dpi CCR2^{RFP/WT}. Los gráficos de barras muestran el número de células CD45 infiltradas por mm² de corteza cerebral lesionada que son RFP⁺ (rojo) y RFP⁻ (blanco) a 3 y 5 dpi.

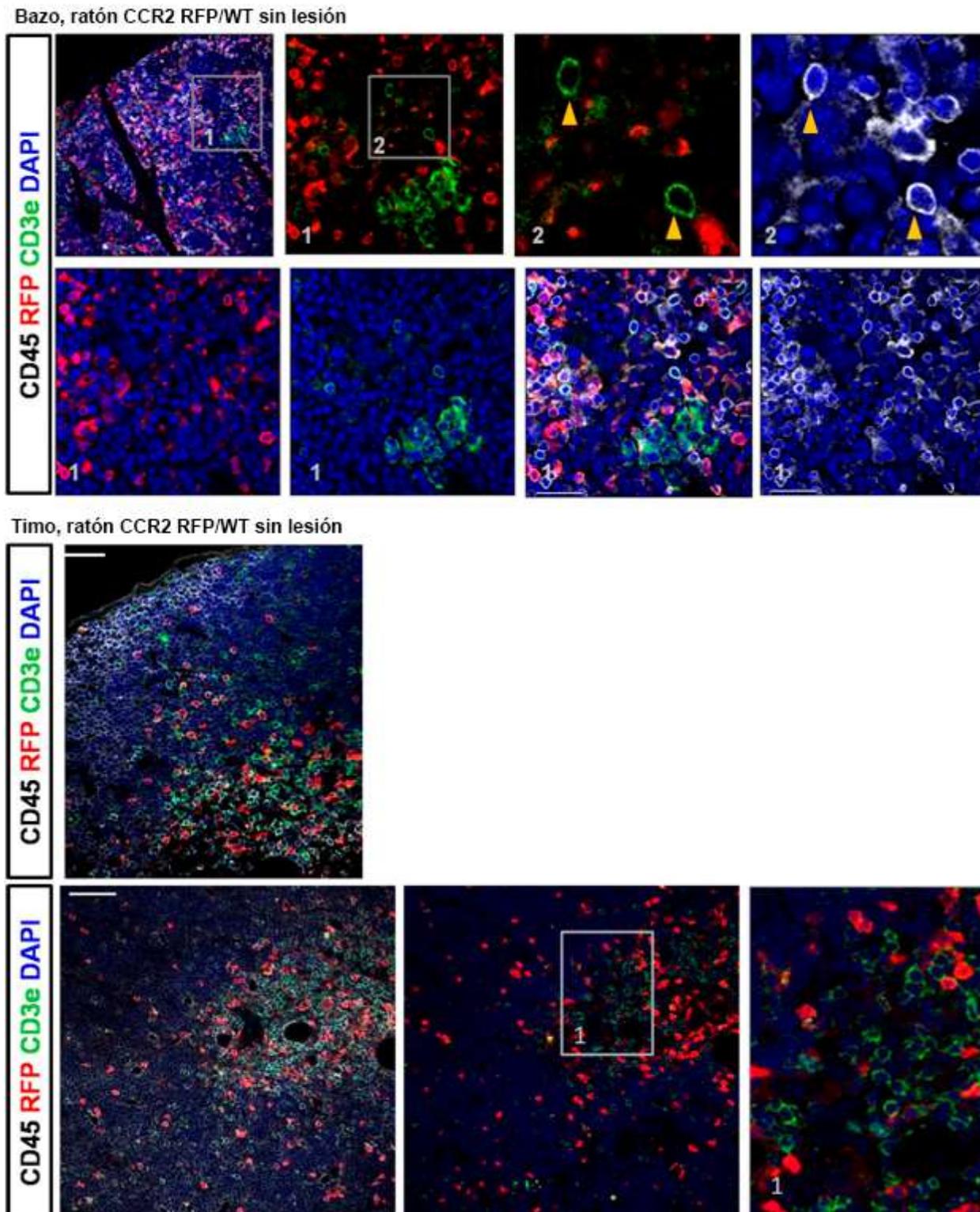


Figura 8.4. Inmunomarcación para CD45, RFP y CD3e en Bazo y timo de ratones CCR2^{RFP/WT}

Discusión

Los resultados de este capítulo permitieron determinar la identidad de las células de origen mieloide que infiltran el parénquima cortical luego de la lesión. La gran mayoría de estas células expresan altos niveles del reportero CCR2-RFP. Las poblaciones de

células CD45⁺CCR2^{high} son monocitos inflamatorios (Yona et al., 2013). Esta descripción que los niveles de este receptor pueden disminuir cuando se produce la diferenciación de monocitos a macrófagos (Saederup et al., 2010) por lo que de producirse este fenómeno, no serían detectados.

El pequeño porcentaje de células CD45⁺ que no expresan RFP detectadas a 3 y 5 dpi podrían ser monocitos que disminuyeron la expresión de CCR2. Por la combinación de marcadores también podría tratarse de linfocitos (Saederup et al., 2010). Sin embargo, la presencia de linfocitos infiltrados es muy rara en la corteza cerebral en los tiempos estudiados para la respuesta aguda a la lesión de tipo *stab wound* (Stroncek JD, 2008). Además, mostrando consistencia con reportes previos (Saederup, Cardona et al. 2010) sobre los linfocitos en sangre periférica, el uso simultáneo de marcadores para células mieloides (CD45), CCR2-RFP y linfocitos CD3e en bazo y timo mostró que los linfocitos no expresaban niveles detectables de CCR2-RFP.

Conclusión

La mayoría de las células inmunes periféricas infiltradas en el parénquima de la sustancia gris lesionada a 3 y 5 dpi son monocitos inflamatorios.

Capítulo 9

Efectos de las señales derivadas de monocitos infiltrados sobre la proliferación astrocitaria

Para confirmar el efecto observado en ratones deficientes de CCR2 en otros modelos (Kurihara et al., 1997; Kuziel et al., 1997; Saederup et al., 2010; Shi and Pamer, 2011), donde la ausencia de este receptor de quimioquinas imposibilita la infiltración de monocitos en el parénquima lesionado, se realizó una cuantificación de los monocitos infiltrados en la corteza cerebral lesionada de ratones CCR2 KO ya que una disminución en la infiltración de células periféricas permitiría evaluar los efectos que tienen estas células o las señales derivadas de las mismas sobre la proliferación astrocitaria.

Resultados

La infiltración de monocitos en ratones CCR2^{RFP/RFP} está impedida severamente

La deficiencia de CCR2 en ratones homocigotas *knock in* para el locus de este receptor (CCR2^{RFP/RFP} o CCR2 KO) resulta en una disminución significativa de los monocitos infiltrados a 3 y 5 dpi (Figura 9.1, A-D). Algunas células RFP⁺ se detectaron en el parénquima lesionado de los ratones CCR2 KO, pero las mismas se encontraban principalmente del lado luminal de los vasos cerebrales (Figura 9.1, F,G). EL mismo resultado puede observarse si se cuantifica el número de células CD45⁺ a 5 dpi (Figura 9.2 A-D), donde además se puede observar que los ratones heterocigotas CCR2^{RFP/WT} no presentan diferencias significativas en el número de células CD45⁺ infiltradas respecto al control, pero si respecto a los homocigotas CCR2^{RFP/RFP} (Figura 9.2 D).

La disminución del número de monocitos infiltrados resulta en un aumento de la proliferación de la macroglia

A continuación, se examinó si la ausencia de monocitos infiltrados en ratones CCR2 KO afecta la proliferación de células gliales luego de la lesión. A 3dpi, el número de células Ki67⁺ fue igual en los genotipos KO y WT (Figura 9.2 E, G-H). Sin embargo, a 5dpi, se encontró una diferencia pronunciada entre KO y WT con un gran aumento del número de células Ki67⁺ en el sitio de lesión en ratones CCR2 KO en comparación con los controles WT (Figura 9.2 F, I-J). El número de astrocitos proliferativos también aumentó significativamente en ratones CCR2 KO (Figura 9.3A-C), lo que sugiere una intrigante regulación negativa entre astrocitos y monocitos infiltrados. Curiosamente, este no fue

el caso de todas las células gliales, ya que la proliferación de microglia no aumentó significativamente a 5dpi en los ratones CCR2 KO (Figura 9.2 E-G). Además, no se notaron diferencias en su estado de activación evaluado por su morfología (Figura 9.1 A, B). Por el contrario, las células NG2 resultaron afectadas en los ratones CCR2 KO la que su proliferación aumentó significativamente a 5dpi en comparación con los controles (Figura 9.3D, H-K).

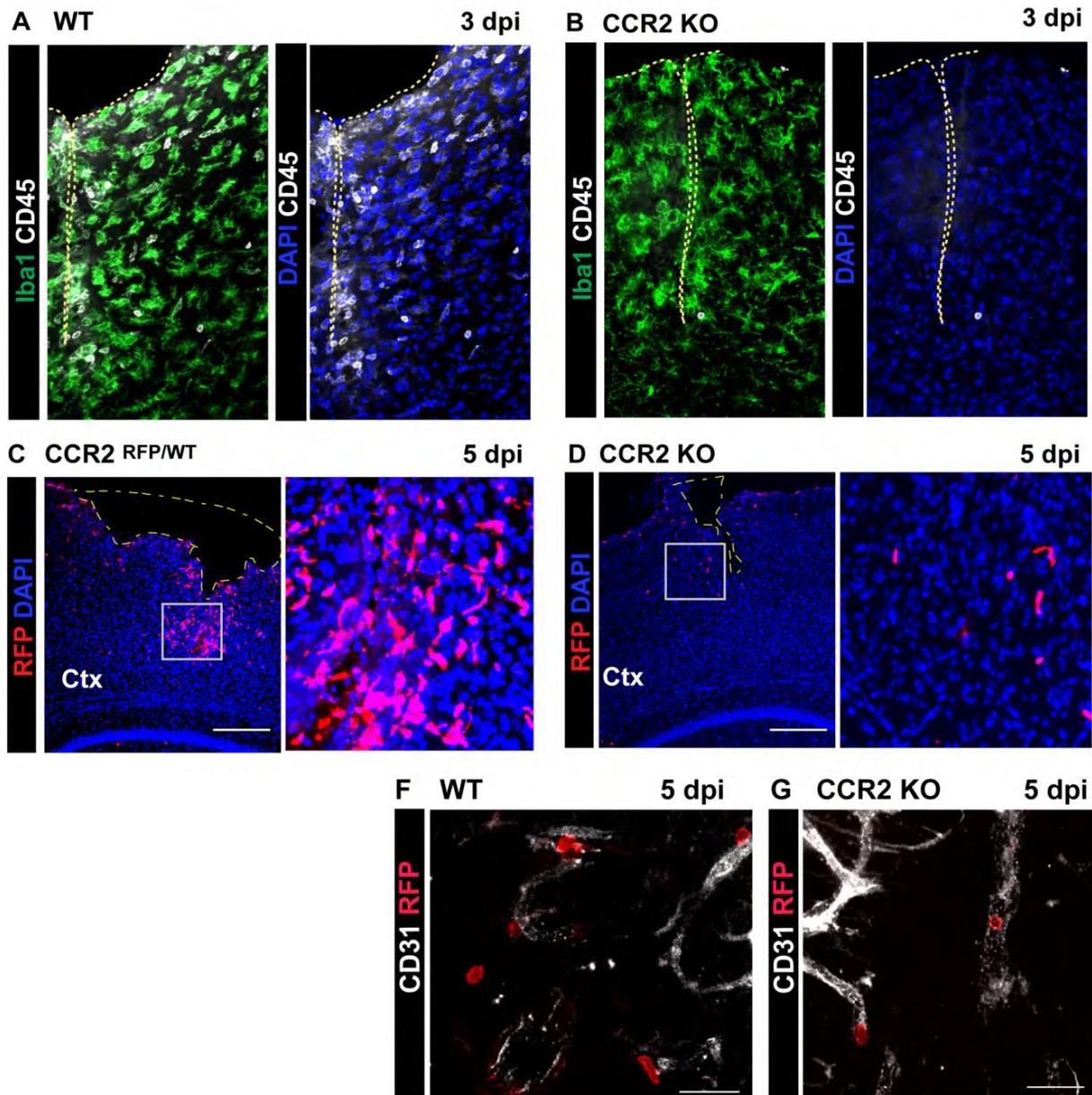


Figura 9.1.A-B) Imágenes de microscopía confocal de la inmunomarcación de CD45 e Iba 1 en ratones Wt (A) y CCR2 KO (B) a 3 dpi. **C-D)** Imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencia de RFP en ratones heterocigotas (C: CCR2^{RFP/WT}) y homocigota (D: CCR2 KO) para CCR2-RFP. **F-G)** Imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencia de RFP y CD31 en ratones heterocigotas (F) y homocigotas (G). Barras 250 µm en C-D, 25 µm en F, G.

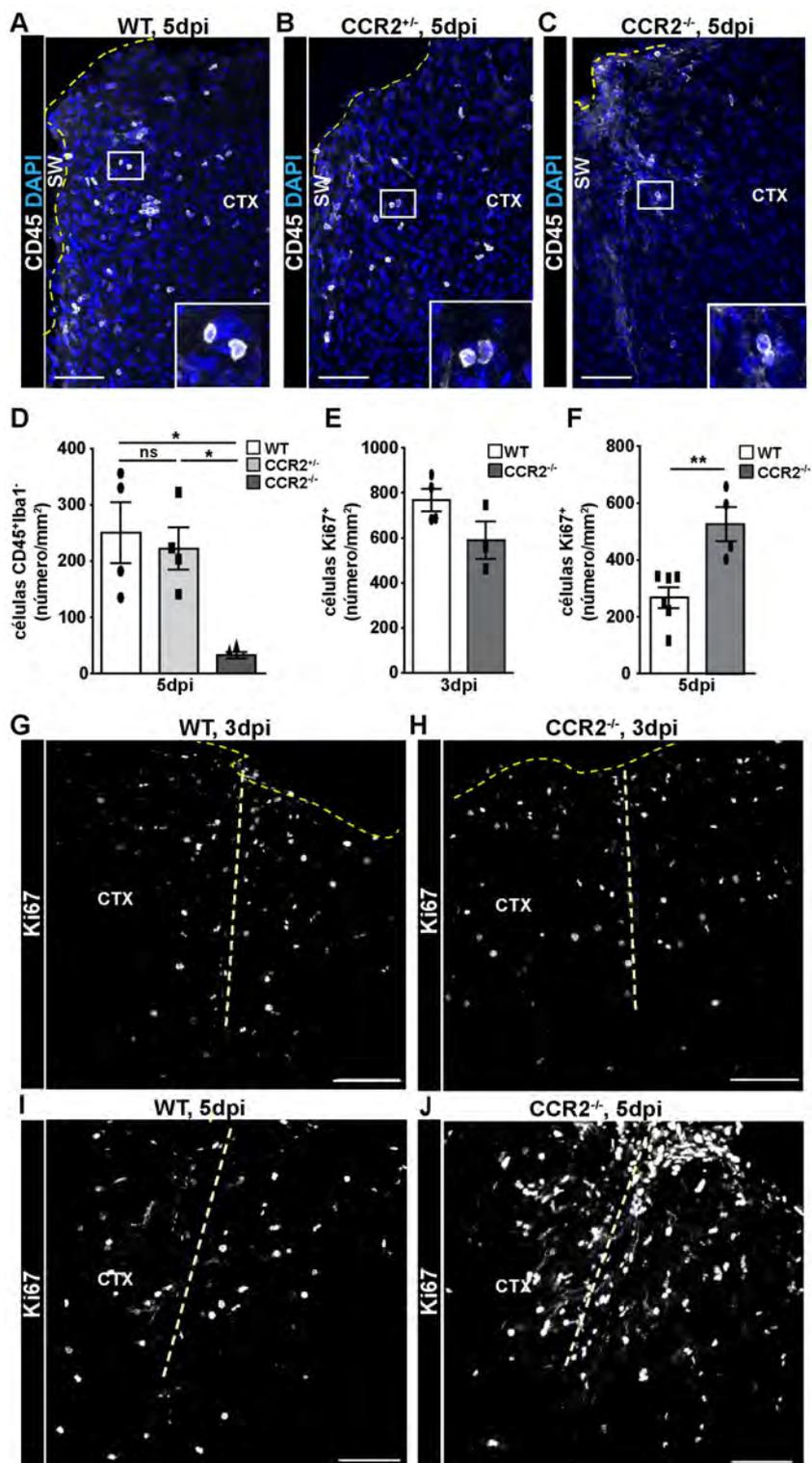


Figura 9.2: Imágenes de confocal de la inmunotinción de CD45 que muestran células CD45⁺ infiltradas en ratones WT (A), CCR2^{+/-} (B) heterocigotos y ratones CCR2 KO (C) homocigotos a 5 dpi. D, E, F) Resumen cuantitativo de los números de células CD45⁺ Iba1⁺, células Ki67⁺ en la sustancia gris (GM) cortical lesionada de ratones de los genotipos indicados a 3 dpi y 5 dpi (One way ANOVA, test de comparación múltiple de Tukey, * p < 0,05, ** p < 0,01, D: p = 0.006, n = 4; E: p = 0.229, n = 4 para WT y n = 3 para CCR2^{-/-}, y F, ** p = 0.0095, n = 6), respectivamente. La población de células proliferativas en la sustancia gris lesionado de ratones WT y CCR2 KO a 3 dpi (G, H) y 5 dpi (I, J)

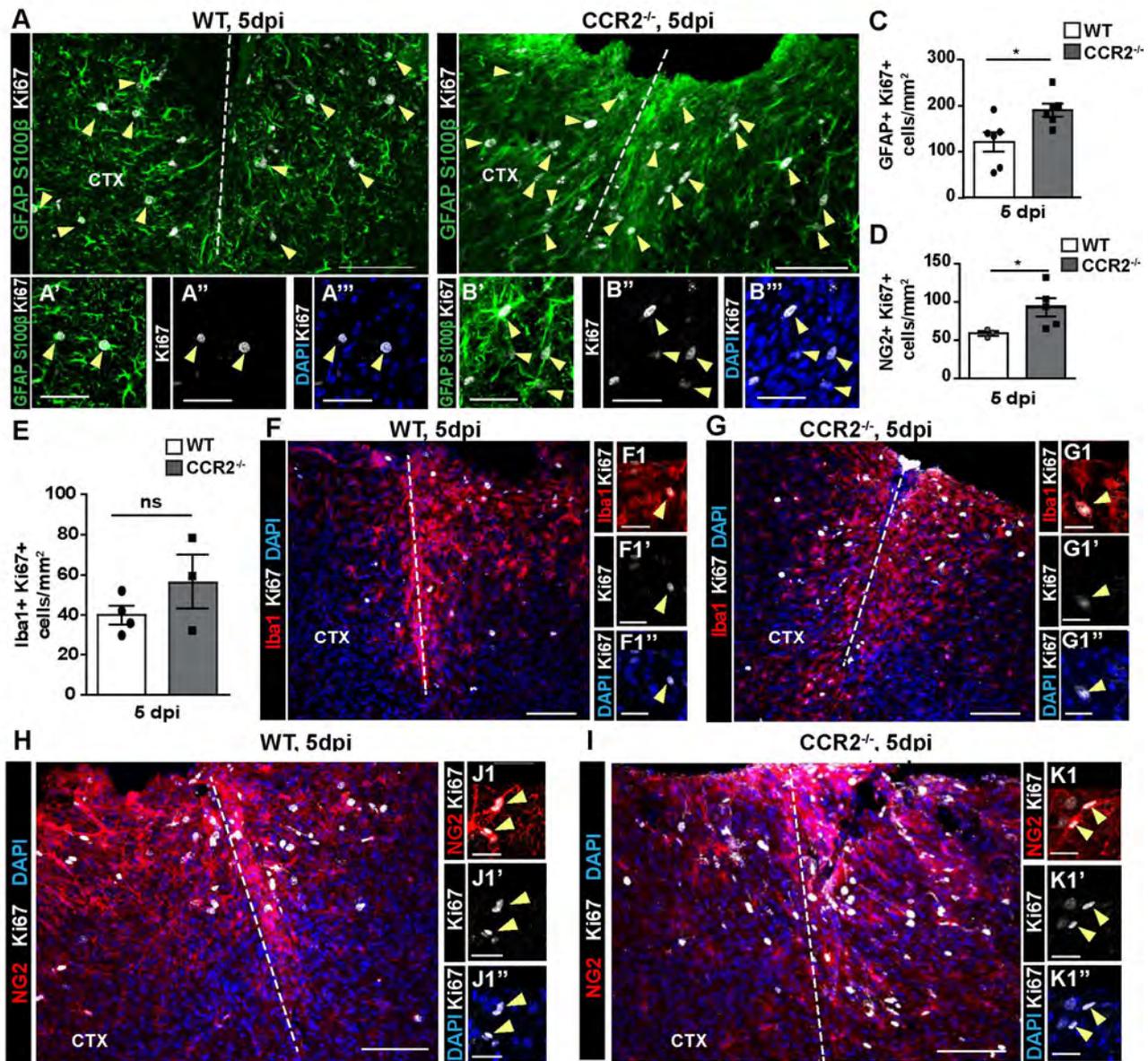


Figura 9.3. La reducción de la infiltración de células inmunes en la sustancia gris cortical de ratones CCR2 KO resulta en un aumento de la proliferación de la macroglia. Microfotografías de los astrocitos proliferativos (GFAP + S100β⁺ Ki67⁺, puntas de flecha amarillas) a 5 dpi en la sustancia gris de ratones WT (A) y CCR2^{-/-}(B). Microfotografías de mayor resolución de células GFAP⁺ S100β⁺ Ki67⁺ en la GM de ratones WT (A'-A''') y CCR2 KO (B'-B'''). C, D, E) Se muestran las cuantificaciones de las células proliferativas GFAP⁺ S100β⁺, NG2⁺ e Iba1⁺ a 5 dpi (test de Mann-Whitney, en A: *p = 0,016, n = 5; N: *p = 0.036, n = 3 para WT yn = 5 para CCR2 KO; en E: p = 0.400, n = 4 para WT yn = 3 para CCR2 KO ratones). F-G) Imágenes representativas de la microglia (Iba1⁺) y células NG2 en el sitio de la lesión en ratones WT y CCR2 KO a 5 dpi. Las microfografías en el panel inferior muestran las células con mayor resolución. Las puntas de flecha amarillas indican los ejemplos de células doblemente marcadas Iba1⁺ Ki67⁺ (F1-G1) y NG2⁺ Ki67⁺ (J1-K1). Todos los datos se representan como media ± SEM (error estándar de la media). La significancia estadística se indica como * p < 0.05, ** p < 0.01. Las líneas discontinuas indican el sitio de la lesión. Se realizó una contratinción de los núcleos celulares con DAPI. Escala: 100 μm (A-B, F,I), 25 μm (F', G', J1-K1).

Discusión

Estos resultados muestran que el inicio de la proliferación de los astrocitos no depende de la invasión de monocitos, ya que no se observaron diferencias significativas en la proliferación a 3 dpi, aunque prácticamente no se detectaron monocitos infiltrados.

La ausencia de reclutamiento de monocitos después de la lesión afecta principalmente la macroglia, resultando en un aumento de la proliferación de astrocitos y células progenitoras de oligodendrocitos, pero no a la microglía. En la discusión general de este trabajo se consideran estos resultados en el contexto general aportado por los experimentos posteriores.

Conclusiones

La proliferación de macroglia no depende de la invasión de monocitos. La ausencia de reclutamiento de monocitos después de la lesión resulta en un aumento de la proliferación de la macroglia pero no afecta a la microglía.

Capítulo 10

Efectos a largo plazo: la formación de la cicatriz glial

A continuación, se evaluaron las consecuencias a largo plazo (28 dpi) de las diferencias observadas en los experimentos descritos en el Capítulo anterior (disminución de la infiltración de monocitos y proliferación macroglial aumentada) en ratones CCR2 KO.

Se ha sugerido que la cicatriz glial deriva de la proliferación de astrocitos reactivos después de una lesión de la médula espinal (Faulkner et al., 2004; Herrmann et al., 2008; Wanner et al., 2013). En estos estudios se describe a la cicatriz glial como la zona de activación astrocitaria detectada por inmunomarcación de la proteína GFAP, por lo que se usó este parámetro para evaluar la misma. Además, se evaluaron marcadores asociados a la matriz extracelular como el Colágeno IV (Col IV) y condroitín sulfato proteoglicanos (CSPG).

Los resultados de estos experimentos condujeron al estudio de la cicatriz glial de ratones SMOM2, un modelo en el que previamente se había observado un aumento de la proliferación astrocitaria. Se evaluaron entonces los mismos parámetros en ratones SMOM2 a 28 dpi.

Resultados

Mejora en la cicatrización de la sustancia gris lesionada en ratones CCR2 KO

Se evaluaron los niveles de la proteína GFAP en la zona de la lesión a 4 semanas de haberse realizado la misma (28 dpi) en ratones control y CCR2 KO. Se observó que la inmunoreactividad para GFAP alrededor del sitio de la lesión en ratones CCR2 KO estaba notablemente reducida respecto a los controles WT (Figura 10.1). Sorprendentemente, en los ratones CCR2 KO se redujeron no solo el área de inmunoreactividad para la GFAP (Figura 10.1 A-D), sino también sus niveles (Figura 10.2 C) en comparación con los controles WT, demostrando claramente una reducción en la extensión de la cicatriz glial en la corteza cerebral de ratones CCR2 KO, a pesar del aumento de la proliferación de astrocitos a 5dpi.

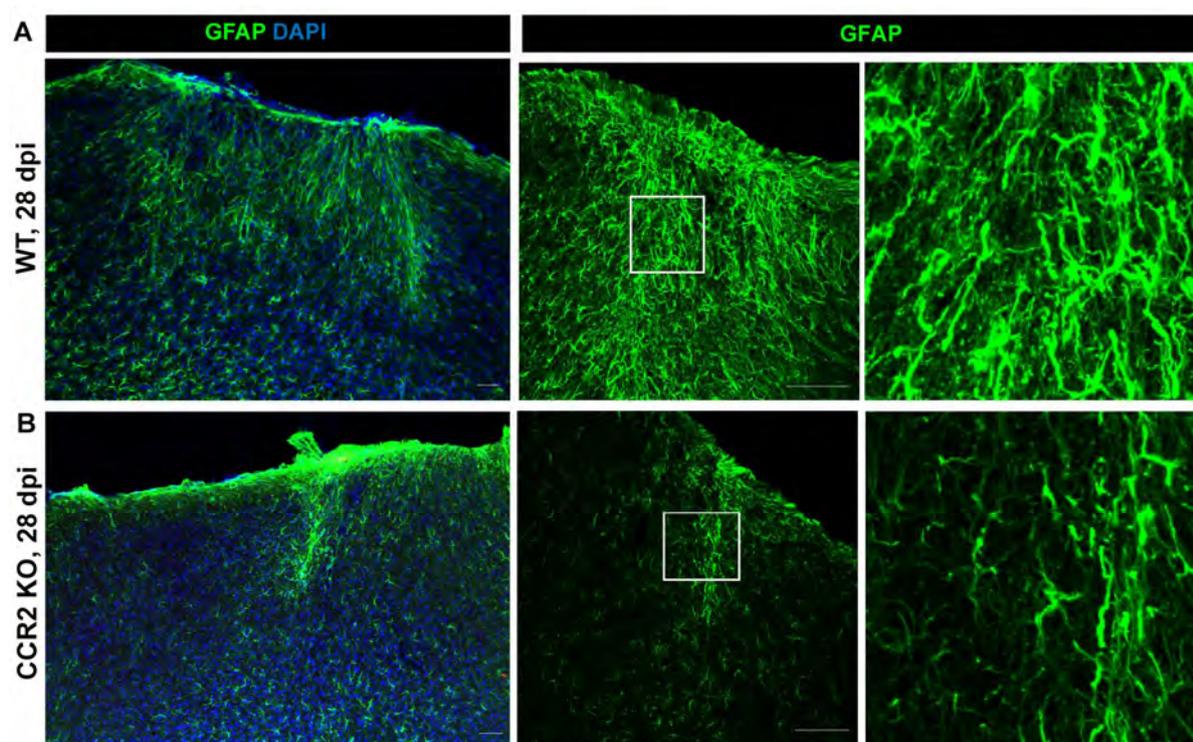


Figura 10.1. Imágenes representativas del área inmunorreactiva para la GFAP a 28 dpi en ratones WT (A) y CCR2 KO (B). Barras 100 μ m.

Para examinar otros parámetros de la cicatrización, se realizó una inmunomarcación de las neuronas utilizando el marcador NeuN y simultáneamente CD45 para detectar zonas ocupadas por macrófagos reactivos. En la sustancia gris de los ratones WT el sitio de la lesión todavía era visible a 28 dpi como una zona negativa para el marcador NeuN con numerosas células CD45⁺ (Figura 10.2A). Por el contrario, ni el área CD45⁺, ni la región NeuN-negativa fueron detectables en ningún lugar en los ratones CCR2 KO (Figura 10.1B). Por consiguiente, la comparación del área NeuN⁺ alrededor del sitio de la lesión en CCR2 KO mostró un aumento significativo en comparación con ratones WT (Figura 10.1D), sugiriendo una mejor cicatrización de la herida y mayor cobertura neuronal como consecuencia de la ausencia de la invasión de monocitos y una proliferación de astrocitos aumentada. Como los datos anteriores indicaron una mejor evolución de la lesión de la sustancia gris cortical, se examinaron los componentes de la matriz extracelular como indicadores alternativos de la formación de la cicatriz. En ratones WT, la inmunoreactividad para glicosaminoglicanos y CSPG fue muy baja en el lado contralateral a 28 dpi, como era esperado (Figura 10.3 H), pero bastante alta en la región de la cicatriz cerca de la superficie pial (Figura 10.3 B), mientras que se redujo marcadamente en la región de la lesión en ratones CCR2 KO (Figura 10.3 D). La inmunoreactividad para el colágeno IV fue particularmente elevada alrededor de los

vasos sanguíneos y en la zona del parénquima que rodea el sitio de lesión en ratones WT (Figura 10.4A), pero estuvo virtualmente ausente en la corteza cerebral de los CCR2 KO (Figura 10.4B).

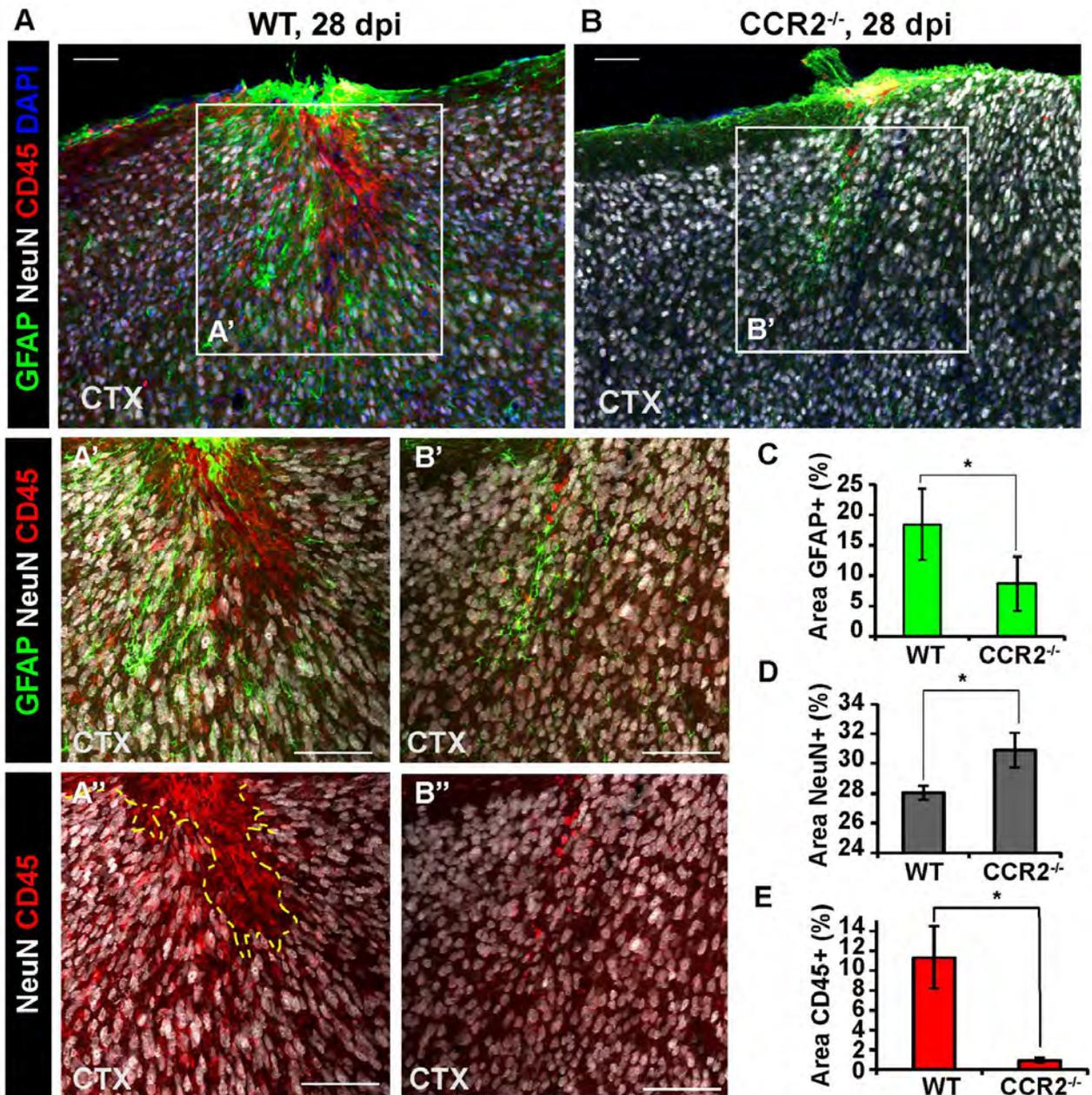


Figura 10.1. Inmunomarcación triple con NeuN, CD45 y GFAP en ratones WT (A) y CCR2 KO (B) que muestran las áreas de pérdida de marcación de NeuN en la sustancia gris lesionada a 28 dpi (línea punteada amarilla en A' y B') que están colonizadas por macrófagos CD45⁺. Porcentajes del área de inmunoreactividad para GFAP (C), NeuN (D) y CD45 (E). Las áreas se normalizaron al área adquirida para cada corte. Todos los datos se representan como media ± SEM por experimentos independientes (n = 3). La significancia de las diferencias entre las medias se analizó usando el t-Test no apareado y se indicó en función del valor de p (* p < 0,05, ** p < 0,01). Barras de escala: 100µm.

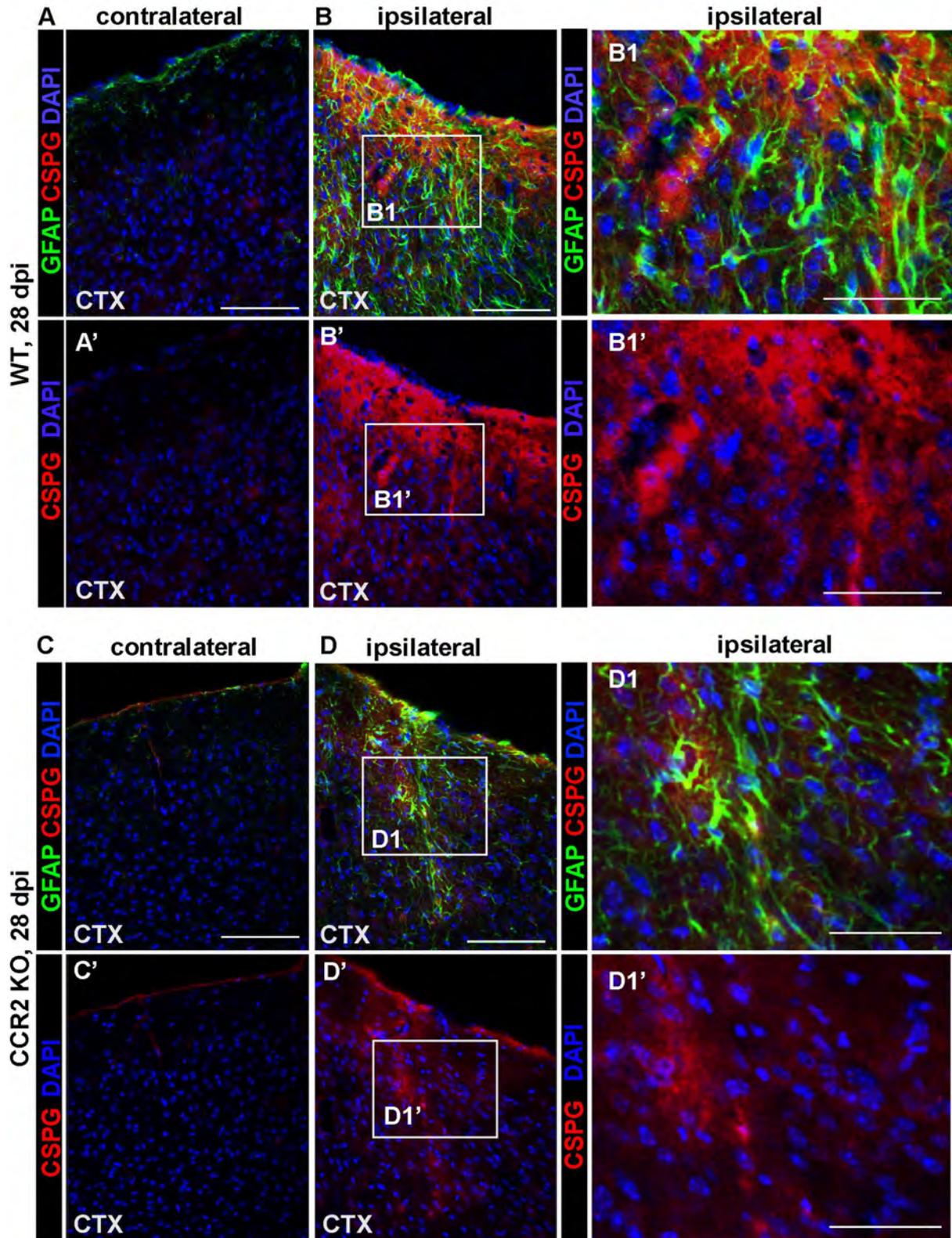


Figura 10.3. Las imágenes de microscopía confocal muestran el el parénquima no lesionado (contralateral) (A, C) y el parénquima de la sustancia gris lesionada (ipsilateral) a 28 dpi (B, D) que se caracteriza por la regulación positiva de la expresión de CSPG y la inmunorreactividad para GFAP en comparación con el parénquima no lesionado (contralateral). Es de destacar que los ratones WT (B', B1') muestran niveles aumentados de CSPG en comparación con los ratones CCR2 KO (D', D1'). Se realizó la contratinción nuclear con DAPI. Barras de escala: 100µm y 50 µm.

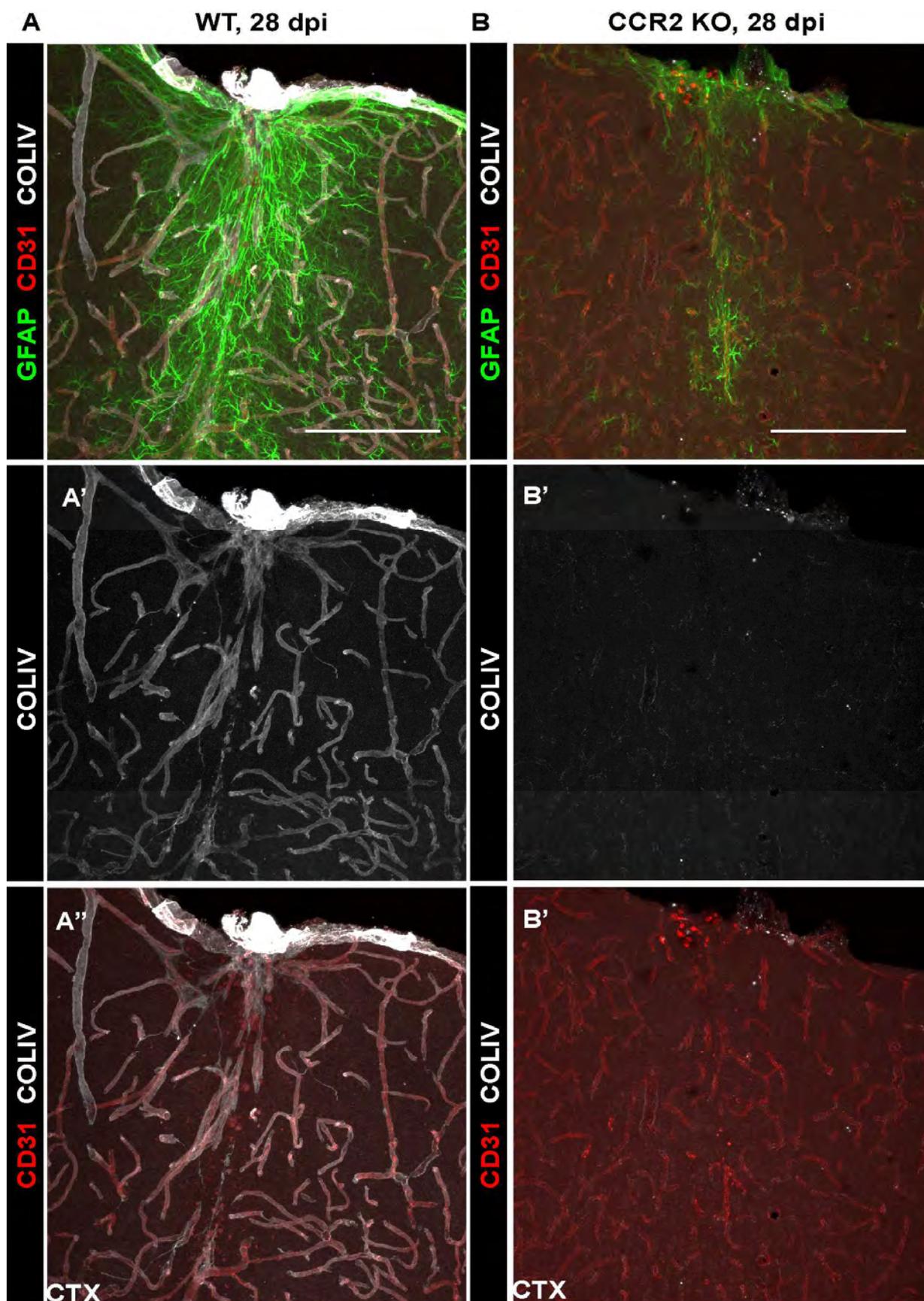


Figura 10.4 La tinción con colágeno IV de las secciones corticales revela una deposición aumentada de membrana basal en ratones WT que rodean la vasculatura en regiones de regulación positiva de GFAP (A-A'') que es casi nula en ratones CCR2 KO^{-/-} (B-B'') a 28 dpi. Barras de escala: 100µm.

Para confirmar que la ausencia de infiltración de células inmunitarias tiene un efecto neuroprotector, se definieron dos regiones de interés (ROI) y se cuantificó el número de neuronas marcadas con NeuN en las mismas. La primera ROI se definió en una zona del borde reactivo que no incluía el centro de la cicatriz de la lesión original (ROI 1, Figura 10.5 A-C) y la segunda incluyendo el centro donde se observa un área libre de neuronas (ROI2, Figura 10.5 A-C). Además, se cuantificó el número de neuronas en una región similar de la corteza contralateral para descartar diferencias genéticas entre las líneas de ratones WT y CCR2 KO (contralateral, Figura 10.5 A-C). Los resultados de la cuantificación muestran que el número de neuronas en las ROI de la zona de la lesión es mayor en los ratones CCR2 KO. Este resultado se observó en ambas ROI de la zona de la lesión estudiadas (Figura 10.5 D). Por el contrario, en la corteza del hemisferio contralateral no se detectaron diferencias significativas en el número de células en una ROI de igual área (Figura 10.5 D).

Este análisis sugiere un efecto neuroprotector en el caso de los ratones CCR2 KO en los cuales la lesión evoluciona en ausencia de monocitos infiltrados. Los resultados sugieren que la muerte neuronal es menor en estos ratones que en los controles que estuvieron afectados por factores secretados por monocitos o macrófagos derivados de monocitos periféricos. Además, es necesario considerar, que en los ratones CCR2 KO la proliferación de los astrocitos en tiempos tempranos (5 dpi) es mayor, por lo que el efecto neuroprotector puede deberse también a una restauración más temprana de la homeostasis tisular.

Efectos de un aumento de la proliferación astrocitaria sobre la formación de la cicatriz glial

Como la falta de reclutamiento de monocitos debido a la deficiencia de CCR2 condujo a una mayor proliferación de astrocitos y neuroglia NG2, se volvió a utilizar la línea de ratones GLASTCreERT2-SMOM2, en la cual la proliferación de astrocitos también está aumentada, para hacer un paralelismo entre los efectos observados en ambas. En esta línea también se había observado una disminución de la infiltración de monocitos en el tejido, aunque el efecto no fue tan importante como el debido a la falta de CCR2 (véase Capítulo 7, Figura 7.3 I-K). Se estudiaron entonces los mismos marcadores para la cicatriz glial en ratones SMOM2 a 28 dpi.

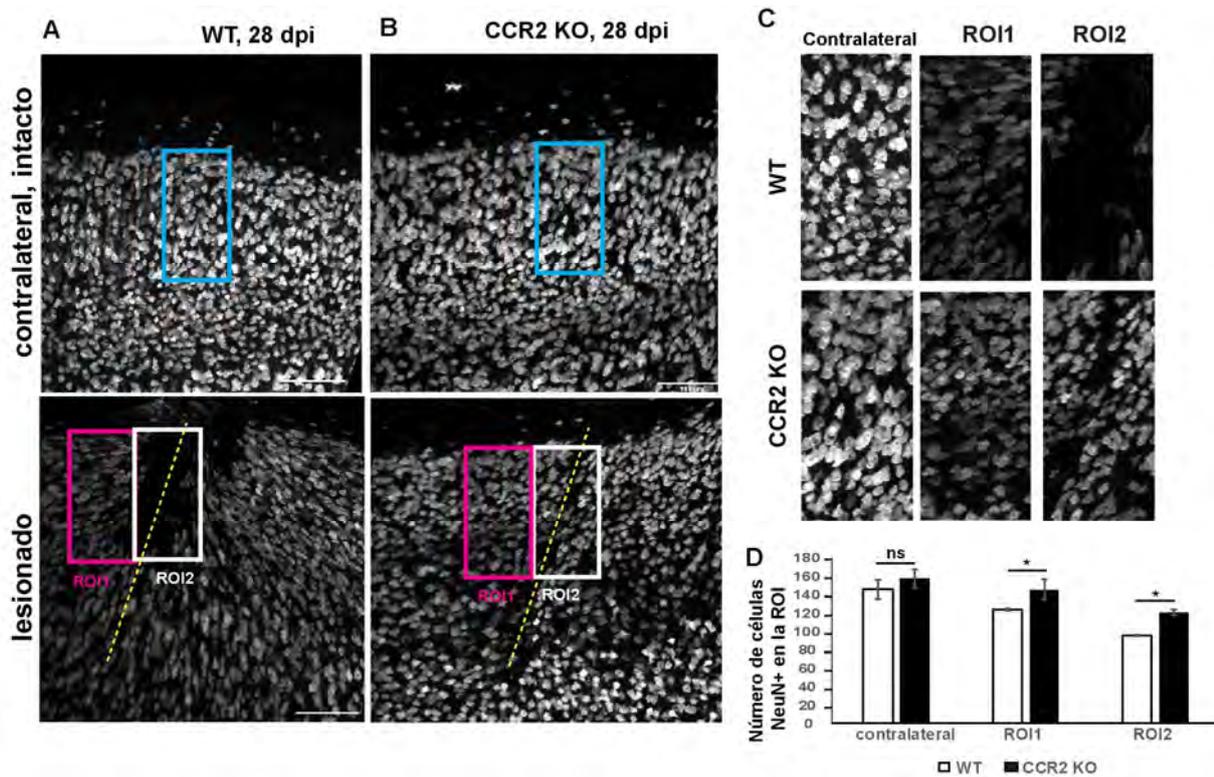


Figura 10.5: Imágenes de microscopía confocal de la corteza cerebral con inmunomarcación para NeuN en ratones WT (A) y CCR2 KO (B) a 28 dpi. En la parte superior se muestran las microfotografías correspondientes a la corteza cerebral del hemisferio contralateral a la lesión (intacto) donde se ha marcado la ROI seleccionada para la cuantificación. En la parte inferior se muestran las imágenes correspondientes a la zona de la cicatriz donde se encontraba originalmente la lesión. Las magnificaciones de las ROI seleccionadas se muestran en (C). El número de neuronas en cada ROI se muestra en (D). El gráfico de barras muestra la media \pm SEM de los valores obtenidos para los distintos animales (n=3) en cada ROI. La significancia estadística entre las medias se analizó utilizando el test T de Student, no apareado. * $p < 0,005$. Barras 100 μ m.

Curiosamente, la región NeuN⁺ también se incrementó a 28 dpi en ratones SmoM2 respecto a los controles WT (Figura 10.6 A, C). Sin embargo, aunque este aumento en el área de NeuN⁺ fue comparable al grado visto en los ratones CCR2 KO, no alcanzó significancia estadística debido a una mayor variación entre los ratones SMOM2 inducidos. Esto es probablemente por las diferencias en la subpoblación de astrocitos en las que se logró la recombinación. Si bien hubo una tendencia visible con respecto a un aumento en NeuN, la acumulación de células CD45⁺ en el núcleo de la lesión no cambió mucho (Figura 10.6 A, B, D) y los niveles de GFAP no se redujeron significativamente a 28 dpi en ratones SMOM2 respecto a los controles (Figura 10.6 E-G). Del mismo modo, no hubo diferencias obvias en la inmunomarcación para CSPG o Colágeno IV (observaciones no mostradas).

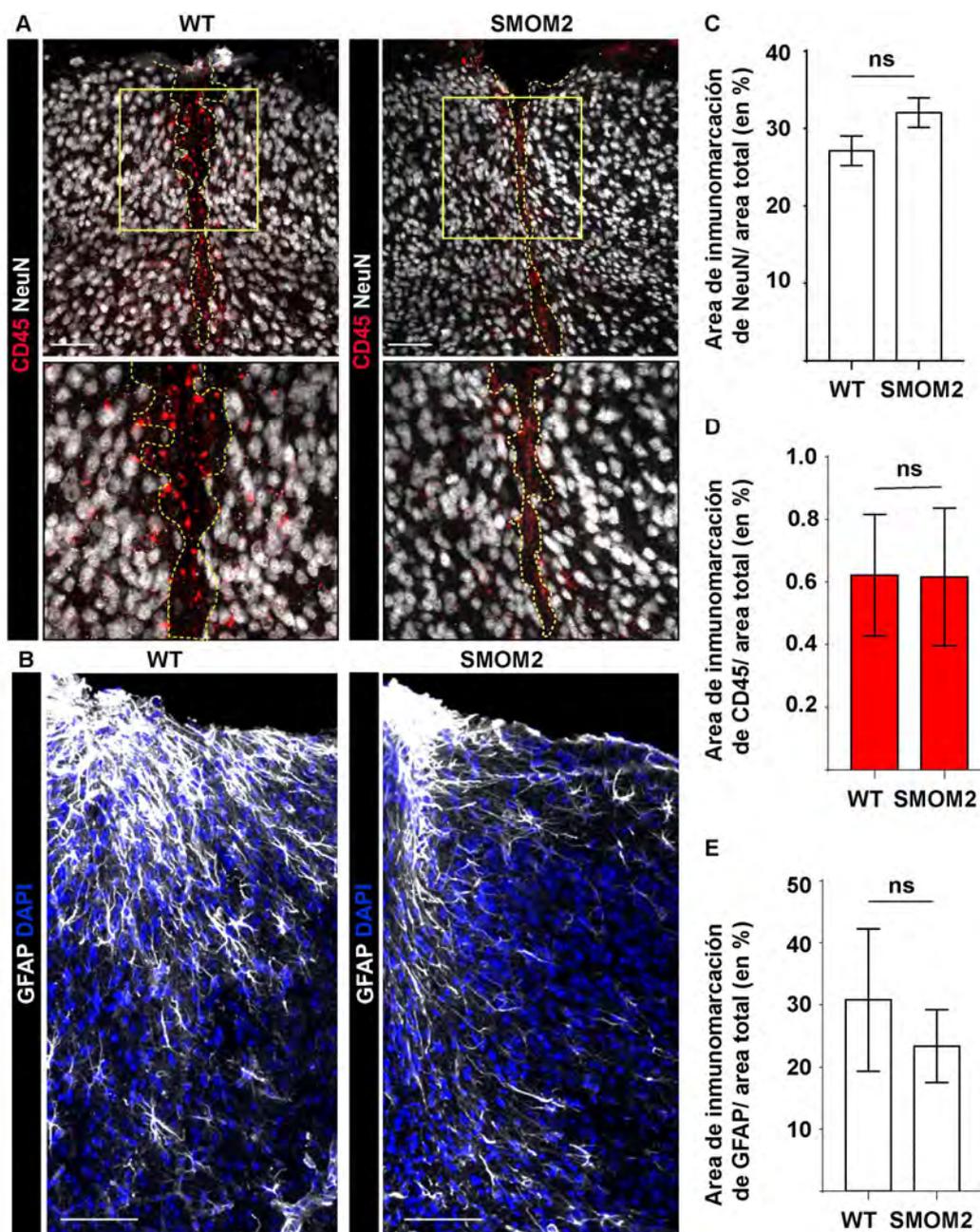


Figura 10.6. Efectos a largo plazo en el proceso de cicatrización de la sustancia gris lesionada luego de la modulación de la proliferación de astrocitos reactivos. (A-B) La doble inmunomarcación con NeuN y CD45 a 28 dpi muestra una reducción de la zona NeuN-negativa (línea punteada amarilla) en la sustancia gris lesionada de ratones SMOM2 (B, B') en comparación con ratones WT (A, A'). Los porcentajes del área con inmunorreactividad para NeuN (C) o CD45 (D) en el parénquima lesionado de las cepas WT y SMOM2 se calcularon para cada corte normalizando con el área adquirida. (E-F) Las imágenes representan el área inmunorreactiva para GFAP a 28 dpi en ratones WT (E) y ratones SMOM2 (F), y la cuantificación del área GFAP⁺ en la sustancia gris lesionada de ratones WT y SMOM2 (G). Todos los datos se representan como media±SEM para experimentos independientes (n = 4 WT y n = 3 SMOM2). La significancia de las diferencias entre las áreas promedio se analizó utilizando T-test no apareado, p = 0,134 para NeuN⁺, p = 0,627 para GFAP⁺ y p = 0,985 para CD45⁺. Se realizó una contratinción con DAPI para marcar núcleos celulares. Barras de escala: 100µm.

Discusión

En conjunto, todos los parámetros de cicatrización descritos anteriormente muestran una mejor recuperación y una cicatriz reducida en la corteza cerebral de los ratones CCR2 KO, lo que sugiere un efecto perjudicial de la infiltración de monocitos sobre estos procesos. Este efecto perjudicial no es consistente con el efecto observado en la cicatrización en otros modelos donde se han depletado macrófagos, en los cuales su ausencia resultó en una disminución de la remoción fagocítica de restos necróticos (Martin and Leibovich, 2005; Mohle et al., 1997). En este sentido, es importante destacar que en los ratones CCR2 se eliminan los macrófagos derivados de monocitos periféricos, pero continúa presente la microglía residente que tiene alta capacidad fagocítica. Además, los astrocitos reactivos también pueden contribuir a la actividad fagocítica (al-Ali and al-Hussain, 1996; Bechmann and Nitsch, 1997; Gomez et al., 2004).

Nótese que, en el punto de tiempo evaluado, la inmunoreactividad para CD45 en ratones WT representa el área de macrófagos reactivos (pueden ser tanto macrófagos derivados de monocitos como de la microglía). Si bien los niveles de CD45 son altos en el centro de la cicatriz, son inferiores a los que se observa a 5 dpi y la morfología no permite distinguir su origen. Además, algunas de estas células son positivas para el marcador Iba1 (Figura 10.7).

La mejora observada debido al aumento del área ocupada por neuronas en la corteza de ratones CCR2 puede deberse a la ausencia de acumulación de células CD45^{high} o a una recuperación más rápida de los números de astrocitos debido al aumento de la proliferación observado a 5 dpi, dada su relevancia funcional luego de la lesión (Robel and Sontheimer, 2016).

Los resultados obtenidos a 28 dpi en la línea de ratones GLASTCreERT2/SMOM2 muestran que un aumento en el número de astrocitos a tiempos tempranos ayuda a mejorar los déficits neuronales hasta cierto punto, pero la cicatriz glial de astrocitos reactivos monitoreada por GFAP solo se reduce en los ratones CCR2 KO.

El nivel de aumento en la proliferación de astrocitos en los ratones GlastCreERT2/SMOM2 no fue suficiente para lograr una mejora en la cicatrización como la observada en ratones CCR2 KO, lo que sugiere que la falta de factores normalmente liberados por monocitos invasores puede contribuir a la mejoría en la cicatrización observada en ratones CCR2 KO.

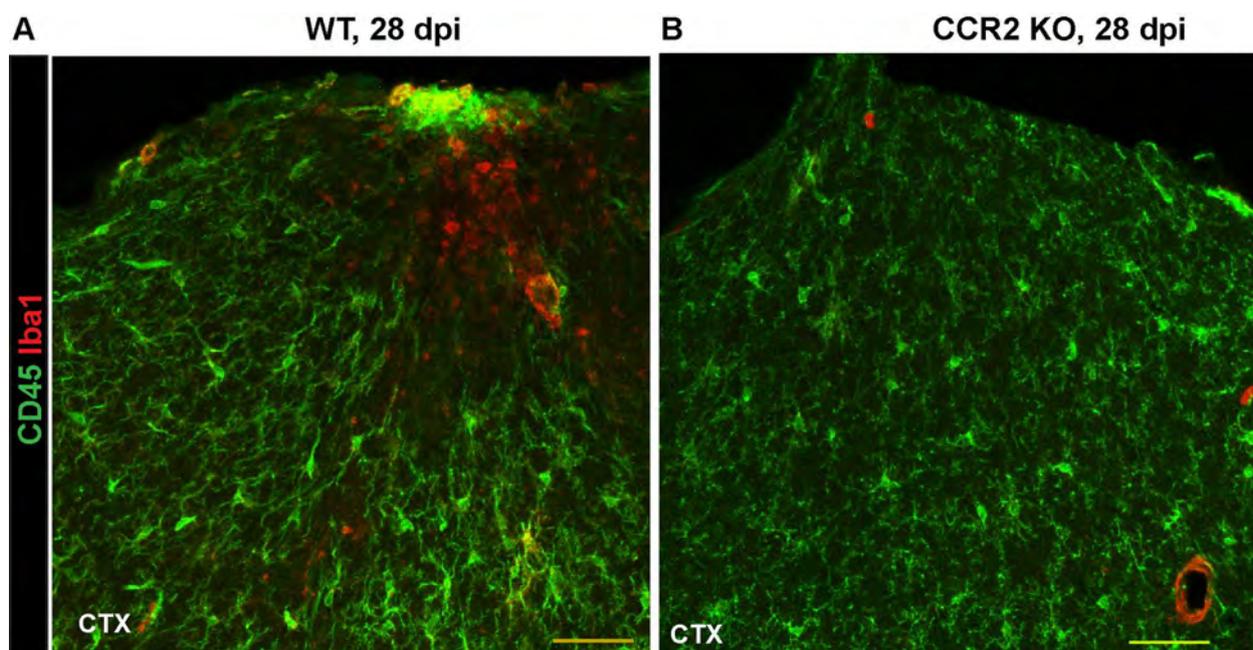


Figura 10.7: A) Microfotografías de inmunomarcación de Iba1 y CD45 a 28 dpi en ratones WT y CCR2 KO (B). Se observan algunas células doble positivas cerca de la superficie pial y en el borde de la zona central caracterizada por niveles más altos de CD45. Barras 100 μ m.

Conclusiones

Se evaluaron las consecuencias a largo plazo (28 dpi) de la ausencia de la invasión de monocitos en el parénquima cortical en ratones CCR2 KO, donde se había observado también una proliferación de astrocitos aumentada durante la respuesta aguda a la lesión.

Se observó una cicatriz glial más pequeña caracterizada por los niveles de GFAP, correlacionando con una mayor cobertura neuronal y menor reactividad de macrófagos. También se observó una menor deposición de proteínas de la matriz extracelular en la cicatriz en ratones CCR2 KO respecto al control.

En conjunto, los datos sugieren un efecto perjudicial de la infiltración de monocitos y un rol beneficioso de la proliferación de la macroglía.

Los resultados de los experimentos con ratones SMOM2 muestran que no solo se requiere un aumento de la proliferación astrocitaria para observar una mejora en la regeneración del tejido observada en ratones CCR2 KO, sino que es necesaria una dramática reducción del número de monocitos infiltrados en durante la respuesta inflamatoria temprana.

Capítulo 11

Proteómica de la lesión

Con el fin de comprender en su conjunto las diferencias entre ratones CCR2 KO y WT en la región de la lesión, utilizamos un enfoque proteómico. Se tomaron muestras de tejido de la corteza cerebral lesionada a 5 dpi de ambos genotipos y se analizaron todas las proteínas detectables en forma comparativa.

Resultados

Diferencias en la expresión de proteínas en la corteza cerebral lesionada entre ratones WT y CCR2 KO a 5 dpi

Luego de recolectar muestras de tejido a 5 dpi con un punzón de biopsia de 2,5 mm de diámetro y de descartar manualmente la sustancia blanca, se obtuvieron las muestras de sustancia gris cortical de la zona de la lesión o una muestra de iguales características del hemisferio contralateral para el análisis proteómico. En total, se detectaron y cuantificaron 4656 proteínas.

El análisis cuantitativo mostró, entre los datos más destacados, que GFAP estaba regulada positivamente en el hemisferio lesionado en un factor de 4 veces respecto a los valores en el hemisferio no lesionado. No se detectaron diferencias en los niveles de GFAP a 5 dpi entre ratones WT y CCR2 KO, lo que sugiere que la reducción del área GFAP⁺ observada a los 28 dpi no fue debida a una reducción inicial en la regulación positiva. Además, se observaron niveles más de 100 veces mayores de Tenascin-C en muestras de ratones WT en comparación con las de CCR2 KO. Este dato resulto llamativo dados los efectos adversos conocidos que Tenascin-C posee en el proceso de cicatrización (Fujimoto et al., 2016). Además, se observaron niveles muy reducidos de Stat1, un factor de transcripción clave en la regulación de la reacción a la lesión y la neurodegeneración (Ly et al., 2016) en muestras de ratones WT en comparación con las de ratones CCR2 KO. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas debido a la variación entre las 6 muestras utilizadas para cada genotipo. Para una evaluación más estricta se eliminaron los valores atípicos y solo se incluyeron diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n = 4$) en el análisis. Esto reveló 311 proteínas significativamente diferentes en su abundancia normalizada entre las biopsias de ratones WT y CCR2 KO a 5 dpi (Figura 11.1). Entre estas, hay proteínas individuales de interés incluyendo Prominina1, una proteína marcadora de células madre, o GSK3a, un componente de

señalización central, que aumentó más de 2 veces en el sitio de lesión de los ratones CCR2 KO (Figura 11.1 puntos azules). Para comprender mejor la interacción entre las proteínas reguladas diferencialmente, se realizó el análisis STRING. Curiosamente, muchas de las proteínas significativamente reguladas están conectadas por interacción o formación de complejos (Figura 11.2), centrándose alrededor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y GSK3a.

Para obtener una visión más completa de las vías significativamente enriquecidas en el proteoma, se enfocó el análisis en las proteínas que fueron al menos 2 veces más abundantes en ratones WT o CCR2 KO, respectivamente (Figura 11.1, (puntos azules y rojos) y Tablas 11.2 y 11.3).

Análisis funcional

Las proteínas listadas en la tabla 11.2 fueron luego utilizadas para identificar términos de enriquecimiento de genes (GO) entre proteínas reguladas. Los términos GO más relevantes para este análisis se encuentran listados en las Figura 11.3 y 11.4.

Algunos de los términos GO enriquecidos en las muestras de ratones CCR2 KO (Figura 11.4) están asociados con la proliferación celular y el proceso biosintético de los nucleótidos de pirimidina y su metabolismo. Otros términos GO importantes destacan las vías de señalización que pueden ser responsables del aumento de la proliferación, como Wnt, ácido retinoico, PDGF, insulina/IGF e interleuquina-3.

Entre los términos GO significativamente enriquecidos en WT en comparación con CCR2 KO (Figura 11 5) hay una serie que se relaciona con la respuesta inmune. Una proteína central aquí es la proteína NEDD4 que interactúa con la familia 1 (Ndfip1) que regula negativamente la inmunidad mediada por leucocitos y la respuesta inmune tipo 2. También se ha descrito que Ndfip1 se expresa en neuronas sobrevivientes después de lesiones por traumatismo cerebral (Sang et al., 2006) y participa en la regulación de la proliferación celular (Howitt et al., 2015).

Sin embargo, más relevantes para los efectos posteriores sobre la formación de la cicatriz son varios términos GO significativamente más altos en WT relacionados con la síntesis de glicosaminoglicanos y procesos metabólicos. Esto indica que los procesos de formación de la cicatriz que involucran deposición de la matriz extracelular ya están regulados diferencialmente entre WT y CCR2 KO en esta etapa temprana, concretamente en el punto máximo de la actividad glial. De hecho, la glicosiltransferasa B3gat2 es 8 veces mayor en ratones WT en comparación con CCR2 KO.

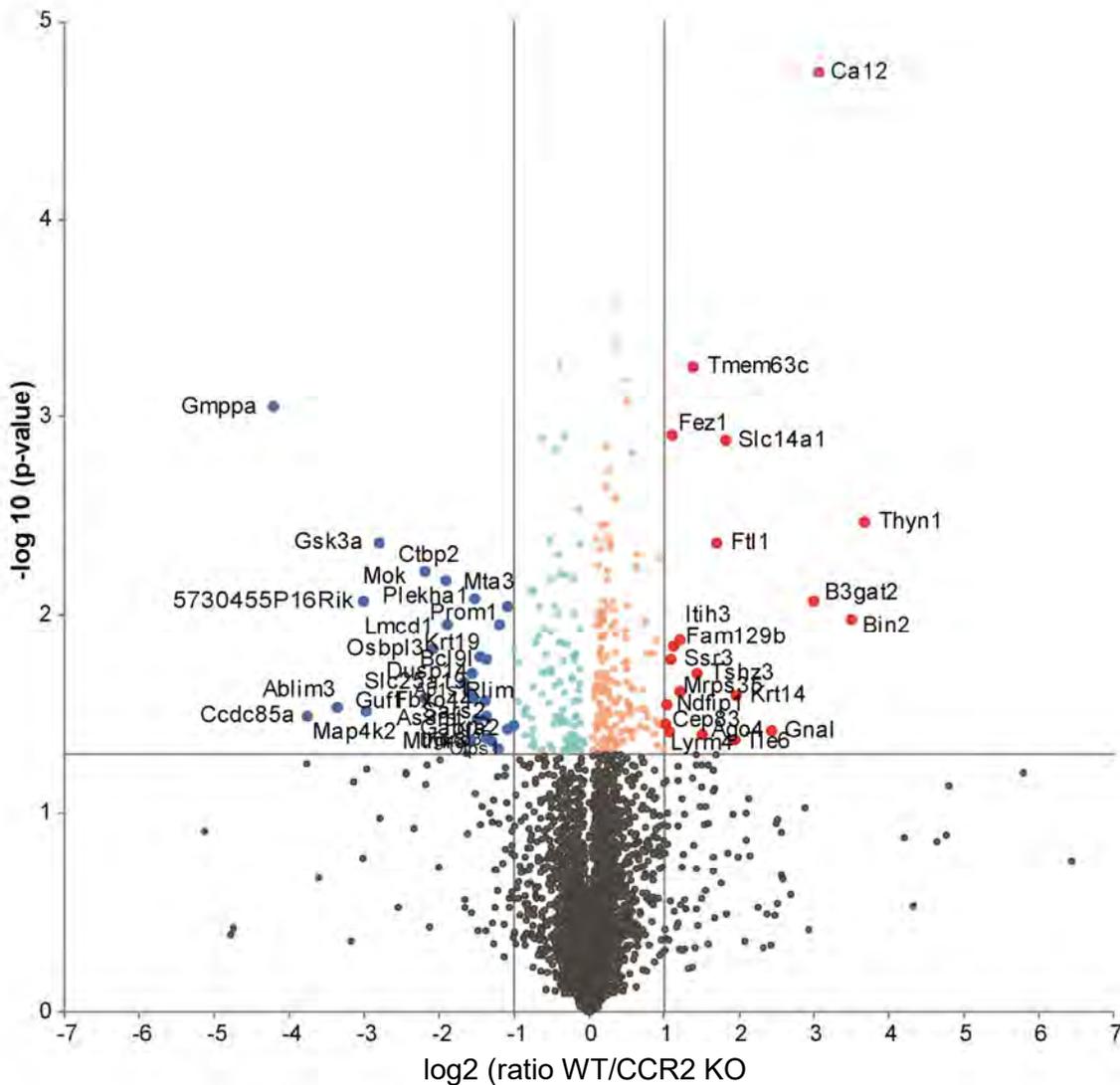


Figura 11.1. Análisis proteómico del sitio de la lesión a 5dpi en ratones WT y CCR2 KO. **(A)** Gráfico de volcán que muestra los datos de la proteómica del parénquima de la sustancia gris lesionada de ratones WT y CCR2 KO a 5 dpi. Las proteínas que fueron significativamente más abundantes en ratones WT ($-\log_{10}$ del valor de p, eje y) y que mostraron un cambio de más de 2 veces se observan como puntos rojos; con puntos de color rosado se indican proteínas significativas con cambios de pliegues por debajo de 2 veces. Las proteínas que fueron significativamente más abundantes en ratones CCR2 KO ($-\log_{10}$ del valor de p, eje y) y mostraron un cambio de más de 2 veces se muestran como puntos azules. Los puntos celestes indican proteínas con diferencias inferiores a 2 veces. Las proteínas que no mostraban diferencias significativas se muestran como puntos grises por debajo de la línea gris horizontal en $p = 0.05$.

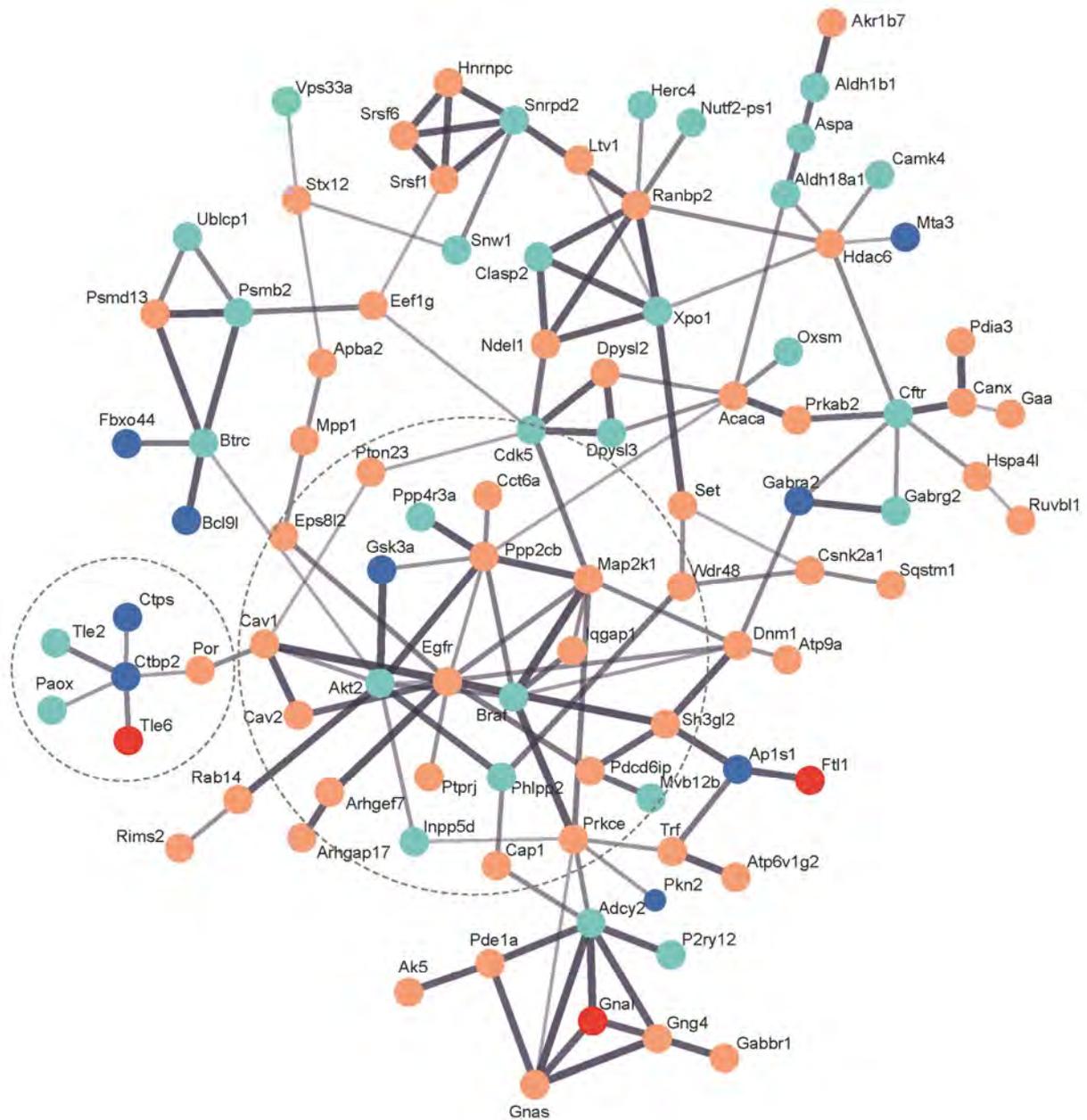


Figura 11.2 Esquema de la red de proteínas resultante del análisis de STRING de las proteínas significativamente diferentes. Las proteínas se muestran como puntos con los colores que se describen en (A) y se conectan en función de la confianza, con un grosor de línea que indica la fortaleza del soporte de los datos. Dos sub-redes prominentes están indicadas por círculos.

Tabla 11.2. Principales proteínas cuya expresión esta aumentada en ratones WT comparados con CCR2 KO

Código UniProt	Símbolo del gen	Ratio WT/KO	Valor p	Nombre completo (en inglés)
Q91YJ3	Thyn1	12.7	0.003	<i>Thymocyte nuclear protein 1</i>
D3Z6Q9	Bin2	11.2	0.010	<i>Bridging integrator 2</i>
Q8CI85	Ca12	8.3	0.000	<i>Carbonic anhydrase 12</i>
P59270	B3gat2	7.9	0.008	<i>Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 2</i>
Q8CGK7	Gnal	5.4	0.038	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha</i>
Q61781	Krt14	3.9	0.025	<i>Keratin, type I cytoskeletal 14</i>
Q9WVB3	Tle6	3.8	0.042	<i>Transducin-like enhancer protein 6</i>
Q8VHL0	Slc14a1	3.5	0.001	<i>Urea transporter 1</i>
P29391	Ftl1	3.2	0.004	<i>Ferritin light chain 1</i>
Q8CJF8	Ago4	2.8	0.039	<i>Protein argonaute-4</i>
Q8CGV9	Tshz3	2.7	0.020	<i>Teashirt homolog 3</i>
Q8CBX0	Tmem63c	2.6	0.001	<i>Calcium permeable stress-gated cation channel 1</i>
Q8BJZ4	Mrps35	2.3	0.024	<i>28S ribosomal protein S35, mitochondrial</i>
Q61704	Itih3	2.3	0.013	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</i>
Q8R1F1	Fam129b	2.2	0.014	<i>Niban-like protein 1 OS=Mus musculus</i>
Q8K0X8	Fez1	2.1	0.001	<i>Fasciculation and elongation protein</i>
Q9DCF9	Ssr3	2.1	0.017	<i>Translocon-associated protein subunit gamma</i>
Q8K215	Lym4	2.1	0.038	<i>LYR motif-containing protein 4</i>
Q8R0W6	Ndfip1	2.1	0.028	<i>NEDD4 family-interacting protein 1</i>
Q9D5R3	Cep83	2.0	0.035	<i>Centrosomal protein of 83 kDa</i>

Tabla 11.3: Proteínas con expresión disminuida en ratones WT respecto a CCR2 KO

Código UniProt	Símbolo del gen	Ratio WT/KO	Valor p	Nombre completo (en inglés)
Q922H4	Gmppa	0.1	0.001	<i>Mannose-1-phosphate guanyltransferase alpha</i>
Q5SP85	Ccdc85a	0.1	0.032	<i>Coiled-coil domain-containing protein 85A</i>
Q69ZX8	Ablim3	0.1	0.029	<i>Actin-binding LIM protein 3</i>
Q9CYI0	Njmu-R1	0.1	0.008	<i>Protein Njmu-R1</i>
Q61161	Map4k2	0.1	0.030	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2</i>
Q2NL51	Gsk3a	0.1	0.004	<i>Glycogen synthase kinase-3 alpha</i>
P56546	Ctbp2	0.2	0.006	<i>C-terminal-binding protein 2</i>
Q8C3X4	Guf1	0.2	0.026	<i>Translation factor Guf1, mitochondrial</i>
Q9DBS9	Osbpl3	0.2	0.015	<i>Oxysterol-binding protein-related protein 3</i>
Q9WVS4	Mok	0.3	0.007	<i>MAPK/MAK/MRK overlapping kinase</i>
Q8VEE1	Lmcd1	0.3	0.011	<i>LIM and cysteine-rich domains protein 1</i>
Q9DAM5	Slc25a19	0.3	0.022	<i>Mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier</i>
P61967	Ap1s1	0.3	0.024	<i>AP-1 complex subunit sigma-1A</i>
Q6P5E8	Dgkq	0.3	0.042	<i>Diacylglycerol kinase theta</i>
Q9JLY7	Dusp14	0.3	0.020	<i>Dual specificity protein phosphatase 14</i>
Q8BK26	Fbxo44	0.3	0.026	<i>F-box only protein 44</i>
Q8BUL6	Plekha1	0.3	0.008	<i>Pleckstrin homology domain-containing family A member 1</i>
Q91WU5	As3mt	0.4	0.033	<i>Arsenite methyltransferase</i>
Q67FY2	Bcl9l	0.4	0.016	<i>B-cell CLL/lymphoma 9-like protein</i>
Q9WTV7	Rlim	0.4	0.027	<i>E3 ubiquitin-protein ligase RLIM</i>
Q9JJL8	Sars2	0.4	0.032	<i>Serine--tRNA ligase, mitochondrial</i>
P19001;	Krt19	0.4	0.017	<i>Keratin, type I cytoskeletal 19</i>

P05784

Código UNIPROT	Nombre abreviado	Valor p	Nombre completo (en inglés)
Q9Z0V1	Kcnd3	0.4	0.042 <i>Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3</i>
Q8K296	Mtmr3	0.4	0.043 <i>Myotubularin-related protein 3</i>
P70698	Ctps1	0.4	0.047 <i>CTP synthase 1</i>
O54990	Prom1	0.4	0.011 <i>Prominin-1</i>
Q924K8	Mta3	0.5	0.009 <i>Metastasis-associated protein MTA3</i>
P26048	Gabra2	0.5	0.037 <i>Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-2</i>
Q8BWW9	Pkn2	0.5	0.036 <i>Serine/threonine-protein kinase N2</i>

Regulados positivamente en CCR2 KO

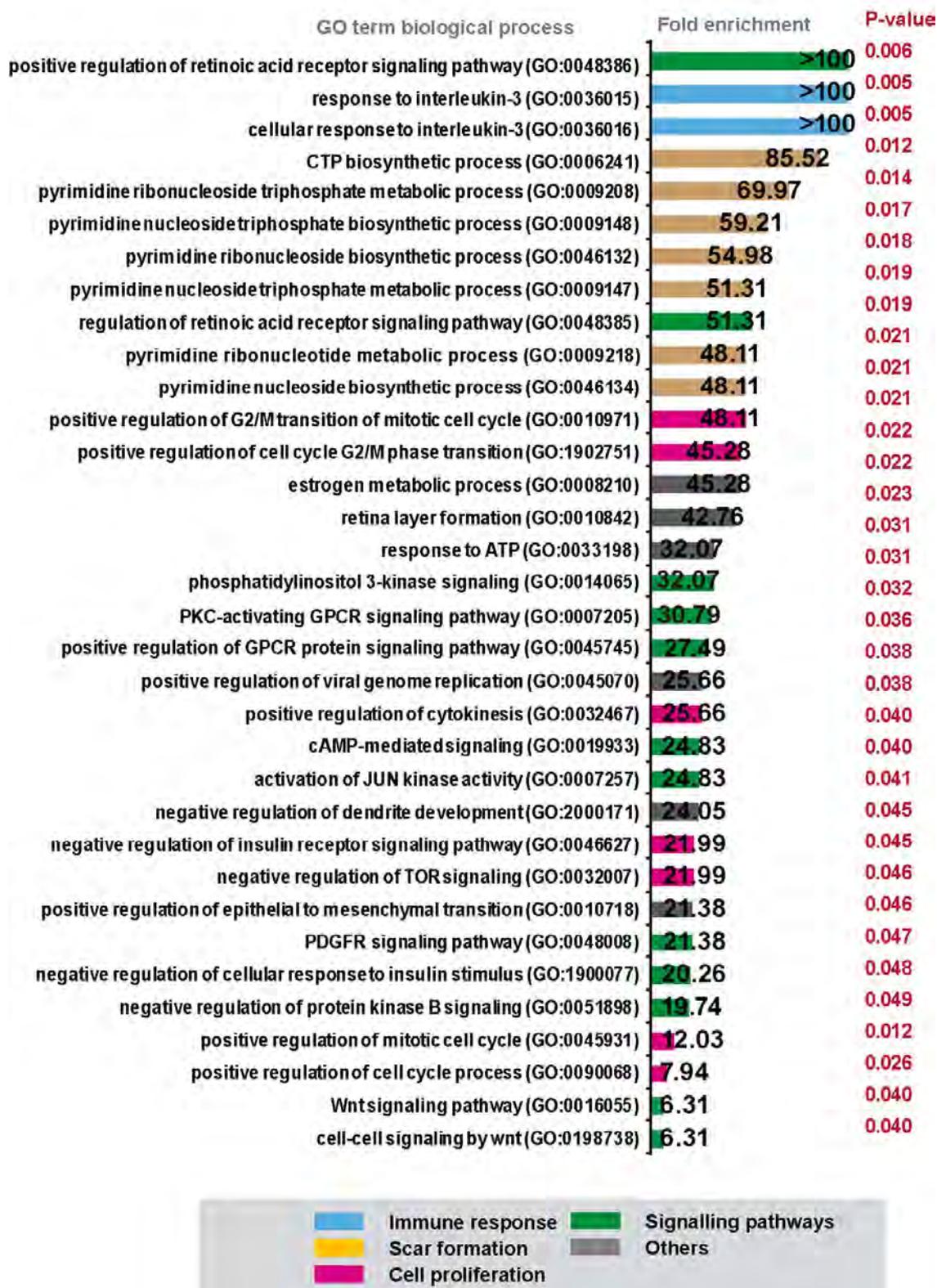


Figura 11.3. Listado de los términos GO correspondientes a procesos biológicos seleccionados arbitrariamente de acuerdo a su relevancia para este análisis que se encontraban disminuidos en ratones WT comparados con ratones CCR2 KO. Los términos se encuentran ordenados de acuerdo al factor de enriquecimiento que arrojó el análisis.

Regulados positivamente en WT

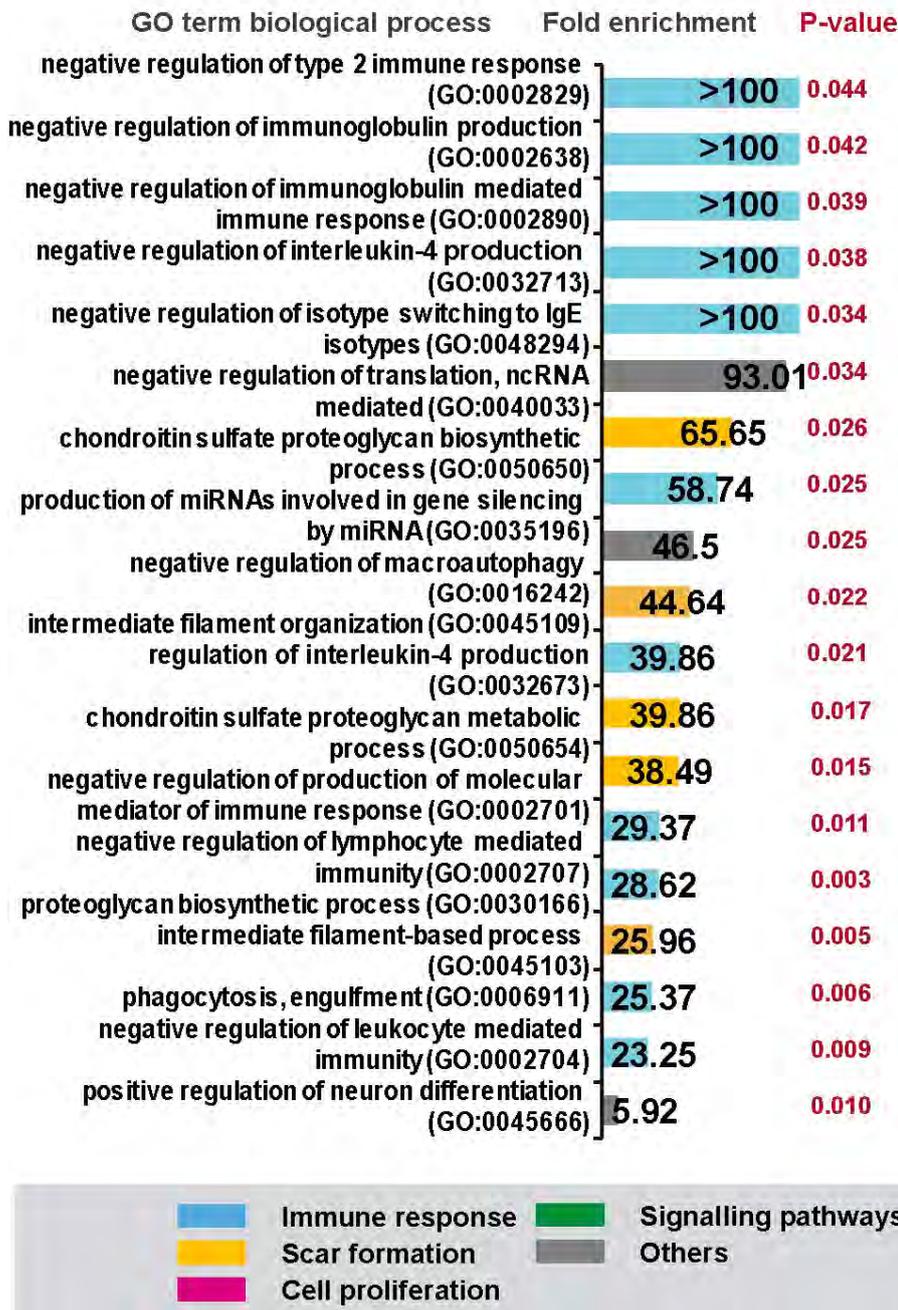


Figura 11.4. Listado de los términos GO correspondientes a procesos biológicos seleccionados arbitrariamente de acuerdo a su relevancia para este análisis que se encontraban aumentados en ratones WT comparados con ratones CCR2 KO. Los términos se encuentran ordenados de acuerdo al factor de enriquecimiento que arrojó el análisis.

Discusión

Los resultados del análisis proteómico sugieren mecanismos que aumentan la proliferación glial en ausencia de invasión de monocitos. Se demostró que están involucradas diversas vías de señalización de factores de crecimiento y mecanismos tempranos que disminuyen la deposición de matriz extracelular además de regular la formación de la cicatriz durante el momento de máxima proliferación de células gliales. Futuros experimentos enfocados en las vías de señalización que surgen de las interacciones de las proteínas identificadas en este análisis permitirán esclarecer los mecanismos que vinculan la proliferación aumentada de astrocitos y células NG2 con los efectos observados en la mejora de la formación de la cicatriz glial.

Conclusiones

Los resultados de este capítulo mostraron las diferencias en los niveles de expresión de proteínas de la sustancia gris de corteza cerebral lesionada de ratones CCR2 KO y WT. Se identificaron las proteínas cuya expresión estaba significativamente aumentada en los ratones CCR2 KO comparada con los WT. Estas proteínas están asociadas a los procesos biológicos de proliferación celular, síntesis de nucleótidos y vías de factores de crecimiento, entre otros.

Las proteínas cuya expresión estaba aumentada en ratones WT también fueron identificadas y se destacan de su análisis un enriquecimiento en las funciones de síntesis de proteoglicanos y proteínas con un rol en la respuesta inmune.

El análisis del proteoma de ratones CCR2 KO y WT confirma los efectos observados por inmunofluorescencia del tejido de la corteza cerebral donde el aumento de la proliferación de células gliales se asocia a una disminución de la formación de la cicatriz glial.

Discusión general

La proliferación de astrocitos reactivos regula el número de monocitos invasores

Aquí se muestra que la proliferación de astrocitos yuxtavasculares no solo ocurre en forma generalizada en diferentes condiciones de lesión cerebral, sino que existe regulación cruzada entre su proliferación y la invasión de monocitos. Mediante el uso de diferentes modelos de ratones adultos con astrocitos modificados genéticamente en forma inducible, se encontró que la proliferación reducida de astrocitos resulta en un aumento significativo del número de células $CD45^+Iba1^-$ en el sitio de la lesión, mientras que la proliferación aumentada de astrocitos se acompañaba de una reducción de las células $CD45^+Iba1^-$. Dada la ausencia virtual de células $CD45^+Iba1^-$ en los ratones CCR2 KO, puede concluirse que casi todas las células $CD45^+Iba1^-$ son monocitos inflamatorios invasores dependientes del receptor CCR2, es decir, $Ly6C^{high}CCR2^+CXCR1^{low}$ (Katsumoto et al., 2014). De hecho, no se detectaron células T o B después de la lesión de tipo *stab wound* (datos no mostrados) consistente con lo que se ha observado previamente para este tipo de lesiones (McKee and Lukens, 2016). Cabe destacar que los astrocitos proliferativos podrían regular a los monocitos CCR2⁺ reduciendo su invasión, proliferación, diferenciación o supervivencia en el parénquima cerebral, sin embargo, no se detectó proliferación de células $CD45^+/Iba1^-$ en el sitio de la lesión en los tiempos estudiados. Es todavía controversial la posibilidad de diferenciación de estas células a macrófagos tisulares (microglia) en el SNC (Ransohoff, 2016), pero ahora resulta claro que la proliferación de astrocitos puede afectar su supervivencia o reclutamiento.

Dada la posición yuxtavascular de la mayoría de los astrocitos proliferativos (alrededor de 70%), es posible especular que interfieren con el reclutamiento de monocitos en el cerebro en esta interfaz. De hecho, a veces se observó acumulación de células $CD45^+$ en los vasos en condiciones de mayor proliferación de astrocitos, consistente con una infiltración disminuida. Para identificar tales señales es interesante tener en cuenta el análisis del transcriptoma de astrocitos reactivos $GFAP^+$ después de una lesión cortical penetrante (Sirko et al., 2015), que revela que algunas proteínas secretadas (por ejemplo, las relacionadas a la señalización por $TGF\beta$) estarían implicadas en la regulación de la invasión de monocitos (Gauger et al., 2011). Además, en diversas condiciones los astrocitos reactivos modifican la expresión de numerosos genes implicados en la regulación de las células inmunes (Jaquenod De Giusti et al., 2011;

Kamphuis et al., 2015; Sirko et al., 2015; Zamanian et al., 2012), sugiriendo un rol clave en esta interacción.

Los monocitos infiltrados regulan la proliferación de la macroglia y la formación de la cicatriz glial

Es importante destacar que la ausencia de monocitos infiltrados dio como resultado una cicatriz notablemente disminuida considerando todos los parámetros analizados a 4 semanas después de la lesión. Por lo tanto, en ausencia de monocitos invasores CCR2⁺ no solo se mejora significativamente el cierre de la herida, sino que también están presentes más neuronas en el sitio de la lesión y tanto la astrogliosis, como la deposición de componentes de la matriz extracelular, (colágeno, TN-C y glicosaminoglicanos) se encuentran significativamente reducidos.

Los resultados expuestos en este trabajo concuerdan con el concepto de que la proliferación de astrocitos reactivos cumple una función beneficiosa reportada en estudios de la respuesta astrocitaria frente a una lesión de la médula espinal (Anderson et al., 2016; Faulkner et al., 2004; Herrmann et al., 2008; Wanner et al., 2013), ya que el aumento de la proliferación de astrocitos se correlacionó con una reducción del tamaño de las lesiones y una mejor cicatrización, especialmente en los ratones CCR2 KO.

Finalmente, la falta de correlación entre la proliferación de astrocitos y su mayor número con la persistencia de GFAP en el sitio de la lesión sugiere que la señalización puede ser más crucial que el número de células. De hecho, nuestro análisis del proteoma reveló una multitud de vías de factores de crecimiento aumentadas en el sitio de la lesión de ratones CCR2 KO que pueden estar implicados en la mejora en la cicatrización en este modelo.

El análisis de los ratones CCR2 KO sugiere que las células CCR2⁺ invasoras juegan un papel directo o indirecto en la inhibición de la proliferación de astrocitos y en la modulación de la cicatrización luego de la lesión penetrante. Este efecto es independiente de los diferentes fenotipos de macrófagos, ya sean M1 proinflamatorios o M2 antiinflamatorios. Los resultados sugieren que su ausencia es beneficiosa en esta condición de lesión de la corteza cerebral. Los monocitos CCR2⁺ cambian su fenotipo dependiendo del microambiente cerebral (Katsumoto et al., 2014; Ransohoff, 2016; Wattananit et al., 2016). Aunque se ha sugerido que su función antiinflamatoria es importante para mejorar supervivencia y función neuronal (Wattananit et al., 2016) nuestros resultados muestran que la ausencia total de monocitos invasores resulta en una cicatriz reducida en la corteza cerebral. Puede ser que haya una diferencia entre

los modelos de lesión traumática e isquémica, ya que en otro tipo de lesión cerebral traumática leve realizado en ratones CCR2 KO también se observó un tamaño de lesión más pequeño (Gyoneva et al., 2015), aunque la cantidad de proteína tau fosforilada aumentaba considerablemente en ausencia de monocitos invasores. Además, los monocitos CCR2⁺ se han identificado como los principales productores de especies reactivas de oxígeno neurotóxicas después de una lesión cerebral traumática (Morganti et al., 2015). Un papel similar se atribuyó a los monocitos CCR2⁺ en lesiones de la médula espinal (Donnelly et al., 2011).

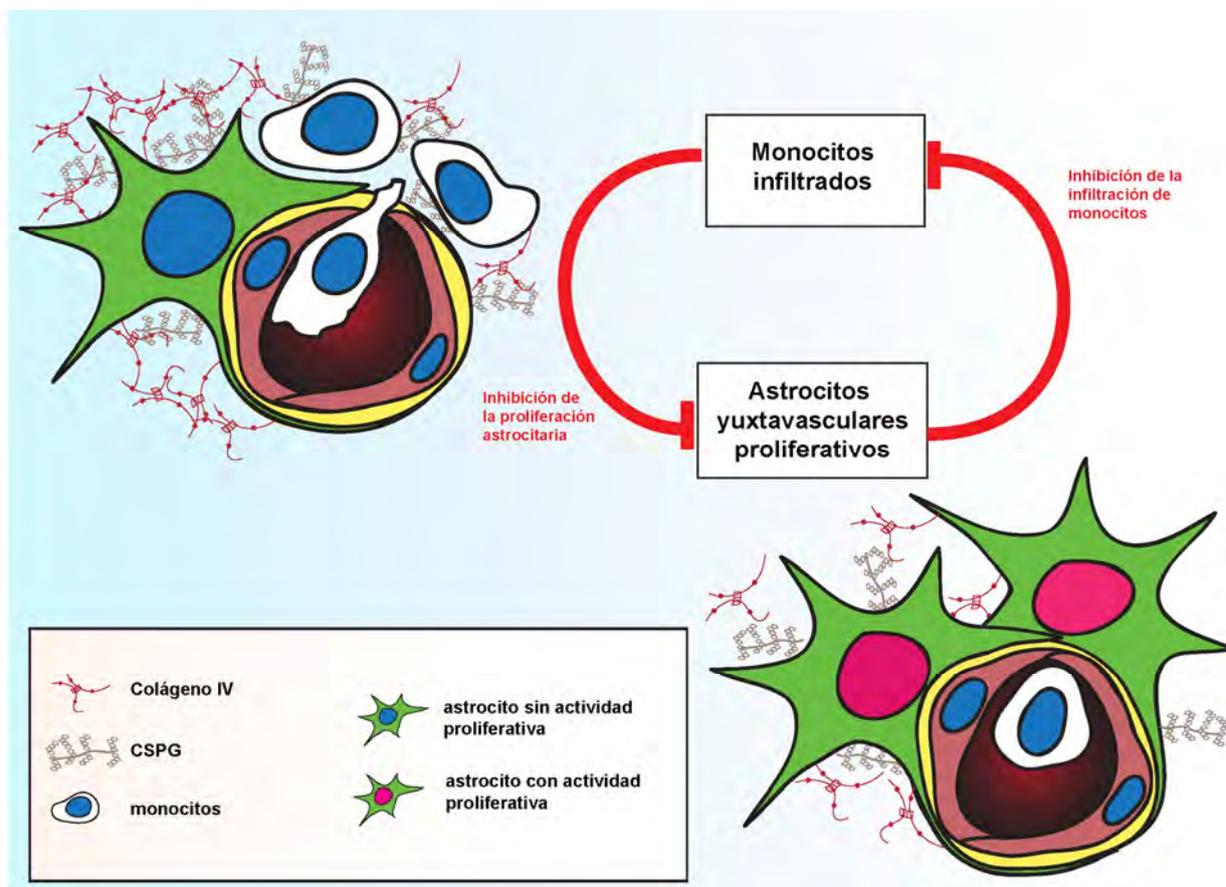
En el futuro, sería importante, además de desentrañar los eventos de señalización subyacentes a la infiltración de monocitos que resulten en efectos adversos, determinar en qué medida contribuye el aumento de la proliferación de la macroglia en los resultados de los distintos estudios previos donde se bloqueó la infiltración mediada por CCR2, ya que esta contribución no se tuvo en cuenta.

En este trabajo se mostró que la ausencia de macrófagos derivados de monocitos CCR2⁺ da como resultado un aumento profundo en la proliferación de astrocitos y de la glía NG2. Cabe preguntar, en qué medida los efectos beneficiosos sobre la formación de cicatrices se deben a la mayor proliferación de astrocitos y de la glía NG2 frente a la ausencia de las células CCR2⁺. El uso de varios modelos de ratón permite obtener una idea inicial sobre la separación de los efectos de la proliferación de astrocitos (aumentada en ratones *Glast-Cre^{ERT2}SMOM2*) de los múltiples efectos provocados en los ratones CCR2 KO. El análisis de la cicatriz después de la lesión cortical penetrante en los ratones *Glast-Cre^{ERT2}SMOM2* reveló un efecto mucho más leve que en los ratones CCR2 KO, y se restringió principalmente a un aumento de la cobertura neuronal en el sitio de la lesión. Esto sugiere que la proliferación de astrocitos y la restauración del número de astrocitos es particularmente importante para la supervivencia neuronal, pero tiene efectos menos directos sobre la cicatrización. De hecho, los astrocitos reactivos influyen en la homeostasis de iones y neurotransmisores, lo que afecta directamente la función neuronal y su supervivencia en el sitio de la lesión (Robel and Sontheimer, 2016).

El análisis del proteoma de la corteza de ratones CCR2 KO reveló numerosas vías de señalización que mostraron estar diferencialmente reguladas en el sitio de la lesión, incluyendo EGF, Wnt, PDGF, RA, e IL3. Muchas de estas vías regulan la proliferación de astrocitos o de la glía NG2, así como la activación de microglia y demuestran la multitud de cambios de señalización que ocurren en ausencia de infiltración de monocitos. Además, estos datos muestran efectos iniciales sobre la deposición de la

matriz extracelular, que ya está profundamente regulada negativamente a 5 dpi en ausencia de monocitos. Estos hallazgos demuestran que algunos de los aspectos clave del proceso de cicatrización ya están determinados en forma temprana.

En el esquema al pie, se resumen los conceptos principales que surgen de los resultados de este trabajo de investigación.



El esquema muestra un astrocito yuxtavascular que se encuentra junto a un vaso en el que se produce la extravasación de monocitos. Las señales, factores de crecimiento o interacciones celulares asociados al ingreso de estos monocitos poseen efectos inhibitorios sobre la proliferación astrocitaria. Ya que su ausencia resulta en un incremento de la proliferación de astrocitos. La proliferación astrocitaria, tienen un efecto inhibitorio sobre la infiltración de monocitos. La infiltración de monocitos resulta en una modulación positiva de la expresión de proteínas asociadas a la deposición de matriz extracelular consistente con una reducción de la cicatriz glial cuando se impide la invasión de estas células periféricas.

Perspectivas de la línea de investigación

Microscopía intravital de dos fotones

Hasta hace alrededor de dos décadas, el estudio de células y tejidos mediante fluorescencia solo era posible *post mortem* mediante la fijación del material a analizar, con la inevitable formación de artefactos. En la actualidad, el desarrollo de la microscopía multifotónica ha brindado la posibilidad de visualizar las células en el organismo prácticamente intacto mediante procedimientos mínimamente invasivos (Coles et al., 2017; Rubart, 2004). Esto se logra mediante la adquisición de imágenes de tejido de ratones vivos que han sido modificados genéticamente para expresar proteínas fluorescentes en el tipo celular de interés. La excitación de la muestra se logra utilizando un láser infrarrojo que emite pulsos de fotones. Los pulsos se emiten con una tasa de repetición muy alta (femtosegundos). De este modo es posible excitar los fluorocromos en un evento cuántico en el que dos fotones, cada uno con la mitad de la energía requerida para la excitación de un electrón, inciden simultáneamente. Al producirse el retorno al estado basal se produce la emisión de fluorescencia que es posible detectar. La gran ventaja de esta técnica es que al usar menor energía para la excitación (es decir, mayor longitud de onda que la que sería necesaria al excitar con un único fotón), el daño por fototoxicidad es mínimo, convirtiéndola en un sistema idóneo para el estudio de especímenes vivos. Además, la utilización de longitudes de onda más largas permite una mayor penetración en los tejidos, posibilitando la obtención de imágenes de células ubicadas a hasta 1 mm de profundidad. Por la naturaleza focal del evento de excitación, no se produce dispersión de la fluorescencia disminuyendo la emisión de fluorescencia inespecífica comparada con la que se observaría en la microscopía confocal normal (Rubart, 2004)

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, en experimentos previos de esta línea de investigación (Bardehle, Kruger et al, 2013) se utilizó la microscopía intravital para el estudio de la reacción astrocitaria luego de la lesión del tipo *stab wound*. Una de las líneas de ratones utilizadas entonces fue la línea GLAST-Cre^{ERT2}xCAG-eGFP, utilizada también en este trabajo para dirigir la recombinasa Cre específicamente a astrocitos en los experimentos de delección de genes destinados a lograr mutantes con proliferación astrocitaria deficiente o aumentada (Capítulos 5-7).

Es importante destacar que en esta línea de ratones se produce la recombinación en una subpoblación de astrocitos, de alrededor del 30%. Esto es útil cuando se desea visualizar células individuales.

Otra línea que se ha usado con anterioridad para la marcación fluorescente de astrocitos corticales es la línea Aldh11-GFP, donde GFP es expresada bajo el promotor de una aldehído-deshidrogenasa (aldolasa) que en el estadio del ratón adulto es un marcador específico de astrocitos (Cahoy et al., 2008). Con esta línea es posible visualizar todos los astrocitos corticales.

Los resultados de este trabajo mostraron la relevancia de la regulación cruzada entre astrocitos y monocitos. La visualización de las interacciones in vivo entre ambos tipos celulares es posible mediante el cruzamiento de algunas de las líneas reporteras de astrocitos mencionadas previamente con la línea CCR2-RFP, utilizada en los experimentos de impedimento de infiltración de monocitos, pero en su forma heterocigota. De este modo se obtienen ratones que expresan GFP en astrocitos y RFP en monocitos, posibilitando la visualización de ambas poblaciones celulares mediante la implantación de una ventana craneal.

Si bien el seguimiento de estas poblaciones por microscopia intravital esta fuera de los objetivos de esta tesis a causa del tiempo requerido para la realización exitosa de los experimentos, se inició una puesta a punto de la técnica para sentar las bases para futuras investigaciones.

Para esto se generaron por cruzamiento las líneas GLAST-Cre^{ERT2}xeGFP x CCR2-RFP y Aldh11-GFP x CCR2-RFP.

Para estudiar la respuesta de los tipos celulares a la lesión de la corteza cerebral, se realizó a cirugía descrita para la aplicación de la lesión de tipo *stab wound* seguida de la implantación de una ventana craneal de 5 mm de diámetro perfectamente sellada, que posibilita la adquisición de imágenes de manera repetida. Debido a que el procedimiento de adquisición de imágenes se realiza con el ratón anestesiado, la frecuencia máxima de adquisición de imágenes de una misma lesión es cada 2 días. La mayoría de estos experimentos iniciales se realizaron con la línea Aldh11-GFP x CCR2-RFP, debido a que no requiere inducción con tamoxifeno, reduciendo el tiempo total requerido para el experimento. Las primeras imágenes obtenidas el día de la cirugía (0 dpi), muestran que, si bien es posible visualizar ambos tipos celulares, la detección de la fluorescencia roja con una excitación de 950 nm se dificulta a una profundidad de alrededor de 100 μ m (Figura P1).

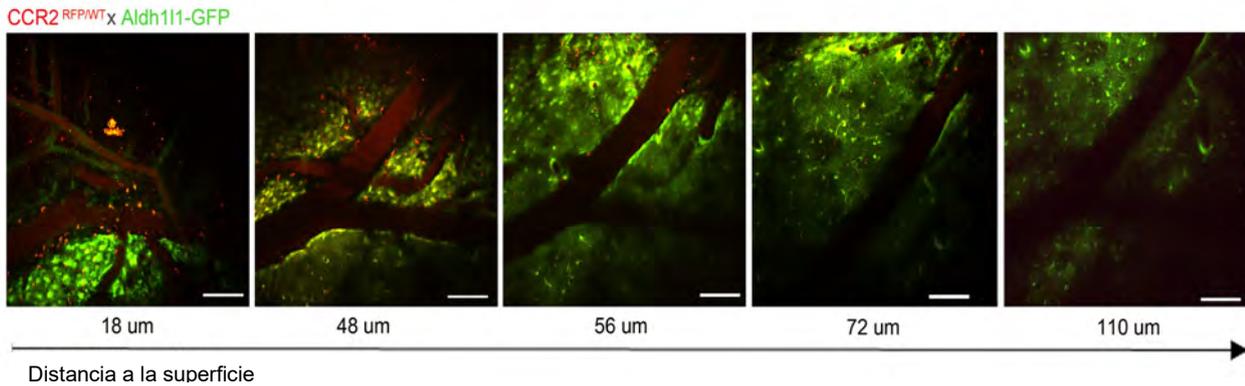


Figura P1: imágenes obtenidas de los bordes de la lesión de la corteza cerebral de ratones Aldh1l1-GFP x CCR2-RFP el mismo día de aplicación de la lesión a distintas profundidades desde la superficie. Nótese la ausencia de fluorescencia roja en la última microfotografía. Barras 50 μm .

Esta dificultad no se había observado en experimentos previos con dextranos fluorescentes por lo que se supuso que es una consecuencia de un bajo nivel de expresión endógena de la proteína RFP en monocitos. El mismo resultado se obtuvo a las distintas longitudes de onda que posibilitan la excitación simultánea de ambos fluorocromos. La posición cero se estableció en las meninges que son detectables debido a que la estructura fibrosa de las mismas genera imágenes mediante la detección de segundos armónicos (Figura P2 A). La morfología astrocitaria se distingue con mayor claridad en los astrocitos del parénquima en zonas más profundas (Figura P2 B) y es comparable a la que se observa mediante la inmunomarcación post mortem de GFP (Figura P2 C). La expresión de RFP pudo confirmarse por inmunomarcación en las células de interés a esta profundidad, sugiriendo que la falta de detección podría deberse a una débil expresión endógena de esta proteína (Figura P2 B). Estos experimentos muestran que es posible utilizar esta línea para el estudio de la interacción de astrocitos y monocitos resolviendo el problema de la excitación a profundidades mayores a 100 μm . Esto podría lograrse mediante la adquisición por separado de las series de imágenes de fluorescencia roja y verde, primero utilizando longitudes de onda más largas (alrededor de 1100 nm, más adecuadas para excitar el fluorocromo rojo) y luego a 950 nm para visualizar GFP. Los aspectos técnicos relacionados a la implantación de la ventana craneal también son susceptibles a la optimización y podrían resultar en una mejoría en la detección de fluorescencia a mayor profundidad.

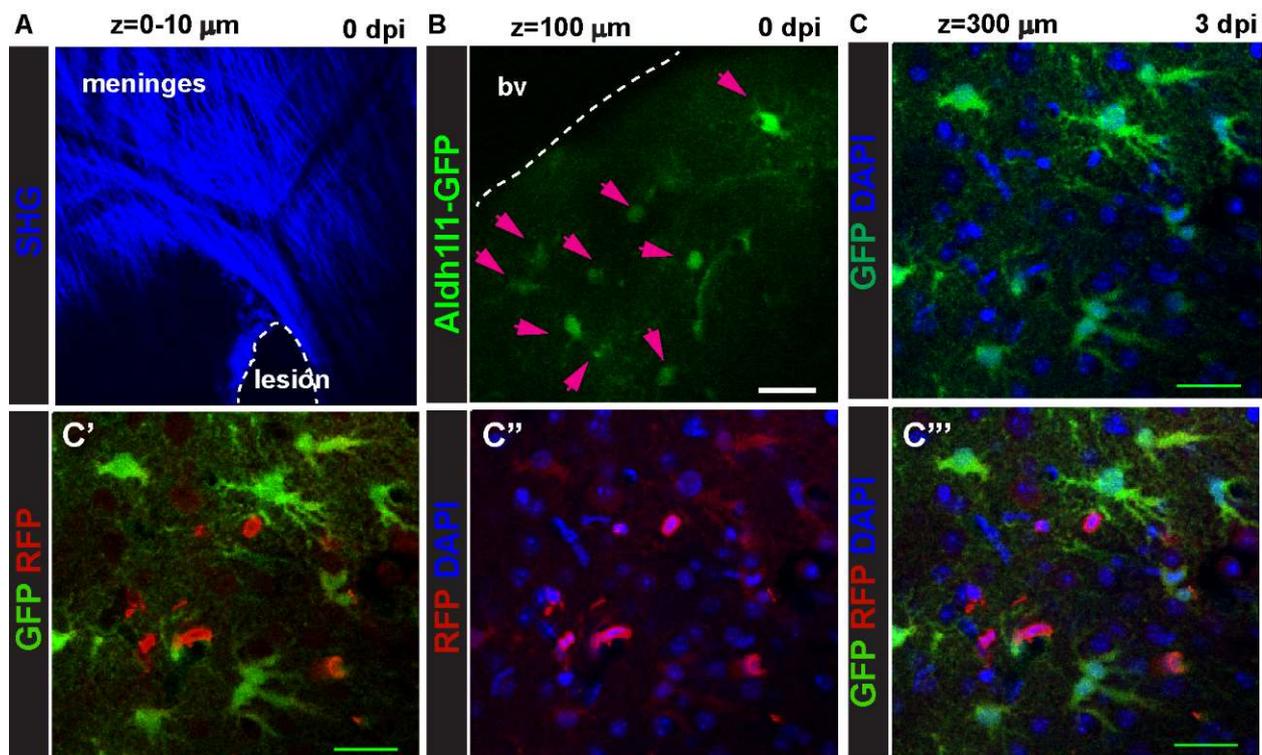


Figura P2: **A)** Proyección de los primeros 5 planos de imágenes adquiridas por microscopía de dos fotones de la zona del borde de la lesión el día de la cirugía (0 dpi) detectadas por la generación de segundos armónicos por las estructuras de la meninges (duramadre). **B)** Imagen de microscopía de dos fotones mostrando los astrocitos que expresan GFP bajo el promotor de Aldh111 a una profundidad de 100 μm a 0 dpi. **C)** Imagen de microscopía confocal de un corte fijo de la línea de ratones Aldh111 con inmunomarcación de GFP, RFP y contratinción nuclear con DAPI. Barras: 50 μm .

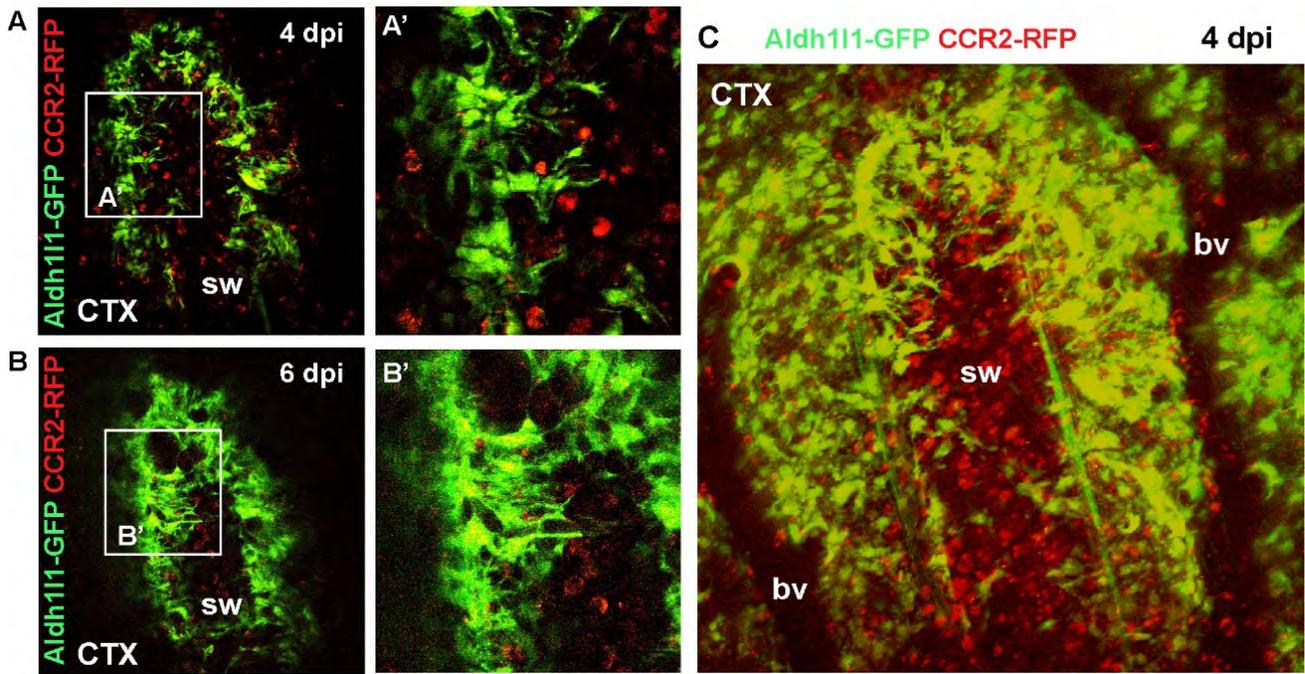


Figura P3: Imágenes de microscopía intravital de dos fotones de una lesión (sw) de la corteza de un ratón Aldh111-GFP x CCR2-RFP heterocigoto. Se muestra la misma área a 4 dpi (**A**) y 6 dpi (**B**). En C puede observarse una proyección en Z de todo el volumen estudiado. Nótese la acumulación de monocitos en el centro de la lesión y la presencia de monocitos adheridos a las paredes de los vasos sanguíneos superficiales (bv, del inglés *blood vessel*).

Conclusiones finales

En este trabajo se caracterizaron los astrocitos proliferativos yuxtavasculares. Se encontró que los mismos no difieren de los astrocitos no yuxtavasculares en cuanto a la expresión de marcadores relacionados a células indiferenciadas como Sox2, BLBP o EGFR.

Además se demostró que la población de astrocitos proliferativos yuxtavasculares está presente tanto en la lesión isquémica y como en la lesión punzante de la sustancia gris de la corteza cerebral y se determinó la dinámica temporal de su proliferación.

Se demostró que la vía del óxido nítrico, una vía característica de la reacción inflamatoria aguda, tiene un rol en la estimulación de la proliferación astrocitaria, ya que la inhibición de la misma resulta en una proliferación reducida.

Utilizando ratones mutantes de genes asociados al ciclo celular, se mostró que la población de astrocitos proliferativos tiene un rol en la limitación de la infiltración de células inmunes periféricas. Se demostró además que la mayoría de las células que infiltran luego de la lesión penetrante de la corteza cerebral son monocitos inflamatorios y que la limitación de su ingreso como consecuencia del aumento de la proliferación astrocitaria resulta en una mejora de la supervivencia neuronal.

Se demostró que la proliferación de las células de la macroglía: astrocitos y células progenitoras de oligodendrocitos es modulada por factores asociados a la presencia de monocitos inflamatorios en el parénquima de la sustancia gris cortical.

Se evaluaron los efectos sobre la cicatrización en modelos donde estaba alterada la proliferación astrocitaria o la infiltración de monocitos y se determinó que la mejor evolución de la lesión ocurre con alta proliferación de la macroglía y ausencia de monocitos inflamatorios, condición que resulta en una mayor cobertura neuronal del área estudiada.

Se demostró que en ausencia de monocitos, determinadas vías asociadas a factores de crecimiento, citoquinas, metabolismo de nucleótidos y proliferación celular están reguladas de manera diferente.

En su conjunto los datos muestran que la interacción crucial entre la macroglía local y los monocitos invasores tiene influencias profundas y multifacéticas en los aspectos clave de la lesión cerebral.

Materiales y Métodos

Modelos experimentales

Los experimentos se realizaron con ratones de 2 a 3 meses de edad de ambos sexos.

Para la delección inducible de *cdc42* en astrocitos, se cruzaron ratones portadores de alelos rodeados de sitios lox P (*cdc42^{fl/fl}*) con ratones **GLAST^{CreERT2}** (Mori et al., 2006) y la línea reportera **CAG-eGFP** (Nakamura et al., 2006).

Para la delección inducible de *Smo* en astrocitos, fueron utilizados ratones homocigotos portadores de alelos *Smo* rodeados de sitios lox P (*Smo^{fl/fl}*, (Long et al., 2001), ratones **GLAST^{CreERT2}** (Mori et al., 2006) y la línea reportera **CAG-eGFP** (Nakamura, Colbert et al. al. 2006).

Se utilizaron ratones **CCR2^{RFP}** (Saederup et al., 2010), Jackson Laboratories, Cat 017586) y se cruzaron con ratones C57BL/6J (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Alemania) para obtener los controles heterocigotas y WT.

Para la expresión constitutiva de la fusión **Smo/eYFP** y señalización no restringida de *Shh* en astrocitos corticales se cruzaron ratones homocigotas *Gt(ROSA)26Sor^{tm1(Smo/eYFP)Amc}/J* (Jackson Laboratories, Cat 005130) con ratones **GLAST^{CreERT2}** (Mori et al., 2006).

En la Tabla 1 se provee información más detallada de las líneas congénicas y su origen. Los animales se asignaron a grupos experimentales con respecto a su genotipo y se mantuvieron en condiciones estándar con acceso a agua y alimento *ad libitum*.

La manipulación de animales y los procedimientos experimentales se realizaron en las instalaciones del Instituto de Fisiología de la Universidad de Munich de acuerdo con las directrices de la Unión Europea y de Alemania, y fueron aprobados por el Estado de Alta Baviera. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento y la cantidad de animales utilizados.

Línea de ratón	Proveedor/ recurso	Identificador
C57BL/6J	Charles River Laboratories	RRID:IMSR_JA X:000664
B6.129(Cg)- <i>Ccr2</i> ^{tm2.1fc} /J	Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JA X:017586
<i>cdc42</i> ^{fl/fl} /GLAST-Cre ^{ERT2} /CAG-eGFP	Robel et al, 2011	N/A
<i>Smo</i> ^{fl/fl} /GLAST-Cre ^{ERT2} /CAG-eGFP	Sirko et al, 2013	N/A
Gt(ROSA)26Sortm1(Smo/EYFP)Amc	Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JA X:005130
GLAST-Cre ^{ERT2} /CAG-eGFP	Mori et al, 2006; Nakamura et al., 2006	N/A
Gt(ROSA)26Sortm1(Smo/EYFP)Amc/GLA ST-Cre ^{ERT2} /CAG-eGFP	Este trabajo	N/A
Línea de ratón	Proveedor/ recurso	Identificador
<i>Aldh1l1</i> -eGFP	Cahoy, Emery et al, 2008	N/A
<i>Aldh1l1</i> -eGFP x CCR2-RFP	Este trabajo	N/A
CCR2-RFP	Jackson Laboratory	RRID:IMSR_JA X:017586

Tabla 1: Detalle de las líneas de ratones utilizadas para los experimentos (referencia; N/A: no aplica).

Recombinación mediada por tamoxifeno

Para la inducción de recombinación mediada por Cre en ratones **GLAST**^{CreERT2}, se administró tamoxifeno (Sigma, Cat# T5648) por vía oral (40 mg/ml en aceite de maíz/etanol al 10%) dividido en 3 aplicaciones repartidas en 5 días de 250 µl, día por medio, para alcanzar una dosis total de 30 mg. Los ratones se analizaron 3 semanas después de la última inducción de la recombinación para asegurar la eliminación de la proteína diana endógena. Los procedimientos para la aplicación de tamoxifeno en este trabajo fueron aprobados por el estado de Baviera (licencia: 55.2-1-54-2532-219-2015).

Procedimientos quirúrgicos

El procedimiento quirúrgico para la aplicación de la lesión de la sustancia gris de la corteza cerebral se describió detalladamente en trabajos anteriores de esta línea de investigación (Buffo et al., 2008; Sirko et al., 2013b). Brevemente, los animales fueron anestesiados y sometidos a una lesión penetrante (0.6 mm de profundidad y 1 mm de largo) en la corteza del hemisferio derecho utilizando una lanceta de cirugía oftálmica (V-lance Knife, Alcon) y un aparato estereotáctico. Los animales fueron sacrificados a los 1, 3, 5, 7 y 28 días después de la cirugía. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el estado de Baviera (licencia: 55.2-1-54-2532-171-11). La isquemia focal transitoria por oclusión de la arteria cerebral media se realizó como se describió previamente (Sirko, Behrendt et al., 2013) por personal del laboratorio colaborador del Dr. Nikolaus Plesnila del Instituto de Investigación de Accidentes Cerebrovasculares y Demencia (ISD), Facultad de Medicina, Universidad Ludwig Maximilian de Munich. Brevemente, se anestesiaron ratones C57/BL6 machos (peso corporal 18-22 g, Charles River, Sulzfeld, Alemania) con 4% de halotano, 30% de O₂ y 66% de N₂O. La anestesia se mantuvo con 1% de halotano, 30% de O₂ y 69% de N₂O durante todo el tiempo de la cirugía (<20 min). La temperatura corporal se mantuvo a 37.0±0.1°C con una almohadilla térmica controlada por retroalimentación (Heater Control Module, FHC, Bowdoinham, ME, EE. UU). Se pegó una sonda Doppler láser flexible en el parietal izquierdo del cráneo expuesto sobre el territorio de la arteria cerebral media para la monitorización continua del flujo sanguíneo cerebral regional (Perimed 4001 Master, Perimed, Järfälla, Suecia). Posteriormente, las arterias carótidas común y externa izquierda se expusieron y se ligaron. Se incidió la arteria carótida común y se empujó un monofilamento de nylon 8-0 revestido de silicona en la arteria carótida interna hasta que la señal del láser Doppler indicó la oclusión de la arteria cerebral media. Las heridas se suturaron, los animales se transfirieron a una incubadora (32°C) y se les permitió despertarse. 40 minutos después de la oclusión de la arteria cerebral media, los ratones se volvieron a anestesiarse brevemente y se terminó la isquemia mediante la eliminación de la sutura intraluminal. Para el mantenimiento de la temperatura corporal después de la cirugía, los animales se transfirieron a la incubadora durante otras 2 hs. Los ratones se sacrificaron 1, 3 o 5 días después de MCAo en anestesia con halotano profundo. Todos los procedimientos descritos están de acuerdo con las leyes locales y fueron aprobados por el comité de protección de animales del Gobierno de Alta Baviera (protocolo número 152-10).

Implantación de ventana craneal y microscopía de dos fotones

Los procedimientos para la implantación de la ventana craneal para la realización de microscopía in vivo de la corteza cerebral ya fueron descritos previamente en el trabajo de Bardehle, Kruger et al, 2013. Brevemente, los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de midazolam (5 mg por kg de peso corporal (mg/kg)), medetomidina (0,5 mg/kg) y fentanyl (0,05 mg/kg) Se realizó una craneotomía unilateral de 3 mm de diámetro posicionada sobre la corteza somatosensorial de acuerdo coordenadas tomando como referencia las suturas craneales bregma y lambda. Se realizó la lesión de tipo stab wound de la misma manera que se describió en la sección correspondiente, con la diferencia de que la longitud del corte se limitó a 1 mm de longitud para limitar el sangrado que perjudica la visibilidad a través de la ventana. La craneotomía se cubrió luego con un vidrio (coverslip) de 5 mm de diámetro de manera permanente, se adhirió una barra metálica para la fijación a la plataforma del microscopio y se sellaron los bordes con acrílico dental (Paladur, Heraeus). El efecto de la anestesia fue antagonizado al terminar el proceso de adquisición de imágenes con una inyección intraperitoneal de atipamezol (2.5 mg/kg), flumazenil (0,5 mg/kg) y naloxona (1,2 mg por kg). Los procedimientos quirúrgicos y de aplicación de anestesia fueron supervisados por el personal autorizado por el estado de Baviera.

Los animales anestesiados se fijaron luego a una plataforma calefaccionada para su ubicación bajo el lente objetivo. La adquisición de imágenes fue realizada con un microscopio Olympus FV1000MPE equipado con un laser pulsado multifotónico de infrarrojo cercano MaiTai HP DeepSee laser (Spectra Physics) equipado con un objetivo de inmersión (20x1.0 NA) un filtro FV10-MRG (filtro de barrera = 495–540 nm, espejo dicromático = 570 nm, BA 575–630 nm) y tubos detectores fotomultiplicadores internos. La emisión de la señal intrínseca de eGFP (procedente de astrocitos) y RFP (monocitos/macrófagos) fue escaneada simultáneamente usando una excitación de 910 nm con ajuste del poder del laser acorde a la profundidad. Las imágenes de cada plano de 512x512 pixeles fueron adquiridas cada 5 μ m en el eje z (profundidad desde la duramadre). En la medida que la calidad del implante lo permitió, se realizaron sesiones de adquisición de imágenes a 0 (correspondiente a aproximadamente 30 minutos posteriores a la lesión, 2, 4, 6 y en un único caso 10 dpi.

Cultivos de astrocitos y ensayos de lesión por raspado de la *monocapa (scratch wound assay)*

La preparación de cultivos primarios de astrocitos fue explicada previamente (Robel et al., 2011a). Brevemente, se realizó la disección la sustancia gris de la corteza cerebral de 3-4 ratones de 5 a 7 días de edad y se disoció mecánicamente en solución buffer salina de Hanks con HEPES 10 mM. Después de lavar en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, HEPES 10 mM y penicilina/estreptomicina, se plaqueó una suspensión de células individuales en frascos de cultivo celular T75 recubiertos con poli-L-ornitina (PLO). El medio se cambió cada dos días. Después de alcanzar la confluencia, se eliminaron las células progenitoras que se ubican en la parte superior de la monocapa de astrocitos sacudiendo completamente el frasco de cultivo celular. Los astrocitos se pasaron a placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos recubiertos con PLO a una densidad 100.000 células/ml. Las placas se colocaron en la incubadora durante 24 hs a 37°C y 5% de CO₂ antes del cambio del medio. Una semana después de haber alcanzado confluencia, se iniciaron los experimentos de la lesión *in vitro* por raspado (*scratch wound assay*), siguiendo un protocolo publicado (Etienne-Manneville, 2006). Brevemente, la monocapa confluyente de astrocitos se raspó una vez desde la pared izquierda a la derecha del pocillo con una punta de plástico estéril de 10 µl, dando como resultado una hendidura libre de células de ~ 500 µm de ancho. El medio de cultivo se cambió diariamente agregando la concentración del inhibidor correspondiente. Los cultivos se lavaron una vez con PBS antes de fijarse con PFA 4% durante 20 minutos. Se realizó la inmunomarcación con las siguientes concentraciones de anticuerpo: GFAP/S100 1:1000, Ki67 1:500. Los detalles de los anticuerpos utilizados y proveedores se encuentran en listados en la tabla 2.

Inmunohistoquímica

Se anestesiaron los animales con una dosis letal de ketamina y se procedió a la perfusión transcardial con solución de buffer fosfato salino (PBS) seguida de paraformaldehído al 4% en PBS, se colectaron los cerebros y se fijaron posteriormente durante la noche a 4°C y se colocaron en solución crioprotectora de sacarosa al 30%. Los cerebros se cortaron a 40 µm y las secciones se tiñeron según los protocolos descritos previamente (Simon et al., 2011) o se guardaron a -20°C en un solución de almacenamiento para análisis futuros.

Se usaron los siguientes anticuerpos y diluciones primarios: anti-GFAP monoclonal de ratón (Sigma Aldrich, 1: 500); anti-S-100β monoclonal de ratón (Sigma Aldrich, 1: 500); conejo anti-Ki67 (Thermo Fisher Scientific, 1: 100); conejo anti-Iba1 (Wako, 1: 500); rata anti-CD45 (BD Biosciences, 1: 500); conejo anti-RFP (Rockland, 1: 500); conejo anti-NG2 (Millipore, 1: 400); rata anti-CD31 (BD Biosciences, 1: 100); conejo anti Colágeno IV (Millipore, 1:40); ratón anti-CSPG (Abcam, 1: 250); conejo anti-GFAP (Dako, 1: 250); monoclonalanti-Ki67 de rata (Thermo Fisher Scientific,1: 300);ratón anti-NeuN(Millipore, 1: 100). En la tabla 2 se muestra información detallada de cada anticuerpo. Anticuerpos secundarios: Alexa488 (1: 500), Alexa647 (1: 500) subclase específicos (todos de Molecular Probes), Cy3 (1: 500) o Cy5 (1: 500) (todos de Dianova) conjugados a anti-ratón, anti-rata y anti-conejo. Los núcleos se visualizaron con DAPI (0,1 µg/ml, Sigma Aldrich).

Tabla 2: anticuerpos primaries utilizados

Anticuerpos	Proveedor	Número de catálogo	Dilución
Mouse monoclonal Anti GFAP	Sigma Aldrich	G3893	1:500
Mouse monoclonal Anti S100 (beta-subunit)	Sigma Aldrich	S2532	1:250
Rabbit anti Ki67	Thermo Fisher Scientific	MA5-14520	1:100
Rabbit anti Iba1	Wako	019-19741	1:500
Rat anti CD45	BD Biosciences	550539	1:500
Rabbit anti RFP	Rockland	600-401-379	1:500
Rabbit anti NG2	Millipore	AB5320	1:400
Rat anti CD31	BD Biosciences	550274	1:100
Rabbit anti Collagen IV	Millipore	AB8201	1:40
Mouse anti CSPG	Abcam	AB11570	1:250
Mouse anti NeuN	Millipore	MAB377	1:100
Rabbit anti GFAP	Dako	Z0334	1:500
Rabbit anti-Collagen I	Rockland	600-401-103-0.5	1:200
Rat monoclonal anti-Ki67	eBioscience	14-5698	1:300
Anti mouse IgG1 Alexa488	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific	A31573	1:500
Anti rabbit IgG Alexa 647	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific	A32733	1:500
Anti rat Alexa 647	Molecular Probes, Thermo Fischer Scientific	A-21247	1:500
Anti rabbit Cy3	Dianova	111-165-144	1:500
Anti rat Cy3	Dianova	112-165-167	1:500
Anti mouse IgM Cy3	Invitrogen	A21042	1:500

Anti rabbit IgG	Molecular	A21206	1:500
Alexa 488	Probes, Thermo Fischer Scientific		
Anti mouse IgG	Dianova	115-165-166	1:500
Cy3			

Cuantificación de imágenes.

La cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia se realizó en al menos 3 cortes por animal de cada grupo experimental (3-6 animales) evaluando plano por plano del volumen 3D multicanal escaneado por microscopia laser confocal, utilizando el software Zeiss ZEN 2010 y el complemento Cell Counter del software ImageJ NIH (Fiji). Los niveles de fluorescencia de canales individuales se ajustaron de forma independiente para la visualización óptima. Los resultados de las cuantificaciones se representan como medias \pm error estándar de la media (SEM) calculada entre diferentes animales.

Los cortes en los que se realizó inmunomarcación para GFAP, NeuN, CD45 o CSPG se escanearon usando parámetros de adquisición constantes. Las imágenes confocales de inmunofluorescencia del volumen adquirido, se proyectaron y se fijó un umbral para cada canal. Luego de aplicar el umbral se midió el área de marcación positiva utilizando el software ImageJ de NIH (Fiji). Las áreas se muestran en gráficos como valores medios \pm SEM, de al menos 3 cortes por animal del grupo experimental (3-6 animales).

Colecta de muestra para análisis proteómicos

Se recolectaron muestras de tejido (\varnothing 0,25 cm) con un punzón de biopsias de la sustancia gris de la corteza somatosensorial lesionada y contralateral ilesa a 5 dpi y se congelaron inmediatamente a -80°C para posterior análisis.

LC-MSMS y análisis cuantitativo

Estos procedimientos fueron realizados por el grupo colaborador del laboratorio de la Dra. Steffanie M. Hauck de la Unidad de Investigación para ciencia de proteínas del Centro Helmholtz de Munich en Alemania, principalmente por la Dra. Juliane Merl-Pham.

Las muestras de tejido se lisaron en 100 μl de buffer de urea/tiourea (Urea 9 M, tiourea 2M, 4% Chaps, DTT 65 mM) y fueron homogeneizadas utilizando un homogeneizador Precellys (VWR). Se digirieron 20 μg por muestra usando un procedimiento de FASP

modificado (Grosche et al., 2016; Wisniewski et al., 2009), resultando en dos fracciones después de una proteólisis secuencial, realizada con Lys-C (Wako Chemicals) seguido de tripsina (Promega). El análisis de LC-MSMS se realizó en un espectrómetro de masas QExactive HF (ThermoFisher Scientific) acoplado en línea a una nano-HPLC Ultimate 3000 RSLC (Dionex). Los datos crudos adquiridos se cargaron en el software Progenesis QI (Nonlinear Dynamics, Waters), por separado para las dos diferentes fracciones proteolizadas. Después del alineamiento, el filtrado y la normalización, todos los espectros de MSMS se exportaron y buscaron en la base de datos de ratón de Swissprot (16772 secuencias, Versión 2016_02) utilizando el motor de búsqueda Mascot. Los ajustes de búsqueda fueron: enzima tripsina o Lys-C respectivamente, 10 ppm de tolerancia de masa peptídica y 0,02 Da de tolerancia de masa para los fragmentos, un clivaje omitido permitido, la carbamidometilación se estableció como modificación fija, la oxidación de metionina y asparagina o la desamidación de glutamina se establecieron como modificaciones variables. El software calculó las tasas de descubrimientos falsos (FDR: False Discovery Rate) en función de la búsqueda en una base de datos llamada señuelo o decoy (base de datos de secuencias incorrectas). Las FDR resultantes fueron <1% (se utilizó un nivel de significación de 0,05 y un punto de corte de 13 para el *mascot percolator score*). Las asignaciones de péptidos se volvieron a importar en el software Progenesis QI. Se sumaron las abundancias de todos los péptidos únicos asignados a cada proteína. Los dos conjuntos de datos se combinaron y las abundancias normalizadas resultantes de las proteínas individuales se usaron luego para el cálculo de los fold-change de las proteínas y los valores de significancia estadística mediante la prueba T de Student.

Análisis de red de proteínas

Se realizó un análisis de red de proteínas de las 311 proteínas significativamente diferentes del análisis proteómico utilizando la base de datos STRING de interacciones proteína-proteína conocidas y predichas (versión 10.0, (Szklarczyk et al., 2015), con las siguientes configuraciones: como fuentes de interacción se usaron experimentos y bases de datos, la puntuación de interacción mínima requerida se estableció en confianza media. Las conexiones entre proteínas se establecieron en base a la confianza, con un grosor de línea que indica la fortaleza del soporte de datos. Los nodos desconectados y las redes pequeñas con menos de 5 proteínas se descartaron y la red de proteínas resultante se muestra en la Figura 10.1 B.

Análisis de enriquecimiento de vías de señalización

El análisis de enriquecimiento de vías de señalización de los términos GO de procesos biológicos se realizó por separado para las 20 proteínas que fueron al menos 2 veces más abundantes en ratones WT y las 29 proteínas que fueron 2 veces más abundantes en ratones CCR2 KO, utilizando la herramienta GeneRanker (Genomatix GmbH, Munich).

Análisis estadístico

Para realizar análisis estadísticos se usó el programa GraphPad Prism 7. Para las comparaciones individuales se usó la prueba de student no apareada o el test U de Mann-Whitney, de acuerdo con la normalidad o no de la distribución de los datos. El ANOVA seguido del test de Tukey o el de Kruskal-Wallis se usaron para comparaciones múltiples. En todos los análisis estadísticos, la significancia fue aceptada en $p < 0.05$.

Software utilizado

Nombre	Proveedor	Identificador
Fiji	http://fiji.sc	RRID:SCR_002285
Graphpad Prism 7	Graphpad Prism	RRID:SCR_002798
Gene Ontology enrichment analysis	Gene Ontology Consortium	http://www.geneontology.org/
Generanker tool	Genomatix GmbH, Munich	https://www.genomatix.de/ ; RRID:SCR_008036
STRING v10.0	http://string-db.org/	RRID:SCR_005223
Mascot search engine	http://www.matrixscience.com/	RRID:SCR_014322
Progenesis QI software	Nonlinear Dynamics, part of Waters	http://www.nonlinear.com/progenesis/qi-for-proteomics/download/ ;

Referencias bibliográficas

al-Ali, S.Y., and al-Hussain, S.M. (1996). An ultrastructural study of the phagocytic activity of astrocytes in adult rat brain. *J Anat* 188 (Pt 2), 257-262.

Albelda, S.M., Oliver, P.D., Romer, L.H., and Clayton A. Buck (1990). EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology* 110, 1227-1237.

Altin, J.G., and Sloan, E.K. (1997). The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol* 75, 430-445.

Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., and Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nature reviews Neuroscience* 2, 287-293.

Anderson, M.A., Burda, J.E., Ren, Y., Ao, Y., O'Shea, T.M., Kawaguchi, R., Coppola, G., Khakh, B.S., Deming, T.J., and Sofroniew, M.V. (2016). Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532, 195-200.

Bardehle, S., Kruger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., *et al.* (2013a). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature neuroscience*.

Bardehle, S., Kruger, M., Buggenthin, F., Schwausch, J., Ninkovic, J., Clevers, H., Snippert, H.J., Theis, F.J., Meyer-Luehmann, M., Bechmann, I., *et al.* (2013b). Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nat Neurosci* 16, 580-586.

Bayir, H., Kagan, V.E., Borisenko, G.G., Tyurina, Y.Y., Janesko, K.L., Vagni, V.A., Billiar, T.R., Williams, D.L., and Kochanek, P.M. (2005). Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 673-684.

Bechmann, I., and Nitsch, R. (1997). Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20, 145-154.

Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D.S., Liu, C., Eroglu, C., and Kuo, C.T. (2013). Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature* 497, 369-373.

Brahmachari, S., Fung, Y.K., and Pahan, K. (2006). Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* 26, 4930-4939.

Brown, G.C. (2010). Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 23, 153-165.

Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.P., Mori, T., and Gotz, M. (2008). Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3581-3586.

Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostendorf, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* *23*, 297-308.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., *et al.* (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* *28*, 264-278.

Coles, J.A., Myburgh, E., Brewer, J.M., and McMenamin, P.G. (2017). Where are we? The anatomy of the murine cortical meninges revisited for intravital imaging, immunology, and clearance of waste from the brain. *Prog Neurobiol* *156*, 107-148.

D'Mello, C., Le, T., and Swain, M.G. (2009). Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factor- α signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci* *29*, 2089-2102.

Donnelly, D.J., Longbrake, E.E., Shawler, T.M., Kigerl, K.A., Lai, W., Tovar, C.A., Ransohoff, R.M., and Popovich, P.G. (2011). Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6Clo/iNOS⁺ macrophages. *J Neurosci* *31*, 9910-9922.

Easton, A.S. (2013). Neutrophils and stroke - can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? *Int Immunopharmacol* *17*, 1218-1225.

Etienne-Manneville, S. (2006). In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol* *406*, 565-578.

Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* *24*, 2143-2155.

Fluri, F., Schuhmann, M.K., and Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy* *9*, 3445-3454.

Frisen, J. (2016). Neurogenesis and Gliogenesis in Nervous System Plasticity and Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

Fujimoto, M., Shiba, M., Kawakita, F., Liu, L., Shimojo, N., Imanaka-Yoshida, K., Yoshida, T., and Suzuki, H. (2016). Deficiency of tenascin-C and attenuation of blood-brain barrier disruption following experimental subarachnoid hemorrhage in mice. *J Neurosurg* *124*, 1693-1702.

Gao, P., Postiglione, M.P., Krieger, T.G., Hernandez, L., Wang, C., Han, Z., Streicher, C., Papusheva, E., Insolera, R., Chugh, K., *et al.* (2014). Deterministic progenitor behavior and unitary production of neurons in the neocortex. *Cell* **159**, 775-788.

Gauger, K.J., Chenausky, K.L., Murray, M.E., and Schneider, S.S. (2011). SFRP1 reduction results in an increased sensitivity to TGF-beta signaling. *BMC Cancer* **11**, 59.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82.

Godoy, D., Piñero, G., Cruz-Flores, S., Alcalá Cerra, G., and Rabinstein, A. (2016). Infarto hemisférico maligno de la arteria cerebral media. Consideraciones diagnósticas y opciones terapéuticas. *Neurología* **31**, 332-343.

Gomez, R.M., Berria, M.I., and Sterin-Borda, L. (2004). Cholinergic modulation of baker's yeast cell phagocytosis by rat astrocytes. *Neurosci Lett* **365**, 19-22.

Gomez, R.M., Yep, A., Schattner, M., and Berria, M.I. (2003). Junin virus-induced astrocytosis is impaired by iNOS inhibition. *J Med Virol* **69**, 145-149.

Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788.

Götz, M., Nakafuku, M., and Petrik, D. (2016). Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**.

Grosche, A., Hauser, A., Lepper, M.F., Mayo, R., von Toerne, C., Merl-Pham, J., and Hauck, S.M. (2016). The Proteome of Native Adult Muller Glial Cells From Murine Retina. *Mol Cell Proteomics* **15**, 462-480.

Gyoneva, S., Kim, D., Katsumoto, A., Kokiko-Cochran, O.N., Lamb, B.T., and Ransohoff, R.M. (2015). *Ccr2* deletion dissociates cavity size and tau pathology after mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation* **12**, 228.

Gyoneva, S., and Ransohoff, R.M. (2015). Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends Pharmacol Sci* **36**, 471-480.

Helmy, A., Antoniadou, C.A., Guilfoyle, M.R., Carpenter, K.L., and Hutchinson, P.J. (2012). Principal component analysis of the cytokine and chemokine response to human traumatic brain injury. *PLoS One* **7**, e39677.

Helmy, A., Carpenter, K.L., Menon, D.K., Pickard, J.D., and Hutchinson, P.J. (2011). The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**, 658-670.

Herrmann, J.E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* **28**, 7231-7243.

- Holmin, S., Mathiesen, T., Shetye, J., and Biberfeld, P. (1995). Intracerebral inflammatory response to experimental brain contusion. *Acta Neurochir (Wien)* 132, 110-119.
- Howitt, J., Low, L.H., Putz, U., Doan, A., Lackovic, J., Goh, C.P., Gunnensen, J., Silke, J., and Tan, S.S. (2015). Ndfip1 represses cell proliferation by controlling Pten localization and signaling specificity. *J Mol Cell Biol* 7, 119-131.
- Hsieh, C.L., Kim, C.C., Ryba, B.E., Niemi, E.C., Bando, J.K., Locksley, R.M., Liu, J., Nakamura, M.C., and Seaman, W.E. (2013). Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *Eur J Immunol* 43, 2010-2022.
- Hua, L.L., Kim, M.O., Brosnan, C.F., and Lee, S.C. (2002). Modulation of astrocyte inducible nitric oxide synthase and cytokine expression by interferon beta is associated with induction and inhibition of interferon gamma-activated sequence binding activity. *J Neurochem* 83, 1120-1128.
- Huang, Q., Chen, B., Wang, F., Huang, H., Milner, R., and Li, L. (2015). The temporal expression patterns of fibronectin and its receptors-alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins on blood vessels after cerebral ischemia. *Restor Neurol Neurosci* 33, 493-507.
- Jaquenod De Giusti, C., Alberdi, L., Frik, J., Ferrer, M.F., Scharrig, E., Schattner, M., and Gomez, R.M. (2011). Galectin-3 is upregulated in activated glia during Junin virus-induced murine encephalitis. *Neurosci Lett* 501, 163-166.
- Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A.H., and McMahon, A.P. (2004). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes & development* 18, 937-951.
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Orre, M., Stassen, O., Pekny, M., and Hol, E.M. (2015). GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia* 63, 1036-1056.
- Katsumoto, A., Lu, H., Miranda, A.S., and Ransohoff, R.M. (2014). Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *J Immunol* 193, 2615-2621.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., and Wojtowicz, J.M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115, 97-105.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.
- Kurihara, T., Warr, G., Loy, J., and Bravo, R. (1997). Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med* 186, 1757-1762.

Kuziel, W.A., Morgan, S.J., Dawson, T.C., Griffin, S., Smithies, O., Ley, K., and Maeda, N. (1997). Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12053-12058.

Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y., and Newman, P.J. (2016). Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Current opinion in hematology* *23*, 253-259.

Liu, H., Li, J., Zhao, F., Wang, H., Qu, Y., and Mu, D. (2015). Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev Neurosci* *26*, 105-117.

Long, F., Zhang, X.M., Karp, S., Yang, Y., and McMahon, A.P. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* *128*, 5099-5108.

Ly, A., Merl-Pham, J., Priller, M., Gruhn, F., Senninger, N., Ueffing, M., and Hauck, S.M. (2016). Proteomic Profiling Suggests Central Role Of STAT Signaling during Retinal Degeneration in the rd10 Mouse Model. *J Proteome Res* *15*, 1350-1359.

Martin, P., and Leibovich, S.J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* *15*, 599-607.

McKee, C.A., and Lukens, J.R. (2016). Emerging Roles for the Immune System in Traumatic Brain Injury. *Front Immunol* *7*, 556.

McNeill, E., Channon, K.M., and Greaves, D.R. (2010). Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications. *Clin Sci (Lond)* *118*, 641-655.

Mildner, A., Schmidt, H., Nitsche, M., Merkler, D., Hanisch, U.K., Mack, M., Heikenwalder, M., Bruck, W., Priller, J., and Prinz, M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature neuroscience* *10*, 1544-1553.

Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* *70*, 687-702.

Mohle, R., Green, D., Moore, M.A., Nachman, R.L., and Rafii, S. (1997). Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 663-668.

Moncada, S., Higgs, A., and Furchgott, R. (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* *49*, 137-142.

Moore, D.L., and Jessberger, S. (2013). All astrocytes are not created equal--the role of astroglia in brain injury. *EMBO Rep* *14*, 487-488.

Morganti, J.M., Jopson, T.D., Liu, S., Riparip, L.K., Guandique, C.K., Gupta, N., Ferguson, A.R., and Rosi, S. (2015). CCR2 antagonism alters brain macrophage polarization and ameliorates cognitive dysfunction induced by traumatic brain injury. *J Neurosci* *35*, 748-760.

Mori, T., Tanaka, K., Buffo, A., Wurst, W., Kuhn, R., and Götz, M. (2006). Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* *54*, 21-34.

Myer, D.J., Gurkoff, G.G., Lee, S.M., Hovda, D.A., and Sofroniew, M.V. (2006). Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology* *129*, 2761-2772.

Nakamura, T., Colbert, M.C., and Robbins, J. (2006). Neural crest cells retain multipotential characteristics in the developing valves and label the cardiac conduction system. *Circ Res* *98*, 1547-1554.

Ransohoff, R.M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature neuroscience* *19*, 987-991.

Rhodes, J. (2011). Peripheral immune cells in the pathology of traumatic brain injury? *Curr Opin Crit Care* *17*, 122-130.

Robel, S., Bardehle, S., Lepier, A., Brakebusch, C., and Gotz, M. (2011a). Genetic deletion of *cdc42* reveals a crucial role for astrocyte recruitment to the injury site in vitro and in vivo. *J Neurosci* *31*, 12471-12482.

Robel, S., Berninger, B., and Gotz, M. (2011b). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nature reviews Neuroscience* *12*, 88-104.

Robel, S., and Sontheimer, H. (2016). Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nature neuroscience* *19*, 28-33.

Rubart, M. (2004). Two-photon microscopy of cells and tissue. *Circ Res* *95*, 1154-1166.

Rushing, G., and Ihrie, R.A. (2016). Neural stem cell heterogeneity through time and space in the ventricular-subventricular zone. *Front Biol (Beijing)* *11*, 261-284.

Sabelström, H., Stenudd, M., Reu, P., Dias, D.O., Elfineh, M., Zdunek, S., Damberg, P., Goritz, C., and Frisen, J. (2013). Resident neural stem cells restrict tissue damage and neuronal loss after spinal cord injury in mice. *Science* *342*, 637-640.

Saederup, N., Cardona, A.E., Croft, K., Mizutani, M., Cotleur, A.C., Tsou, C.L., Ransohoff, R.M., and Charo, I.F. (2010). Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One* *5*, e13693.

Sang, Q., Kim, M.H., Kumar, S., Bye, N., Morganti-Kossmann, M.C., Gunnarsen, J., Fuller, S., Howitt, J., Hyde, L., Beissbarth, T., *et al.* (2006). Nedd4-WW domain-binding protein 5 (*Ndfip1*) is associated with neuronal survival after acute cortical brain injury. *J Neurosci* *26*, 7234-7244.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* *11*, 762-774.

Simon, C., Götz, M., and Dimou, L. (2011). Progenitors in the adult cerebral cortex: cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59, 869-881.

Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P.A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., *et al.* (2013a). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog glia. *Cell stem cell* 12, 426-439.

Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P.A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., *et al.* (2013b). Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell stem cell* 12, 426-439.

Sirko, S., Irmeler, M., Gascon, S., Bek, S., Schneider, S., Dimou, L., Obermann, J., De Souza Paiva, D., Poirier, F., Beckers, J., *et al.* (2015). Astrocyte reactivity after brain injury: The role of galectins 1 and 3. *Glia* 63, 2340-2361.

Soares, H.D., Hicks, R.R., Smith, D., and McIntosh, T.K. (1995). Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci* 15, 8223-8233.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-647.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119, 7-35.

Steinert, J.R., Chernova, T., and Forsythe, I.D. (2010). Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16, 435-452.

Stroncek JD, R.W. (2008). Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. In *Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment*, R. WM, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis;).

Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K.A., and Gage, F.H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell* 1, 515-528.

Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., *et al.* (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43, D447-452.

Thomas, M.L. (1989). The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7, 339-369.

Torres-Platas, S.G., Comeau, S., Rachalski, A., Bo, G.D., Cruceanu, C., Turecki, G., Giros, B., and Mechawar, N. (2014). Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation* 11, 12.

Villarreal, A., Seoane, R., González Torres, A., Rosciszewski, G., Angelo, M.F., Rossi, A., Barker, P.A., and Ramos, A.J. (2014). S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *J Neurochem* 131, 190-205.

von Bohlen und Halbach, O. (2011). Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345, 1-19.

Wanner, I.B., Anderson, M.A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., and Sofroniew, M.V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J Neurosci* 33, 12870-12886.

Wattananit, S., Tornero, D., Graubardt, N., Memanishvili, T., Monni, E., Tatarishvili, J., Miskinyte, G., Ge, R., Ahlenius, H., Lindvall, O., *et al.* (2016). Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *J Neurosci* 36, 4182-4195.

Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359-362.

Xie, J., Murone, M., Luoh, S.-M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.-W., Hynes, M., Goddard, A., *et al.* (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391, 90-92.

Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., *et al.* (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79-91.

Zacchetti, A., van Garderen, E., Teske, E., Nederbragt, H., Dierendonck, J.H., and Rutteman, G.R. (2003). Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus *in vivo* bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS* 111, 430-438.

Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* 32, 6391-6410.

Zhang, L., Liu, Q., Yuan, X., Wang, T., Luo, S., Lei, H., and Xia, Y. (2013). Requirement of heat shock protein 70 for inducible nitric oxide synthase induction. *Cell Signal* 25, 1310-1317.

Zhao, X., Ahram, A., Berman, R.F., Muizelaar, J.P., and Lyeth, B.G. (2003). Early loss of astrocytes after experimental traumatic brain injury. *Glia* 44, 140-152.

Zhou, M., Wang, C.M., Yang, W.L., and Wang, P. (2013). Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. *Brain Res* 1506, 105-114.