



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES *TOLL*-LIKE EN LA INDUCCIÓN DE LA
GLIOSIS REACTIVA Y LA NEUROINFLAMACIÓN LUEGO DE LA ISQUEMIA
CEREBRAL**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

LIC. GERARDO ARIEL ROSCISZEWSKI

Director de tesis: Dr. Alberto Javier Ramos

Consejero de estudios: Prof. Dr. Christian Höcht

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. E. De Robertis”,
Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2018

Título:

La participación de los receptores *Toll*-like en la inducción de la gliosis reactiva y la neuroinflamación luego de la isquemia cerebral.

Resumen:

El Stroke, ataque cerebral o accidente cerebrovascular (AC) es la tercera causa de muerte en el mundo y se considera la primera causa de discapacidad en adultos. Hay dos tipos de AC: isquémicos y hemorrágicos, siendo la mayor parte de los AC de tipo isquémicos. El único tratamiento disponible en la actualidad para el AC isquémico es el fibrinolítico que tiene una estrecha ventana terapéutica, un alto costo y complicaciones asociadas a la conversión hemorrágica. A pesar de un activo desarrollo de nuevos compuestos que mostraron capacidad neuroprotectora en modelos experimentales de AC, la mayoría de las pruebas clínicas con drogas neuroprotectoras realizadas en las últimas tres décadas fallaron. Por esto resulta fundamental profundizar el conocimiento acerca de los mecanismos fisiopatológicos que se disparan en los diferentes tipos celulares afectados por el AC.

Todos los tipos celulares presentes en el cerebro son afectados por el AC. Si bien décadas de investigación básica en el AC fueron dedicados al estudio de las neuronas, el trabajo de los últimos años permitió comprender que todas las células de la unidad neurovascular son afectadas por el AC. En particular, los astrocitos responden en forma genérica al daño mediante un fenómeno conocido como gliosis reactiva o más específicamente astrogliosis reactiva. Este fenómeno se evidencia a nivel morfológico por un aumento en el tamaño celular y en la complejidad de las proyecciones astrogliales. Los astrocitos reactivos pueden sufrir una polarización hacia un fenotipo denominado A1 que es proinflamatorio e induce neurodegeneración o bien hacia el fenotipo A2 anti-inflamatorio.

En este trabajo de tesis se estudió la participación de los receptores de la inmunidad innata tipo *Toll* (*Toll*-like receptor, TLR) en la gliosis reactiva y en la conversión astrogliótica hacia el fenotipo proinflamatorio que induce neurodegeneración. Utilizando paradigmas de ganancia y pérdida de función *in vitro* e *in vivo* pudimos establecer que TLR4 aumenta su expresión en células gliales (astrocitos y microglía) luego de inducida la isquemia cerebral *in vivo* en modelos experimentales en roedores o bien luego de una exposición a privación de oxígeno y glucosa *in vitro*. La sobreexpresión de TLR4 facilita la conversión de los astrocitos al fenotipo proinflamatorio que induce neurodegeneración cuando están disponibles los ligandos

de TLR, siendo NF- κ B el efector final de la vía. Nuestros experimentos mostraron que tanto un PAMP como el LPS o DAMP como la molécula HMGB-1, liberada de células en necrosis, actúan como activadores de esta señalización, aunque HMGB-1 muestra capacidad de activar otros receptores de patrones moleculares como TLR2 y RAGE y muestra cierta capacidad sinaptogénica sobre neuronas *in vitro*. Finalmente, la aplicación *in vivo* de un inhibidor químico de la activación de NF- κ B, sulfasalazina, modula la gliosis reactiva, disminuye la neurodegeneración y altera la formación de la cicatriz glial en animales sometidos a isquemia cerebral experimental.

En función de nuestros resultados proponemos que TLR4 participa en la conversión glial al fenotipo proinflamatorio-neurodegenerativo activando NF- κ B. Esta cascada ofrece varios puntos de control que podrían ser explorados para el desarrollo de estrategias de reducción de la neuroinflamación luego de la isquemia cerebral.

Palabras clave:

Neuroinflamación, astrocitos, isquemia cerebral, inmunidad innata, DAMP.

Title:

Toll-like receptors role in the induction of reactive gliosis and neuroinflammation after cerebral ischemia.

Summary:

Stroke is the third leading cause of death in the world and is considered the leading cause of disability in adults. There are two types of stroke: ischemic and hemorrhagic, with the majority of stroke being ischemic. The currently available treatment for ischemic stroke is fibrinolytic, which has a narrow therapeutic window, a high cost and several complications associated with hemorrhagic conversion. In spite of the large amount of new compounds developed for neuroprotection in experimental stroke models, most of the clinical trials with neuroprotective drugs performed in the last three decades failed. This is why is fundamental to increase the knowledge about the physiopathological mechanisms that are triggered in the different cell types affected by stroke.

All cell types present in the brain are affected by stroke. While decades of basic research in the field were devoted to the study of neurons, the work of recent years let us understand that all cells of the neurovascular unit are affected by stroke. In particular, astrocytes generically respond to brain damage by a phenomenon known as reactive gliosis or more specifically reactive astrogliosis. This phenomenon is evidenced at the morphological level by an increase in cell size and in the complexity of astroglial projections. Reactive astrocytes can further polarize to a phenotype named A1 which is proinflammatory and induce neurodegeneration or towards the anti-inflammatory phenotype A2.

In this thesis work we have studied the participation of Toll-like receptors (TLR) in reactive gliosis and in astroglial conversion to the proinflammatory phenotype that induces neurodegeneration. Using gain- and loss of function paradigms *in vitro* and *in vivo* we have established that TLR4 increases its expression in glial cells (astrocytes and microglia) after focal experimental brain ischemia *in vivo* or after exposure to deprivation of oxygen and glucose *in vitro*. TLR4 overexpression facilitates the conversion of astrocytes to the proinflammatory phenotype that induces neurodegeneration when TLR ligands are available, with NF- κ B being the effector of the pathway. Our results have also demonstrated that HMGB-1, released from cells undergoing necrosis, acts as activator of this signaling. However, HMGB-1 also shows ability to activate other pattern recognition receptors such as TLR2 and RAGE, and

shows some synaptogenic capacity on neurons *in vitro*. Finally, *in vivo* administration of a chemical inhibitor of NF- κ B activation, sulfasalazine, modulates reactive gliosis, decreases neurodegeneration and alters the formation of the glial scar in animals, in an experimental model of cerebral ischemia.

Based on our results, we propose that TLR4 participates in the glial conversion to the proinflammatory-neurodegenerative phenotype by activating NF- κ B. This cascade offers several control points that could be explored for the development of strategies to reduce neuroinflammation after cerebral ischemia.

Keywords:

Neuroinflammation, astrocyte, brain ischemia, innate immunity, DAMP.

Abreviaturas:

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ATP: Adenosin Tri-fosfato

BHE: Barrera Hematoencefálica

DAMP: del inglés *Danger Associated Molecular Pattern* o *Damage Associated Molecular Pattern*

DC: Devascularización Cortical

DMEM: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTP: Desoxirribonucleótidos Tri-fosfato

DPI: Días post- isquemia

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: del inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*

HMGB-1: del inglés *High Mobility Group Box 1*

IL-1 β : Interleuquina-1 β

I κ B: Inhibidor de kappa B

LPS: Lipopolisacárido

MYD88: del inglés *Myeloid Differentiation primary response gene 88*

NF- κ B: del inglés *Nuclear Factor Kappa B*

PAMP: del inglés *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBS: del inglés *Phosphate Buffer Saline*

PCR: del inglés *Polimerase Chain Reaction*

PRR: del inglés *Pattern Recognition Receptor*

RAGE: del inglés *Receptor for Advanced Glycation End products*

ROS: del inglés *Reactive Oxygen Species*

SNC: Sistema Nervioso Central

TLR: del inglés *Toll Like Receptor*

TNF- α : del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*

Agradecimientos

A mi familia que siempre me apoyó incondicionalmente y me guiaron durante mis primeros pasos y hoy ven los resultados.

A mi director, Dr. Alberto Javier Ramos por darme un lugar, hacer posible esta tesis, brindarme toda su experiencia y guiarme durante este camino, a desafiarme día a día, a superar mis límites y a salir de la zona de confort.

A la Dra. Analía Reinés y su grupo de laboratorio por el cariño y la paciencia para enseñarme en innumerables oportunidades.

Al grupo del Laboratorio de Neuropatología Molecular (LNPM) quienes durante todos estos 6 años supieron aguantarme y darme una mano en todo lo que necesitaba. A Ale Villarreal quien me guió en mis primeros experimentos y conclusiones y a sentir la pasión por la ciencia. A mis compañeros Alicia Rossi, Vero Murta, Belu Cieri y Paula Sarchi. A las otras personas con las que compartí el LNMP lab y ahora están en búsqueda de nuevos desafíos Flor Angelo, Jero Lukin y Raj Sekhar Manava. A todos porque siempre que surgía una duda o inconveniente estaban para ayudarme; y por compartir el día de la mejor manera posible.

A toda la gente del Instituto De Robertis quienes colaboraron también para que sea posible esta tesis doctoral, especialmente a los laboratorios Paratcha-Ledda y Falzone; al personal técnico (Lisandro Anton, Juan Pablo Maura) y de bioterio (Manuel Ponce, Andrea Pecile, Alejo Ramos y Ezequiel Tibaldi).

A la Dra. Flavia Gomes (UFRJ, Brasil) y todo su grupo por la cordial ayuda y enseñanza durante la pasantía que realicé en ese laboratorio.

Al CONICET por la financiación de mi beca; al FONCYT (ANPCYT, MinCyt) y a la UBA por la financiación del trabajo.

A la IBRO y a la FENS por financiación de estadías cortas en cursos y laboratorios.

A los Dres. Pablo Iribarren y Mariana Maccioni (CIBICI, UNC, Córdoba) por cedernos los ratones transgénicos knockout para TLR2 y TLR4; al Dr. Thierry Roger (CHUV, Lausanne, Suiza) por facilitarnos los plásmidos de expresión de TLR4.

A Vane, una persona de un corazón tan noble y hermoso quien supo escuchar, ayudar en cualquier circunstancia. "...si vienes a las 4 de la tarde, comenzaré a ser feliz desde las 3..."

Al trípode ese grupo conformado por excelentes personas y hermanos que me acompañaron durante la carrera y por fortuna, me siguen acompañando durante esta nueva etapa: Rodri, Mati Pili, gracias por todos los momentos compartidos.

A toda la gente que transcurrió una estadía en la casita de J Álvarez: Pascus el hermano mayor, Jr, Franco, Pedro, Sergio y la lista tiende a muchos.

A los muchachos de la V Promo, Angelito, Chiky, Chelo, Tuti, Ati, Papi, Facu, Dino, Ricki, Toto quienes durante mi doctorado siempre estuvieron para apoyarme y escuchar sobre mis decisiones.

A la comunidad de genetistas en Buenos Aires, que algunos sin saber quién era me ayudaron sin ningún problema y otros ya conocidos siempre estuvieron cada vez que necesité: Gaby Pepper, Marian, Javi, Mode, Diego, Fede Penas, Ezequiel, Lucas.

Gracias a todos que de alguna u otra forma colaboraron e hicieron posible la realización de este trabajo.

A mi papá Edgardo y a mi mamá Nilda.

A mis hermanos Gabriel y Diego.

Los amo inmensamente.

*“Aprendí que el coraje no es
la ausencia del miedo,
sino el triunfo sobre él.
El hombre valiente no es aquel
que no siente miedo,
sino aquel que lo conquista”
(Nelson Mandela 1918-2013)*

Los resultados de este trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en:

Rosciszewski G, Cadena V, Murta V, Lukin J, Villarreal A, Roger T, Ramos AJ. Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM-2) Activation Balance Astrocyte Polarization into a Proinflammatory Phenotype. *Molecular Neurobiology* (2018) May;55(5):3875-3888. doi: 10.1007/s12035-017-0618-z. Epub 2017 May 25.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION..... | 12 |
| Isquemia cerebral: Generalidades y Epidemiología..... | 13 |
| La unidad neurovascular | 13 |
| La unidad neurovascular en la isquemia cerebral..... | 15 |
| La inmunidad innata en el Sistema Nervioso Central (SNC)..... | 16 |
| HMGB-1 como DAMP en la isquemia cerebral..... | 20 |
| Los receptores de patrones moleculares (PRR) tipo Toll..... | 22 |
| Estructura y funciones..... | 22 |
| NF-κB en el sistema nervioso central | 23 |
| NF-κB en la isquemia cerebral | 25 |
| La gliosis reactiva como mecanismo de respuesta frente al daño al SNC | 26 |
| Heterogeneidad astrogliar..... | 29 |
| HIPOTESIS Y OBJETIVOS..... | 32 |
| Objetivo General | 33 |
| Objetivo específicos: | 33 |
| MATERIALES Y METODOS | 33 |
| Experimentos in vivo | 35 |
| Animales | 35 |
| Modelo de isquemia cerebral por Devascularización Cortical..... | 35 |
| Fijación de animales por perfusión intracardiaca | 37 |
| Inmunohistoquímica de cortes en flotación..... | 38 |
| Inmunofluorescencia de cortes en flotación..... | 39 |
| Inmunoblot de homogenatos de corteza..... | 40 |
| Experimentos in vitro..... | 40 |
| Cultivos primarios de astrocitos corticales de rata o ratón | 40 |
| Cultivos primarios de neuronas corticales | 41 |
| Análisis <i>Puncta</i> | 42 |
| Ensayos de co-cultivo | 42 |
| Exposición de astrocitos a privación de oxígeno y glucosa | 43 |

| | |
|--|----|
| Obtención de medios condicionados de astrocitos | 44 |
| Inmunofluorescencia de cultivos celulares | 44 |
| Inmunoblots de cultivos celulares..... | 45 |
| Extracción de RNA mensajero total a partir de cultivos celulares | 45 |
| Reacción de la polimerasa en cadena semicuantitativa o de punto final. | 46 |
| Reacción de la polimerasa en cadena de tiempo real (qPCR)..... | 46 |
| Producción de plásmidos para transfecciones..... | 47 |
| Transfección de cultivos primarios | 48 |
| Análisis de imágenes | 48 |
| Análisis estadísticos | 49 |
| TABLA 1..... | 50 |
| Anticuerpos Primarios para Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica | 50 |
| TABLA 2..... | 50 |
| Anticuerpos Secundarios para Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica | 50 |
| TABLA 3..... | 51 |
| Anticuerpos Primarios para Western Blot | 51 |
| TABLA 4..... | 51 |
| Anticuerpos Secundarios para Western Blot | 51 |
| TABLA 5..... | 51 |
| Primers..... | 51 |
| TABLA 6..... | 51 |
| Reactivos para RT PCR | 51 |
| RESULTADOS..... | 52 |
| La privación de oxígeno y glucosa produce un aumento en la expresión de TLR4 en células gliales..... | 53 |
| La privación de oxígeno y glucosa induce un incremento en la expresión de TLR4 en cultivos enriquecidos en astrocitos | 55 |
| La sobreexpresión de TLR4 sensibiliza a los astrocitos hacia sus ligandos | 57 |
| El receptor TLR4 facilita la polarización de los astrocitos reactivos hacia el perfil proinflamatorio | 60 |

| | |
|---|----|
| El DAMP HMGB-1 está involucrado en la gliosis reactiva y la sobrevida neuronal.. | 62 |
| Los efectos del DAMP HMGB-1 son TLR2 y TLR4 dependientes en células gliales | 63 |
| La exposición a HMGB-1 genera un incremento en la expresión del ARNm de TLR4 | 64 |
| El medio condicionado de astrocitos expuestos a HMGB-1 produce sinaptogénesis en neuronas corticales | 66 |
| Los astrocitos expuestos a HMGB-1 alteran la sobrevida neuronal..... | 67 |
| DISCUSION | 77 |
| Inducción de la expresión de TLR4 en astrocitos..... | 78 |
| TLR4 en la conversión de los astrocitos hacia el perfil proinflamatorio que induce degeneración neuronal..... | 80 |
| Los efectos de HMGB-1 como modelo de DAMP en la injuria al SNC..... | 82 |
| La modulación de la conversión astrogliar al fenotipo proinflamatorio-neurodegenerativo | 85 |
| Proyección clínica de los resultados y conclusiones finales | 90 |
| BIBLIOGRAFIA | 94 |

Introducción

Isquemia cerebral: Generalidades y Epidemiología:

El *stroke*, ataque cerebral o isquemia cerebral es un evento que se origina a partir de la reducción del flujo sanguíneo en un área del cerebro, interrumpiendo el transporte normal de oxígeno y nutrientes necesarios para el metabolismo celular. Independientemente de su origen, que puede ser obstructivo o hemorrágico, la isquemia cerebral genera dos zonas claramente definidas. La zona de infarto o *core* (*del inglés*: núcleo) isquémico es el lugar donde se observa el mayor daño causado por la necrosis de todos los tipos celulares. Este daño, que ocurre rápidamente luego de la interrupción del flujo sanguíneo, es considerado irreversible. A partir del *core* isquémico, la injuria se expande en forma radial hacia regiones más distales amplificando el daño original, generando una región afectada en forma secundaria que recibe el nombre de *penumbra isquémica* y rodea al *core* (Figura 1). Los estudios de imágenes en pacientes que sufrieron isquemia cerebral y la subsecuente evolución de las lesiones fueron fundamentales para entender los fenómenos que ocurren en la penumbra (Gondim, 2004; Tong y col., 2014; Lin, 2016) (Figura 2).

En relación con la dinámica temporal de expansión del infarto, se determinó que las intervenciones terapéuticas son más eficientes si se realizan en las primeras horas que siguen a la isquemia cerebral. Hacia la primera hora de sufrida la isquemia, el área afectada de la penumbra ocupa cerca del 50% del territorio isquémico. A partir de allí, el volumen del tejido *salvable* decae considerablemente y, a partir de las 3 horas, la capacidad de recuperación es muy pobre sufriendo la penumbra isquémica muerte celular pero, en este caso, por apoptosis (Hossmann, 2012).

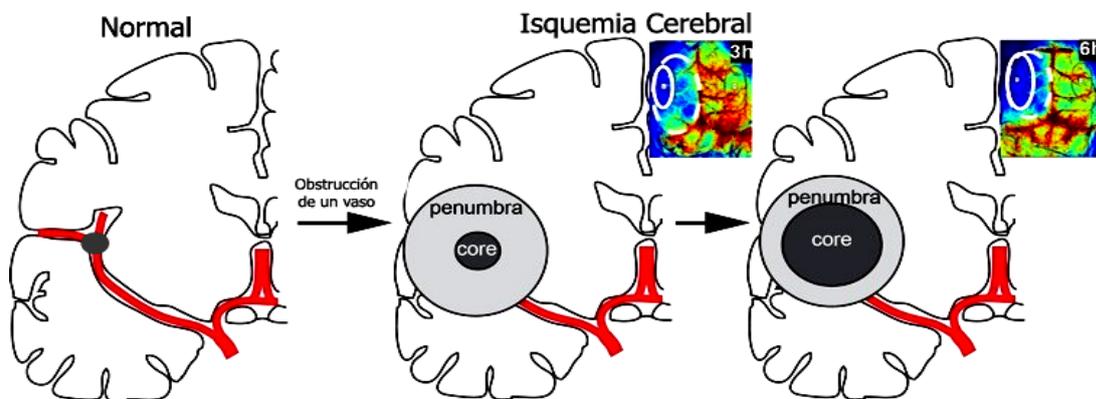


Figura 1: La isquemia cerebral genera zonas definidas en relación al daño del tejido. Se observa la expansión radial del *core* hacia zonas más distales tanto en el esquema como en imágenes de Laser de Speckle tomadas del flujo sanguíneo cerebral de ratones que sufrieron isquemia experimental obstructiva. Adaptado de Sigler y Murphy, (2010).

La lesión isquémica no sólo es una de las principales causas de muerte sino también una importante fuente de discapacidad. Las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud muestran que más de 6 millones de personas durante 2015 murieron a raíz de un accidente isquémico en el mundo y que el mayor número de afectados por estas patologías pertenece a países en desarrollo como Argentina (WHO, 2015). Un estudio demográfico realizado en nuestro país, refleja una prevalencia de 868 casos cada 100 mil habitantes (revisado en Melcon, 2006).

Actualmente el único tratamiento aceptado mundialmente para pacientes que sufrieron un episodio isquémico consiste en la administración del activador del plasminógeno tisular recombinante (t-PAr), el cual actúa como un fibrinolítico. El t-PA es una serina-proteasa de unos 70 kDa que se encuentra en las células endoteliales y es el responsable de activar y convertir el plasminógeno en plasmina. Cuando el t-PAr es administrado, aumenta la formación de plasmina unas 60 veces lo que contribuye a mantener la fluidez sanguínea. A pesar de sus beneficios, esta estrategia sólo es eficaz cuando se suministra dentro de una ventana temporal de 3 horas desde que ocurre el episodio isquémico y solamente es aplicable si no existe riesgo de hemorragia (revisado en Koroshetz, 1996).

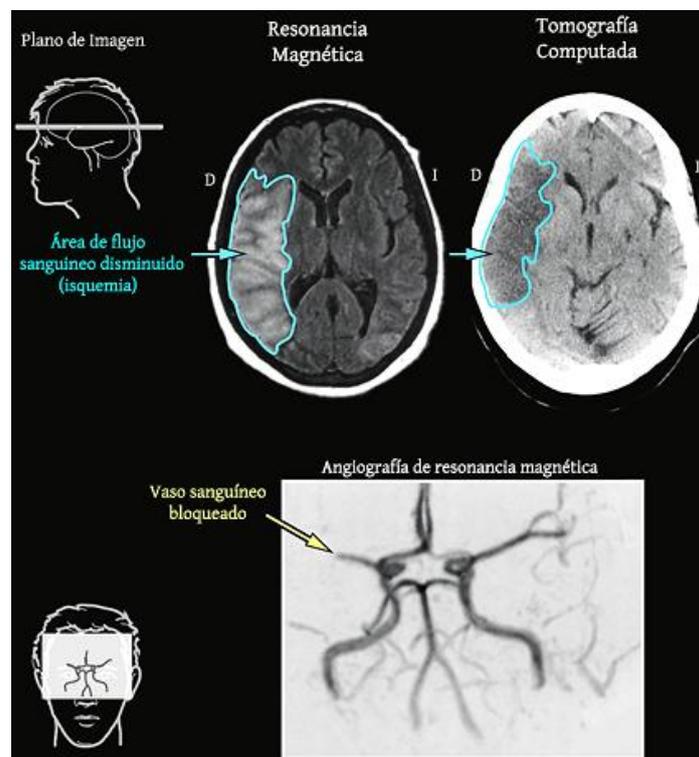


Figura 2: La isquemia cerebral genera zonas definidas en relación al daño del tejido. Se puede apreciar tanto por tomografía como por resonancia el área comprometida como consecuencia de la disminución del flujo normal de sangre. Adaptado de Gondim y Thomas, (2004). En la parte inferior se puede apreciar a partir de una angiografía, un vaso sanguíneo bloqueado el cual impide el correcto transporte de la sangre hacia las regiones irrigadas.

A pesar de los grandes esfuerzos que se realizaron a nivel mundial para desarrollar nuevas estrategias de neuroprotección que sean útiles ante lesiones isquémicas cerebrales, la mayoría de los ensayos clínicos con nuevas drogas demostraron falta de eficacia neuroprotectora. La existencia de mecanismos redundantes y complejas interacciones celulares, permite especular que probablemente las aproximaciones terapéuticas dirigidas a múltiples objetivos celulares mejorarán las posibilidades de preservar la funcionalidad, integridad estructural y las interacciones entre ellas (Moskowitz y col., 2010).

La unidad neurovascular

Las células endoteliales junto con los pericitos, los astrocitos, la microglía, los oligodendrocitos y las neuronas constituyen la denominada *unidad neurovascular* (NVU *del inglés neurovascular unit*), la cual permite establecer en el cerebro un microambiente estrechamente controlado, indispensable para el correcto funcionamiento neuronal (del Zoppo, 2006).

Las células endoteliales y los procesos terminales, pies terminales o pies chupadores de los astrocitos forman la barrera hematoencefálica (BHE), la cual controla el ingreso de macromoléculas, y limita el ingreso de células y patógenos desde la sangre hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) (Sweeney y col., 2016). El endotelio cerebral, también regula el transporte del SNC de metabolitos, nutrientes e iones, y participa en la eliminación de metabolitos tóxicos.

Los pericitos se ubican centralmente en la NVU entre las células del endotelio, astrocitos y neuronas (Figura 3 A). Reciben señales de sus células vecinas y generan respuestas funcionales que son esenciales para procesos como: la permeabilidad de la BHE, la angiogénesis, el *clearance*, el flujo sanguíneo cerebral (CBF, *del inglés Cerebral Blood Flow*) y la neuroinflamación (Armulik y col., 2011) (Figura 3 B).

Los astrocitos, en particular sus procesos terminales, se encuentran en íntimo contacto con la microvasculatura, y son intermediarios funcionales entre las neuronas y los vasos sanguíneos. Estudios recientes de la morfología astrocítica han revelado que la superficie externa vascular está casi completamente cubierta por los pies terminales de los astrocitos (Mathiisen y col., 2010). Estos procesos son compartimentos celulares importantes y altamente especializados (Bindocci y col., 2017). Están enriquecidos en proteínas específicas tales como canales de potasio, acuaporina-4, conexina-43 y receptores purinérgicos (Simard y col., 2003). Además, se demostró que los astrocitos poseen una actividad heterogénea de cambio de los niveles de

calcio, la cual se encuentra compartimentada entre regiones. Los procesos terminales son los que poseen una actividad rápida frecuente, mientras que, generalmente, el soma no se encuentra activo (Bindocci y col., 2017).

Finalmente, en el nivel ultraestructural, los procesos de muchas interneuronas vasoactivas, en particular las que expresan noradrenalina, hacen sinapsis en astrocitos en lugar de hacerlo directamente en los vasos sanguíneos (Hamel, 2006). Estos datos morfológicos y funcionales indican que, existe un acople funcional complejo entre las diferentes células que conforman la NVU y el daño a cualquiera de estos tipos celulares, afectará la funcionalidad del conjunto (Sweeney y col., 2016).

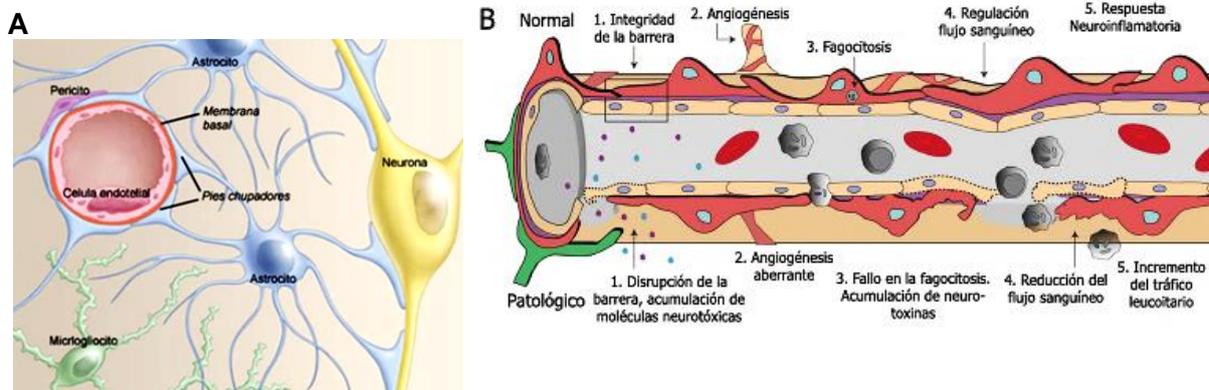


Figura 3: A: Esquema básico de la Unidad Neurovascular. Adaptado de del Zoppo (2006). B: En condiciones fisiológicas la NVU participa en importantes actividades como las mostradas en la figura y, cuando ocurre algún daño en cualquiera de sus componentes se ve gravemente afectada comprometiendo el correcto funcionamiento de la misma. Adaptado de Sweeney y col., (2016).

La unidad neurovascular en la isquemia cerebral

Poco después del inicio de la isquemia cerebral, la disfunción neurovascular se manifiesta por la alteración de la integridad y la función de la barrera hematoencefálica.

A nivel celular, las células endoteliales se convierten rápidamente hacia un perfil proinflamatorio a través de la expresión del gen de la metaloproteína de matriz 9 (MMP del inglés *Matrix Metalloproteinase*) en el núcleo isquémico lo que facilita la disrupción de la barrera. La contracción de los pericitos después de la lesión isquémica da como resultado una constricción microvascular persistente, así los pericitos están implicados en la disfunción hemodinámica microvascular durante el *stroke*. La isquemia cerebral además, induce una considerable disminución en la expresión de la proteína de membrana integrina $\beta 1$ presente en las células endoteliales y en los astrocitos, lo que se condice al observar un aumento de la

permeabilidad vascular (del Zoppo, 2006). En neuronas, la interrupción del flujo sanguíneo durante la isquemia, limita la disponibilidad de oxígeno y glucosa, lo que causa una reducción de los niveles de ATP, la pérdida de los gradientes iónicos e inicia mecanismos excitotóxicos que son perjudiciales. La liberación en exceso de glutamato en el espacio extracelular conduce a la activación de los receptores de glutamato, induce la despolarización de las neuronas y un aumento considerable del calcio intracelular que a su vez activa múltiples vías de muerte intracelular (Taoufik, 2008).

A diferencia de las neuronas, los astrocitos poseen una menor densidad de canales iónicos y una menor demanda energética, lo que les permite mantener su metabolismo por un mayor periodo de tiempo durante la isquemia. Además, los astrocitos poseen la mayor reserva de glucógeno dentro de los tipos celulares del SNC (revisado en Brown, 2004) y alta capacidad de realizar glicólisis (revisado en Bolaños, 2016). Estas reservas de glucógeno pueden beneficiar a las neuronas tanto en circunstancias fisiológicas como patológicas (Brown, 2004).

Los astrocitos convierten el glucógeno en lactato y lo administran a las neuronas vecinas, complementando los requerimientos de energía neuronal durante los períodos de intensa actividad (Rossi y col., 2007). Esta hipótesis denominada *shuttle de lactato* fue verificada por estudios recientes, los cuales han sostenido este modelo metabólico al demostrar *in vivo* la existencia de un gradiente de lactato entre astrocitos y neuronas (revisado en Magistretti, 2018). Estudios recientes, utilizando microscopía de dos fotones con nanosensores, permitieron visualizar los cambios en los niveles de lactato y revelaron que, al agregar piruvato exógeno, el lactato disminuye en astrocitos y luego, después de un retraso, aumenta en las neuronas (revisado en Magistretti, 2018). Otra evidencia de este acople bioenergético es que la recaptación de glutamato por astrocitos aumenta la importación de glucosa dependiente de la actividad desde la circulación hacia el parénquima cerebral tanto *ex vivo* como *in vivo* (revisado en Magistretti, 2018). La evidencia electrofisiológica también indica que el lactato liberado por los astrocitos e incorporado por las neuronas es necesario para mantener la actividad neuronal (Machler y col., 2016).

La inmunidad innata en el Sistema Nervioso Central (SNC)

El concepto del SNC como un sistema inmuno-privilegiado, protegido de su entorno por la BHE, ha llevado a un malentendido con respecto a su naturaleza inmunológica. Los recientes avances en el campo demuestran que el SNC es un órgano

inmunológicamente activo, con respuestas inmunes basadas en la activación del sistema inmune innato (Lampron y col., 2013) e incluso una vigilancia activa por parte del sistema inmune adaptativo (Prinz, 2017). Diferentes trabajos han revelado que, luego de la isquemia cerebral, el número de leucocitos, como así también el número de células gliales y, la expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria, aumentan en las horas siguientes a la isquemia (Offner y col., 2006; Gelderblom y col., 2009; Ding, 2014) (Figura 4).

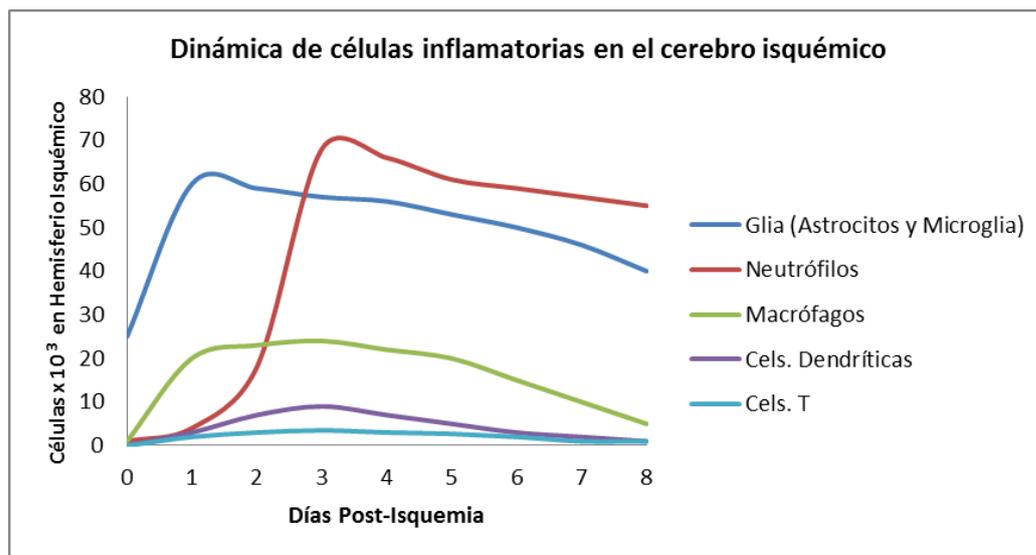


Figura 4: Dinámica del reclutamiento de células inflamatorias en el cerebro isquémico de roedores. El gráfico muestra la contribución de las principales células inflamatorias luego de la isquemia (Adaptado de Gelderblom y col., 2009).

La respuesta inmune innata del SNC se basa en sus células residentes del parénquima cerebral (células gliales), macrófagos meningeales y otras células de linaje mielóide en tránsito en los espacios perivasculares.

La microglía, que son las células inmunes profesionales, residentes del SNC, funcionan como sensores de eventos que ocurren dentro de su microambiente y proporcionan la primera línea de defensa (Griffiths y col., 2009). La microglía responde a las lesiones del SNC con un aumento de la proliferación, motilidad, la actividad fagocítica, y la liberación de citoquinas y especies reactivas de oxígeno (Yang y col., 2010b).

Esta respuesta es generada a partir de la activación de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*), que reconocen estructuras o pequeñas moléculas denominadas PAMPs (del inglés

Pathogen Associated Molecular Pattern). Los PAMPs se encuentran en un gran número de microorganismos e incluyen: proteínas de membranas bacterianas tales como peptidoglicanos, lipopolisacárido de la pared bacteriana (LPS), patrones de ácidos nucleicos tales como CpG no metilado, ADN, ARN de doble cadena y ARN de simple cadena. Los PRR también reconocen moléculas tipo DAMP (del inglés *Damage Associated Molecular Pattern*), por ejemplo proteínas intracelulares, proteínas de shock térmico, productos no proteicos tales como ATP y urea (Kumar y col., 2011).

Existen diferentes familias de PRR. En particular este trabajo de tesis se enfocó sobre los receptores de tipo *Toll* o TLR (del inglés *Toll-like Receptors*) siendo estos de gran relevancia en el SNC. La activación de estos receptores da como resultado la inducción de vías de señalización específicas que conducen a la activación de un factor de transcripción asociado a la respuesta inflamatoria: NF- κ B (del inglés *Nuclear Factor Kappa B*). La posterior activación de genes que contienen sitios para NF- κ B induce la expresión y subsecuente liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β , TNF- α e IL-12, exceptuando TLR3 que conduce a la liberación de otras citoquinas como IFN β (Lampron y col., 2013).

Sin embargo, como comentamos más arriba, el sistema inmune innato no sólo es capaz de activarse por productos bacterianos o virales. Estudios desarrollados en el área de la inmunología han definido el concepto de DAMP para hacer referencia a un conjunto de moléculas endógenas, usualmente localizadas intracelularmente, que al ser liberadas al espacio extracelular tienen la capacidad de activar la respuesta inmune innata. Estas moléculas funcionan esencialmente como señales de alarma frente al daño tisular. El repertorio de DAMP es amplio e incluye: ácidos nucleicos, proteínas de shock térmico (HSP), ATP, proteínas intracelulares como HMGB-1 y S100B, entre muchas otras. Estas moléculas cumplen diversas funciones celulares y comparten la característica de ser liberadas en forma pasiva al espacio extracelular por células que sufrieron muerte por necrosis aumentando así sus niveles extracelulares en regiones del tejido dañado. En algunos casos, su liberación puede darse también en forma activa desde células vivas que han sufrido algún tipo de estrés celular, como ocurre con HMGB-1 y S100B. Una vez en el espacio extracelular, estas moléculas son capaces de interactuar con receptores de superficie como los PRR y desencadenar la activación de cascadas intracelulares proinflamatorias (Hirsiger y col., 2012; Amor y col., 2014) (Figura 5).

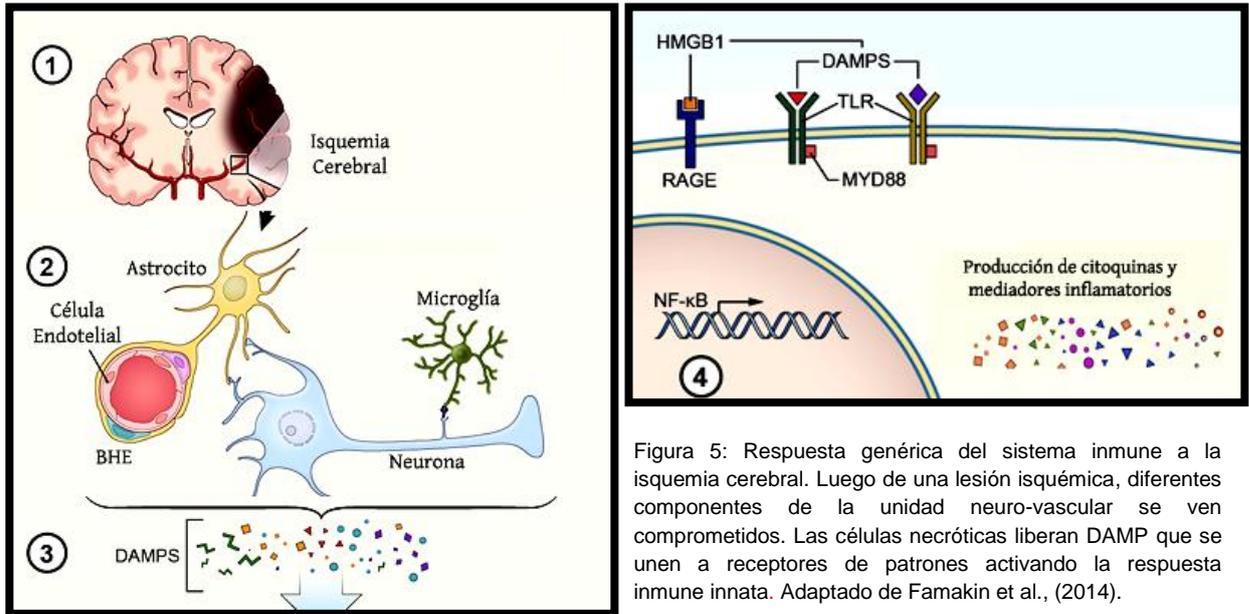


Figura 5: Respuesta genérica del sistema inmune a la isquemia cerebral. Luego de una lesión isquémica, diferentes componentes de la unidad neuro-vascular se ven comprometidos. Las células necróticas liberan DAMP que se unen a receptores de patrones activando la respuesta inmune innata. Adaptado de Famakin et al., (2014).

HMGB-1 como DAMP en la isquemia cerebral

La proteína nuclear no histónica HMGB-1 (del inglés *High Mobility Group Box-1*) pertenece al grupo de las proteínas HMG las cuales pueden unirse directamente al ADN. El gen HMGB-1 humano se localiza en el cromosoma 13q12.3 y fue descrito por primera vez en 1999 (Wang y col., 1999).

HMGB-1 tiene una estructura altamente conservada, contiene dos dominios de unión a ADN similares, denominados box A y box B, cada uno con tres hélices α que se pliegan en una estructura en forma de L o V, y una cola ácida con residuos de ácidos glutámico y aspártico. Posee dos señales de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*) ubicadas en la box A (aminoácidos 28-44) y en la box B (aminoácidos 179-185), respectivamente (VanPatten, 2018) (Figura 6). Además contiene tres residuos de cisteína sensibles al potencial de óxido-reducción, los cuales parecen ser claves para la actividad de esta molécula (Kang y col., 2013).

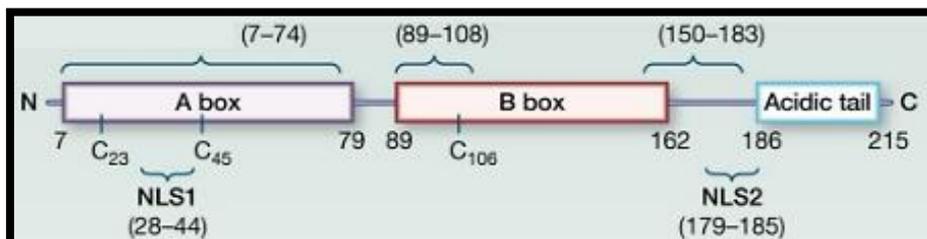
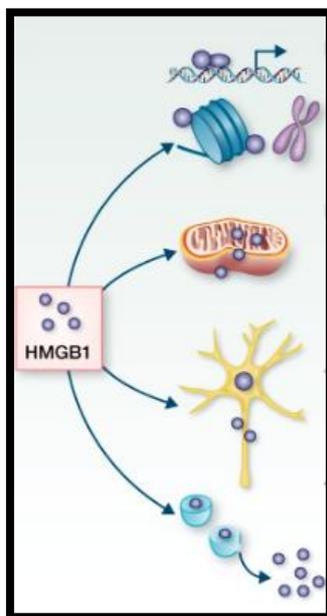


Figura 6: Estructura del DAMP HMGB-1. Adaptado de Kang y col., (2013).

La proteína HMGB-1 tiene numerosos roles en la regulación de procesos intracelulares que han sido ampliamente descritos y resumimos en la figura 7 (Kang y col., 2013). También numerosos trabajos han demostrado la importante contribución de HMGB-1 en situaciones patológicas en el SNC. En el caso particular de la isquemia cerebral, se propone que las células necróticas del *core* y de la penumbra liberan HMGB-1 al espacio extracelular, donde HMGB-1 se comporta como DAMP activando PRR como TLR y RAGE (Muhammad y col., 2008). Los niveles de HMGB-1 se ven drásticamente aumentados en suero luego de la isquemia cerebral tanto en roedores como humanos (Liesz y col., 2015). Estudios en pacientes han puesto en evidencia un aumento en los niveles séricos de HMGB-1 luego de un episodio isquémico, lo que se correlaciona con un peor pronóstico clínico (Yang y col., 2011). Experimentos de pérdida de función, utilizando ARN de interferencia para HMGB-1, mostraron una menor activación de las células gliales y un menor tamaño de infarto en el *knockdown* de HMGB-1, lo que permite especular con una función pro-inflamatoria de esta molécula (Kim y col., 2006; Kim y col., 2008; Qiu y col., 2008). Gong y colaboradores utilizaron glicirricina, que es un inhibidor de HMGB-1 y demostraron un menor volumen de infarto en animales isquémicos (Gong y col., 2014).



En el núcleo: Chaperona ADN. Modulación de la recombinación V (D) J. Reparación del ADN y mantenimiento de los telómeros.

En el citosol o en la mitocondria: Aumenta la autofagia e inhibe la apoptosis. Regula la morfología y la función mitocondrial.

En la superficie celular: Promueve el *sprouting* neuronal y el crecimiento de las dendritas

En el medio extracelular: Funciona como DAMP. Interactúa con múltiples receptores. Regula inflamación, inmunidad, proliferación.

Figura 7: Resumen de las funciones de HMGB-1. Adaptado de la revisión de Kang y col., (2013).

Los receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR) tipo *Toll*

Estructura y funciones

Los receptores TLR, denominados así por su homología con el receptor *Toll* de *Drosophila*, fueron originalmente caracterizados en mamíferos por su respuesta a los PAMPs, especialmente los derivados de las paredes celulares de bacterias como lipopolisacárido (LPS) y peptidoglicano o bien dsRNA y ssRNA virales, citosinas-guanosinas no metiladas y ADN desnudo. Los TLR constituyen una familia de proteínas transmembrana y tienen un rol fundamental en el sistema inmune innato. Recientemente se determinó que los TLR también responden a DAMP, estableciendo una '*vigilancia*' para determinar la existencia de daño tisular y median la respuesta inflamatoria liberando citoquinas y activando la inmunidad innata (Marsh y col., 2009). Se han descubierto 11 receptores en humanos y 13 en ratones (Takeda y col., 2003). Los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 (este último se expresa únicamente en ratones) se expresan en la superficie celular mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en vesículas intracelulares como endosomas y retículo endoplásmico (Kumar y col., 2009) (Figura 8).

Los TLR se expresan constitutivamente en células presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos, células dendríticas y microglía). Sin embargo, la expresión del mRNA de TLR en el SNC también se induce en neuronas y células de la glía luego del stress celular (Marsh y col., 2009). Resultados de esta tesis y estudios recientes de transcriptómica de astrocitos demostraron un incremento significativo de la expresión del gen de TLR4 en astrocitos maduros *in vivo* (Zhang y col., 2016; Rosciszewski y col., 2017).

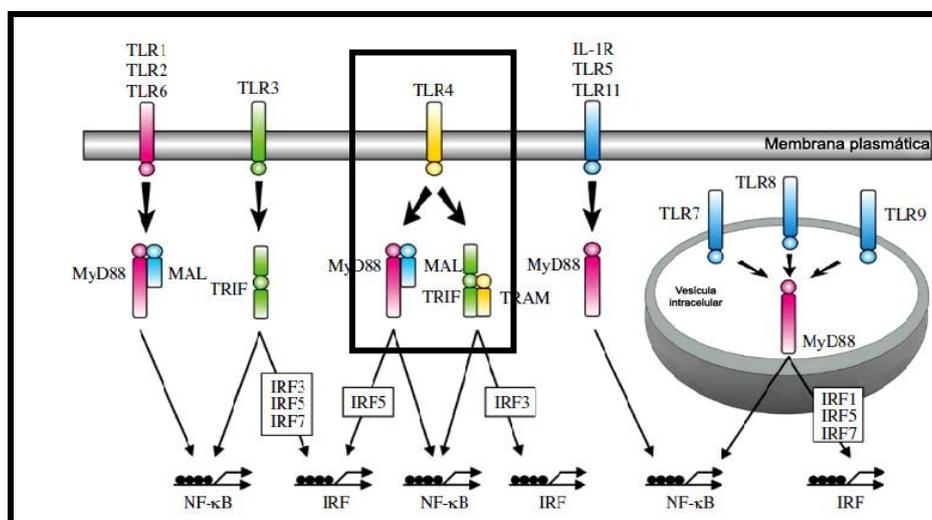


Figura 8: Los TLR constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato. Esquema que muestra los diferentes integrantes de la familia y su sitio de expresión (membrana, endosomas). Adaptado de Ogier-Denis et al., (2008).

La familia de receptores TLR comparten un dominio en el citoplasma llamado TIR (del inglés *Toll/IL-1 Receptor*) que inicia la vía de señalización por la cual los receptores afectan la actividad celular en la presencia de sus ligandos. Esta región se une a otros dominios TIR en proteínas adaptadoras como MyD88 o TRIF y posee zonas N-terminales extracelulares (de 550 a 980 aminoácidos) que contienen una secuencia repetida rica en leucina (LRR) y una secuencia flanqueadora rica en cisteína. A pesar de esta homología, los dominios extracelulares son más variables que los citoplásmicos entre distintos TLR, reflejando su capacidad de unir diferentes ligandos. Luego de la unión a sus ligandos, los TLR forman heterodímeros u homodímeros, lo que parece ser un paso esencial en su activación (Kawai y Akira 2011).

Evidencia acumulada muestra que la lesión isquémica y la inflamación contribuyen a la progresión patogénica de los accidentes cerebrovasculares (Yang y col., 2011). La capacidad de los TLR para mediar respuestas inflamatorias en las células inmunes sugiere su participación en estos y en la isquemia inducida por daño cerebral.

Se ha descrito la activación de TLR4 y TLR2 en diferentes enfermedades neurodegenerativas donde se reconoce un fundamental componente inflamatorio, como por ejemplo en la epilepsia (Maroso y col., 2010), la enfermedad de Alzheimer (Gambuzza y col., 2014), la enfermedad de Parkinson (McCabe y col., 2017) o estadios patológicos como la injuria traumática cerebral (Jiang y col., 2017).

NF-κB en el Sistema Nervioso Central

NF-κB (*del inglés Nuclear Factor Kappa-B*) es un factor de transcripción de expresión ubicua y altamente conservado. Este factor se encuentra formado por la combinación de dos subunidades a partir de siete posibles (p105, p100, p50, p52, RELA o p65, c-REL y RELB).

NF-κB tiene diferentes funciones en el SNC, dependiendo del contexto celular. Es de expresión constitutiva en neuronas glutamatérgicas y glía, siendo además altamente inducible en astrocitos y microglía (Kaltschmidt, 2009). NF-κB puede ser activado por una amplia variedad de agentes entre los que se incluyen virus, toxinas bacterianas tales como lipopolisacárido (LPS), luz UV, estímulos inflamatorios, citoquinas, carcinógenos, promotores tumorales y diversos mitógenos (Shih y col., 2015). La activación se produce a través de dos vías distintas: la vía clásica o canónica y la vía alternativa o no canónica. La vía de activación canónica puede ser iniciada por la activación de una variedad de receptores de superficie celular, incluyendo al receptor de IL-1β, a los receptores TLR y al receptor TNF, en respuesta sus ligandos

proinflamatorios IL-1 β , LPS y TNF- α . En condiciones de reposo, el dímero NF- κ B se localiza en el citoplasma unido a una proteína conocida como I κ B (Inhibidor Kappa B). Los miembros de la familia I κ B incluyen I κ B α , I κ B β , p105 / I κ B γ (precursor de p50), p100 (precursor de p52) e I κ B ϵ (Li, 1997; Whiteside y col., 1997). Ante la señal de activación, la proteína I κ B es fosforilada por las kinasas de I κ B denominadas I κ K lo que lleva a su ubiquitinización y posterior degradación mediada por el proteosoma (Figura 9). Una vez libre, el dímero NF- κ B expone su señal de localización nuclear (NLS, del inglés *Nuclear Localization Signal*), lo que le permite la migración de NF- κ B al núcleo luego de ser reconocido dicho dominio por importinas nucleares (Pasparakis y col., 2006; Niederberger, 2013). Subsecuentemente, NF- κ B se une a las secuencias específicas en los promotores de los genes blanco.

Se ha encontrado una notable vinculación de activación de NF- κ B con una amplia variedad de enfermedades humanas en las cuales existe un alto componente autoinmune / inflamatorio, tanto en el SNC como en la periferia. Por ejemplo asma, aterosclerosis, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral, artritis reumatoide, cáncer, diabetes y osteoporosis (Vallabhapurapu, 2009; Gupta y col., 2010).

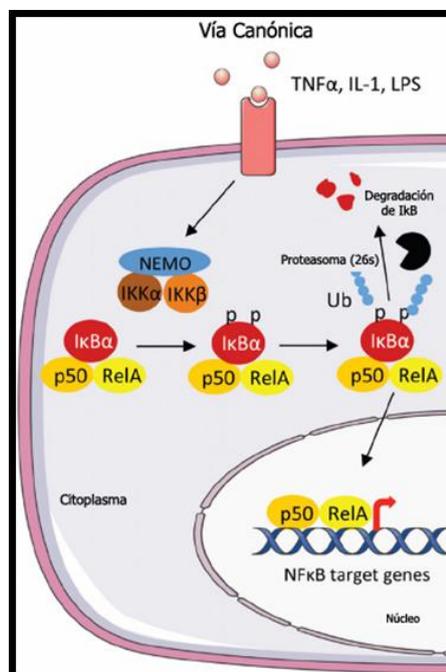


Figura 9: Vía canónica de activación del factor de transcripción NF- κ B. Adaptado de Viennois y col., (2013).

Más allá de su rol en la respuesta inmune innata y la inflamación, se ha descrito que NF- κ B también tiene otras funciones en el SNC, incluyendo su participación en procesos de plasticidad, aprendizaje y memoria (de la Fuente y col., 2014; Zalcman y col., 2015; Salles y col., 2017). A nivel celular, la participación de NF- κ B en estos procesos parece ser mediada, al menos en parte, por la modulación de la plasticidad y la función sináptica (Kaltschmidt y col., 2006), así como el crecimiento de las dendritas (Gutierrez y col., 2005) y de las espinas dendríticas (Boersma y col., 2011).

NF- κ B en la isquemia cerebral

En los últimos años, se ha demostrado que la desregulación de NF- κ B se vincula a mecanismos neurodegenerativos que ocurren en el cerebro durante la isquemia (Schneider y col., 1999). En muestras de cerebro humano *post mortem* de pacientes que sufrieron un accidente cerebrovascular, se pudo observar la translocación nuclear de p65 en áreas del cerebro que rodean al *core* necrótico (Figura 10), lo que permite especular con una activación de NF- κ B en la isquemia cerebral (Nurmi y col., 2004).

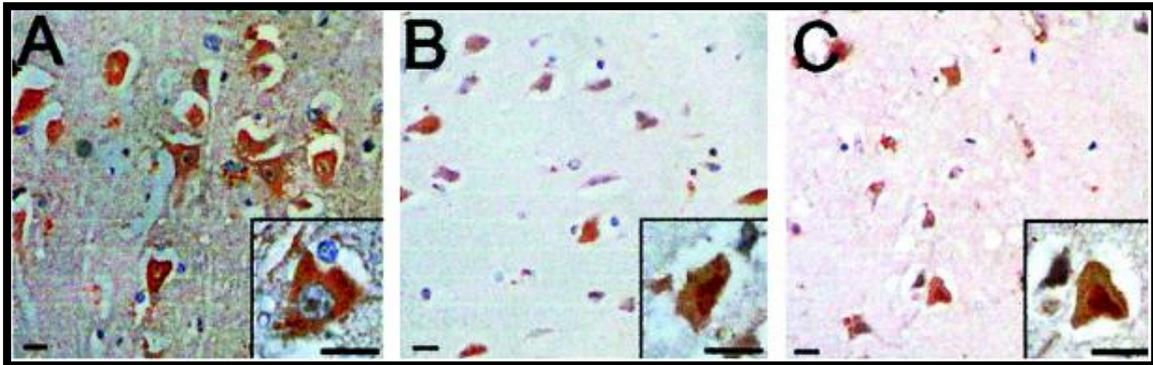


Figura 10: Activación del factor de transcripción NF- κ B luego de la isquemia cerebral. Se observan cortes de cerebros humanos *post mortem* donde se evidencia la marca para p65 en neuronas y un aumento de su localización nuclear. Tomado de Nurmi y col., (2004).

También, se ha observado un aumento de la actividad de NF- κ B en distintos modelos de isquemia cerebral en animales. En el modelo de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAO), por ejemplo, se observan mayores niveles de activación tanto de p65 como de p50 en neuronas de la zona isquémica (Stephenson y col., 2000). Además, en modelos de ratón de isquemia cerebral, tanto permanente como

transitoria, se evidenció un aumento en la actividad transcripcional de NF- κ B (Nurmi y col., 2004).

En los últimos años se han empleado diversos agentes para la modulación de NF- κ B en la isquemia cerebral. Tal es el caso del andrografólido, el cual es un diterpeno lactona que se extrae de una planta (*Andrographis paniculata*). El mismo atenúa la respuesta inflamatoria, luego de producida la isquemia, a partir de la modificación covalente de la subunidad p50 de NF- κ B (Yang y col., 2017).

Otro caso interesante es el empleo de genisteína, el cual es un fitoestrógeno perteneciente a la categoría de las isoflavonas. El prometedor papel farmacológico de la genisteína se atribuye a su capacidad para suprimir la vía de señalización de NF- κ B y Akt, la acción antioxidante directa y las rutas moleculares mediadas por estrógenos y andrógenos que ayudan a mitigar los daños cerebrales y prolongan la supervivencia celular (Nabavi y col., 2015).

La sulfasalazina es un agente antiinflamatorio que se utiliza en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide. Combina un grupo antiinflamatorio no esteroideo (ácido 5-aminosalicílico, 5-ASA) y un resto con actividad antibacteriana (sulfapiridina). El tratamiento con sulfasalazina, pero no con 5-ASA o sulfapiridina, inhibe la activación de NF- κ B inducida por el tratamiento con TNF- α , LPS o éster de forbol (Wahl y col., 1998). La inhibición de la ruta de NF- κ B por la sulfasalazina se asocia con la supresión de la fosforilación de I κ B α que inhibe su posterior degradación (Yamamoto, 2001).

Resveratrol, un polifenol que se encuentra en el vino tinto induce la expresión del gen SIRT1, el cual es un tipo de histona deacetilasa (HDAC). La administración antes y después de generada la isquemia, redujo el volumen de lesión (Yang y col., 2013). En otro estudio, en cultivos primarios de microglía y astrocitos, el resveratrol inhibió la activación del NF- κ B (Chen y col., 2005). Mediante el uso de inhibidores de HDAC, la acetilación de las subunidades de NF- κ B puede modificarse y ya ha demostrado ser efectiva para atenuar los déficits neurológicos y la pérdida neuronal en varios modelos animales de isquemia cerebral (Ren y col., 2004; Kim y col., 2007).

La gliosis reactiva como mecanismo de respuesta frente al daño al SNC

Los astrocitos son componentes fundamentales de la NVU y constituyen aproximadamente el 30% de las células gliales en el SNC, donde cada astrocito ocupa un territorio único delimitado por procesos no superpuestos que se extienden desde el soma celular (von Bartheld y col., 2016). Las extremidades distales de estos procesos forman los límites de la glía cuando envuelven la lámina basal parenquimatosa

asociada con vasos sanguíneos o meninges (revisado en Sofroniew, 2015). Los astrocitos son primordiales para las funciones normales del SNC, incluido el mantenimiento de la homeostasis del glutamato, potasio extracelular y del agua (revisado en Sofroniew, 2010). Los astrocitos están funcionalmente conectados a los astrocitos adyacentes y a los oligodendrocitos mediante uniones tipo gap, formando así grandes redes gliales que se componen de cientos de células (Orthmann-Murphy y col., 2008). La notable interacción entre prolongaciones astrogliales y sinapsis ha dado lugar a la teoría de la sinapsis tripartita, donde un solo astrocito se conecta con decenas de miles de sinapsis neuronales, probablemente para regular la transmisión sináptica neuronal, liberando glutamato, D-serina y ATP (revisado en Santello, 2010).

Los astrocitos también participan en el podado (del inglés *pruning*) de las sinapsis etiquetando con proteínas del complemento aquellas que deben ser fagocitadas por la microglía (Chung y col., 2015). La interacción con las neuronas también parece ser capaz de modificar la expresión génica, en las neuronas circundantes ya que los astrocitos secretan exosomas que contienen miARN y serían capaces así de controlar la estabilidad y traducción de mRNA neuronales (Lafourcade y col., 2016).

Como se comentó anteriormente, los astrocitos se acoplan metabólicamente a las neuronas, entregando lactato para el metabolismo neuronal y proporcionando antioxidantes como el glutatión y la tioredoxina (Masutani y col., 2004; revisado en Magistretti, 2018; Bolaños, 2016). Los astrocitos también participan en la producción de neuroesteroides, como alopregnanolona, estrógeno y dehidroepiandrosterona (DHEA), que se sintetizan en el SNC, donde modulan la excitabilidad neuronal, promueven la mielinización y atenúan las respuestas proinflamatorias en los astrocitos (Schumacher y col., 2012). En un trabajo reciente, la administración de progesterona fue capaz de atenuar la astrogliosis y microgliosis y además promovió la diferenciación de oligodendrocitos luego de una lesión en la médula espinal (Labombarda y col., 2011). Cabe aclarar que los niveles endógenos de alopregnanolona no serían suficientes para conferir neuroprotección después del *stroke*. Un trabajo reciente demostró que utilizando ratones *knockout* para el receptor de progesterona (PR) durante el *stroke*, no se modificaban los niveles de esta hormona y, ni la alopregnanolona endógena ni el tratamiento con una dosis elevada de progesterona exógena protegieron la lesión generada por la isquemia en ratones PR *knockout* (Liu y col., 2012).

El rol de los astrocitos en el SNC sano parece ser fundamentalmente anti-inflamatorio a través de la secreción constitutiva de bajo nivel de las citoquinas antiinflamatorias TGF- β e IL-10, expresión del ligando Fas (revisado en Choi, 2004), la inducción de la regulación del receptor CTLA-4 en las células T *helper* (Gimsa y col., 2004; Ponath y

col., 2018) y la interacción con linfocitos Treg (revisado en Xie, 2015). Frente a la injuria al SNC, los astrocitos responden en forma genérica mediante un fenómeno conocido como gliosis reactiva o más específicamente astrogliosis reactiva. Este fenómeno se evidencia a nivel morfológico por un aumento en el tamaño celular (hipertrofia) y en la complejidad de las proyecciones astrogliales (Figura 11).

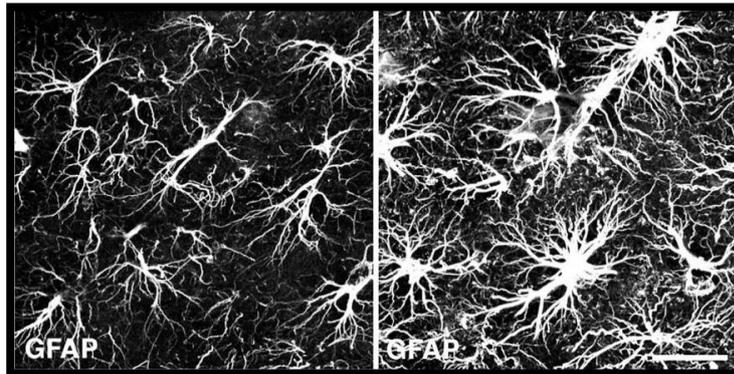


Figura 11: La astrogliosis reactiva como mecanismo de activación frente a la injuria. Se puede observar un aumento de la expresión de la proteína de GFAP luego de una injuria traumática en el hipocampo. Adaptado de Pekny et al., (2016).

La astrogliosis es un proceso que ocurre en forma continua y progresiva en el tiempo, en el cual, los astrocitos pueden alcanzar distintos estadios o niveles de activación. Si bien la astrogliosis es un proceso altamente genérico, se han detectado diferentes respuestas de acuerdo al tipo de lesión (revisado en Sofroniew, 2009).

Dependiendo de la severidad del daño, los astrocitos pueden sufrir modificaciones morfológicas que van desde hipertrofia moderada (evidenciada por un incremento del tamaño celular, aumento del número de prolongaciones y una sobre-expresión de la proteína GFAP) hasta la formación de una cicatriz glial en condiciones más severas donde los astrocitos comienzan a filamentarse perdiendo por completo su morfología original y reorientándose para cubrir así los bordes de la lesión. En las astrogliosis más severas, también se observa una hiperplasia celular donde los astrocitos comienzan a proliferar (revisado en Sofroniew, 2009). Trabajos más recientes han demostrado que sólo los astrocitos perivasculares son susceptibles de proliferar (Bardehle y col., 2013).

Los astrocitos reactivos también pueden ser promotores de la respuesta inflamatoria luego de su activación. Este proceso involucraría liberación de citoquinas y otras moléculas capaces de activar la respuesta inmune innata con reclutamiento de células

de la microglía pero también facilitando el infiltrado de leucocitos en la zona lesionada del SNC (revisado en Cekanaviciute, 2016).

En cuanto a la cicatriz glial (considerado el estadio más avanzado de gliosis reactiva), se ha mostrado que esta sería capaz de reducir el daño al generar una barrera en los márgenes del *core* isquémico, lo que limitaría la propagación inflamatoria. Sin embargo, también se ha mostrado que su formación impide el crecimiento axonal resultando perjudicial para la reconexión neuronal luego del infarto cerebral (revisado en Sofroniew, 2009; Wanner y col., 2013).

Con el advenimiento de la transcriptómica (Zamanian y col., 2012) y luego con la disponibilidad de RNAseq específica de astrocitos reactivos (Liddelow y col., 2017; Clarke y col., 2018) se pudo definir el concepto de polarización astrogliar al *fenotipo proinflamatorio* que induce neurodegeneración. Así, actualmente se acepta que los astrocitos reactivos pueden sufrir una polarización a diferentes fenotipos. Los astrocitos polarizados al fenotipo reactivo A1 son neuroinflamatorios, aumentan la expresión de diferentes genes asociados con la cascada del complemento y la expresión de citoquinas proinflamatorias. Por el contrario los astrocitos polarizados al fenotipo A2 tendrían actividad neuroprotectora ya que expresan diferentes factores que facilitan la supervivencia neuronal, reclutan microglía polarizada al fenotipo alternativo M2, expresan citoquinas antiinflamatorias y favorecen la reconexión sináptica (Liddelow y col., 2017).

Conocer las bases moleculares de la activación proinflamatoria glial y sus puntos de control es un paso esencial para el desarrollo de nuevas estrategias de neuroprotección que contribuyan a reducir el impacto de dicha respuesta no solo en la isquemia cerebral sino en otras neuropatologías donde se reconoce un fundamental componente inflamatorio, como por ejemplo en la epilepsia (Maroso y col., 2010), la enfermedad de Alzheimer (Businaro y col., 2017), la enfermedad de Parkinson (Gao y col., 2011) o estadios patológicos como la lesión traumática cerebral (Corps y col., 2015).

Heterogeneidad astrogliar

La heterogeneidad astrogliar ha sido observada pasivamente por los neurocientíficos durante mucho tiempo, pero no fue hasta la última década en donde se aceptó seriamente que hay un número no del todo definido de subfamilias astrogliales más allá de los clásicos fenotipos protoplásmicos y fibrosos, incluso en una misma región anatómica del SNC (Bardehle y col., 2013; Martin-Lopez y col., 2013; revisado en

Ramos, 2016). Esta heterogeneidad incluye las diferencias relacionadas con la morfología, el origen en el desarrollo (Bayraktar y col., 2014), los perfiles de expresión génica (Bachoo y col., 2004; Zamanian y col., 2012), las interacciones célula-célula (Petzold and Murthy, 2011) y las respuestas a la lesión (revisado en Sofroniew, 2014). Las distinciones en las propiedades de los astrocitos regionales también se extienden al nivel de expresión de receptores y de canales iónicos, la conectividad entre uniones gap y las propiedades de señalización del calcio (Agulhon y col., 2010; Oberheim y col., 2012).

Diferentes trabajos muestran evidencia acerca de estas diversas subpoblaciones astrogiales. Por ejemplo, un estudio clásico mostró que las células madre del hipocampo de ratas adultas se diferenciaron en neuronas cuando se cocultivaron con astrocitos del hipocampo, pero no cuando se cocultivaron con astrocitos derivados de la médula espinal (Song y col., 2002).

Otro ejemplo son los astrocitos en las diferentes regiones del hipocampo que muestran heterogeneidad en su morfología. En la zona del CA1, muchas células muestran una morfología fusiforme o alargada con una orientación paralela a las dendritas apicales de las células piramidales (Nixdorf-Bergweiler, 2001; Bushong y col., 2002). En contraste, los astrocitos en el estrato *lacunosum moleculare* son más pequeños y están más densamente empaquetados y sus procesos principales están orientados aleatoriamente (Wallraff y col., 2006). La densidad de astrocitos en la zona *lacunosum moleculare* es mayor que en el *stratum radiatum*, tanto en el CA1 como en la región CA3. Además, se han observado diferencias en la densidad de astrocitos en el giro dentado al comparar el hipocampo dorsal y ventral (revisado en Ogata, 2002).

Höft y colaboradores describieron dos subpoblaciones de astrocitos en el tálamo que podrían distinguirse por la expresión de receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-soxazolpropiónico (AMPA). Esos astrocitos AMPA positivos tienen una densidad de corriente rectificadora de canales de potasio menor que los astrocitos que no expresan estos receptores (Hoft y col., 2014).

Okuda y colaboradores postulan al anticuerpo CS56, el cual podría usarse para identificar una subpoblación de astrocitos corticales y delinear así los territorios astrocíticos en el cerebro adulto (revisado en Okuda, 2018).

En la corteza cerebral de la rata, la dinámica de las oscilaciones espontáneas en los niveles de Ca^{2+} muestra patrones de capas específicas. Las características electrofisiológicas de los astrocitos del hipocampo de rata también varían según su localización en diferentes subregiones (revisado en Takata, 2008).

En conjunto, estas diferencias tienen implicaciones importantes no sólo para las propiedades fisiológicas de los astrocitos, sino también para las contribuciones que

hacen a la función del SNC, su desarrollo y plasticidad, incluidas las respuestas a lesiones y patologías. Trabajos recientes han demostrado la existencia de distintos subconjuntos de astrocitos que se polarizan hacia el sitio de la lesión, mientras que otros conservan su morfología a pesar de reaccionar claramente a la lesión volviéndose hipertróficos y un subconjunto distinto, localizado en sitios yuxtavasculares que proliferan (Bardehle y col., 2013).

Estas evidencias son importantes y nos permiten especular con la posibilidad de modular en forma selectiva las diferentes poblaciones astrogliales, con miras a mejorar la evolución de una lesión cerebral.

Hipótesis y Objetivos

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es comprender como los astrocitos responden a una lesión isquémica cerebral y evidenciar algunos blancos moleculares que puedan ser útiles para estrategias de neuroprotección.

Hipótesis:

La hipótesis de trabajo se construyó a partir evidencias publicadas y resultados preliminares del laboratorio. Experimentos de otros grupos realizados con ratones *knockout* para TLR4 demostraron que estos receptores están involucrados en el desarrollo de la lesión isquémica, pero se desconoce si estos efectos eran dependientes de la activación de estos receptores en los distintos tipos celulares del SNC (Yang y col., 2010a). En cuanto a los ligandos de TLR4 en el daño al SNC, se ha propuesto que moléculas de tipo DAMP como HMGB-1 son liberadas desde las células en necrosis luego de la isquemia cerebral (Muhammad y col., 2018).

Nuestra hipótesis de trabajo propone que la activación de TLR4 durante la isquemia cerebral, participa en la conversión glial hacia el perfil proinflamatorio que induce neurodegeneración, efecto que probablemente involucra la actividad del factor de transcripción NF- κ B.

Para testear esta hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico I: Estudiar la distribución del receptor TLR4 *in vivo* en un modelo experimental de isquemia cerebral por devascularización cortical. En particular fueron analizadas la distribución *core-penumbra* isquémica de este receptor y su localización en los diferentes tipos celulares.

Objetivo específico II: Estudiar los efectos de la interacción entre DAMP/TLR *in vivo* en el modelo experimental de isquemia cerebral. Para ello evaluamos como se activan los mecanismos de señalización río abajo de TLR4, lo relacionamos con el patrón de sobrevida neuronal y gliosis reactiva en experimentos de pérdida de función.

Objetivo específico III: Estudiar las consecuencias de diferentes niveles de activación de TLR4 por DAMP Y PAMP *in vitro* en cultivos primarios neuronales y gliales.

Objetivo específico IV: Estudiar la gliosis reactiva *in vivo* en un modelo de isquemia cerebral. En particular fueron analizadas la respuesta de células gliales y neuronas frente al daño y los efectos del bloqueo de NF- κ B con sulfasalazina sobre esta respuesta.

Materiales y Métodos

Experimentos *in vivo*

Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (250-300 g) del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Ratones (25-30 g) *knockout* para TLR4 (TLR4 B6.B10ScNTlr4^{lps-del}/JthJ) y TLR2 (B6.129-Tlr2^{tm1Kir}/J) (The Jackson Laboratory, USA) fueron generosamente cedidos por el Dr. Pablo Iribarren y la Dra. Mariana Maccioni (CIBICI, UNC, Córdoba, Argentina). Los animales fueron mantenidos en un ambiente de humedad y temperatura controladas. Su manejo y exposición al protocolo experimental fue realizado bajo las normas y protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Estos protocolos se desarrollan de acuerdo a las normas para uso y cuidado de animales de experimentación de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH) y a las recomendaciones de la *Society for Neuroscience* (SfN).

Modelo de isquemia cerebral por Devascularización Cortical

El modelo de isquemia por devascularización cortical (DC) ha sido extensamente usado en la literatura y por el laboratorio (Figueiredo y col., 1993; Maysinger y col., 1994; Ramos y col., 2004; Villarreal y col., 2014; Villarreal y col., 2016; Murta y col., 2018). Brevemente, la cirugía fue realizada en ratas Wistar anestesiadas por vía intraperitoneal con ketamina-xilazina (90 mg/kg-10 mg/kg). Luego los animales fueron colocados en un marco estereotáxico con el fin de mantener fija la cabeza del animal y la cirugía se realizó bajo lupa. Utilizando un bisturí de 15 mm se disecó el músculo temporal y la fascia para exponer el cráneo el cual fue trepanado hasta lograr una abertura de 2x2 mm aproximadamente entre la sutura coronal y la línea del bregma en un solo hemisferio del cerebro. Luego, mediante la utilización de una aguja de 27G, se realizaron cortes sobre la piamadre a modo de generar un daño sobre los vasos sanguíneos superficiales que irrigan la corteza cerebral superficial, lo que produce una isquemia cortical focal permanente y muy localizada. Durante todo el procedimiento se utilizaron hisopos estériles embebidos con solución salina estéril con el fin de eliminar la sangre debido a la pequeña hemorragia generada. Una vez verificado el cese de la hemorragia (no más de 50 segundos) la incisión en la piel se cerró con el músculo temporal y la fascia utilizando un pegamento cutáneo. Durante la cirugía y

recuperación de la anestesia la temperatura de los animales fue controlada y mantenida con calefacción si así era requerido. Luego de la recuperación, los animales fueron colocados en jaulas separadas (Figura 12).

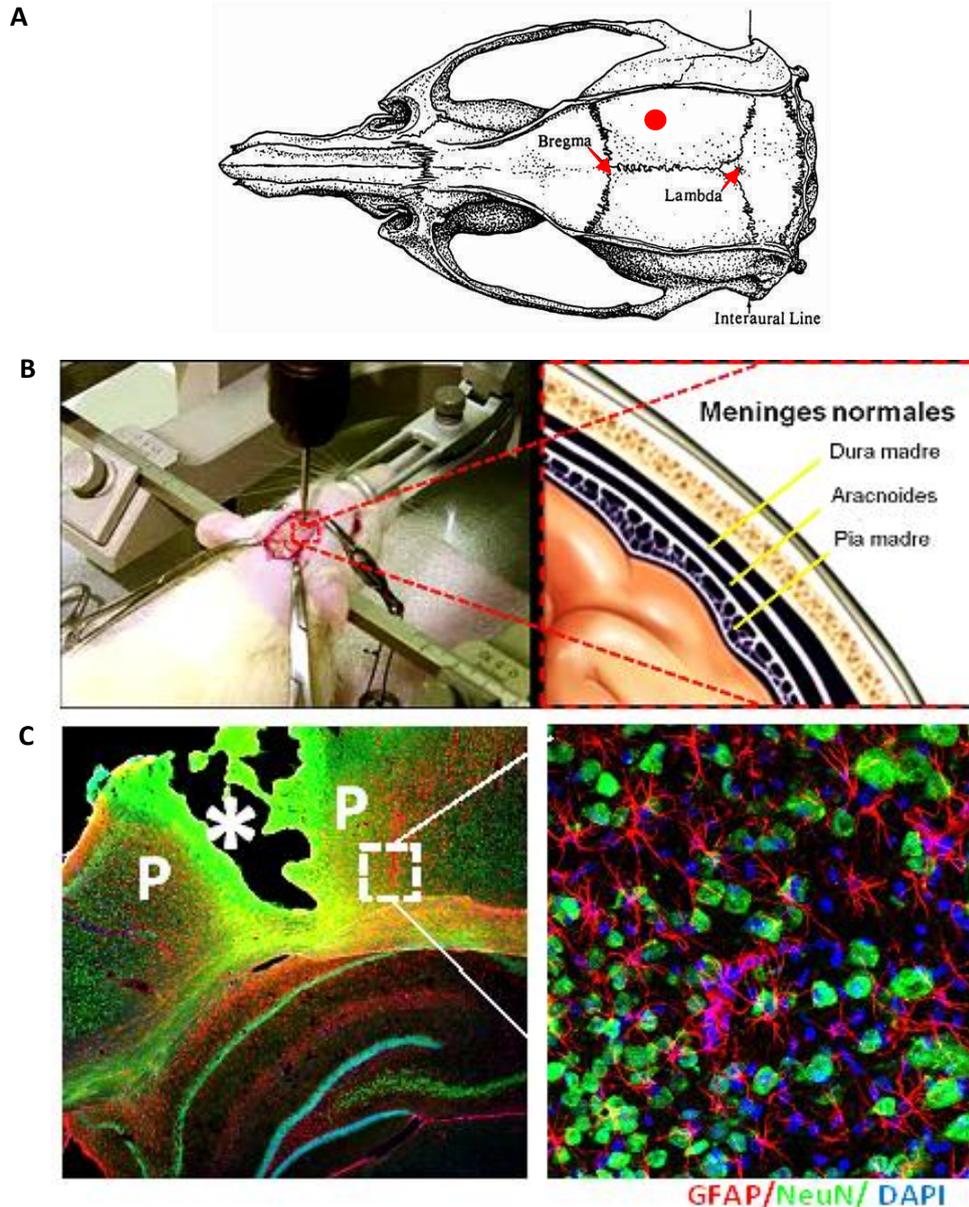


Figura 12: Modelo de isquemia cerebral por Devascularización Cortical (DC). A: Se indican con flechas la ubicación de los puntos anatómicos del cráneo Bregma y Lambda según la definición del Dr. George Paxinos (George Paxinos y Charles Watson: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, Nueva York, 1998, p.11) En rojo se indica la zona donde se genera la DC. B: El modelo consiste en una pequeña lesión en la zona de la pía-aracnoides (corteza pre frontal) que genera una isquemia focal y permanente. C: Imágenes representativas obtenidas en ratas luego de ser sometidas a DC. Se observan cortes coronales de 7 DPI con su respectiva magnificación a la derecha. Se distinguen la zona de *core* (asterisco) y bordeando la misma la zona de la penumbra (P). Se observan astrocitos marcados con GFAP y neuronas con NeuN. Se utilizó DAPI para visualizar los núcleos.

La lesión únicamente se realizó en el hemisferio derecho, por lo que el hemisferio contralateral fue utilizado como control en la mayoría de los experimentos. Alternativamente también se utilizaron animales *sham* en los que se realizaron la abertura en el cráneo pero se dejó intactas las meninges. Los animales tratados se dividieron en distintos grupos y fueron eutanasiados en cámara de CO₂ a distintos tiempos luego de la DC o bien perfundidos por vía intracardíaca bajo anestesia profunda con ketamina-xilazina, típicamente a 1-3-7-14 días.

En algunos experimentos, luego de ser sometidos a la isquemia, los animales recibieron el bloqueante químico de NF-κB sulfasalazina (Sigma cat# S0883) o vehículo por vía intraperitoneal. La dosis de sulfasalazina fue de 200 mg/kg cada 12 horas y los animales se eutanasiaron a 3 o 14 DPI (DPI, días post-isquemia).

Fijación de animales por perfusión intracardíaca

Los animales fueron anestesiados profundamente con una solución de ketamina-xilazina (90 mg/kg-10 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal y luego perfundidos a través del ventrículo izquierdo con 50 ml de solución salina conteniendo 5000 UI/ml de heparina con el objetivo de lavar el sistema circulatorio y prevenir la coagulación sanguínea. Luego los animales fueron perfundidos con 300 ml de solución fijadora conteniendo 4% (p/v) paraformaldehído en *buffer* fosfato 0.1 M; pH 7.4. Una vez finalizada la perfusión se disecaron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego los cerebros se mantuvieron en una solución de 5 % (p/v) de sacarosa en *buffer* fosfato 0.1 M, pH 7.4 por 18 horas para luego ser transferidos a una solución de sacarosa 30% (p/v) en *buffer* fosfato 0.1 M, pH 7.4 por otras 48 horas para lograr la crioprotección del órgano. Por último, los cerebros fueron rápidamente congelados a -80°C por 3 horas y luego almacenados a -20°C hasta ser seccionados en crióstato.

En crióstato se obtuvieron secciones de tejido de 30 μm de espesor en flotación. Las secciones se colocaron luego en forma seriada en placas *multiwell*. De esta manera, se logra obtener una representación completa de la lesión o zona de interés. Las secciones fueron preservadas a -20°C en solución crioprotectora compuesta por fosfato de sodio 0.05 M, etilen glicol 30% (v/v) y glicerol 20% (v/v) hasta ser utilizadas en ensayos histológicos.

Inmunohistoquímica de cortes en flotación

Secciones de los distintos grupos experimentales fueron procesadas simultáneamente bajo las mismas condiciones utilizando placas *multiwell*. Allí fueron lavados una vez en PBS y otra vez en agua destilada para luego ser deshidratados por sucesivos pasajes en alcoholes de graduación creciente (25%, 50%, 70%, 96% y 100%). Terminados los pasos de deshidratación se inhibió la peroxidasa endógena incubando en una solución de peróxido de hidrógeno 0.03% (v/v) en metanol durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego los cortes fueron rehidratados por sucesivos pasajes en alcoholes de graduación decreciente (100%, 96%, 70%, 50% y 25%) y agua y posteriormente permeabilizados con una solución de Tritón 1% en PBS durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos incubando los cortes de tejido con una solución conteniendo suero normal equino (SNE) 3% (v/v) y Tritón 0.5% (v/v) en PBS durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente. Luego se incubaron las secciones con los anticuerpos primarios diluidos en una solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS por 36 horas a 4°C en agitación lenta. Luego los cortes fueron lavados 3 veces con una solución de Tritón 0.025% (v/v) en PBS (PBS-X) e incubados durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos conjugados a biotina y diluidos 1:500 en solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS. Posteriormente los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-X e incubados por 1 hora con el complejo extravidina-peroxidasa diluido 1:500 en una solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS, manteniéndose en agitación a temperatura ambiente. Se lavaron los cortes 3 veces con PBS-X y una vez con *buffer* acetato 0.1 M pH 5.5. El revelado se llevó a cabo por incubación de los cortes con una solución de diaminobencidina (DAB) 0.035% (p/v) y sulfato de níquel (II)-amonio 2.5% (p/v) en *buffer* acetato 0.1 M pH 5.5 (solución de DAB-níquel) que se hizo reaccionar con peróxido de hidrógeno (0.1% v/v). La reacción se detuvo retirando la solución de revelado y por dilución en *buffer* acetato. Posteriormente los cortes fueron montados en portaobjetos de vidrios gelatinizados y secados a temperatura ambiente, lavados en xilol y finalmente cubiertos con DPX (Sigma cat# 44581) y cubreobjetos. Las secciones de tejido animal procesadas para inmunohistoquímica fueron visualizadas en microscopio óptico Zeiss Axiophot equipado con cámara digital Olympus Q5. Las fotomicrográficas capturadas fueron almacenadas en formato digital hasta posterior análisis.

Inmunofluorescencia de cortes en flotación

Alternativamente, algunas secciones se procesaron por inmunofluorescencia. En esta técnica, los cortes fueron seleccionados como se indicó para inmunohistoquímica y lavados con PBS. Luego fueron permeabilizados incubándolos con una solución de Tritón 1% (v/v) en PBS durante 60 minutos en agitación. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos incubando los cortes con una solución conteniendo SNE 10% (v/v) y Tritón 0.5% (v/v) en PBS durante 60 minutos en agitación a temperatura ambiente para luego incubar con los anticuerpos primarios diluidos en una solución de SNE 1% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS por 36 horas a 4°C en agitación lenta. Los cortes fueron lavados 3 veces con PBS-X e incubados durante 4 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios específicos conjugados a fluoróforos del tipo *Alexa Fluor 594* y *488* (Jackson ImmunoResearch). Los anticuerpos secundarios fueron diluidos 1:800 en una solución de SNE 3% (v/v) y Tritón 0.3% (v/v) en PBS. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-X seguido de una incubación con el colorante nuclear fluorescente Hoechst 33342 (2 µg/ml) o DAPI (0.1 µg/ml) en PBS durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente. Por último, los cortes fueron lavados 2 veces con PBS, montados en portaobjetos de vidrios y cubiertos con glicerol 30% (v/v) en PBS. Luego se colocó el cubreobjetos y se realizó el sellado con esmalte. El detalle de los anticuerpos primarios y secundarios está indicado en las Tablas 1 y 2 respectivamente.

Las secciones de tejido animal procesadas para inmunofluorescencia fueron visualizadas en microscopio invertido Olympus IX81 computarizado y equipado con cámara digital de video DP71. Las fotomicrografías capturadas fueron almacenadas en formato digital hasta posterior análisis. Para cada campo se obtuvieron 3 fotomicrografías, una correspondiente a cada canal (Rojo/Verde/Azul). La fotocomposición o *merge* de los tres canales fue realizada mediante el uso del software NIH-ImageJ versión 1.51 j8. Alternativamente, algunas de las secciones de tejido animal procesadas para inmunofluorescencia fueron visualizadas en microscopio confocal Olympus FV-1000/UX81. En este caso se obtuvieron 11 imágenes contiguas en el eje Z de 2 µm de espesor para cada canal (Rojo/Verde/Azul). Cada una de las imágenes corresponde a un plano focal del eje Z. Las fotomicrografías de microscopía confocal mostradas en la sección de resultados corresponden a la proyección de los 11 planos focales. La fotocomposición o *merge* de los tres canales fue realizada mediante el uso del software NIH-ImageJ 1.51 j8 para PC.

Inmunoblot de homogenatos de corteza

Animales sometidos a isquemia por DC fueron anestesiados con ketamina-xilazina (90 mg/kg-10 mg/kg i.p.) y sacrificados por decapitación a 3, 7 o 14 DPI. Rápidamente y trabajando sobre hielo, se disecaron los cerebros y se extrajo por animal un fragmento de la corteza isquémica y otro de igual tamaño de la corteza contralateral. El tejido fue conservado en tubos tipo *Eppendorf* a -80°C hasta ser homogeneizado. Para la homogeneización, se agregó a cada tubo 1 ml de *buffer* de homogeneización, al cual se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas al 10% (Sigma cat# 78830) y PMSF (PMSF del inglés *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*) al 5%. La muestra fue colocada en un *potter* de vidrio para realizar la disgregación mecánica utilizando un homogeneizador eléctrico manteniendo las muestras sobre hielo. Luego se realizó una centrifugación a 14000 RPM por 10 minutos a 4°C para obtener un pellet que contenía la fracción nuclear y de membranas y un sobrenadante con la fracción citoplasmática. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y luego el contenido proteico de las muestras fue normalizado antes de sembrarlas en los geles para electroforesis. Las muestras fueron desnaturalizadas, separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y transferidas a una membrana de nitrocelulosa de $0.22\ \mu\text{m}$ (BioRad). El bloqueo de sitios de unión inespecífica se realizó con una solución de leche en polvo descremada o BSA (Sigma cat# A4737) al 5% en TBS-T (10 mM Tris, pH 8.0. 150 mM NaCl, 2% Tween 20) por dos horas a temperatura ambiente y con agitación. Luego de quitar la solución de bloqueo, se incubó con los anticuerpos específicos diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C y con agitación suave. Luego de tres lavados con TBS-T las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa diluidos en solución de bloqueo durante 2 horas, a temperatura ambiente y con agitación. Por último, se lavó tres veces con TBS-T. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas usando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Pierce) y placas radiográficas (AGFA). Por último, las placas radiográficas fueron digitalizadas utilizando un scanner y la cuantificación de la densidad óptica de cada banda se realizó utilizando el *software* Image J 1.51 j8. El detalle de los anticuerpos utilizados está indicado en las tablas 3 y 4.

Experimentos *in vitro*

Cultivos primarios de astrocitos corticales de rata o ratón

Los cultivos se realizaron según está descrito previamente (McCarthy, 1980) con algunas modificaciones (Villarreal y col., 2014). Se disecaron cortezas de ratas Wistar

o ratón C57BL/6 en estadio de 3-4 días post natal. El tejido fue disgregado mecánicamente empleando tijeras de cirugía estériles y pipetas pasteur. Luego de sucesivos lavados en medio de cultivo DMEM con glutamina sin suero, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio DMEM completo (DMEM + suero fetal bovino 10% + penicilina/estreptomicina 100 µg/ml) para ser sembradas en botellas de cultivo de 25 cm² recubiertas con poli-L lisina. El medio fue reemplazado por medio completo cada 48 h hasta alcanzar la confluencia (8-10 días), para luego ser tripsinizados y resembrados en las placas multiwell donde se desarrollaron los experimentos. Esos cultivos contenían aproximadamente un 60% de astrocitos y un 40% de microglía aproximadamente, por lo que los consideramos cultivos mixtos gliales. Con el objetivo de enriquecer los cultivos de astrocitos limitando la abundancia de microglía, las botellas de cultivo mixto obtenidas con el protocolo anterior fueron mantenidas en agitación (145 RPM) durante 48 horas y los cultivos lavados con DMEM para eliminar la microglía que crece por encima de la monocapa de astrocitos. Luego se añadió por 24 horas 50 µg/ml de 5-fluorouracilo para inhibir la microglía mitótica remanente, estos cultivos alcanzaron un 95-98% de abundancia de astrocitos. Si los experimentos requerían ausencia de microglía, luego de la agitación se añadió por 30 minutos 5 mM de Leu-Leu metil ester hidrobromuro (Sigma Cat# L7393) que es un compuesto que elimina específicamente las células con capacidad fagocítica (Marinelli y col., 2015). En cualquiera de los casos, los astrocitos que permanecen adheridos a la botella de cultivo fueron nuevamente incubados en medio DMEM completo por otras 48 h antes de ser tripsinizados y resembrados en placas multiwell para realizar experimentos. Luego de la tripsinización y antes de sembrar, la densidad celular fue estimada mediante la cuantificación de número total de células utilizando la cámara de Neubauer en microscopio invertido de contraste de fase. El número de células utilizado fue variable según los objetivos de cada experimento.

Cultivos primarios de neuronas corticales

Se realizó según lo descrito por (Goslin y col., 1988) con ligeras modificaciones (Angelo y col., 2009). Se disecaron las cortezas de embriones de rata de día 17 de gestación. Se realizó una primera disgregación con tripsina durante 20 minutos a 37°C en baño térmico. Luego la tripsina fue neutralizada incubando con suero fetal bovino 10% (v/v) en DMEM, y sucesivos lavados con DMEM. Posteriormente se realizó una disgregación mecánica del tejido mediante el empleo de pipetas pasteur. Luego se realizó una centrifugación seguido de la suspensión celular empleando medio Neurobasal (Invitrogen) suplementado con B27 2% v/v (Gibco) y glutamina 0.5 mM. Antes de sembrar en placas o cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina, la densidad

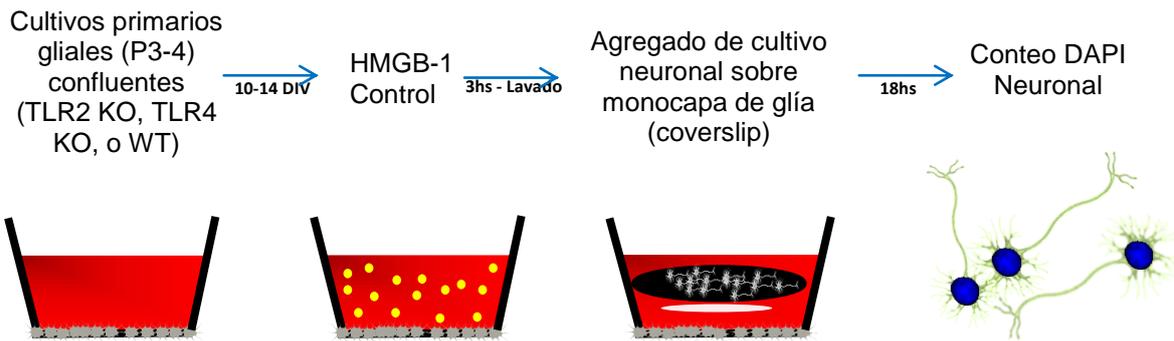
celular fue estimada mediante la cuantificación de número total de células utilizando la cámara de Neubauer en microscopio invertido de contraste de fase. El número de células utilizado fue variable según los objetivos de cada experimento. Luego de 10 días *in vitro* (DIV), los cultivos neuronales fueron expuestos a los distintos tratamientos según se indica en cada experimento.

Análisis Puncta

Las neuronas que se encontraban al menos a dos diámetros de la neurona vecina se seleccionaron al azar e identificaron usando la tinción DAPI. Después de capturar 15-20 imágenes / condición experimental, los canales verde y rojo se alinearon, y las neuritas del mismo tamaño (10 μm) se seleccionaron y cuantificaron usando el complemento Puncta Analyzer en NIH ImageJ. Las neuritas se eligieron al azar, siguiendo un solo criterio; tenían que estar ubicados a una distancia de un cuerpo celular del soma de células neuronales. En cada imagen, se analizaron 8-10 neuritas, totalizando al menos 1000 μm de longitud de neurita analizada por condición experimental. En cada experimento, se analizaron al menos 30-40 neuronas por condición experimental.

Ensayos de co-cultivo

Se realizaron ensayos de co-cultivo a partir de cultivos gliales provenientes de ratones *wild type*, deficientes del receptor TLR2 o deficientes en TLR4 y neuronas corticales *wild type* descritos anteriormente. Los cultivos de astrocitos se sembraron en monocapas en placas multiwell y, por separado, las neuronas se crecieron sobre cubreobjetos. Luego de que los astrocitos alcanzaran la confluencia y fueran tratados de acuerdo a como se explica más adelante, se cambió el medio de cultivo por un medio fresco conteniendo 50% de Neurobasal-B27 y 50% de DMEM sin suero fetal bovino y se colocaron en forma invertida los cubreobjetos conteniendo neuronas corticales sobre la monocapa de astrocitos. Esto se realizó colocando previamente un soporte espaciador de acero quirúrgico esterilizado a 180°C, diseñado específicamente para este propósito. El conjunto se incubó durante 18 horas en un medio conteniendo DMEM y neurobasal completo en partes iguales, pero libre de suero. Luego los cultivos fueron fijados por separado para inmunofluorescencia.

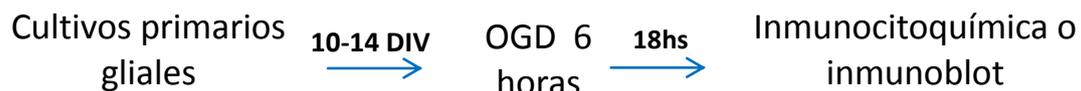


Esquema del diseño experimental para el tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales. Cultivos primarios gliales en estadio 10 a 14 DIV fueron estimulados con el DAMP HMGB-1. Se cambió el medio por medio fresco. Luego se añadió al mismo well un cover con neuronas corticales de 10 DIV durante 18 horas. Se procedió al conteo de núcleos marcados con DAPI.

Exposición de astrocitos a privación de oxígeno y glucosa

La exposición a una situación de privación de oxígeno y glucosa (OGD) es un protocolo clásico que intenta emular la situación fisiopatológica que enfrentan las células en zona de isquemia (Kleinschnitz y col., 2011; Holloway, 2016).

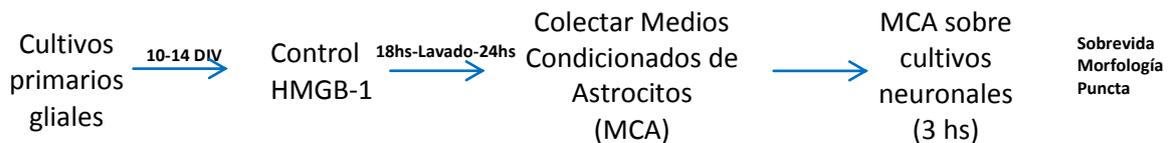
Para realizar la exposición a OGD, los astrocitos fueron sembrados en placas multiwell y crecidos hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80%. Los astrocitos fueron luego privados de glucosa reemplazando el medio de cultivo por un medio DMEM sin glucosa y colocados en una cámara de hipoxia donde se los expuso a una mezcla de gases que contenía 0.1% O₂, 5% CO₂, y 94.9% N₂ y se incubaron a 37°C durante 6 horas. Finalizado el tratamiento se retiraron las placas de la cámara de hipoxia y se reemplazó el medio por DMEM completo estabilizado a una concentración normal de gases (21% O₂; 5% CO₂), y fueron incubados nuevamente en condiciones normales de cultivo (5% CO₂). Luego de 18 horas los cultivos fueron fijados para inmunofluorescencia o se extrajeron proteínas para inmunoblots.



Diseño experimental para el tratamiento de cultivos primarios de células gliales. Células gliales (astrocitos, microglía) en estadio 10 a 14 DIV fueron privadas de oxígeno y glucosa por 6 horas. Luego de 18 horas los cultivos fueron fijados para inmunofluorescencia o se realizó la lisis para obtener los extractos celulares para inmunoblots.

Obtención de medios condicionados de astrocitos

Los cultivos enriquecidos en astrocitos fueron sembrados en botellas de cultivo de 25 cm² hasta alcanzar confluencia. Luego se agregó HMGB-1 (500 ng/ml) o S100B (0.05 µM o 1 µM) y se incubó durante 18 horas. Finalizada la incubación se lavó el cultivo con DMEM y se reemplazó el medio por OptiMEM (Gibco), medio completo libre de suero y se incubó por 24 h adicionales para recolectar los factores liberados por el cultivo. Luego, estos medios condicionados (MCA) se colectaron, se centrifugaron a 900 RPM para eliminar restos celulares y se conservaron a -80°C hasta su uso.



Diseño experimental para el tratamiento de cultivos primarios de neuronas corticales. Cultivos enriquecidos en astrocitos en estadio 10 a 14 DIV fueron estimulados con el DAMP HMGB-1 (500 ng/ml) por 18 horas. Luego de 24 horas los medios condicionados fueron colectados para su posterior utilización sobre los cultivos neuronales.

Inmunofluorescencia de cultivos celulares

Luego de realizados los tratamientos, los cultivos en placas o cubreobjetos fueron lavados con PBS e incubados con una solución fijadora conteniendo paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se hicieron 3 lavados con PBS y se conservaron los cultivos en una solución de 0.3% (v/v) de Kathón como conservante (Dow Chemical) en PBS a 4°C hasta su utilización en técnicas de inmunohistoquímica.

La células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 1% (v/v) en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se procedió con el bloqueo de sitios inespecíficos incubando con una solución de suero normal equino (SNE) al 5% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubó con anticuerpos diluidos en solución de bloqueo durante 18 horas a 4°C (ver tabla 1). Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios específicos conjugados a fluoróforos diluidos en solución de bloqueo durante cuatro horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS seguidos de una incubación con el colorante nuclear fluorescente Hoechst 33342 (2 µg/ml) o DAPI (0.1 µg/ml) en PBS durante 15 minutos. Por último, se realizaron tres lavados en PBS y las células se observaron directamente en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX81. En el caso de los

cubreobjetos, se montaron en forma invertida con PBS-glicerol 30% para ser observados en el microscopio.

Inmunoblots de cultivos celulares

Las células fueron lavadas con PBS y lisadas con buffer de lisis (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glicerol) al cual se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas tal como se explicó previamente para los tejidos obtenidos de animales. Posteriormente se realizó una homogeneización utilizando micropipeta con tip de 200 μ l. La mezcla de células lisadas fue transferida a tubos tipo Eppendorf y agitada en un vortex durante 10 seg. Los extractos celulares fueron centrifugados (14000 RPM) a 4°C con el fin de obtener por separado las fracciones solubles y nucleares. La concentración de proteína total se determinó mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y luego el contenido proteico de las muestras fue normalizado antes de sembrarlas en los geles para electroforesis y realizar la técnica de inmunoblot tal como se describió previamente para muestras obtenidas de animales de experimentación.

Extracción de RNA mensajero total a partir de cultivos celulares

La extracción de RNA a partir de cultivos primarios de astrocitos se realizó mediante la utilización del RNeasy mini kit comercial (Qiagen cat# 74106) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lisaron utilizando *buffer* RLT y sucesivos pasajes por agujas 21G. Se vortexeó el extracto y se añadió al lisado celular un volumen de 600 μ l de etanol al 70%. Esta mezcla se transfirió a una columna de purificación adaptada a un tubo colector y se sometió a centrifugación. Luego se realizaron sucesivas centrifugaciones utilizando buffers de lavado provistos por el kit. En el último paso se realizó el lavado de la columna con un volumen de 40 μ l de H₂O miliQ libre de RNAsas a modo de eluir el RNA. El eluido fue recogido y guardado a -80°C hasta su uso para la retrotranscripción y la síntesis del cDNA. Una alícuota de 4 μ l del RNA eluido fue utilizada para determinar concentración y la pureza del RNA midiendo absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro de luz ultravioleta.

La reacción de síntesis de los correspondientes cDNA se realizó utilizando el kit comercial *Omniscript Reverse Transcription* (Quiagen cat# 205111) con primers *OligodT* (Applied Biosystem cat# N8080128), según las instrucciones del fabricante. Brevemente se procedió a preparar la master mix en presencia de la enzima transcriptasa reversa en conjunto con los OligosdT (son secuencias monocatenarias de desoxitimidina dT), los cuales son necesarios para ser catalizados por la transcriptasa reversa y así iniciar la reacción), inhibidor de RNAsas, dNTPs y buffer de reacción. Una vez preparada la master mix se agregó la cantidad correspondiente

de RNA y se dejó reaccionar por 60 minutos a 37°C. En la tabla 6 se detallan los volúmenes utilizados.

Reacción de la polimerasa en cadena semicuantitativa o de punto final

La reacción de PCR se realizó utilizando la enzima Taq Polimerasa (Inbio High Way, Tandil, Argentina, cat# K1002) con modificaciones específicas en las temperaturas de *annealing* y número de ciclos de acuerdo a cada set de primers (ver tabla 3 donde figuran ciclos y temperatura de *annealing* para cada par de primers).

Los primers utilizados fueron sintetizados por Invitrogen de acuerdo a las secuencias solicitadas reportadas previamente en la literatura o diseñadas por nosotros (ver tabla 5). Independientemente de las referencias bibliográficas, la especificidad de cada par de primers fue corroborada mediante el uso de software disponible en la web: *UCSC Genome Bioinformatics* y *NIH Primer Blast*.

Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa conteniendo bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para su observación en transiluminador. Típicamente un volumen de 9 µl de la reacción de PCR fue mezclado con 1 µl de buffer de carga (Azul de bromofenol: 60 mM EDTA 0.03%; Glicerol: 60%; 10 mM Tris-HCl pH 7.6) y sembrado en un gel de agarosa 1.5% para separación electroforética. Los geles de agarosa se corrieron en forma *submarina* en *buffer TAE* para la visualización del ADN en transiluminador (Gel Doc Ez Imager, Biorad). En paralelo se sembró un marcador de peso molecular para corroborar el tamaño de los productos esperados de PCR. Las imágenes de los geles adquiridas con el equipo fueron almacenadas en computadora para posterior análisis. La cuantificación de las bandas se realizó mediante el cálculo de densidad óptica utilizando el software Image J 1.51 j8.

Reacción de la polimerasa en cadena de tiempo real (qPCR)

Se realizó la reacción de PCR en tiempo real utilizando el equipo *Step One Plus* (Applied Biosystems) y la mezcla de reacción utilizada fue el kit comercial *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems). El ciclado utilizado fue 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C. Se realizaron curvas con distintas concentraciones de ADNc para calcular la eficiencia de amplificación de los primers. La secuencia de los primers utilizados se detalla al final de esta sección.

La expresión relativa de las IL-1β y TNF-α se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Brevemente, los valores del ciclo umbral (Ct) de cada triplicado se promediaron, y para cada muestra se calculó la diferencia entre el Ct (ΔCt) de la amplificación de cada citoquina y el Ct de la amplificación del control endógeno. Luego, para cada muestra

se calculó la diferencia ($\Delta\Delta Ct$) entre el ΔCt de esa muestra y el promedio de los ΔCt controles. Si la eficiencia de amplificación es cercana a 2, al calcular el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada muestra, se obtiene un valor de expresión relativa de cada citoquina, relativizado a la expresión del control endógeno. La eficiencia de amplificación se corroboró mediante curvas de calibración.

Producción de plásmidos para transfecciones

Para los estudios de ganancia de función utilizamos plásmidos pCMV-flag que expresan TLR2 o TLR4, los cuales fueron cedidos por el Dr. Thierry Roger (Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland) (Roger y col., 2009). Una vez recibidos fueron reconstituidos y amplificados mediante transformación bacteriana. De igual manera para poder seguir las transfecciones utilizamos el plásmido de expresión *Cherry* (pcDNA3 mCherry, Addgene, USA).

Se transformaron bacterias *Escherichia coli DH5- α* (Invitrogen) mediante el protocolo de choque térmico. Una reacción de transformación típica incluyó una alícuota de 50 μ l de bacterias competentes descongelada en hielo e incubada con 5 μ l de ADN plasmídico reconstituido por 30 min. El tubo conteniendo las bacterias y el plásmido fue incubado a 42°C por 60 seg y luego pasado rápidamente a hielo por 2 min. Posteriormente se añadieron al tubo 300 μ l de medio SOC (del inglés *Super Optimal broth with Catabolite repression*) precalentado a 37°C. El uso de SOC maximiza la eficiencia de transformación de las células competentes. Las bacterias se incubaron a 37 °C en agitación durante 1 h y luego se sembraron 100 μ l de bacterias en placas con ágar Luria Broth (LB) conteniendo ampicilina (50 μ g/ml). Luego de incubar 18 horas a 37°C, se seleccionó una colonia aislada y se usó para inocular 300 ml de LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) durante otras 18 horas en agitación. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.6 se realizó la purificación del plásmido utilizando kits comerciales (Wizard *Plus* SV Miniprep cat# A1330 o Quiagen MidiPrep cat# 12145). Brevemente, el protocolo consiste en la lisis bacteriana, precipitación de proteínas y DNA genómico, y el DNA plasmídico se adhiere a una columna de sílica. Posteriormente se lava la columna y se eluye el DNA plasmídico con agua libre de nucleasas. El objetivo fue obtener suficiente cantidad del DNA para su posterior utilización en las transfecciones a células eucariontes. Una alícuota de 4 μ l del DNA eluido fue utilizada para determinar concentración y la pureza del DNA plasmídico midiendo absorbancia a 260 y 280 nm en espectrofotómetro de luz ultravioleta. Lo restante se conservó en glicerol stock en medio LB a -70°C hasta su posterior uso.

Transfección de cultivos primarios

Los experimentos de transfección fueron realizados en placas *multiwell* de 24 pocillos. Debido a que la eficiencia de transfección en los cultivos primarios de astrocitos raramente supera el 30-40% de eficiencia, realizamos co-transfecciones de los plásmidos pCMV-TLR4 o plásmido *backbone* (vacío) con pcDNA3-Cherry para poder identificar las células efectivamente transfectadas. El método de transfección utilizado fue el de liposomas comercial Lipofectamina 2000 (Invitrogen).

El procedimiento desarrollado fue como se describe a continuación. Primeramente se reemplazó el medio completo de cultivos de astrocitos confluentes en placas multiwell de 24 pocillos por medio OptiMEM libre de suero (Gibco) durante 1 hora. Luego se extrajo el medio OptiMEM y las células fueron incubadas durante 3 horas con la mezcla de transfección. La misma estaba constituida de la siguiente forma: por cada pocillo a transfectar se preparó A) 50 μ l de OptiMEM + 1 μ l de lipofectamina y B) 50 μ l de OptiMEM + 0.9 μ g de ADN plasmídico (0.8 μ g TLR4, TLR2 o pcDNA3 + 0.1 μ g *Cherry*). Las soluciones A y B fueron incubadas en forma separada durante 5 minutos y luego se realizó una mezcla de ambas soluciones (A+B) la cual se incubó por otros 20 minutos. Luego de las 3 horas de incubación con la mezcla que contiene el ADN y lipofectamina, el medio fue reemplazado nuevamente por medio completo por otras 18 horas. Transcurrido este tiempo, se realizaron los experimentos que se describen en la sección de resultados. Las células transfectadas fueron fácilmente reconocidas debido a la expresión de la proteína *Cherry*.

Análisis de imágenes

Los estudios para analizar morfología celular y fracción de área ocupada por células inmunomarcadas se realizaron utilizando el software ImageJ 1.51 j8. Las imágenes digitalizadas, se transformaron a la escala de grises de 8 bits, se normalizaron y se realizó una delineación de las áreas de interés, eliminando los artefactos. Se utilizó el software indicando el tamaño máximo y mínimo esperado para las células. Las imágenes parciales de células fueron excluidas. Sobre las imágenes se analizaron diferentes parámetros de morfología celular o se realizaron conteos manuales directos (número total de células por campo) o categorizados (tipos celulares según su morfología). En el caso de las co-localizaciones se utilizó el coeficiente de Manders. Dicho coeficiente de superposición, mide la proporción de co-localización de una señal A respecto de una señal B, sin tener en cuenta la intensidad de ambas señales (Manders y col. 1993).

Análisis estadísticos

Los valores crudos de cada medición se chequearon para verificar su distribución normal. En el caso de que este supuesto se cumpliera, seguidamente se realizó la comparación estadística de los diferentes grupos mediante ANOVA de una vía seguido del post- test de Student-Newman-Keuls dependiendo el caso o bien para comparar dos grupos se utilizó el test t de Student. En el caso de que no se cumplieran los supuestos de normalidad, se realizó la comparación por el test no paramétrico de Dunn seguido del post- test de Kruskal Wallis. Los datos en cada gráfico son presentados como la media y su error estándar. Un $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los asteriscos ubicados sobre las barras muestran diferencias con distintos grados de significancia entre los distintos grupos (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$), tal como se describe en la leyenda de cada figura.

TABLA 1**Anticuerpos Primarios para Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica**

| NOMBRE ANTICUERPO | ORIGEN | DILUCION | MARCA | # CATALOGO |
|-------------------|-------------------|----------|------------|------------|
| GFAP | Policlonal-conejo | 1 .1500 | DAKO | Z0334 |
| GFAP | Monoclonal-ratón | 1. 1000 | Sigma | G3893 |
| Iba-1 | Policlonal-cabra | 1. 1000 | Abcam | AB5076 |
| MAP-2 | Policlonal-conejo | 1. 1000 | Millipore | AB522 |
| NeuN | Monoclonal-ratón | 1. 1000 | Chemicon | MAB377 |
| p65 | Policlonal-conejo | 1. 1000 | Santa Cruz | sc-372 |
| S100B | Monoclonal-ratón | 1. 800 | Sigma | S2532 |
| TLR-4 | Policlonal-conejo | 1. 500 | Santa Cruz | sc-30002 |
| Drebrina | Policlonal-conejo | 1. 800 | Millipore | AB10140 |
| Sinaptofisina | Monoclonal-ratón | 1. 1000 | Chemicon | MAB329 |

TABLA 2**Anticuerpos Secundarios para Inmunofluorescencia e Inmunohistoquímica**

| NOMBRE ANTICUERPO | LONGITUD DE ONDA | DILUCION | MARCA | # CATALOGO |
|---------------------------|------------------|----------|---------|-------------|
| Donkey Anti Rabbit igG | Alexa488 | 1.900 | Jackson | 711-545-152 |
| Donkey Anti Rabbit igG | Alexa594 | 1.900 | Jackson | 711-585-152 |
| Donkey Anti-Goat IgG | Alexa594 | 1.900 | Jackson | 705-585-147 |
| Donkey Anti-Human IgG | Alexa488 | 1.900 | Jackson | 709-545-149 |
| Donkey Anti-Mouse IgG | Alexa488 | 1.900 | Jackson | 715-545-151 |
| Donkey Anti-Mouse IgG | Alexa594 | 1.900 | Jackson | 715-585-151 |
| Donkey Anti-Mouse IgG | Alexa488 | 1.900 | Jackson | 715-545-151 |
| ExtraAvidin TM | Peroxidasa | 1.500 | Sigma | E2886 |
| Goat Anti-Mouse IgG | Alexa594 | 1.900 | Jackson | 715-585-150 |
| Goat Anti-Mouse IgG | Biotin | 1.500 | Sigma | B7264 |
| Goat Anti-Rabbit | FITC | 1.900 | Sigma | F9887 |
| Goat Anti-Rabbit IgG | Biotin | 1.500 | Sigma | B7264 |
| Goat Anti-Rabbit IgG | Biotin | 1.500 | Sigma | B7389 |
| Rabbit Anti-Goat IgG | FITC | 1.800 | Sigma | F7367 |
| Rabbit Anti-Goat IgG | Biotin | 1.500 | Sigma | B7014 |
| Sheep Anti-Mouse IgG | FITC | 1.800 | Sigma | F2883 |

TABLA 3
Anticuerpos Primarios para Western Blot

| NOMBRE ANTICUERPO | ORIGEN | DILUCION | MARCA | # CATALOGO |
|-------------------|-------------------|----------|------------|------------|
| Actina | Monoclonal/ratón | 1. 20000 | Millipore | MAB1501 |
| TLR-4 | Policlonal-conejo | 1. 500 | Santa Cruz | Sc-3002 |

TABLA 4
Anticuerpos Secundarios para Western Blot

| NOMBRE ANTICUERPO | LONGITUD DE ONDA | DILUCION | MARCA | # CATALOGO |
|-----------------------|------------------|----------|---------|-------------|
| Goat Anti-Rabbit IgG | Peroxidasa | 1 .6000 | Jackson | 111-035-003 |
| Rabbit Anti-Mouse IgG | Peroxidasa | 1 .6000 | Sigma | A-9044 |

TABLA 5
Primers

| RNAm | Forward | Reverse | Citas |
|-----------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| TLR2 | GAAAGATGCGCTTCCTGAAC | CGCCTAAGAGCAGGATCAAC | (Fan y col., 2009) |
| IL-1b | ACAACAAAAAGCCTCGTGCTG | CCATTGAGGTGGAGAGCTTTCA | (Murta y col.,2012) |
| α -actin | CACCACTTTCTACAATGAGC | CGGTCAGGATCTTCATGAGG | (Ho y col., 2005) |
| TNF- α | TTGTCTTTGAGATCCATGCC | TCTCATCAGTTCTATGGCCC | (Murta y col.,2012) |
| TLR4 | GCCGAAAGTTATTGTGGTGGT | ATGGGTTTTAGGCGCAGAGTTT | (Fan y col., 2009) |
| TBP | ACCGTGAATCTTGCTGTAA | CCTTCATTGACCTCAACACATGG | (Murta y col., 2012) |
| GAPDH | AGTCTTCTGGGTGGCGTGATGG | AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAGG | (Murta y col., 2012) |

TABLA 6
Reactivos para RT PCR

| Reactivos | Stock | Volumen para una reacción |
|----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Buffer RT | 10x | 2 μ l |
| dNTPs Mix | 5Mm | 2 μ l |
| OligodT primer | 10 μ M | 2 μ l |
| ARNm | 50 ng–2 μ g | Variable |
| Omniscript Reverse Transcriptase | 0.5 μ g/ μ l | 1 μ l |
| Inhibidor de RNasa | (10 unidades/ μ l) | 1 μ l |
| Agua libre de RNasa | Variable | |
| Volumen Final | 25 μ l | 25 μ l |

Resultados

La privación de oxígeno y glucosa (OGD) produce un aumento en la expresión de TLR4 en células gliales

Como comentamos en la introducción, la OGD imita *in vitro* las condiciones del área isquémica. Datos de la literatura nos indicaban que luego de un episodio isquémico, existe una gran liberación de mediadores solubles de tipo DAMP, algunos de los cuales son capaces de generar la activación de diferentes receptores de la inmunidad innata, entre ellos el receptor TLR4 (Hakimizadeh y col., 2016). Sin embargo, no estaba claro si TLR4 está presente constitutivamente en las células gliales o si la situación de isquemia tisular es capaz de inducirlo. Por ello, en esta sección nos propusimos estudiar si la OGD *per se* induce un aumento de la expresión de TLR4 en células gliales.

En primer lugar, estudiamos la expresión del receptor TLR4 en cultivos mixtos gliales corticales, en condiciones control o sometidos a OGD por 6 horas, a través de ensayos de inmunofluorescencia e inmunoblot. Observamos un claro aumento en la expresión de este receptor en los cultivos mixtos expuestos a OGD tanto por la técnica de inmunofluorescencia como por inmunoblot (Figura 13 A, B). La observación detallada de las imágenes mostró que tanto la microglía como los astrocitos presentes en el cultivo mostraron un aumento de la expresión de TLR4 inducida por la OGD (Figura 13 A).

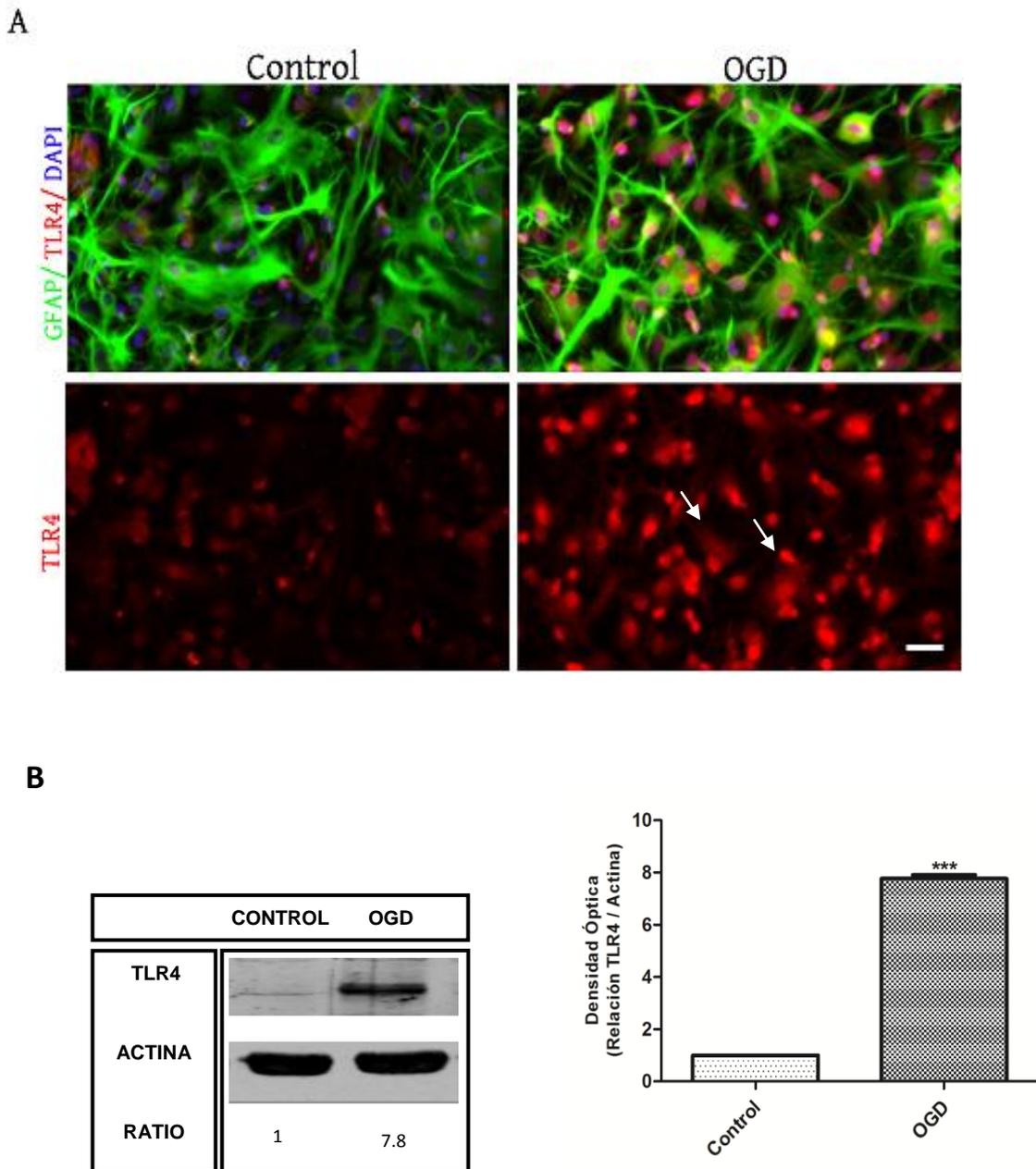


Figura 13: La privación de oxígeno y glucosa (OGD) por 6 horas genera un incremento en la expresión de TLR4 analizado a las 24 horas luego de la OGD. A: Inmunofluorescencia de cultivos primarios gliales mixtos conteniendo astrocitos y microglía en condiciones control y en OGD. Se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia para las células TLR4 positivas (rojo) astrocitos (flechas) marcados con GFAP (verde) como para otros tipos celulares presentes en el cultivo (Barra = 20 μ m). B: El inmunoblot muestra el nivel relativo de la proteína TLR4 en cultivos gliales mixtos expuestos a condiciones control y OGD. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra la cuantificación de la relación TLR4/actina. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por t-test de Student de 2 colas. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control *** $p < 0.001$.

La privación de oxígeno y glucosa (OGD) induce un incremento en la expresión de TLR4 en cultivos enriquecidos en astrocitos

Posteriormente, evaluamos si los astrocitos requieren de la presencia de microglía para que se induzca la expresión de TLR4 en condiciones de OGD. Para ello utilizamos cultivos primarios corticales enriquecidos en astrocitos depletados de microglía. Los mismos se obtuvieron por agitación y subsecuente tratamiento con un agente lisosomotrópico (Leu-Leu metil éster) tal como se describió previamente (Marinelli y col., 2015). Este compuesto ingresa específicamente a las células con capacidad fagocítica y, por la acción de la transpeptidasa de la catepsina C, se condensa en un polímero membranólítico dentro de los lisosomas generando la muerte de células con alta actividad fagocítica (Marinelli y col., 2015).

Una vez obtenido el cultivo enriquecido en astrocitos procedimos a ejecutar de igual manera el protocolo de OGD mencionado anteriormente. Los resultados mostraron un notorio el cambio de la morfología astrogliar ameboides en condiciones normales por el fenotipo filamentosos inducido por la OGD (Figura 14 A). Este fenotipo es clásico de astrocitos reactivos *in vitro*. Además, los astrocitos GFAP+ aumentaron la expresión de TLR4 al ser expuestos a OGD, aun en ausencia de microglía (Figura 14 B).

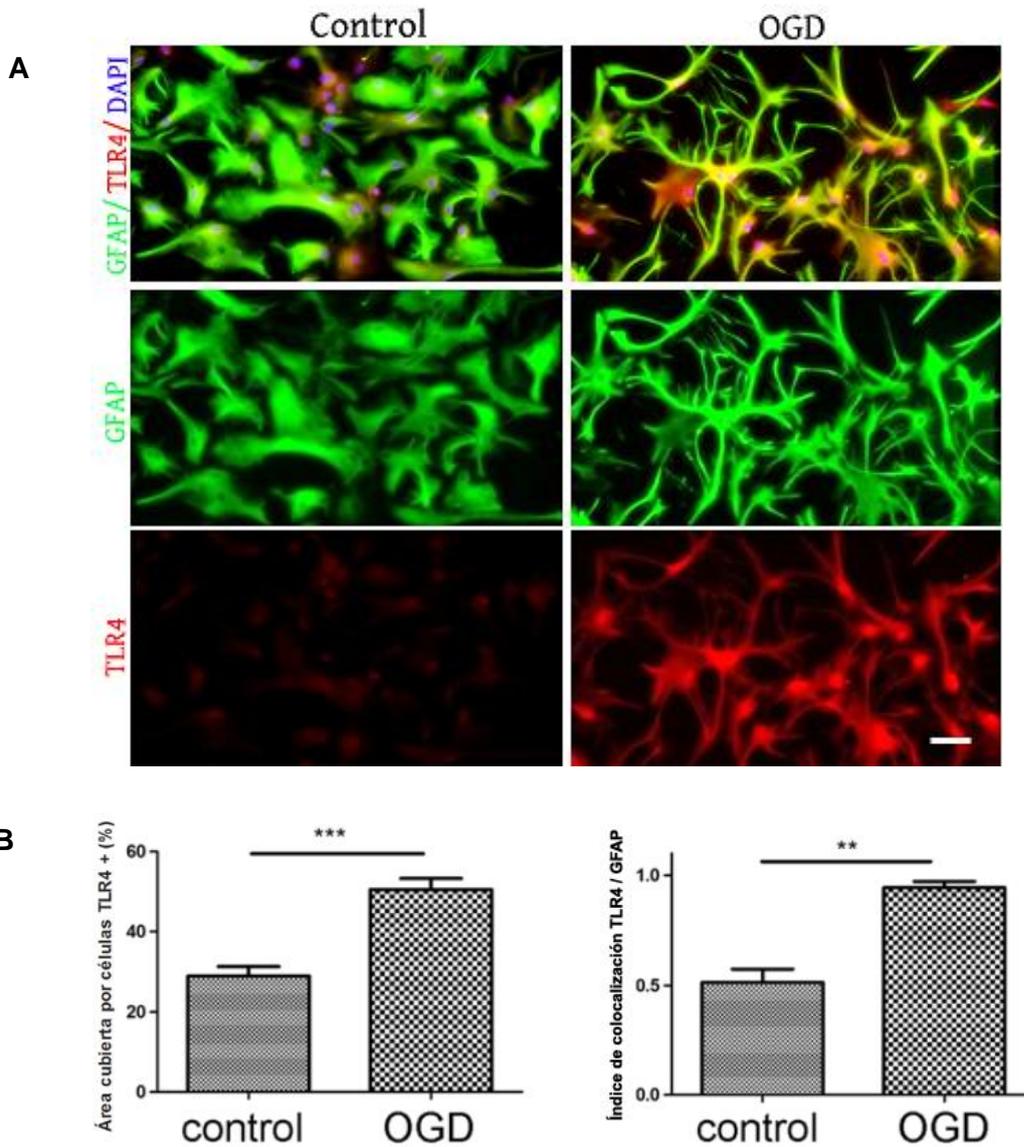


Figura 14: La privación de oxígeno y glucosa por 6 horas genera un incremento en la expresión de TLR4 en astrocitos analizados a las 24 horas. A: Inmunofluorescencia de cultivos primarios enriquecidos en astrocitos en condiciones control y OGD. Se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia para las células TLR4 positivas (rojo) en astrocitos marcados con GFAP (verde) como así también un drástico cambio de una morfología poligonal hacia una más fibrilar y estrellada. Barra = 50 μ m. B. Los gráficos muestran cambios significativos en el área celular TLR4-inmunorreactiva inducida por OGD, mientras que el índice de colocalización de Manders mostró un aumento de la co-expresión de TLR4 y GFAP en astrocitos. El coeficiente de superposición de Manders mide la proporción de colocalización de la señal TLR4 con GFAP sin tener en cuenta la intensidad de las señales. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por t-test de Student de 2 colas. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control *** p <0.001.

La sobreexpresión de TLR4 sensibiliza a los astrocitos hacia sus ligandos

Luego de observar que la OGD produce un aumento en la expresión de TLR4, nos preguntamos si este incremento tendría consecuencias funcionales en los astrocitos. Para ello estimulamos la expresión de TLR4 con OGD y luego tratamos cultivos primarios enriquecidos en astrocitos con un agonista clásico de TLR4 que es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), un PAMP agonista de TLR4.

Comparando condiciones controles con la exposición a OGD, LPS o bien OGD y luego LPS, observamos un claro incremento en la proporción de astrocitos filamentosos respecto de los ameboides en todos los tratamientos (Figura 15). Ambas morfologías ameboides y filamentosas pueden ser observadas al mismo tiempo en un cultivo pero su abundancia relativa cambia según la situación. Los astrocitos no reactivos presentan principalmente una morfología del tipo poligonal o ameboide, que se transforma en una morfología del tipo filamentososa cuando son expuestos a estímulos que producen reactividad glial o gliosis reactiva. Este pasaje de una morfología a otra recibe el nombre de filamentosación o *stellation*. Este cambio en la morfología astrogliar es considerada el correlato morfológico *in vitro* del fenómeno de astrogliosis *in vivo* (Park y col., 2006a; Wanner y col., 2013).

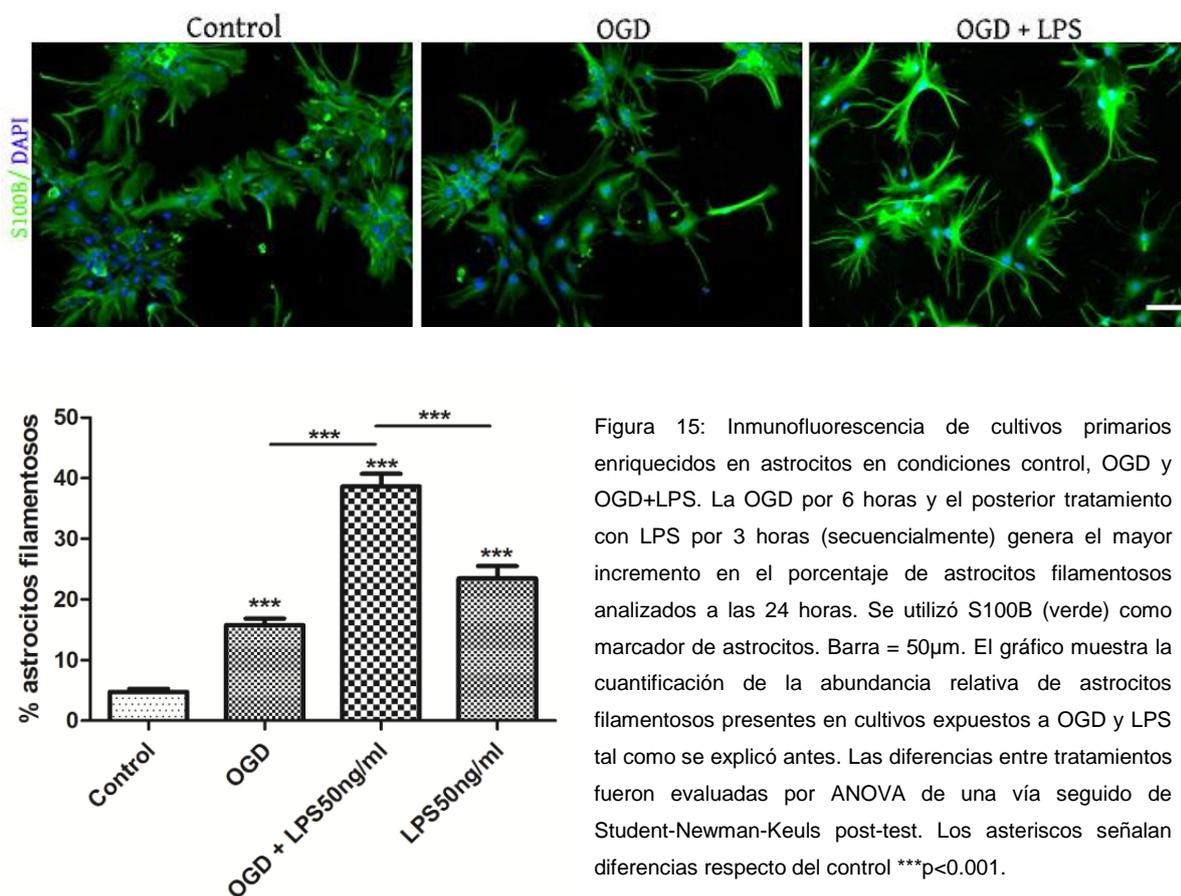


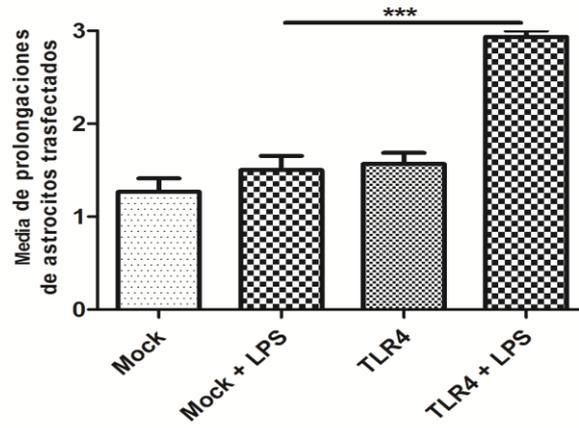
Figura 15: Inmunofluorescencia de cultivos primarios enriquecidos en astrocitos en condiciones control, OGD y OGD+LPS. La OGD por 6 horas y el posterior tratamiento con LPS por 3 horas (secuencialmente) genera el mayor incremento en el porcentaje de astrocitos filamentosos analizados a las 24 horas. Se utilizó S100B (verde) como marcador de astrocitos. Barra = 50µm. El gráfico muestra la cuantificación de la abundancia relativa de astrocitos filamentosos presentes en cultivos expuestos a OGD y LPS tal como se explicó antes. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control ***p<0.001.

Si bien este experimento nos indicó que los astrocitos expuestos a OGD, expresan TLR4 y reaccionan con mayor intensidad a la exposición al ligando de TLR4 que es el LPS, este efecto podría ser dependiente de una sensibilización de los astrocitos a través de rutas no dependientes de TLR4. Por ello, decidimos realizar un experimento de ganancia de función sobreexpresando TLR4 en astrocitos en condiciones control. Para esto transfectamos cultivos primarios gliales corticales enriquecidos en astrocitos con un plásmido de expresión que codifican al receptor TLR4 o su control (mock) en conjunto con un plásmido reportador para poder seguir los astrocitos efectivamente transfectados. Luego de permitir la expresión de TLR4, los cultivos fueron tratados con LPS y se midió la filamentación de los astrocitos positivamente transfectados. Los resultados mostraron que los astrocitos transfectados con un plásmido de expresión de TLR4 expuestos a LPS, exhibieron una filamentación mucho mayor en relación a los astrocitos transfectados con el plásmido mock (Figura 16 A).

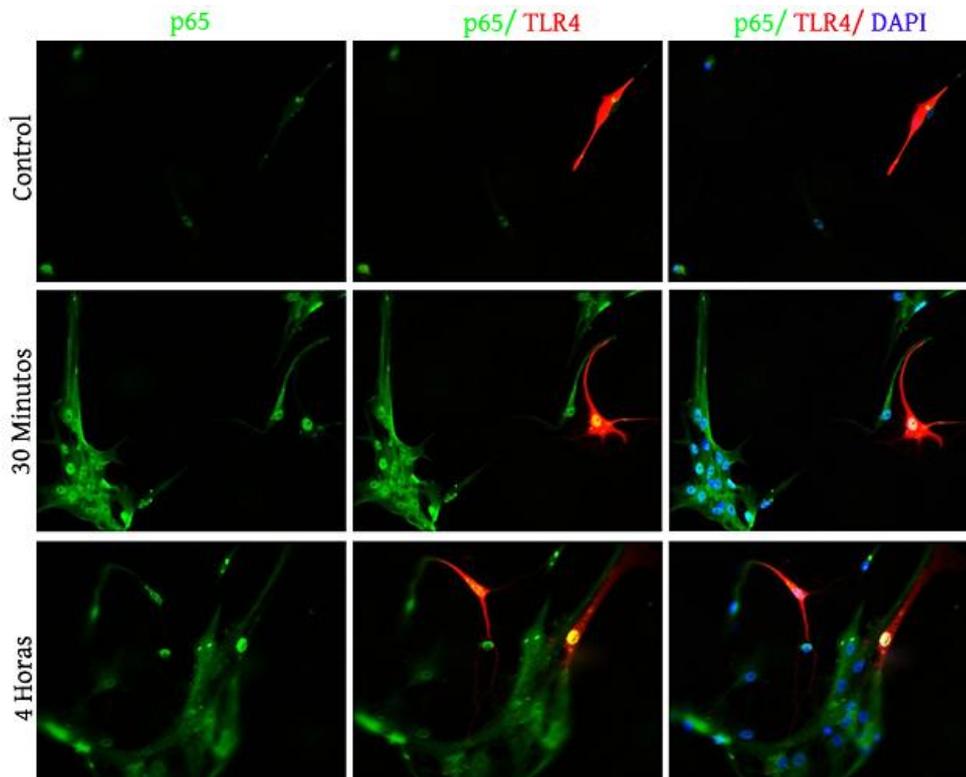
Considerando que la filamentación integra varias rutas de señalización que involucran la remodelación del citoesqueleto astrogial, decidimos analizar si la ruta de señalización río abajo de TLR4 estaba sobreactivada cuando aumenta su expresión y se produce la exposición a los ligandos del receptor. Sabiendo que una de las vías efectoras clásicas de TLR4 es NF- κ B, estudiamos la respuesta siguiendo la localización nuclear de p65 que es la subunidad más abundante de este factor de transcripción en el SNC. Observamos que los astrocitos transfectados con el plásmido control mock, tratados con LPS, muestran una cinética clásica de activación de NF- κ B, alcanzando el máximo a los 30 minutos luego del tratamiento, regresando a los niveles basales a las 4 horas post tratamiento. En cambio, los astrocitos transfectados con el plásmido de expresión de TLR4, también tratados con LPS, presentaron una mayor activación de NF- κ B y dicha actividad se mantuvo elevada durante todo el tiempo analizado en el experimento (hasta las 4 horas de tratamiento) (Figura 16 C).

Figura 16: La sobre-expresión de TLR4 sensibiliza a los astrocitos frente a sus ligandos A: El gráfico muestra la media del número de prolongaciones por astrocito efectivamente transfectado identificado por la expresión de Cherry como índice de filamentación. Las diferencias entre tratamientos (*filamentación*) fueron evaluadas luego de la sobreexpresión de TLR4 en cultivos de astrocitos por 18 horas y luego de ser tratados con LPS durante 3 horas por test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un test de comparación múltiple de Dunn's. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control *** $p < 0.001$. B: Imágenes representativas de inmunofluorescencia para la subunidad p65 de NF- κ B (verde) y TLR4 *Cherry* (rojo) de cultivos primarios enriquecidos en astrocitos transfectados con plásmido mock o sobre expresando TLR4 durante 18 horas y posteriormente tratados con LPS. Barra = 50 μ m. C: Los gráficos muestran la curva temporal de localización nuclear de p65 en astrocitos transfectados con el plasmido vacío (mock) o el plásmido de expresión de TLR4. Se observa un incremento marcado y sostenido en el tiempo de localización nuclear de p65 en los astrocitos transfectados con TLR4. Las diferencias entre tratamientos (cinética de activación) fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

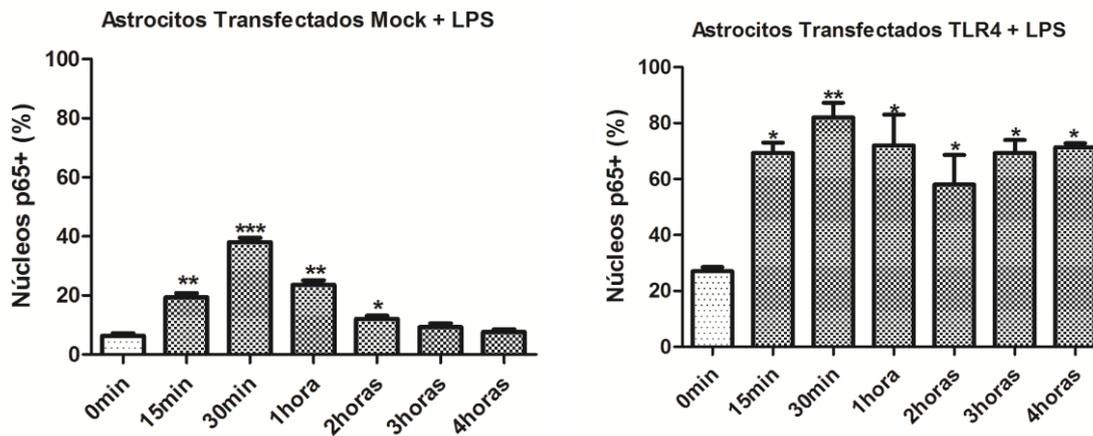
A



B



C



El receptor TLR4 facilita la polarización de los astrocitos reactivos hacia el perfil proinflamatorio

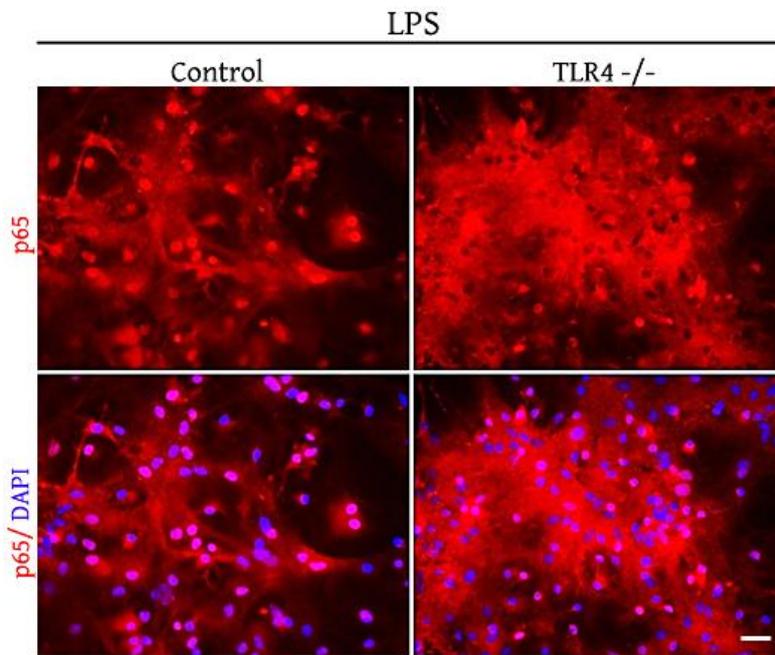
A partir de los resultados obtenidos en relación a la activación sostenida de NF- κ B en el tiempo, en astrocitos que sobreexpresan TLR4, investigamos si esta activación sostenida da como consecuencia una polarización de los astrocitos reactivos hacia el perfil proinflamatorio A1 que es capaz de inducir neurodegeneración.

Primariamente realizamos un ensayo de pérdida de función utilizando cultivos de astrocitos obtenidos de animales deficientes en TLR4 (TLR4-KO) que fueron expuestos a LPS. Como controles utilizamos cultivos de animales *wild type* y cultivos de animales TLR2-KO y se analizó la localización nuclear de p65 como índice de activación de NF- κ B. Como era esperado, los cultivos deficientes en TLR4 no mostraron un aumento significativo de la localización nuclear de p65 cuando fueron tratados con LPS (Figura 17 A). Es interesante notar que los cultivos TLR2-KO respondieron en forma normal a la estimulación con LPS, ya que este ligando es específico de TLR4 (Figura 17 A).

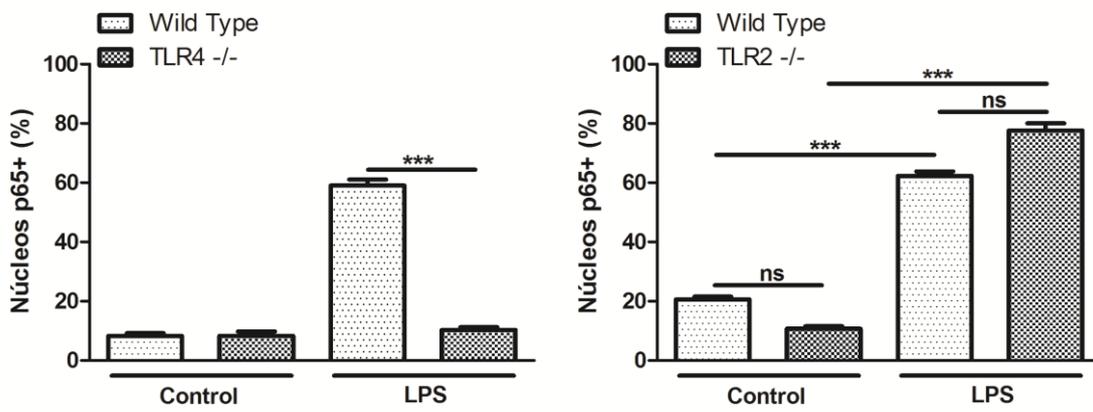
La activación sostenida del factor de transcripción NF- κ B en el tiempo podría ser un indicativo temprano de la conversión astrogliar hacia el perfil proinflamatorio. Para testear esta hipótesis, realizamos PCR cuantitativa en tiempo real para medir dos citoquinas proinflamatorias típicas como lo son IL1 β y TNF α . Las poblaciones astrogliales que fueron utilizadas para este análisis fueron los cultivos transfectados con plásmido mock o con el plásmido de expresión de TLR4 y posteriormente expuestos a LPS. Observamos que la sobreexpresión de TLR4 incrementó considerablemente la expresión de estas dos citoquinas proinflamatorias cuando fueron comparadas con los astrocitos transfectados con el plásmido mock (Figura 17 B).

Figura 17: La expresión de TLR4 en astrocitos facilita la polarización hacia el perfil proinflamatorio. A: Se muestran fotomicrografías representativas de cultivos enriquecidos en astrocitos TLR4 *-/-* y *wild type* tratados con LPS 25 ng/ml por 1 hora e inmunomarcadas con p65. Barra 50 μ m. B: Los gráficos muestran la cuantificación del porcentaje de células con marcación de p65 nuclear en cultivos astrogliales provenientes de animales *wild type*, TLR2 *-/-* o TLR4 *-/-* respectivamente. C: Los gráficos muestran la expresión de las citoquinas proinflamatorias: IL-1 β y TNF- α en astrocitos transfectados con el plásmido TLR4 y plásmido mock. Posterior a la transfección se trataron los astrocitos con LPS 25 ng/ml por 12 horas. Luego se realizó la extracción de RNA para su posterior amplificación. Los datos se muestran como medias obtenidas a partir de 3 determinaciones diferentes y representan la expresión relativa al housekeeping TBP por qRT-PCR. Las diferencias significativas fueron evaluadas con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn (B) o un test de Student de 2 colas (C). ***p < 0.001.

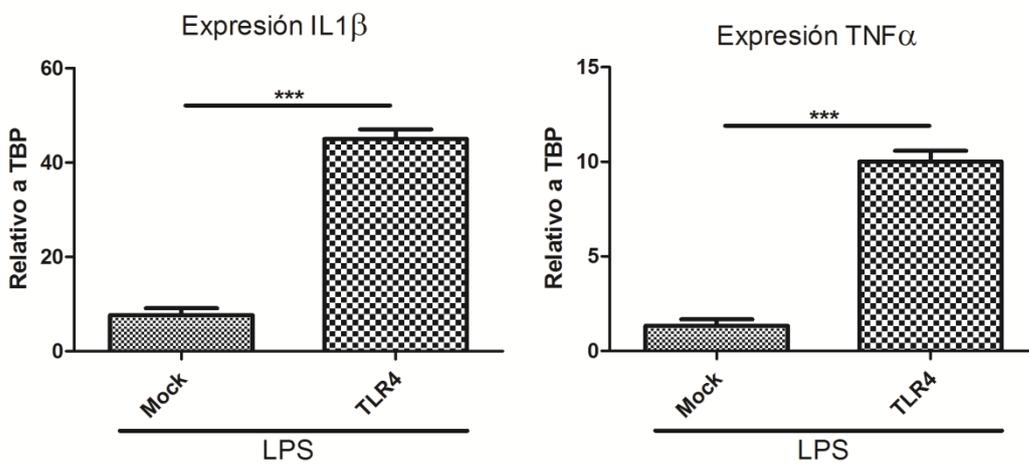
A



B



C



Se ha propuesto que la polarización astrogial al perfil proinflamatorio A1 es neurodegenerativa e induce muerte neuronal (Liddelw y col., 2017). Con el objetivo de comprobar si la polarización proinflamatoria de los astrocitos inducida por la sobreexpresión de TLR4 y la activación por LPS es neurodegenerativa, realizamos co-cultivos de astrocitos y neuronas corticales utilizando un diseño experimental que permitió tratar a los astrocitos por separado y luego exponer las neuronas a los mediadores secretados por los astrocitos. En estas condiciones, observamos una significativa disminución en la sobrevida neuronal cuando fueron expuestas a astrocitos tratados con LPS (Figura 18).

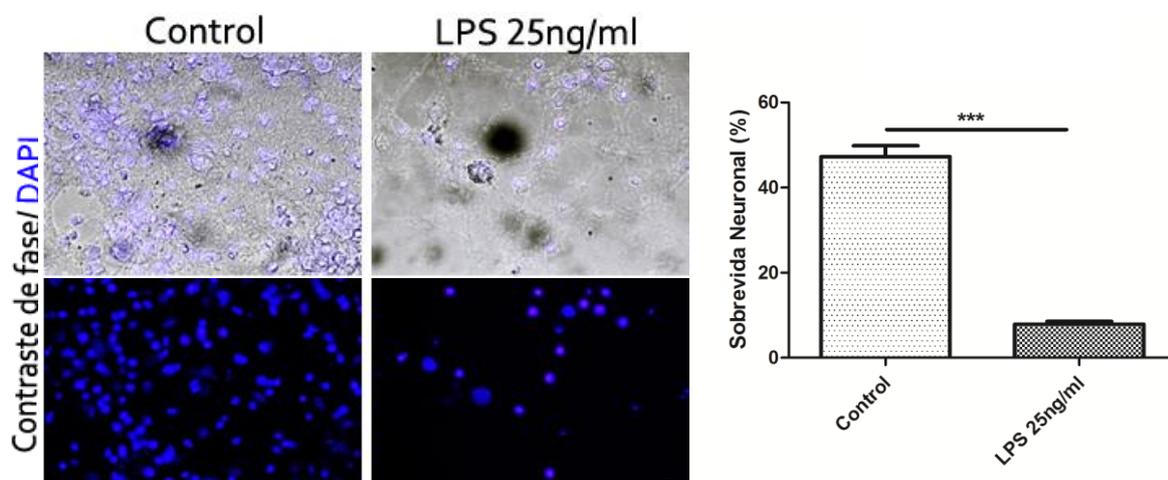


Figura 18: La activación de TLR4 por el PAMP LPS genera la conversión de los astrocitos al perfil A1 neurodegenerativo. Imágenes representativas de cultivos de neuronas corticales de 10 DIV co-cultivadas con astrocitos provenientes de animales *wild type* durante 18 horas y coloreadas con DAPI para evaluar la sobrevida neuronal analizando la morfología nuclear neuronal. Los astrocitos fueron tratados previamente con vehículo o el PAMP LPS 25 ng/ml por 3 horas. El gráfico muestra la sobrevida neuronal evaluada analizando la morfología nuclear neuronal. Cada tratamiento se hizo por triplicado en 3 experimentos diferentes. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por t-test de Student de 2 colas. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control *** $p < 0.001$.

El DAMP HMGB-1 está involucrado en la gliosis reactiva y la sobrevida neuronal

Los experimentos con LPS detallados en las secciones anteriores nos permitieron demostrar que la sobreexpresión de TLR4, tal como ocurre en condiciones de OGD, sensibiliza a los astrocitos a ligandos como el LPS, facilitando su polarización proinflamatoria al fenotipo A1, que es capaz de inducir muerte neuronal. Sin embargo,

en las condiciones de la isquemia cerebral, en ausencia de infección, no sería esperable la presencia de un PAMP como el LPS de origen bacteriano.

Existen reportes que muestran que, en condiciones de daño estériles como en la isquemia, existe una liberación del DAMP HMGB-1 desde las células en necrosis del *core* isquémico, tanto en roedores como en humanos, lo que ocasiona la respuesta de la inmunidad innata (Liesz y col., 2015).

Es por ello que decidimos investigar si un DAMP como HMGB-1, es capaz de modular la respuesta de los astrocitos y el destino sobre la población neuronal.

Los efectos del DAMP HMGB-1 son TLR2 y TLR4-dependientes en células gliales

Como comentamos previamente, se propone que los efectos de HMGB-1 serían mediados por receptores de patrones moleculares como TLR y RAGE (Park y col., 2006b). Es por ello, que nos propusimos estudiar si HMGB-1 tiene la capacidad de activar estos receptores *in vitro* en células gliales analizando el perfil de activación de su efector NF- κ B. Con el objetivo de establecer el requerimiento de los receptores realizamos ensayos de pérdida de función. Para tal fin, utilizamos cultivos gliales mixtos de animales *wild type*, TLR2-KO, TLR4-KO o bien bloqueamos el receptor RAGE con anticuerpos neutralizantes.

La exposición a HMGB-1 indujo la movilización de la subunidad p65 desde el citoplasma hacia el núcleo en las células gliales, lo que evidencia la activación de la ruta dependiente de NF- κ B. En los cultivos TLR2-KO y TLR4-KO observamos una clara disminución de la relocalización nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B al ser estimulados con HMGB-1 (Figura 19). De igual forma observamos una reducción parcial de la relocalización nuclear de p65 cuando bloqueamos RAGE utilizando anticuerpos neutralizantes (Figura 19). Estos resultados nos indican que el efecto de HMGB-1 sería parcialmente mediado por los receptores de patrones moleculares TLR2, TLR4 y RAGE.

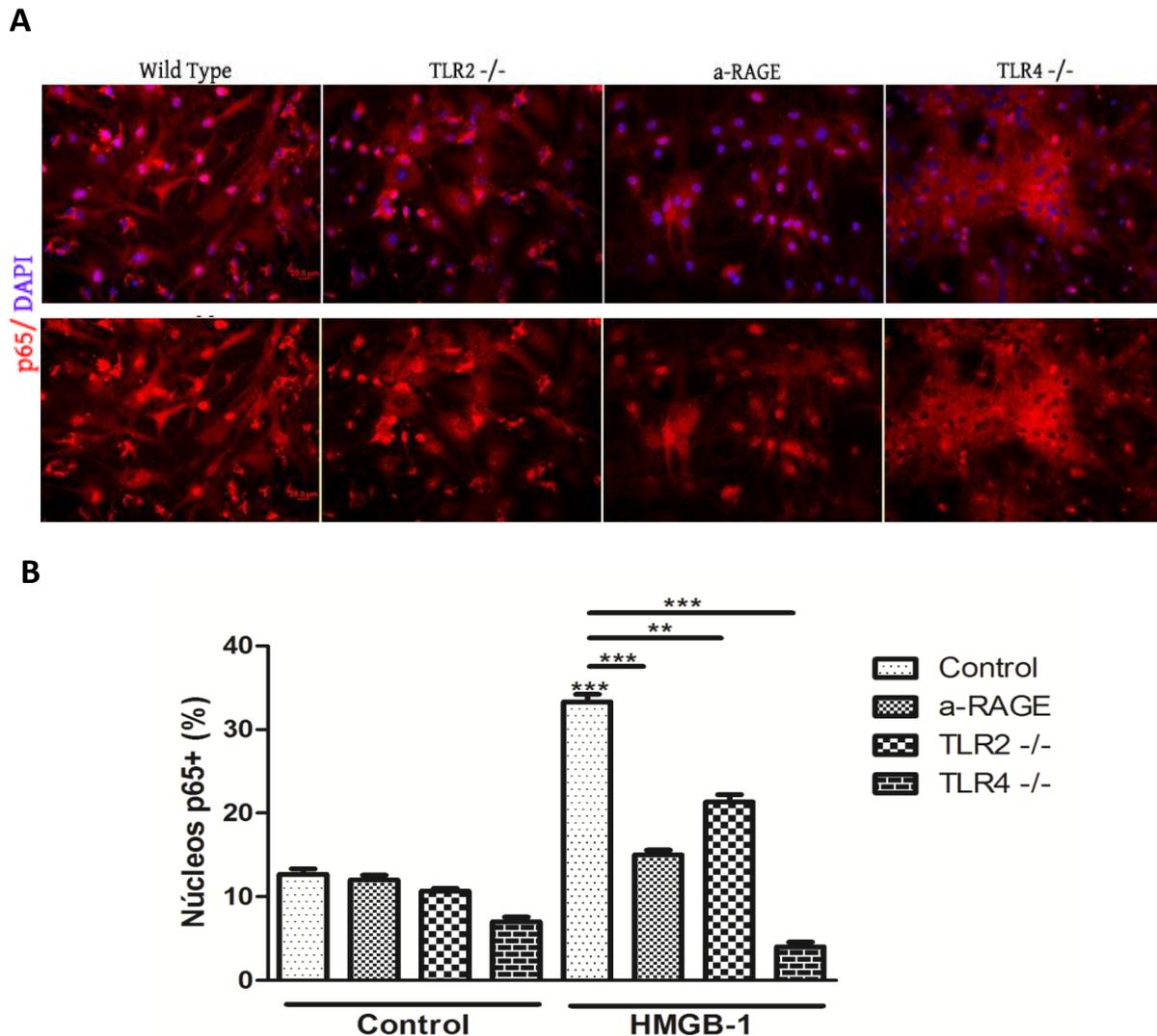


Figura 19: A: Imágenes representativas de la localización nuclear de p65 en astrocitos tratados con HMGB-1 500 ng/ml luego de 3 horas de exposición. Se observa que HMGB-1 activa NFκB en estos cultivos gliales y que se produce una disminución de la activación de NF-κB con las diferentes estrategias de pérdida de función. Barra = 20 μm. Cada tratamiento se hizo por triplicado en dos experimentos diferentes. B: El gráfico muestra la cuantificación de la localización nuclear de p65. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

La exposición a HMGB-1 aumenta la expresión del ARNm de TLR4

Los receptores de la inmunidad innata y sus ligandos tipo DAMP y PAMP muestran una gran promiscuidad de interacción ligando-receptor, la cual ha sido probablemente una ventaja evolutiva para permitir una más amplia respuesta del sistema inmune innato. También es común observar fenómenos de *feed forward* o retroalimentación positiva, donde los ligandos estimulan la expresión de su propio receptor. Es por ello

que nos propusimos estudiar si efectivamente HMGB-1 tiene la capacidad de inducir la expresión de TLR4 en astrocitos.

Para ello evaluamos mediante ensayos de RT-PCR si el DAMP HMGB-1 era capaz de inducir la expresión de dicho receptor. Observamos que el tratamiento con el DAMP HMGB-1 generó un claro aumento en el ARNm de TLR4 (Figura 20). Interessantemente, cuando utilizamos el inhibidor químico de TLR4 denominado VGX-1027 e incubamos con HMGB-1 no obtuvimos cambios estadísticamente significativos, mostrando que este efecto de *feed forward* podría ser mediado por los otros receptores de patrones moleculares sobre los cuales HMGB-1 tiene acción. Por otra parte evaluamos la expresión de una citoquina asociada a la respuesta antiinflamatoria como lo es TGF- β . Tanto los astrocitos control como los tratados con HMGB-1 no presentan expresión detectable del mRNA de esta citoquina, en cambio, cuando es agregado el VGX-1027 se puede observar incremento en la expresión del ARNm de TGF- β .

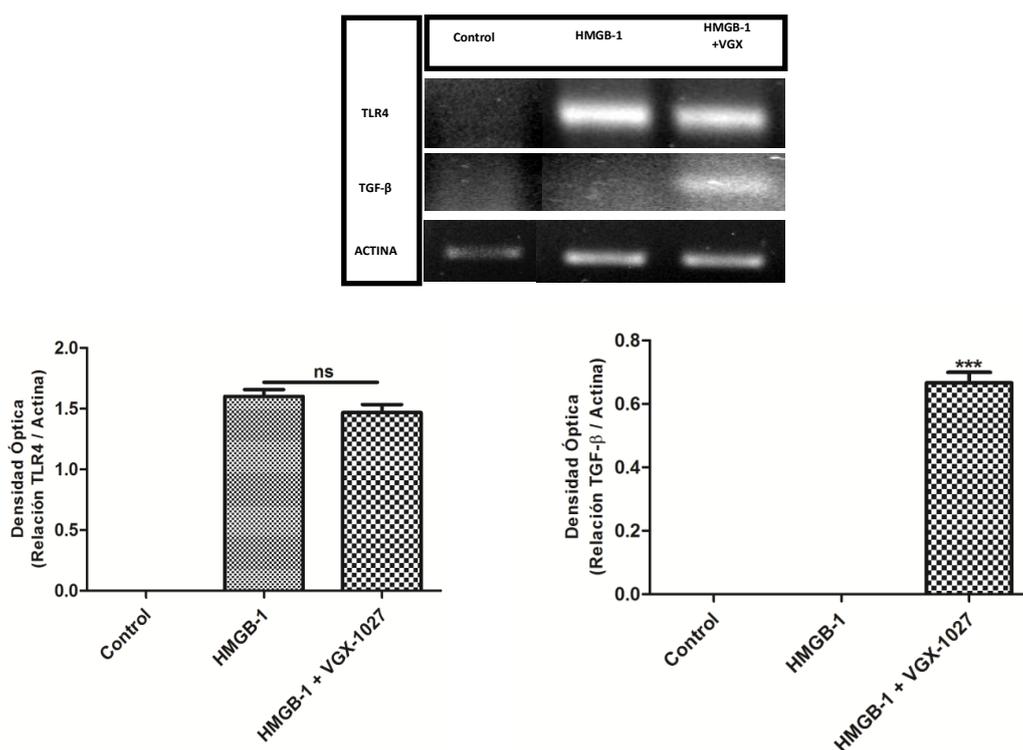


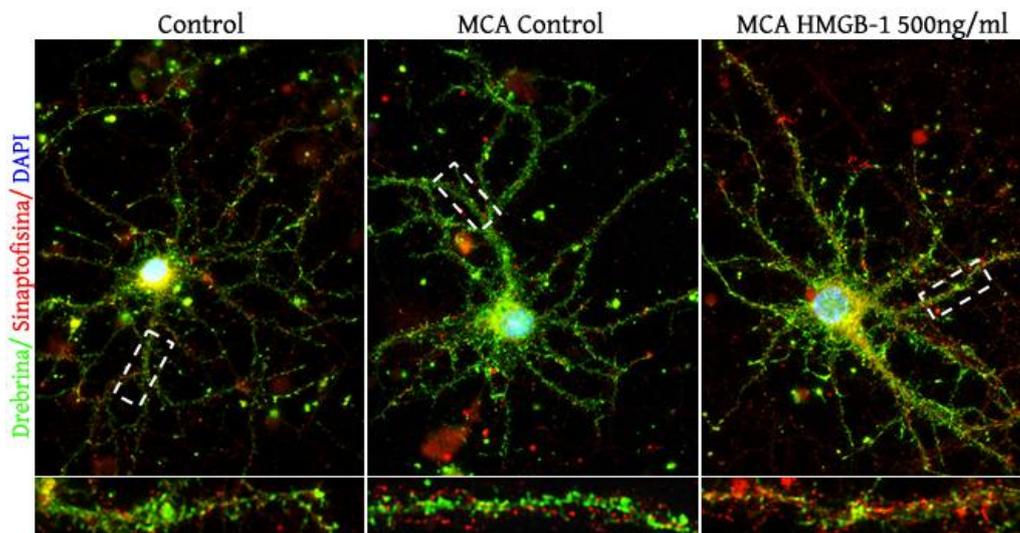
Figura 20: Los niveles de mRNA de TLR4 se incrementan cuando los astrocitos son estimulados con el DAMP HMGB-1. El tratamiento con el VGX-1027 un inhibidor químico TLR4, y en menor medida de TLR2, no produjo un efecto significativo en la expresión de TLR4 pero si indujo en la expresión de TGF- β en astrocitos tratados con el DAMP. Los gráficos muestran la cuantificación de densidad óptica de cada banda de TLR4 o TGF- β en relación a la banda correspondiente de actina. Cada tratamiento se hizo por triplicado en 3 experimentos diferentes. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

El medio condicionado de astrocitos expuestos a HMGB-1 produce sinaptogénesis en neuronas corticales

La liberación de HMGB-1 desde el *core* necrótico en la isquemia, podría tener efectos sobre las células de la glía en la penumbra. Subsecuentemente, estas células de la glía podrían liberar factores con efectos sobre las neuronas vecinas. Para intentar diseccionar estos efectos *in vitro*, partimos de cultivos enriquecidos en astrocitos expuestos al DAMP HMGB-1 y recolectamos medio condicionado de esos astrocitos (MCA). Luego utilizamos los MCA para tratar cultivos neuronales corticales y evaluamos la abundancia de sinapsis y la sobrevivencia neuronal.

Los resultados mostraron un aumento significativo en el número de *puncta sinápticos*, identificados por la superposición de los marcadores drebrina y sinaptofisina (Thiel, 1993; Takahashi y col., 2003) cuando las neuronas fueron tratadas durante 3 horas con los medios condicionados de astrocitos expuestos a HMGB-1. Esta corta incubación con los MCA no produjo cambios significativos en la sobrevivencia neuronal (Figura 21).

A



B

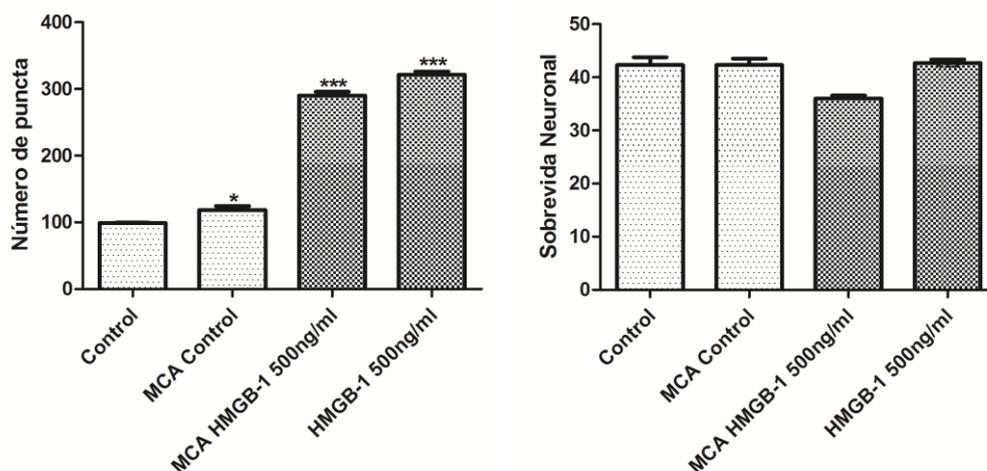


Figura 21: Las neuronas corticales tratadas durante 3 horas con medios condicionados de astrocitos (MCA) expuestos a HMGB-1 (500 ng/ml) aumentan su número de *puncta* sináptico al ser analizadas 18 horas luego de la exposición al MCA. A: Se muestran fotomicrografías representativas para Sinaptofisina y Drebrina en cultivos neuronales corticales tratados con MCA por 3 horas. Barra 50 μ m. B: El gráfico muestra el análisis de *puncta sinápticos*. Neuronas aisladas al azar fueron seleccionadas. Se realizó el merge para los canales verde y rojo y se seleccionaron secciones de neuritas de igual longitud (10 μ m) para cuantificar. Se utilizó el plugin del ImageJ Puncta Analyzer. El gráfico de la derecha muestra que la sobrevida neuronal no fue significativamente afectada durante la exposición al MCA tal como muestra la cuantificación del número de neuronas por campo. Cada tratamiento se hizo por triplicado en 3 experimentos diferentes. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los astrocitos expuestos a HMGB-1 producen un MCA que alteran la sobrevida neuronal

En la sección anterior mostramos que los MCA expuestos a HMGB-1 inducen sinaptogénesis pero no afectan significativamente la viabilidad neuronal. Esta ausencia de efecto tóxico fue observada a muy corto plazo de exposición al MCA (3 horas) y a través del uso de medios condicionados. Para investigar en mayor profundidad si la exposición a HMGB-1 es capaz de inducir astrocitos reactivos polarizados al perfil proinflamatorio que induce muerte neuronal, decidimos preparar cultivos reconstituidos de neuronas y glía.

Para ello partimos de cultivos gliales que fueron expuestos a HMGB-1 por 3 horas, que es el tiempo al cual se observa la máxima activación de NF- κ B. Luego, se retiró la HMGB-1, se renovó el medio de cultivo y se colocó sobre los astrocitos un cultivo neuronal primario cortical de 10DIV soportado en un cubreobjetos. Se incubó el conjunto durante 18 horas.

Los resultados mostraron una significativa reducción en la sobrevida neuronal luego de que estas permanecieran en contacto con los mediadores solubles secretados por la monocapa de astrocitos tratados con el DAMP HMGB-1 (Figura 22 A). Es interesante comentar que la pérdida de viabilidad resultó significativamente atenuada cuando se utilizaron cultivos gliales de animales TLR2-KO. El tratamiento con HMGB-1 en presencia de VGX-1027, un bloqueante químico de TLR2 y TLR4 (Stojanovic y col., 2007), también rescató parcialmente la sobrevida neuronal. Esto sugiere que dichos receptores, estarían involucrados en la polarización glial hacia el perfil neurodegenerativo inducido por la exposición a HMGB-1.

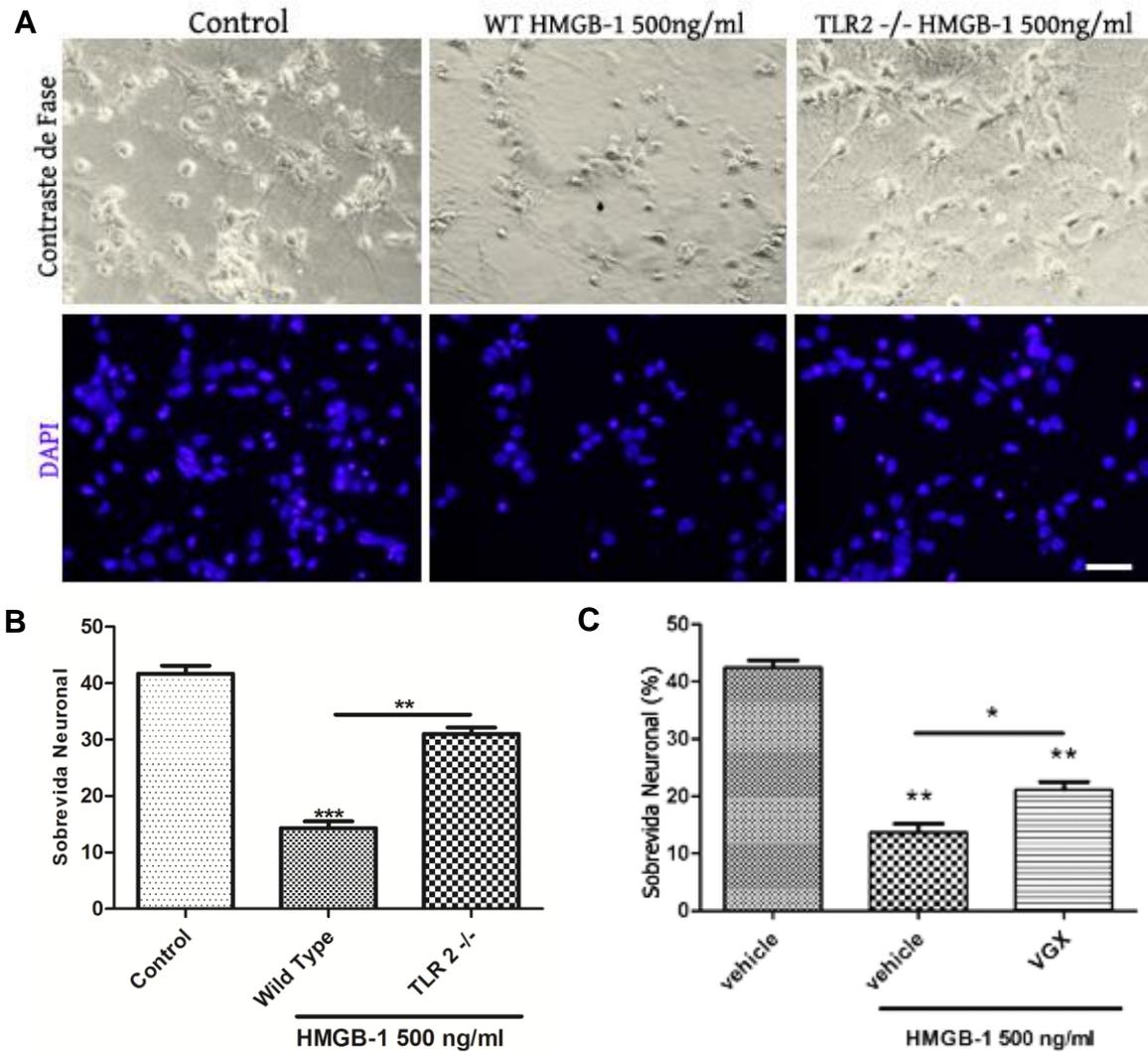


Figura 22: El DAMP HMGB-1 polariza los astrocitos al perfil neurodegenerativo. A: Imágenes representativas de neuronas corticales de 10 DIV fueron co-cultivadas con astrocitos provenientes de animales *wild type* o TLR2-KO durante 18 horas. Los astrocitos fueron tratados previamente con el DAMP HMGB-1 500 ng/ml por 3 horas. B y C: Cuantificación de la sobrevivencia neuronal a través de la determinación del número de núcleos neuronales normales. C: Neuronas corticales de 10 DIV fueron co-cultivadas con astrocitos expuestos previamente a HMGB-1 500 ng/ml por 3 horas. Se utilizaron astrocitos wild type, TLR2 o TLR4-KO. Los astrocitos wild type fueron controles o tratados previamente con el inhibidor VGX-1027 10 µg/ml por 1 hora. Se lavó y se agregó el DAMP HMGB-1 500 ng/ml por 3 horas. Cada tratamiento se hizo por triplicado en 2 experimentos diferentes. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001.

Expresión de TLR4 luego de isquemia por devascularización cortical

Los resultados comentados en las secciones anteriores mostraron una central participación del receptor de reconocimiento de patrones moleculares TLR4 en la conversión de los astrocitos reactivos al perfil proinflamatorio que induce neurodegeneración *in vitro*. En los siguientes experimentos intentamos encontrar el correlato *in vivo* de estos hallazgos, utilizando para ello el modelo de isquemia por devascularización cortical (DC) en roedores.

Luego de la isquemia por DC, analizamos por inmunohistoquímica e inmunoblots la expresión de TLR4 a distintos tiempos luego de inducida la lesión. Observamos a 1 DPI (DPI, días post-isquemia), el mayor número de células inmuno-positivas para TLR4 en la zona del *core* que tienen el aspecto morfológico clásico de los leucocitos infiltrantes de sangre periférica (Figura 23 A panel superior izquierdo). A 3 DPI observamos la mayor cantidad de células inmuno-positivas para TLR4 que presentan morfología compatible con astrocitos y microglía (Figura 23 A panel medio izquierdo). A 7 DPI se observan unas pocas células inmuno-positivas para TLR4 en la zona de la penumbra (Figura 23 A panel medio derecho). Finalmente a 14 DPI se observan células inmuno-positivas para TLR4 en cicatriz glial (Figura 23 A panel inferior). La cuantificación de la abundancia de células TLR4 inmunoreactivas mostró que el máximo de expresión se produce hacia 1 DPI en el *core* y a 3 DPI en la penumbra (Figura 23 B-C). Los ensayos de inmunoblots (Figura 23 C) demostraron un aumento significativo en la expresión de TLR4 luego de 3 DPI que mostró una leve disminución hacia 14 DPI (Figura 23 C).

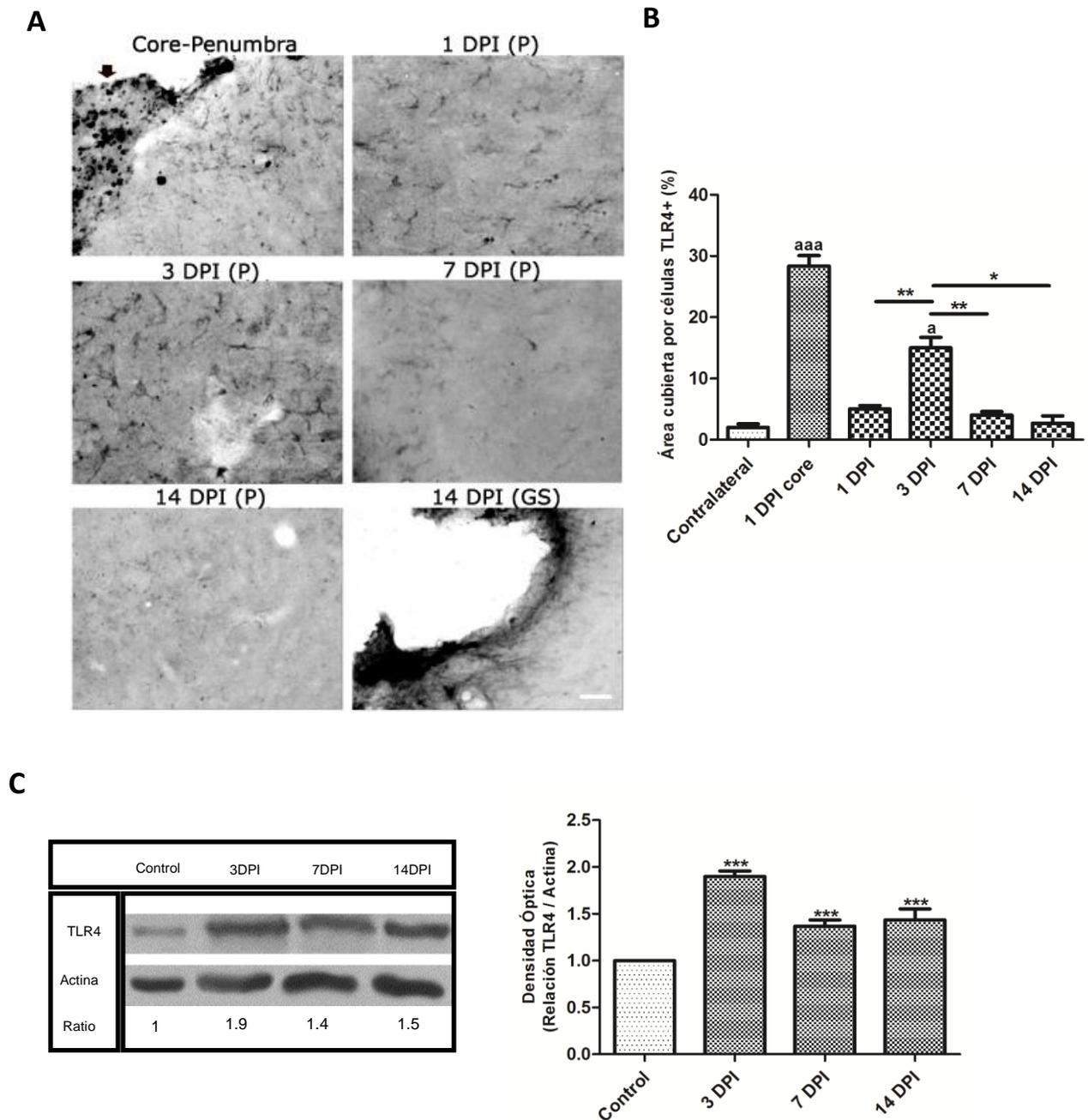


Figura 23: La expresión de TLR4 es inducida luego de la isquemia cerebral. A: Imágenes representativas a diferentes tiempos post isquemia por DC. La expresión de TLR4 está asociada probablemente con las células infiltrantes del sistema inmune en el core (flechas) y con células con morfología astrogliar en la penumbra isquémica. Se observa un mayor número de células TLR4 positivas en el core a 3 DPI. A 14 DPI se puede observar la clásica formación de la cicatriz glial (GS). B: El gráfico muestra el porcentaje del área cubierta por células positivas para TLR4 en el core y la penumbra. La tinción específica para TLR4 se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-Níquel) y la especificidad de los anticuerpos se chequeó en animales TLR4-KO. Barra = 100 μ m. C: Inmunoblot que muestra el incremento de TLR4 a distintos tiempos luego de inducida la lesión. Se compara el hemisferio lesionado contra el hemisferio control sin lesionar a 3DPI, que no fue significativamente diferente del control *sham* a ese tiempo. Se utilizó actina como control de carga. Se muestra la relación TLR4/actina. Las diferencias entre días post injuria fueron evaluadas por ANOVA de una vía seguido de Student-Newman-Keuls post-test. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Habiendo demostrado que la expresión de TLR4 aumenta luego de la isquemia cerebral, nos propusimos estudiar en qué tipo celular se expresa. Realizamos ensayos de inmunohistoquímica a distintos tiempos luego de generada la lesión y observamos a 7 DPI astrocitos positivos para TLR4, usando como marcador astrogial a la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) en zonas cercanas a la penumbra isquémica como así también rodeando el endotelio de vasos. Es importante mencionar que no todos los astrocitos GFAP positivos expresan TLR4 como se observa en los paneles de imágenes (Figura 24 A-B) y en la representación gráfica de la abundancia de astrocitos TLR4+ vs astrocitos totales (Figura 24 C).

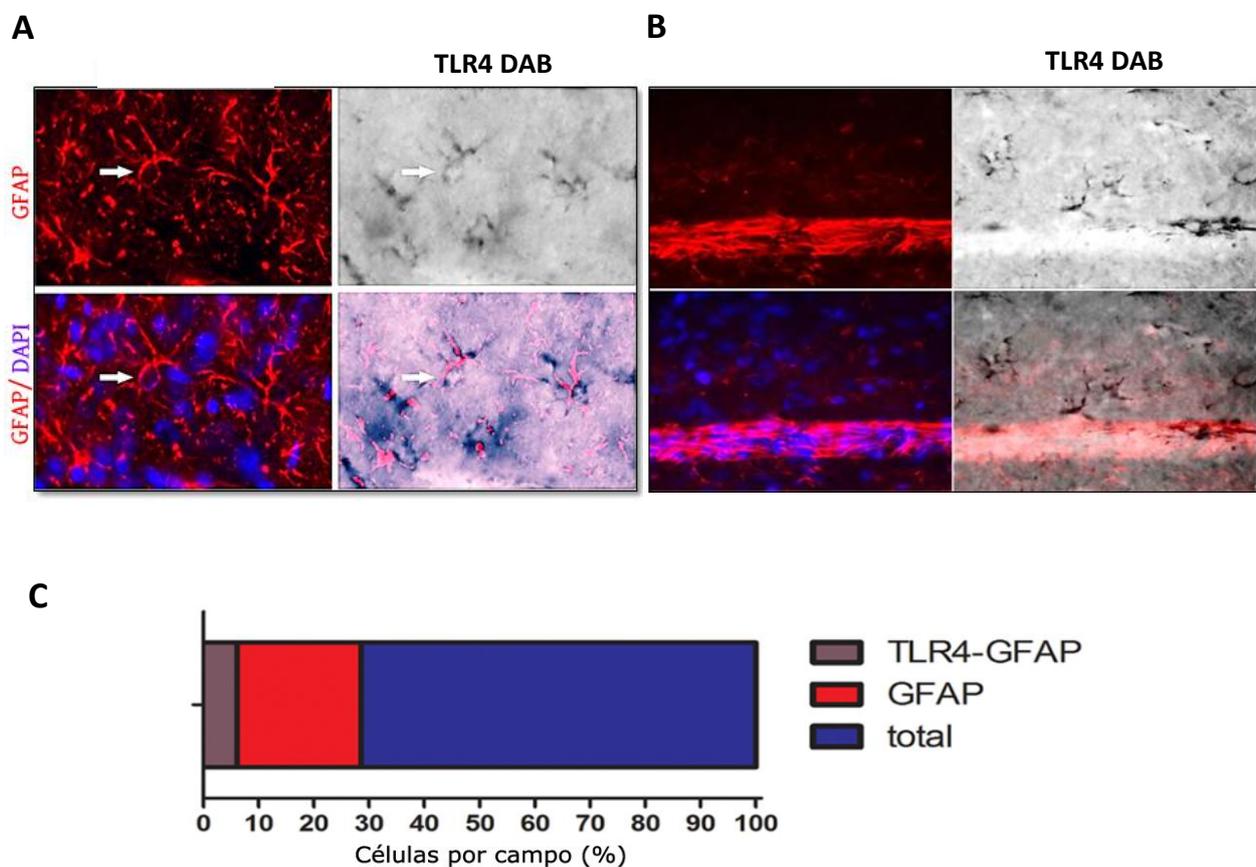


Figura 24: A: Expresión de TLR4 en astrocitos de la penumbra isquémica. Se observan fotomicrografías representativas de zonas de la penumbra isquémica donde observamos células inmuno marcadas para GFAP (rojo), TLR4 (negro) y DAPI (azul). Se muestran cortes de cerebro de animales a 7 DPI. Sólo algunos astrocitos GFAP positivos muestran expresión de TLR4. Barra = 10 μ m. B: Expresión de TLR4 en astrocitos vecinos al endotelio vascular. Se observan fotomicrografías de zonas de la penumbra isquémica donde observamos células inmuno marcadas para GFAP (rojo), TLR4 (negro) y DAPI (azul). Se muestran cortes de cerebros de animales a 7 DPI. Sólo algunos astrocitos GFAP positivos muestran expresión de TLR4. Barra = 10 μ m. C: El gráfico muestra el porcentaje de astrocitos positivos para GFAP y GFAP / TLR4 dentro de las células totales en un campo típico de penumbra isquémica a 7 DPI.

Activación de NF- κ B en el tejido isquémico

Teniendo en cuenta que la ruta activada por los receptores de patrones moleculares como TLR4 induce la señalización dependiente de NF- κ B, estudiamos la activación de este factor de transcripción en la zona isquémica. Nos propusimos estudiar la dinámica temporal y espacial de activación de este factor de transcripción en las células gliales. Para estudiar la activación de NF- κ B realizamos ensayos de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo que reconoce la subunidad p65 de este factor de transcripción. Tal como realizamos previamente en los ensayos *in vitro*, utilizamos p65 ya que forma parte del complejo de unión a ADN más abundante en el cerebro adulto de los roedores (revisado en Kaltschmidt, 2009). Este complejo es retenido en el citoplasma por I κ B, que oculta el NLS de p65, reteniéndolo en el citoplasma. La fosforilación de los residuos de serina de I κ B induce su degradación por el proteasoma, permitiendo así la translocación de NF- κ B al núcleo, donde este factor de transcripción se une a las secuencias de reconocimiento en los promotores de sus genes blanco (Terai y col., 1996).

La cuantificación de las células que mostraban p65 en localización nuclear nos permitió observar que el máximo de activación de NF- κ B se produce a los 3 y a los 7 DPI en un área anatómica que coincide con la penumbra isquémica (Figura 25).

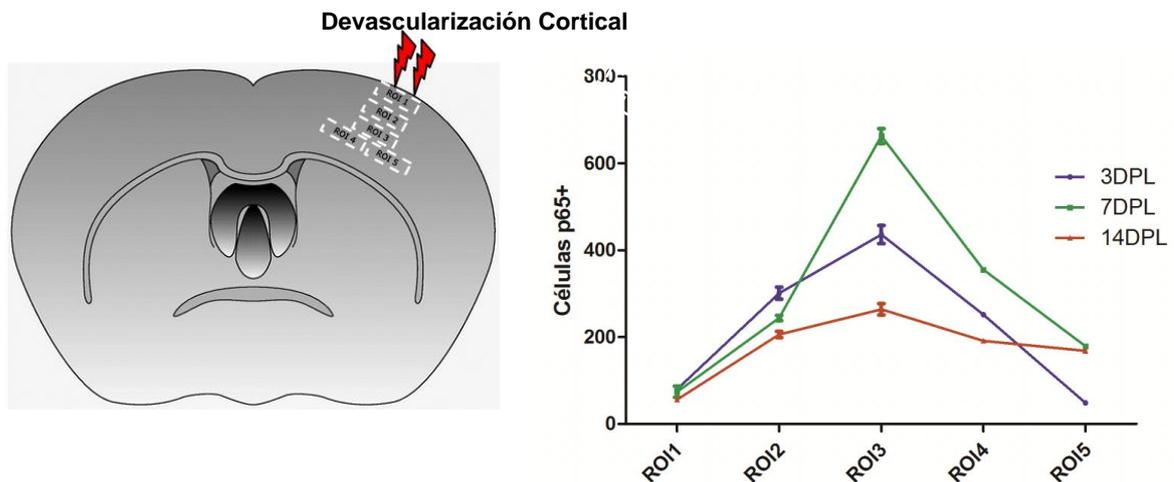


Figura 25: Evaluación semicuantitativa de la activación de NF- κ B en el tejido isquémico a 3, 7 y 14 días de inducida la lesión a diferentes distancias del core isquémico (ROI 1). Distintas áreas de interés (ROI) de 852x640 pixels cercanas a la lesión fueron analizadas. La tinción se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-níquel) utilizando a p65 y su localización nuclear como marcador de activación de NF- κ B. El gráfico muestra la abundancia de células con marcación nuclear para p65.

Disminución de la gliosis reactiva y la neurodegeneración en el tejido isquémico por tratamiento con sulfasalazina (SFZ)

En base a los hallazgos *in vitro* e *in vivo* que conectan el receptor TLR4 y su efector NF- κ B con la polarización al fenotipo proinflamatorio-neurodegenerativo astrogliar denominado A1, decidimos realizar un estudio de pérdida de función bloqueando NF- κ B luego de la isquemia con el bloqueante químico de NF- κ B sulfasalazina (SFZ). La SFZ es un derivado de ácido 5-aminosalicílico, (5-ASA). Se utiliza principalmente como agente antiinflamatorio en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y de la artritis reumatoide. Se ha demostrado que parte de la actividad de la SFZ como fármaco antiinflamatorio se debe a que inhibe específicamente la activación de NF- κ B (actuando sobre el complejo IKK quinasa) (Robe y col., 2004).

Inmediatamente después de realizada la isquemia cerebral, los animales recibieron SFZ o vehículo cada 12 horas durante 3 días. Cuando analizamos la morfología astrogliar en los cerebros de los animales tratados con SFZ, encontramos a 3 DPI una marcada disminución de la gliosis reactiva evaluada como el área ocupada por los astrocitos marcados con GFAP (Figura 26). La microglía, por otro lado, también mostró un menor nivel de reactividad microglial en el grupo de animales tratados con SFZ (Figura 26).

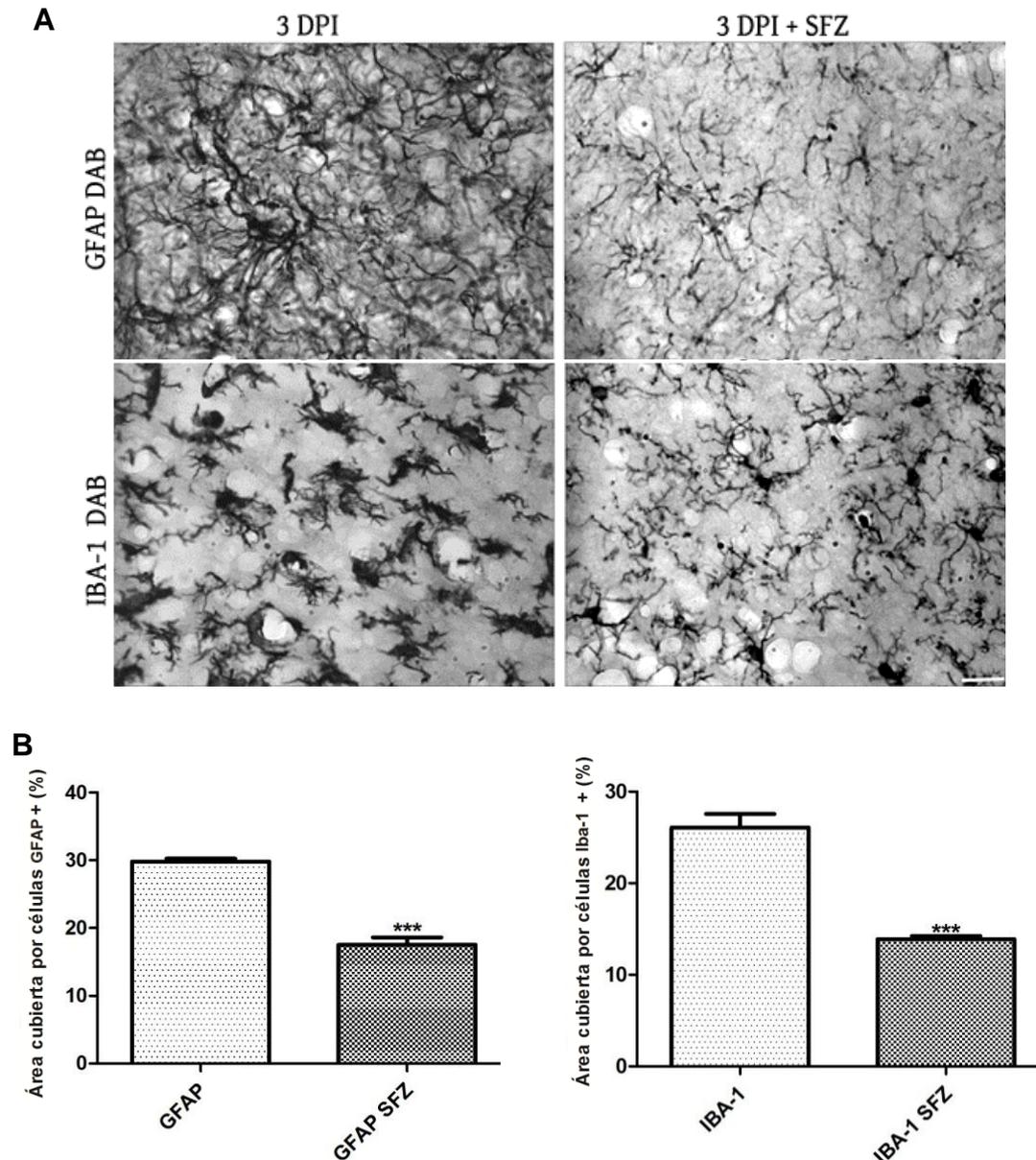


Figura 26: Disminución de la gliosis reactiva en el tejido isquémico a 3 DPI por el tratamiento temprano con SFZ. Se administró sulfasalazina 200 mg/kg o vehículo cada 12 horas IP en animales isquémicos durante 3 días. A: Se muestran fotomicrografías representativas de regiones de la penumbra limitantes con el core isquémico donde se observan células inmunopositivas para GFAP e IBA-1. La tinción se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-níquel). (Barra=500µm). B: Los gráficos muestran la cuantificación del área cubierta por células GFAP+ e Iba-1+ respectivamente. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por t-test de Student de 2 colas. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control ***p<0.001.

Luego estudiamos la supervivencia neuronal a la isquemia en los animales tratados con SFZ. La movilización del factor de transcripción específico de neuronas NeuN, desde su localización típica nuclear hacia el citoplasma, e incluso su completa desaparición del soma neuronal es un signo temprano de degeneración neuronal (Robertson y col., 2006; Angelo y col., 2009). Cuando analizamos las alteraciones neuronales a través

de la cuantificación de la localización atípica citoplasmática de NeuN, observamos que disminuyen significativamente a 3 DPI en los animales tratados con SFZ (Figura 27).

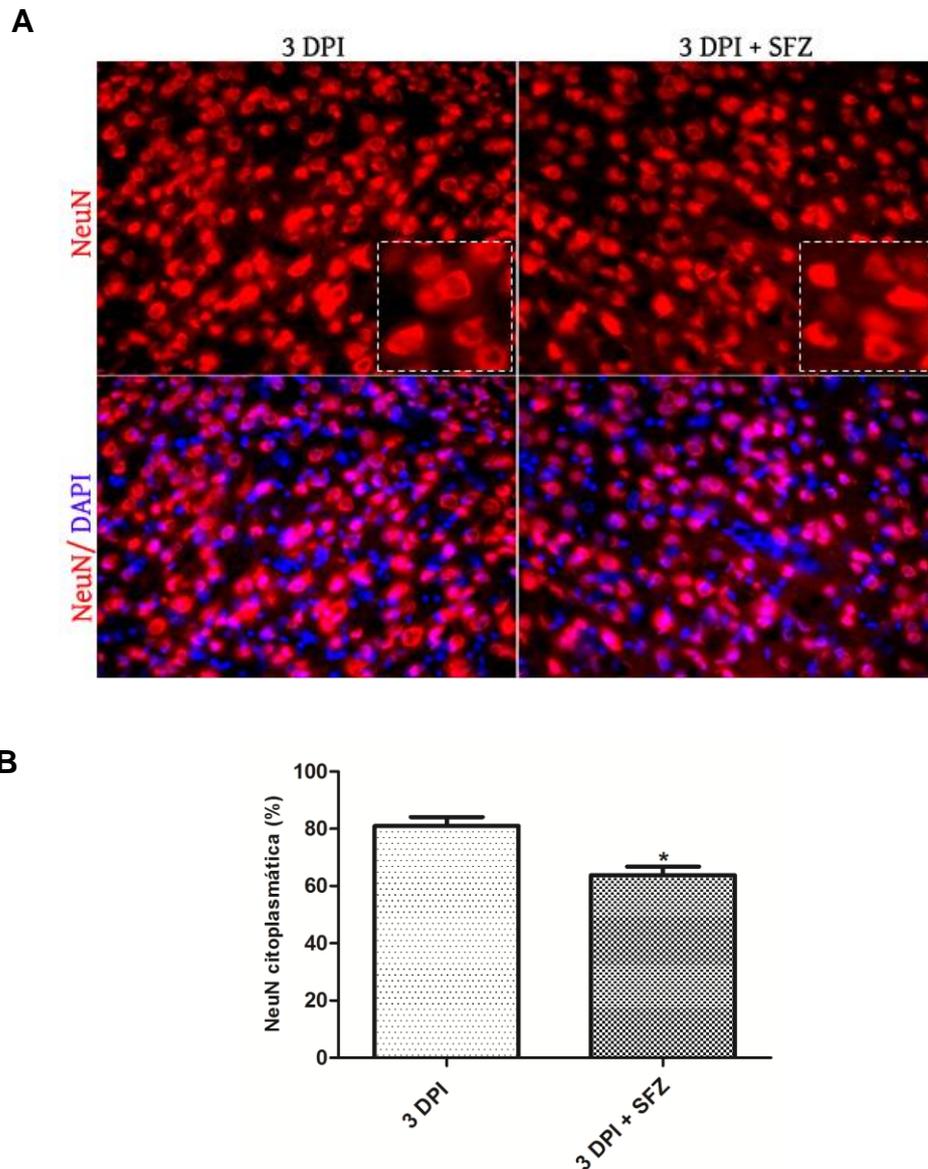


Figura 27: Disminución de la neurodegeneración en el tejido isquémico a 3 DPI. A: Se muestran fotomicrografías de alto aumento de regiones de la penumbra limitantes con el *core* isquémico donde se observan células inmunopositivas para NeuN (Barra=30 μ m). Los inset muestran el detalle de los somas neuronales en el área de la penumbra isquémica de la corteza cerebral. B: Cuantificación del daño neuronal a través de la localización citoplasmática del marcador neuronal NeuN. Las diferencias entre tratamientos fueron evaluadas por t-test de Student de 2 colas. Los asteriscos señalan diferencias respecto del control * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

A partir de los resultados obtenidos y sabiendo que los astrocitos reactivos participan en la formación de la cicatriz glial (revisado en Sofroniew, 2009), especialmente aquellos que rodean al *core* isquémico, utilizamos el mismo modelo experimental de isquemia para visualizar como se encontraban los astrocitos en esta zona en los animales tratados tempranamente con SFZ. A los 14 DPI en este modelo de isquemia

por DC observamos, en los animales tratados con vehículo, la clásica imagen de formación de cicatriz glial por parte de los astrocitos que reordenan sus prolongaciones GFAP+ en forma de empalizada o cicatriz rodeando al *core* (Figura 28, panel superior). Por otro lado, en los animales tratados con SFZ podemos apreciar una mayor desorganización de los procesos astrogliales y no se observa claramente el inicio de la formación de la cicatriz glial (Figura 28, panel inferior).

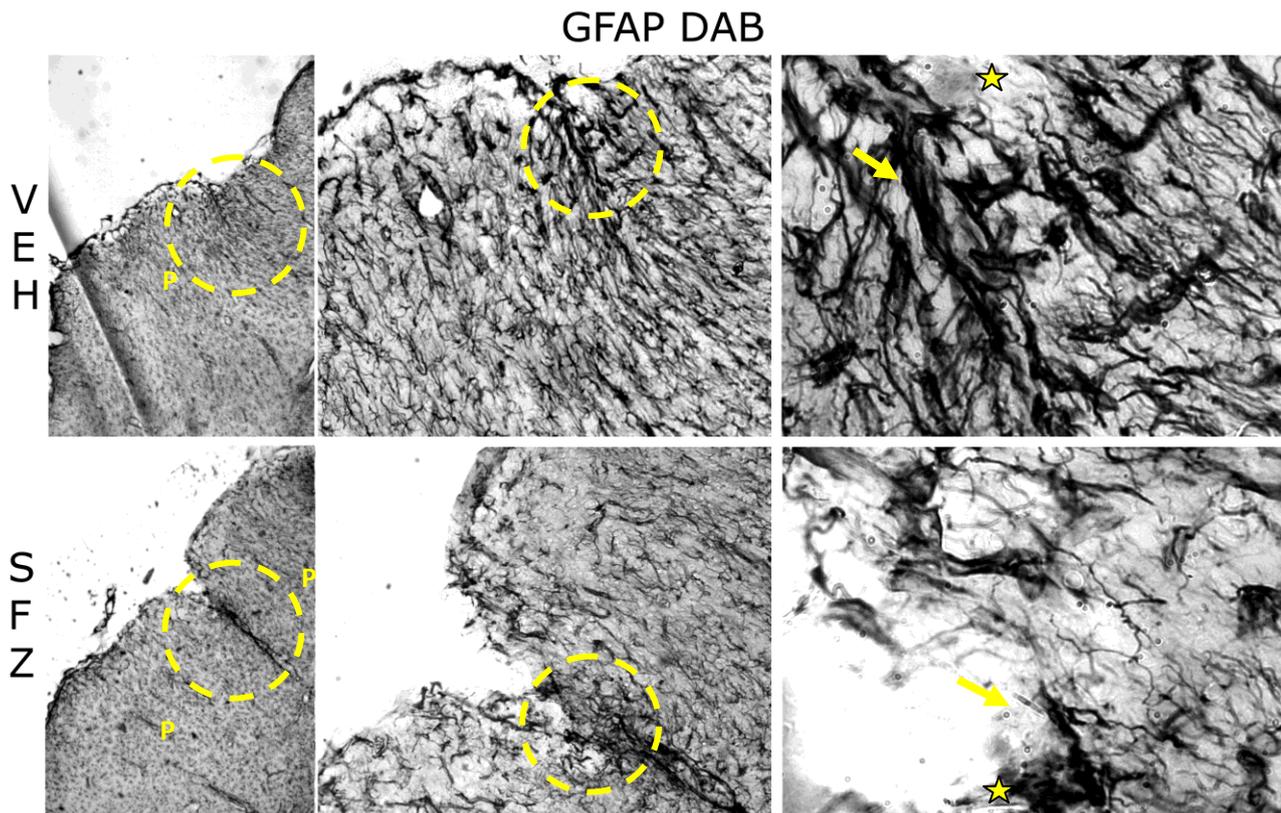


Figura 28: El tratamiento temprano con sulfasalazina por 3 días altera gliosis reactiva y la normal formación de la cicatriz glial a 14 DPI. Se administró sulfasalazina 200 mg/kg cada 12 horas (i.p) en animales isquémicos durante 3 días. Se administró vehículo en animales isquémicos control. La tinción se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-níquel). Se muestran fotomicrografías a distintos aumentos de regiones limitantes al *core* isquémico en animales de 14 días post isquemia donde se observan células inmunopositivas para GFAP. Se observan en flechas la diferencia en la orientación y morfología de los astrocitos en los animales isquémicos que recibieron SFZ. Core. P: Penumbra. La tinción se realizó mediante inmunohistoquímica (DAB-níquel).

Discusión

Inducción de la expresión de TLR4 en astrocitos

El estudio de la expresión de los TLRs en tejido nervioso ha cobrado gran interés en los últimos años por su clara implicancia en los fenómenos neuroinflamatorios en diferentes estadios patológicos del SNC. Especialmente la expresión de TLR4 ha sido estudiada por numerosos autores que han demostrado, en diferentes modelos experimentales, la expresión de este receptor tanto en el SNC (Yao y col., 2013; Facci y col., 2014), como en el sistema nervioso periférico (Anderson y col., 2016; Church y col., 2016). La mayoría de los trabajos estudiaron la expresión de TLR4 en la microglía, que son las células inmunes profesionales del SNC. Nuestro trabajo se enfocó en estudiar si los astrocitos reactivos eran capaces de comportarse como células facultativas del sistema inmune innato, expresando TLR4.

En este trabajo de tesis observamos que los astrocitos expresan TLR4 *in vitro*, independientemente del tipo de cultivo utilizado. De hecho, los astrocitos expresaron TLR4 en cultivos mixtos gliales (conteniendo microglía y astrocitos) y en cultivos enriquecidos en astrocitos, libres de microglía. Se ha propuesto que la presencia de pocas células microgliales en cultivos enriquecidos en astrocitos sería esencial para la respuesta astrogliar a LPS y otros ligandos de TLR (Holm y col., 2012). Sin embargo, otros autores han demostrado que los astrocitos purificados son capaces de unir LPS, activando la cascada de señalización intracelular río abajo de TLR4 (Marinelli y col., 2015). Es interesante notar que en nuestros experimentos, la presencia de microglía no fue necesaria para que los astrocitos induzcan su expresión de TLR4. La expresión de TLR4 astrogliar se incrementó por la exposición a la OGD. La OGD imita *in vitro* la situación fisiopatológica de depleción de oxígeno y glucosa que enfrentan las células en el núcleo isquémico y la penumbra *in vivo* luego de la isquemia cerebral.

La expresión de TLR4 en astrocitos se ha detectado raramente en el cerebro adulto normal (Nakano y col., 2015). Sin embargo, diferentes estudios muestran expresión de TLR4 en astrocitos en cerebros lesionados de forma aguda o crónica (van Beijnum y col., 2008; Zamanian y col., 2012), incluida la isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media (del inglés MCAO *Middle Cerebral Artery Occlusion*) (De Paola y col., 2012). Por otra parte, la inhibición de TLR4 o la delección genética de este receptor tienen un efecto beneficioso sobre la evolución de la esclerosis lateral amiotrófica experimental (Caso y col., 2007; Lee y col., 2015) como así también sobre la isquemia para reducir el volumen de infarto y disminuir los marcadores inflamatorios después de la MCAO (Qiu y col., 2010).

En este trabajo de tesis, encontramos que la expresión de TLR4 en astrocitos se induce en la isquemia cerebral focal por devascularización cortical. El análisis de las

secciones inmunomarcadas para TLR4 nos permitió evidenciar que una población específica de astrocitos de la penumbra expresa TLR4 después de la isquemia focal *in vivo*. Si bien la expresión inicial de TLR4 se asoció con macrófagos infiltrantes provenientes de sangre periférica y microglía residente activada después de 3 días de generada la isquemia, se detectó expresión de TLR4 en astrocitos de la penumbra. Interesantemente, nuestro trabajo mostró que esta expresión es transitoria, disminuyendo a los 14 DPI.

La tipificación morfológica de los astrocitos inmunoreactivos mostró que TLR4 no se expresa en toda la población de astrocitos de la penumbra, sino en una subpoblación que parece no estar morfológicamente polarizada hacia el núcleo isquémico, como si lo están la mayoría de los astrocitos reactivos penumbrales. Un trabajo reciente del laboratorio de la Dra. Magdalena Gotz (Bardehle y col., 2013) ha demostrado al menos tres poblaciones de astrocitos que responden en forma diferente a lesiones focales. Mientras que la mayoría de los astrocitos se polarizan hacia el sitio de la lesión, otros conservan su morfología a pesar de reaccionar claramente a la lesión volviéndose hipertróficos y un tercer grupo, localizados en forma cercana a los vasos sanguíneos serían los únicos que retienen capacidad proliferativa (Bardehle y col., 2013). Por otro lado existen numerosas evidencias de subpoblaciones de astrocitos que tienen un comportamiento diferencial frente a las lesiones agudas del SNC, aún dentro de la misma región anatómica (revisado en Ramos, 2016). Más aún, nuestro laboratorio logró aislar una población específica de astrocitos derivados de la isquemia capaces de proliferar *in vitro* en forma prácticamente indefinida (Villarreal y col., 2016), comportándose en forma muy diferente a astrocitos normales *in vitro*, pero en una forma similar a los astrocitos derivados de lesiones de esclerosis lateral amiotrófica (Diaz-Amarilla y col., 2011; Trias y col., 2013). Teniendo en cuenta estas evidencias de la heterogeneidad astrogliar y el comportamiento diferencial de las diferentes subpoblaciones de astrocitos (revisado en Ramos, 2016; Villarreal y col., 2016), nuestros resultados sugieren que después del daño cerebral focal, TLR4 se expresa en células inmunes profesionales como macrófagos infiltrantes y microglía, pero también por una subpoblación de astrocitos de la penumbra con un papel aún desconocido.

La vía de señalización que dirige la expresión de TLR4 en los astrocitos es aún desconocida, pero se especula que la liberación de DAMP derivados de las células necróticas del núcleo isquémico y de mediadores de los macrófagos invasores probablemente estén implicados (Muhammad y col., 2008; van Beijnum y col., 2008). Diferentes receptores de patrones moleculares, incluyendo a TLR4, aumentan su expresión frente a la presencia de sus ligandos, en un mecanismo definido como

feedforward o retroalimentación positiva. En el caso de la injuria aguda al SNC, varios DAMP, por ejemplo HMGB-1 liberado de neuronas necróticas y S100B, (derivado de la glía) son capaces de inducir la expresión de su propio receptor (Qiu y col., 2010; Villarreal y col., 2014; Lee y col., 2015), a través de un mecanismo dependiente del factor de transcripción NF- κ B. Diferentes trabajos muestran la implicancia central de la activación de este factor de transcripción en la isquemia cerebral y la posterior liberación de citoquinas proinflamatorias que propagan la neuroinflamación hacia regiones distales del SNC (Harari, 2010; Zhao y col., 2018).

TLR4 en la conversión de los astrocitos hacia el perfil proinflamatorio que induce degeneración neuronal

La astrogliosis reactiva es un proceso continuo de cambios graduales y progresivos en la expresión génica y en la morfología celular. Si bien la astrogliosis es un proceso altamente genérico, se han detectado diferentes respuestas de acuerdo al tipo de lesión (revisado en Sofroniew, 2009). En esta revisión el autor dividió a la gliosis reactiva según el grado de superposición de los dominios astrogliales en tres niveles: i) gliosis leve a moderada, ii) gliosis severa y iii) gliosis muy severa con formación de cicatriz glial. En su forma leve, los astrocitos exhiben un aumento en la expresión de GFAP e hiperplasia del cuerpo celular y de las prolongaciones. Este estadio leve es reversible y, si la injuria se resuelve, el tejido y los astrocitos retoman su apariencia normal. En sus formas severas, los astrocitos sufren proliferación celular, además de mostrar una expresión pronunciada de GFAP y una mayor hipertrofia con respecto a la astrogliosis leve. Como consecuencia, los dominios celulares de los astrocitos comienzan a superponerse, se produce una interacción con otros tipos celulares y deposición de una matriz extracelular de colágeno muy densa, lo cual conlleva a la formación de una cicatriz glial. Esta cicatriz glial actúa como una barrera que limita la invasión de las células inflamatorias provenientes de la periferia, pero también impide la reconexión neuronal ya que inhibe el crecimiento axonal. Así la cicatriz glial tendría efectos tanto benéficos como perjudiciales para la sobrevivencia neuronal (revisado en Sofroniew, 2010). Estudios posteriores profundizaron esta idea y, con el advenimiento de la transcriptómica (Zamanian y col., 2012) y luego con la disponibilidad de RNAseq específica de astrocitos reactivos (Liddel y col., 2017; Clarke y col., 2018) se pudo definir el concepto de polarización astrogliosa al *fenotipo proinflamatorio* que induce neurodegeneración. Actualmente se acepta que los astrocitos reactivos están divididos

en dos grandes grupos: A1 que son neuroinflamatorios, aumentan la expresión de diferentes genes asociados con la cascada del complemento y la expresión de citoquinas proinflamatorias; mientras que los astrocitos polarizados al fenotipo A2 son neuroprotectores y expresan diferentes factores que facilitan la supervivencia neuronal, reclutan microglía, expresan citoquinas antiinflamatorias y favorecen la reconexión sináptica (Liddel y col., 2017). Recientemente, se observó además que la población de astrocitos A1 se incrementa con el envejecimiento, estableciendo un fuerte vínculo con diferentes enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, entre otras, con este fenotipo proinflamatorio astrogliar (Clarke y col., 2018).

Diferentes trabajos han puesto en evidencia la importancia de TLR4 en la gliosis reactiva. Alfonso-Loeches y colaboradores mostraron que ratones *knockout* para TLR4 expuestos a etanol presentaron menor gliosis reactiva y menor expresión de GFAP en astrocitos (Alfonso-Loeches y col., 2010). Otros grupos han demostrado que los ratones deficientes en TLR4 tienen un volumen de infarto reducido después la isquemia cerebral en comparación con animales *wild type* (Caso y col., 2007).

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de TLR4 está asociada con la astrogliosis reactiva y que la expresión de TLR4 vuelve a los astrocitos más plausibles de polarizar al fenotipo A1 si existen ligandos de TLR4 disponibles. Así la sobreexpresión de TLR4 por OGD o los paradigmas de sobreexpresión plasmídica nos permitieron observar que los astrocitos que sobreexpresan TLR4 presentan una respuesta exacerbada a LPS en términos de filamentación, activación de NF- κ B y expresión de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α . Es interesante notar que la activación de NF- κ B no sólo fue mayor en cuanto a intensidad, sino que fue más duradera en el tiempo, no mostrando el clásico perfil de activación e inactivación de los astrocitos control.

Es importante mencionar que si bien observamos en esta tesis que los astrocitos pueden reaccionar frente a un PAMP y modificar su perfil hacia el A1, la microglía puede potenciar este efecto. Un trabajo reciente demostró este fenómeno al utilizar NLY01, un agonista de un receptor tipo glucagón péptido-1 (GLP1R) que demostró proteger neuronas dopaminérgicas en un modelo de enfermedad de Parkinson tanto en neuronas de roedores como en neuronas humanas. Este efecto fue generado a partir de la inhibición de conversión inflamatoria de la microglía, lo que evitó que los astrocitos modifiquen su perfil hacia el A1 proinflamatorio (Yun y col., 2018).

Nuestros experimentos mostraron que el perfil proinflamatorio astrogliar inducido por la sobreexpresión de TLR4 y posterior exposición a un PAMP como LPS demostró ser neurodegenerativo en los ensayos de cocultivo sin contacto celular. Estas evidencias nos permiten especular con una participación importante de TLR4 y su ruta de

señalización mediada por NF- κ B en la conversión de los astrocitos hacia el perfil A1 proinflamatorio neurodegenerativo.

La hipótesis prevalente en el campo de la gliosis reactiva indica que el gradiente de DAMP y otros morfógenos sería el factor principal que determina la intensidad de la gliosis reactiva e induce una distribución radial desde un punto de lesión focal en el cerebro (Burda y Sofroniew y col., 2014). En esta tesis, expandimos este concepto para incluir la noción de que la expresión de los PRR en astrocitos, como TLR4, también sería necesaria para responder a los DAMP con el fin de producir el gradiente de gliosis reactiva *in vivo*.

La evidencia acumulada en el estudio de la respuesta de inmunidad innata ha mostrado que existen reguladores negativos de la señalización mediada por TLR4. El receptor TREM-2 es un reconocido limitador de la actividad de TLR4, y por lo tanto se comporta como facilitador anti-inflamatorio. TREM-2 se expresa principalmente en macrófagos y células derivadas de monocitos, incluida la microglía (Pelham, 2014), suprime la producción de citoquinas proinflamatorias y promueve la fagocitosis por las células inmunes profesionales (Turnbull y col., 2006; Hoyos y col., 2014; Sugimoto y col., 2014). El bloqueo de TREM-2 en un modelo de encefalitis autoinmune experimental exacerba la enfermedad, mientras que el tratamiento con células mieloides que expresan TREM-2 reduce la inflamación y mejora el puntaje neurológico en ese modelo experimental de esclerosis múltiple (Takahashi y col., 2005; Piccio y col., 2007).

El trabajo de nuestro laboratorio demostró que los astrocitos cultivados en presencia o ausencia de microglía, expresan TREM-2 a un nivel muy bajo, y que la exposición a OGD, al DAMP HMGB-1 o al PAMP LPS, inducen la expresión de TREM-2 en los astrocitos (Rosciszewski y col., 2017). Es interesante especular que TREM-2 en astrocitos podría ser un limitador de la conversión al fenotipo proinflamatorio A1, o en otros términos, un facilitador del fenotipo A2 anti-inflamatorio. En concordancia con esta idea el ensayo de *crosslinking* para desencadenar la activación de TREM-2 (Hamerman y col., 2006), la sobreexpresión de TREM-2 o su molécula adaptadora DAP12 mostraron una disminución parcial en la activación de NF- κ B por LPS, limitando la conversión proinflamatoria astrogliar, de acuerdo con la función propuesta para TREM-2 en otros tipos de células (Rosciszewski y col., 2017).

Los efectos de HMGB-1 como modelo de DAMP en la injuria al SNC

HMGB-1 es una proteína nuclear de expresión ubicua que está implicada en el mantenimiento de la estructura de la cromatina (Ellwood y col., 2000; Verrijdt y col.,

2002). Estudios de las últimas dos décadas han demostrado que HMGB-1 es liberada desde las neuronas en necrosis y se comporta como DAMP activando la inmunidad innata a través de la interacción con receptores de patrones moleculares como los TLR (Qiu y col., 2008; Maroso y col., 2010). Trabajos posteriores han demostrado que HMGB-1 participa en la neuroinflamación, modula la autofagia y la apoptosis, y también regula la transcripción génica (Angelopoulou y col., 2018).

Nuestros resultados mostraron que la exposición de los astrocitos a HMGB-1 produce la respuesta clásica que es la activación de NF- κ B, aunque con un perfil diferente tanto a nivel temporal como en su magnitud comparado con activadores potentes como el LPS (Cadena y col., 2017).

Los ensayos de pérdida de función que realizamos nos permitieron evidenciar que la capacidad de HMGB-1 de activar NF- κ B en astrocitos es parcialmente dependiente de los receptores de patrones moleculares TLR2, TLR4 y RAGE. Si bien puede resultar llamativo este resultado, es importante notar que clásicamente los ligandos de la inmunidad innata muestran baja especificidad de receptores ya que estos reconocen justamente patrones moleculares, lo cual ha sido probablemente una ventaja adaptativa en la evolución (Buchmann, 2014). En el mismo sentido, hemos observado que la exposición a HMGB-1 induce la expresión de TLR4 en una forma no dependiente de TLR4 y TLR2, lo cual es otra característica clásica de los ligandos tipo DAMP que es la de activar un *feed forward loop* no sólo sobre su propio receptor sino en forma cruzada sobre otros receptores de patrones moleculares, un efecto que expande la respuesta a los ligandos (Zurolo y col., 2011).

Numerosos trabajos señalan la importancia de las células gliales en el control de la formación, función, plasticidad y eliminación de sinapsis tanto en condiciones normales como patológicas (Eroglu, 2010). Un claro ejemplo obtenido por el mismo grupo, en roedores, demuestra que, tanto el número como la actividad de sinapsis excitatorias se incrementa cuando las neuronas están en contacto con astrocitos o simplemente utilizando medios condicionados de los mismos (Ullian y col., 2001). Sumado a esto, un trabajo reciente afirma esta hipótesis a partir de neuronas y células gliales humanas (Zhang y col., 2016). Nuestro trabajo mostró que los medios condicionados por astrocitos expuestos a HMGB-1 presentan un notable poder sinaptogénico sobre neuronas corticales en cultivo. De la misma forma, la exposición directa de neuronas a HMGB-1 también presentó un aumento en los *puncta* sinápticos lo que se correspondería con un aumento en la plasticidad. Es importante recalcar que estos efectos se visualizaron rápidamente, en una corta exposición de 3 horas al MCA o bien a HMGB-1.

Estos resultados indicarían que los astrocitos tratados con HMGB-1 secretarían una serie de factores que favorecen la formación de sinapsis o la reorganización de las estructuras sinápticas. De acuerdo a la literatura disponible, existen numerosos candidatos de origen astrogial que podrían mediar dichos efectos, siendo los más probables trombospondina 1 y 2, *hevin* entre otros (Liddelow y col., 2017).

Hasta aquí nuestros resultados mostraban un cierto efecto benéfico de HMGB-1 o los MCA de astrocitos expuestos al DAMP de aumentar la plasticidad neuronal y probablemente producir sinaptogénesis. Sin embargo, existen trabajos que demuestran que bloqueando dicho ligando HMGB-1, se atenúa la citotoxicidad de la hipoxia/isquemia y se produce un menor volumen de infarto como consecuencia de la inhibición de la vía de señalización NF- κ B (Hu y col., 2012). Más aún, el bloqueo de HMGB-1 reduce la inflamación y mejora la recuperación del comportamiento en modelos de accidente cerebrovascular (Wang y col., 2016; Wang y col., 2017). Con estos antecedentes, decidimos realizar experimentos posteriores co-cultivando astrocitos expuestos a HMGB-1 con neuronas corticales, en un sistema que no permite el contacto celular, pero sí la difusión de moléculas entre los tipos celulares de neuronas y glía. En este sistema de co-cultivos verificamos que, más allá del inicial efecto sinaptogénico, los astrocitos expuestos a HMGB-1 liberan mediadores capaces de producir la muerte neuronal. Los ensayos de pérdida de función para TLR2 y TLR4 demostraron que estos receptores de patrones, son necesarios para que HMGB-1 induzca un fenotipo astrogial capaz de inducir muerte neuronal.

Teniendo en cuenta estos resultados, proponemos que HMGB-1 es una proteína endógena que se libera al espacio extracelular, y actuando como DAMP sobre TLR2 y TLR4, sería capaz de polarizar a las células gliales hacia el perfil A1 neurodegenerativo, aunque con menor intensidad si se lo compara con ligandos clásicos PAMP como el LPS. Diversos autores han resaltado el rol de HMGB-1 actuando como citoquina al liberarse de células en necrosis activando la respuesta inflamatoria por parte de las células gliales (Kim y col., 2006; Faraco y col., 2007). Estudios recientes han demostrado que HMGB-1 puede sufrir modificaciones redox que afectan su actividad. A través de estudios de espectrometría de masa, Liesz y colaboradores (2016) han demostrado que las células isquémicas se vuelven necróticas y liberan pasivamente HMGB-1 completamente reducido a partir de su localización nuclear. En las horas posteriores al accidente cerebrovascular, se detecta una forma *oxidada* de HMGB-1 probablemente debido al entorno pro-oxidante que rodea el núcleo isquémico (Liesz y col., 2015; Singh y col., 2016). La forma oxidada de HMGB-1 actúa en los órganos periféricos (médula ósea y bazo) para reclutar células mieloides que contribuyen a expandir la neuroinflamación (Liesz y col., 2015). Si bien

en este trabajo de tesis no realizamos el estudio acerca del nivel de oxidación de HMGB-1, el origen recombinante de la rHMGB-1 utilizada *in vitro* reduce las posibilidades de alteraciones derivadas del entorno isquémico.

La modulación de la conversión astrogliar al fenotipo proinflamatorio-neurodegenerativo

La gliosis reactiva es un fenómeno altamente genérico presente tanto en injurias agudas como crónicas del SNC. Haber comprendido que la conversión hacia el fenotipo A1 proinflamatorio-neurodegenerativo es un evento clave en la expansión del daño luego de la injuria al SNC abrió una nueva era en el estudio de la astrogliosis reactiva. Es evidente que modular la gliosis reactiva evitando la conversión glial al fenotipo A1 y la propagación del daño sería una estrategia terapéutica de enorme impacto en el tratamiento de la neuroinflamación en el SNC y de gran importancia en la Salud Pública.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis establecimos que la ruta TLR4 NF- κ B sería clave para facilitar la conversión astrogliar al fenotipo A1. En concordancia con nuestros resultados, diferentes grupos han señalado la importancia de TLR4 en el progreso de la lesión en la isquemia cerebral. Experimentos con ratones deficientes en TLR4 muestran un menor volumen de infarto en comparación con animales *wild type* (Qiu y col., 2010), como así también el empleo del antagonista del receptor TLR4 denominado TAK-242 fue capaz de reducir el daño agudo en isquemia cerebral con reperusión (Hua y col., 2015). Sin embargo, la alta redundancia y promiscuidad de este sistema de ligandos/receptores de la inmunidad innata, los vuelven muy complejos como blancos de estrategias de tratamiento experimental. Se suma a este hecho, la alta heterogeneidad astrogliar y el comportamiento diferencial de estas subpoblaciones que recién comenzamos a comprender (revisado en Ramos, 2016). No menor son las barreras farmacocinéticas como la barrera hematoencefálica y la presencia de varios tipos celulares en el microentorno del SNC, lo que requiere una alta especificidad en el blanco molecular y celular.

Diferentes estrategias de modulación de la gliosis reactiva fueron utilizadas para evitar la conversión glial, actuando a diferentes niveles específicos. En nuestro laboratorio se evaluaron diferentes estrategias. Por ejemplo, la utilización de anticuerpos bloqueantes para el DAMP S100B, el cual es liberado por los astrocitos bajo situaciones de hipoxia o bien la sobreexpresión de un dominante negativo del receptor de patrones moleculares RAGE. En ambos casos, se obtuvo una marcada disminución

en la astrogliosis pero resultados menos contundentes en cuanto a la sobrevivencia neuronal (Angelo y col., 2014). El inconveniente de la modulación farmacológica de estos receptores de patrones moleculares, es justamente su baja especificidad y la alta redundancia en sus funciones. Otras estrategias aún más específicas apuntaron a lograr una entrega de drogas inhibitorias a un tipo e incluso un fenotipo celular especial. Así estrategias de *targeted drug delivery* fueron exploradas por nosotros y otros grupos (Kannan y col., 2012; Murta y col., 2018) En particular, un nanocompuesto de tipo tectodendrímico G5G2.5 PAMAM, fue incorporado específicamente por la glia reactiva *in vitro* e *in vivo* en la zona de la penumbra luego de la isquemia cerebral. Este compuesto sería un interesante *carrier* de drogas para modular el fenómeno de activación glial (Murta y col., 2018).

Frente a receptores que muestran una alta promiscuidad, baja especificidad y alta redundancia, la estrategia de interferir con la señalización intracelular emerge como otro posible blanco de estrategias experimentales de tratamiento. Específicamente la ruta de los receptores de patrones moleculares conduce a NF- κ B y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran su posible rol en la determinación del fenotipo A1 proinflamatorio-neurodegenerativo astrogliar. Diferentes grupos han reportado interesantes resultados actuando a este nivel. Zhang y colaboradores utilizaron un modelo de ratón transgénico en el que NF- κ B se inhibe selectivamente en las células que expresan GFAP. El transgén, GFAP-I κ B α -DN se sobreexpresa en forma dominante negativa bajo el control del promotor GFAP. Utilizando un modelo de dolor neuropático en ratones lesionados por constricción crónica (CCI) del nervio ciático, observaron que los ratones GFAP-I κ B α -DN tuvieron menos hiperalgesia mecánica y térmica en comparación con los ratones wild type post-CCI. Después de la CCI, además observaron regulación positiva de galanina en ganglios de la raíz dorsal y nervio ciático, que fue menor en ratones GFAP-I κ B α -DN. Estos resultados mostraron que la inhibición glial de NF- κ B reduce la expresión de galanina y CGRP, que son neuropéptidos que se correlacionan con el comportamiento del dolor y la inflamación después de una lesión del nervio periférico (Zhang y col., 2011).

Herrman y colaboradores utilizaron un modelo genético similar en dos líneas transgénicas diferentes en un modelo de *stroke* a partir de la oclusión de la arteria cerebral media, y obtuvieron un volumen de infarto menor cuando eran comparados con animales *wild type*. Similares resultados obtuvieron con la administración intracerebro-ventricular de BMS-345541, la cual inhibe la actividad de I κ K 1 e I κ K 2 (Herrmann y col., 2005).

En esta tesis, identificamos los tipos celulares en los cuales se produce la localización nuclear de p65 que sería un índice de activación de NF- κ B y la dinámica temporal del

mismo. Así, evidenciamos que existe una activación de NF- κ B tanto en neuronas como en astrocitos penumbrales cercanos al core isquémico. De los puntos temporales evaluados, sólo logramos detectar astrocitos con marca positiva para p65 a 3 DPI coincidiendo con el comienzo de la gliosis reactiva y la expresión astroglial de TLR4. You y colaboradores observaron una dinámica de expresión similar utilizando un modelo de hemorragia experimental sub-aracnoidea (You y col., 2013). Estos resultados, en conjunto con la evidencia obtenida *in vitro*, nos indican que existiría una respuesta inflamatoria temprana probablemente mediada por NF- κ B luego de la lesión isquémica cerebral.

Con el objetivo de explorar las posibilidades de la modulación directa de la señalización dependiente de NF- κ B y a la vez analizar la posible ventana terapéutica de intervención, en este trabajo utilizamos a la droga sulfasalazina (SFZ), que es un compuesto capaz de inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B (Robe, Bentires-Alj y col. 2004). SFZ es una droga ampliamente utilizada para tratar patologías que poseen algún componente autoinmune tales como la artritis reumatoide o la enfermedad de colon irritable entre otras. Además, es una droga que atraviesa la barrera hematoencefálica y fue utilizada en terapias oncológicas de glioblastomas (Sontheimer y Bridges 2012). Los resultados obtenidos con la administración de SFZ, en animales sometidos al modelo de isquemia experimental utilizado en esta tesis, fueron muy interesantes ya que pudimos verificar una significativa disminución en la reactividad glial a nivel morfológico luego de 3 DPI tanto para los astrocitos como para la microglía. En adición, el tratamiento con SFZ fue capaz de reducir el índice de daño neuronal visualizado a partir del menor desplazamiento del marcador NeuN del núcleo neuronal al citoplasma. La relocalización citoplasmática de NeuN es un indicador temprano de neurodegeneración y además se considera que este daño inicial, podría ser potencialmente reversible (Robertson y col., 2006; Avilés Reyes y col., 2011; Angelo y col., 2014). Los efectos obtenidos con SFZ fueron notables y mostraron el efecto duradero de una intervención a tiempos cortos luego de la isquemia, ya que los efectos sobre los astrocitos se observaron aun a 14 DPI. Numerosos autores y la experiencia clínica con otras drogas han evidenciado la importancia de accionar a la brevedad para contener el daño ocasionado por la isquemia. La experiencia clínica con drogas del tipo del tPA ha mostrado que la ventana temporal existente para preservar el área mínimamente afectada, decae considerablemente luego de las 4 horas de ocurrida la isquemia. (Saver y col., 2010; Sauser y col., 2014) y es un desafío el desarrollo de estrategias terapéuticas que superen esa ventana de tratamiento.

Nuestros resultados obtenidos en animales tratados con SFZ son parcialmente coincidentes con lo demostrado por Nurmi, y col. (2004), utilizando al ditiocarbamato

de pirrolidina (PDTC) para prevenir la inducción en la expresión de genes proinflamatorios regulados por NF- κ B. Sin embargo, aunque estos autores lograron obtener un menor daño neuronal en diferentes modelos de isquemia, el PDTC no fue capaz de modular la reactividad glial (Nurmi y col., 2004).

La formación de la cicatriz glial ha sido observada desde los trabajos pioneros de Ramón y Cajal y aún hoy se la considera como la mayor limitante para la reconexión neuronal (Cregg y col., 2014). Varios grupos se han centrado en los astrocitos inmediatamente después de la lesión en un intento de limitar la formación de la cicatriz glial. Diferentes reportes han demostrado los efectos beneficiosos de reducir el número de células gliales reactivas después de una lesión, que culminó en la atenuación de la gliosis con distintas consecuencias fisiopatológicas. Los primeros trabajos en estudiar la formación de la cicatriz glial utilizaron ratones *knockout* para GFAP y vimentina y demostraron que estos ratones presentan menos cicatrices gliales postraumáticas debido a la alteración en la activación de los astrocitos frente a la injuria (Pekny, 2001). Además, se ha demostrado que los astrocitos deficientes en GFAP y Vimentina son un mejor sustrato para el desarrollo de neuritas que los astrocitos de tipo salvaje. Sin embargo, recientes estudios del grupo del Dr. Michael Sofroniew han proporcionado información valiosa sobre los efectos perjudiciales de eliminar, atenuar o inhibir la formación de la cicatriz glial (Anderson y col., 2016). En ese trabajo se logró eliminar los astrocitos que forman la cicatriz glial, sin embargo, estos ratones presentaron grandes áreas libres de astrocitos de tejido no neuronal alrededor de la lesión y curiosamente, la falta de astrocitos y la cicatriz glial no promovió el crecimiento axonal espontáneo, y en su lugar estos ratones presentaron muerte axonal regresiva significativamente mayor (Anderson y col., 2016).

Otros estudios han demostrado que la cicatriz glial desempeña un papel esencial en la reparación rápida de la BHE, reduciendo la infiltración de células inflamatorias y disminuyendo la degeneración neuronal, limitando así los efectos perjudiciales de la lesión (Faulkner y col., 2004). Además, los astrocitos juegan un papel importante en la desmielinización y la pérdida de oligodendrocitos en la sustancia blanca adyacente al sitio de la lesión (Faulkner y col., 2004). Como resultado de la limitación de la degeneración tisular, se ha demostrado que la cicatriz glial evita el deterioro funcional y permite la recuperación de las funciones motoras tras lesiones menores y medianas de la médula espinal (Faulkner y col., 2004).

En la última década, una serie de estudios se han centrado en la limitación o modulación de la cicatriz glial como un medio para promover la regeneración. Sin embargo, los resultados han sido muy controvertidos y los resultados beneficiosos proyectados nunca se obtuvieron. Por lo tanto, es posible que la cicatriz glial tenga una

función beneficiosa después de la lesión, a costa de limitar la regeneración (Gesteira y col., 2016). Diferentes trabajos señalan la relevancia del correcto ensamblado de la cicatriz glial para la protección y la posterior regeneración tisular (Rolls y col., 2009; Wanner y col., 2013; Huang y col., 2014).

Más allá de estas controversias, está claro que los astrocitos reactivos localizados en una zona específica que rodea al *core* de una lesión isquémica o traumática focal, se reorganizan algunas semanas después del evento agudo y forman esta empalizada de procesos celulares que contiene depósitos de CSPG (del inglés *chondroitin sulfate proteoglycans*) y colágeno, rodeando la zona del daño focal. Esta cicatriz limita el ingreso de células mieloides de la periferia, que de otra manera invaden el parénquima del SNC, y tiene un efecto discutido sobre el crecimiento axonal.

Interesantemente, nosotros observamos que la administración de SFZ en esta ventana de 3 DPI produce una notable alteración en la capacidad de los astrocitos de reorganizarse hacia un perfil de cicatriz glial a 14 DPI. Nuestras imágenes mostraron que, si bien los astrocitos se disponen para iniciar la formación de la cicatriz glial, ésta formación parece ser menos organizada e incompleta. Estas observaciones muestran que la formación de la cicatriz glial probablemente depende de estadios muy tempranos de la injuria aguda, y probablemente involucran a la actividad de la ruta que incluye a NF- κ B.

Proyección clínica de los resultados y conclusiones finales

El objetivo principal de la neurociencia moderna es comprender y brindar soluciones terapéuticas que permitan mejorar la clínica de una amplia gama de trastornos del SNC. Con este fin, existe un interés creciente en los mecanismos celulares y moleculares involucrados en las diferentes patologías del SNC. Por ejemplo, como mencionamos en la introducción, durante la isquemia cerebral, se liberan mediadores solubles, entre ellos HMGB-1 que actúa como señal de alarma alertando a las células inmunes innatas residentes del SNC como los astrocitos y la microglía.

En particular, en la isquemia cerebral, existen en la actualidad muy pocas estrategias terapéuticas disponibles para contener el daño generado. Las únicas estrategias que continúan siendo utilizadas son la administración de tPA que tiene una estrecha ventana terapéutica (entre las 0 - 4.5 horas de sufrir la isquemia) y puede incrementar las probabilidades de una hemorragia cerebral (Hankey, 2017). Es importante mencionar que luego de haber sufrido una isquemia cerebral el acceso a unidades de cuidado intensivo, los tratamientos adecuados a posteriori con una correcta rehabilitación, así como las investigaciones existentes, tienen un menor desarrollo en países emergentes, por lo que los pacientes tienen una tasa de recuperación mucho más baja respecto de países con mayores ingresos (Langhorne y col., 2018). Por todo esto, es de vital importancia continuar investigando los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la isquemia cerebral.

En este trabajo de tesis hemos podido describir que la ruta de señalización mediada por el receptor de patrones moleculares TLR4 y su efector NF- κ B tienen un rol central en la conversión de los astrocitos reactivos a un perfil proinflamatorio que induce neurodegeneración. Este tipo de receptores y sus ligandos tienen una alta promiscuidad y muestran fenómenos de retroalimentación positiva que son una grave complicación desde el punto de vista del diseño de estrategias de tratamiento. El perfil de activación de NF- κ B luego de una lesión focal isquémica muestra un máximo de activación a corto tiempo luego de la lesión y, en concordancia, la interferencia con esta activación de NF- κ B con drogas como la SFZ es capaz de cambiar significativamente la evolución de la sobrevida neuronal y la formación de la cicatriz glial (Figura 29). Nuestros resultados muestran evidencias que sugieren la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas tempranas que actúen en una ventana temporal y que permitan modular la conversión glial al fenotipo proinflamatorio neurodegenerativo presente, no sólo en la isquemia cerebral, sino en distintas patologías del SNC.

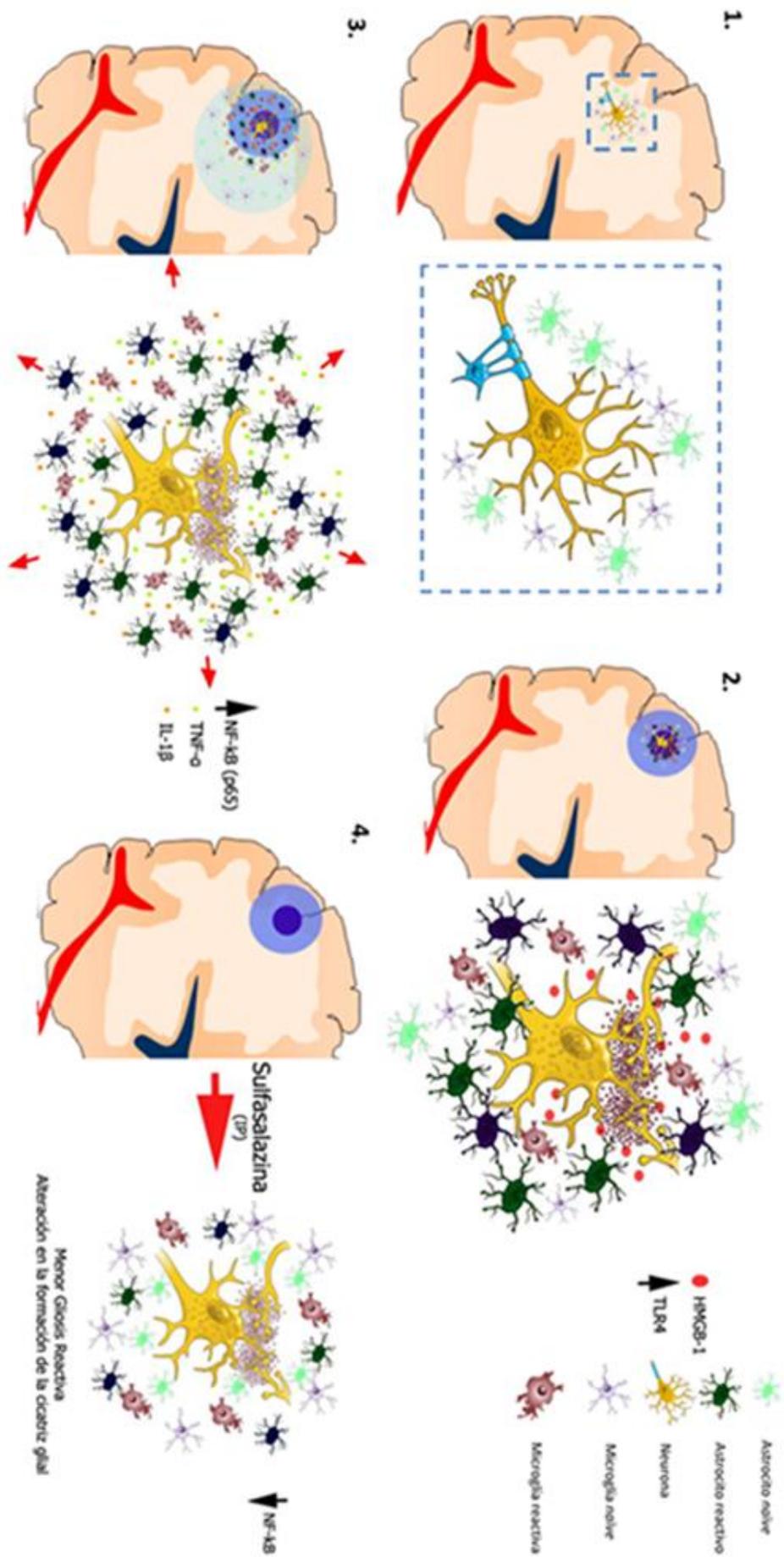


Figura 29: Modelo propuesto. 1) Condiciones normales. 2) Luego de generada la isquemia existe una liberación de factores solubles, entre ellos HMGB-1 que activa TLR4 presentes en microglía, induce el aumento de expresión de TLR4 en algunos astrocitos de la penumbra, y produce su activación. 3) Esta activación genera una propagación de la neuroinflamación en forma de gradiente hacia zonas más alejadas del *core necrótico* a partir de la liberación de citoquinas proinflamatorias como por ejemplo IL-1 β y TNF- α cuya expresión está controlada por la activación de NF- κ B. La sulfasalazina administrada al poco tiempo de inducida la isquemia genera un bloqueo temprano o limitación de la actividad de NF κ B que reduce la reactividad glial, reduce el daño neuronal y altera la correcta formación de la cicatriz glial.

Bibliografía

Bibliografía:

- Agulhon C, Fiacco TA, McCarthy KD (2010) Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science* 327:1250-1254.
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:8285-8295.
- Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, van der Valk P, Baker D, van Noort JM (2014) Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology* 142:151-166.
- Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, O'Shea TM, Kawaguchi R, Coppola G, Khakh BS, Deming TJ, Sofroniew MV (2016) Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature* 532:195-200.
- Angelo MF, Aviles-Reyes RX, Villarreal A, Barker P, Reines AG, Ramos AJ (2009) p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization. In: *J Neurosci Res*, 2009/01/22 Edition, pp 1892-1903.
- Angelo MF, Aguirre A, Aviles Reyes RX, Villarreal A, Lukin J, Melendez M, Vanasco V, Barker P, Alvarez S, Epstein A, Jerusalinsky D, Ramos AJ (2014) The proinflammatory RAGE/NF-kappaB pathway is involved in neuronal damage and reactive gliosis in a model of sleep apnea by intermittent hypoxia. *PLoS one* 9:e107901.
- Angelopoulou E, Piperi C, Papavassiliou AG (2018) High-mobility Group Box 1 in Parkinson's disease: from pathogenesis to therapeutic approaches. *Journal of neurochemistry*.
- Armulik A, Genove G, Betsholtz C (2011) Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell* 21:193-215.
- Bachoo RM, Kim RS, Ligon KL, Maher EA, Brennan C, Billings N, Chan S, Li C, Rowitch DH, Wong WH, DePinho RA (2004) Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:8384-8389.
- Bardehle S, Kruger M, Buggenthin F, Schwausch J, Ninkovic J, Clevers H, Snippert HJ, Theis FJ, Meyer-Luehmann M, Bechmann I, Dimou L, Gotz M (2013) Live imaging of astrocyte responses to acute injury reveals selective juxtavascular proliferation. *Nature neuroscience* 16:580-586.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH (2014) Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020362.
- Bindocci E, Savtchouk I, Liaudet N, Becker D, Carriero G, Volterra A (2017) Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science* 356.
- Boersma MC, Dresselhaus EC, De Biase LM, Mihalas AB, Bergles DE, Meffert MK (2011) A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:5414-5425.
- Brown AM (2004) Brain glycogen re-awakened. *Journal of neurochemistry* 89:537-552.
- Buchmann K (2014) Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. *Frontiers in immunology* 5:459.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:183-192.
- Businaro R, Corsi M, Asprino R, Di Lorenzo C, Laskin D, Corbo RM, Ricci S, Pinto A (2017) Modulation Of Inflammation As A Way Of Delaying Alzheimer's Disease Progression: The Diet's Role. *Current Alzheimer research*.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Cekanaviciute E (2016) Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 13:685-701.

- Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Munch AE, Heiman M, Barres BA (2018) Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115:E1896-E1905.
- Corps KN, Roth TL, McGavern DB (2015) Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA neurology* 72:355-362.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J (2014) Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology* 253:197-207.
- Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L (2005) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *The Journal of biological chemistry* 280:40364-40374.
- Choi C (2004) Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain research Brain research reviews* 44:65-81.
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C (2015) Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7:a020370.
- Church JS, Kigerl KA, Lerch JK, Popovich PG, McTigue DM (2016) TLR4 Deficiency Impairs Oligodendrocyte Formation in the Injured Spinal Cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 36:6352-6364.
- de la Fuente V, Federman N, Fustinana MS, Zalcmán G, Romano A (2014) Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor-kappaB signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 24:1549-1561.
- De Paola M, Mariani A, Bigini P, Peviani M, Ferrara G, Molteni M, Gemma S, Veglianese P, Castellaneta V, Boldrin V, Rossetti C, Chiabrando C, Forloni G, Mennini T, Fanelli R (2012) Neuroprotective effects of toll-like receptor 4 antagonism in spinal cord cultures and in a mouse model of motor neuron degeneration. *Mol Med* 18:971-981.
- del Zoppo GJ (2006) Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:1966-1975.
- Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Trias E, Cragolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:18126-18131.
- Ding S (2014) Dynamic reactive astrocytes after focal ischemia. *Neural regeneration research* 9:2048-2052.
- Ellwood KB, Yen YM, Johnson RC, Carey M (2000) Mechanism for specificity by HMG-1 in enhanceosome assembly. *Molecular and cellular biology* 20:4359-4370.
- Eroglu C (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468:223-231.
- Facci L, Barbierato M, Marinelli C, Argentini C, Skaper SD, Giusti P (2014) Toll-like receptors 2, -3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1beta release. *Scientific reports* 4:6824.
- Fan H, Li L, Zhang X, Liu Y, Yang C, Yang Y, Yin J (2009) Oxymatrine downregulates TLR4, TLR2, MyD88, and NF-kappaB and protects rat brains against focal ischemia. *Mediators of inflammation* 2009:704706.
- Faraco G, Fossati S, Bianchi ME, Patrone M, Pedrazzi M, Sparatore B, Moroni F, Chiarugi A (2007) High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry* 103:590-603.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2143-2155.
- Figueiredo BC, Piccardo P, Maysinger D, Clarke PB, Cuello AC (1993) Effects of acidic fibroblast growth factor on cholinergic neurons of nucleus basalis magnocellularis and in a spatial memory task following cortical devascularization. *Neuroscience* 56:955-963.
- Gambuzza ME, Sofo V, Salmeri FM, Soraci L, Marino S, Bramanti P (2014) Toll-like receptors in Alzheimer's disease: a therapeutic perspective. *CNS & neurological disorders drug targets* 13:1542-1558.
- Gao HM, Zhou H, Zhang F, Wilson BC, Kam W, Hong JS (2011) HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive

- neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:1081-1092.
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40:1849-1857.
 - Gesteira TF, Coulson-Thomas YM, Coulson-Thomas VJ (2016) Anti-inflammatory properties of the glial scar. *Neural regeneration research* 11:1742-1743.
 - Gimsa U, A OR, Pandiyan P, Teichmann D, Bechmann I, Nitsch R, Brunner-Weinzierl MC (2004) Astrocytes protect the CNS: antigen-specific T helper cell responses are inhibited by astrocyte-induced upregulation of CTLA-4 (CD152). *J Mol Med (Berl)* 82:364-372.
 - Gondim FA (2004) Late "spectacular shrinking deficit"? *Archives of neurology* 61:129-130.
 - Gong G, Xiang L, Yuan L, Hu L, Wu W, Cai L, Yin L, Dong H (2014) Protective effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats. *PLoS one* 9:e89450.
 - Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G (1988) Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336:672-674.
 - Griffiths MR, Gasque P, Neal JW (2009) The multiple roles of the innate immune system in the regulation of apoptosis and inflammation in the brain. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 68:217-226.
 - Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB (2010) Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et biophysica acta* 1799:775-787.
 - Gutierrez H, Hale VA, Dolcet X, Davies A (2005) NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132:1713-1726.
 - Hakimizadeh E, Kazemi Arababadi M, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Allahtavakoli M (2016) The Possible Role of Toll-Like Receptor 4 in the Pathology of Stroke. *Neuroimmunomodulation* 23:131-136.
 - Hamel E (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985) 100:1059-1064.
 - Hamerman JA, Jarjoura JR, Humphrey MB, Nakamura MC, Seaman WE, Lanier LL (2006) Cutting edge: inhibition of TLR and FcR responses in macrophages by triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM)-2 and DAP12. *J Immunol* 177:2051-2055.
 - Hankey GJ (2017) Stroke. *Lancet* 389:641-654.
 - Harari OA (2010) NF-kappaB and innate immunity in ischemic stroke. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1207:32-40.
 - Herrmann O, Baumann B, de Lorenzi R, Muhammad S, Zhang W, Kleesiek J, Malfertheiner M, Kohrmann M, Potrovita I, Maegle I, Beyer C, Burke JR, Hasan MT, Bujard H, Wirth T, Pasparakis M, Schwaninger M (2005) IKK mediates ischemia-induced neuronal death. *Nature medicine* 11:1322-1329.
 - Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D (2012) Danger signals activating the immune response after trauma. *Mediators of inflammation* 2012:315941.
 - Ho WC, Dickson KM, Barker PA (2005) Nuclear factor-kappaB induced by doxorubicin is deficient in phosphorylation and acetylation and represses nuclear factor-kappaB-dependent transcription in cancer cells. *Cancer research* 65:4273-4281.
 - Hoft S, Griemsmann S, Seifert G, Steinhauser C (2014) Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 369:20130602.
 - Holm TH, Draeby D, Owens T (2012) Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia* 60:630-638.
 - Holloway PM (2016) Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke* 47:561-569.
 - Hossmann KA (2012) The two pathophysiologicals of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32:1310-1316.

- Hoyos HC, Rinaldi M, Mendez-Huergo SP, Marder M, Rabinovich GA, Pasquini JM, Pasquini LA (2014) Galectin-3 controls the response of microglial cells to limit cuprizone-induced demyelination. *Neurobiology of disease* 62:441-455.
- Hu YM, Pai MH, Yeh CL, Hou YC, Yeh SL (2012) Glutamine administration ameliorates sepsis-induced kidney injury by downregulating the high-mobility group box protein-1-mediated pathway in mice. *American journal of physiology Renal physiology* 302:F150-158.
- Hua F, Tang H, Wang J, Prunty MC, Hua X, Sayeed I, Stein DG (2015) TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 35:536-542.
- Jiang H, Wang Y, Liang X, Xing X, Xu X, Zhou C (2017) Toll-Like Receptor 4 Knockdown Attenuates Brain Damage and Neuroinflammation After Traumatic Brain Injury via Inhibiting Neuronal Autophagy and Astrocyte Activation. *Cellular and molecular neurobiology*.
- Kaltschmidt B (2009) NF-kappaB in the nervous system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a001271.
- Kaltschmidt B, Ndiaye D, Korte M, Pothion S, Arbibe L, Prullage M, Pfeiffer J, Lindecke A, Staiger V, Israel A, Kaltschmidt C, Memet S (2006) NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Molecular and cellular biology* 26:2936-2946.
- Kang R, Zhang Q, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Tang D (2013) HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19:4046-4057.
- Kannan S, Dai H, Navath RS, Balakrishnan B, Jyoti A, Janisse J, Romero R, Kannan RM (2012) Dendrimer-based postnatal therapy for neuroinflammation and cerebral palsy in a rabbit model. *Science translational medicine* 4:130ra146.
- Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM (2007) Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321:892-901.
- Kim JB, Lim CM, Yu YM, Lee JK (2008) Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain. *Journal of neuroscience research* 86:1125-1131.
- Kim JB, Sig Choi J, Yu YM, Nam K, Piao CS, Kim SW, Lee MH, Han PL, Park JS, Lee JK (2006) HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:6413-6421.
- Kleinschnitz C, Blecharz K, Kahles T, Schwarz T, Kraft P, Gobel K, Meuth SG, Burek M, Thum T, Stoll G, Forster C (2011) Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke* 42:1081-1089.
- Koroshetz WJ (1996) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 334:1405-1406.
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* 388:621-625.
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology* 30:16-34.
- Labombarda F, Gonzalez S, Lima A, Roig P, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF (2011) Progesterone attenuates astro- and microgliosis and enhances oligodendrocyte differentiation following spinal cord injury. *Experimental neurology* 231:135-146.
- Lafourcade C, Ramirez JP, Luarte A, Fernandez A, Wyneken U (2016) MiRNAs in Astrocyte-Derived Exosomes as Possible Mediators of Neuronal Plasticity. *Journal of experimental neuroscience* 10:1-9.
- Lampron A, Elali A, Rivest S (2013) Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron* 78:214-232.
- Langhorne P, O'Donnell MJ, Chin SL, Zhang H, Xavier D, Avezum A, Mathur N, Turner M, MacLeod MJ, Lopez-Jaramillo P, Damasceno A, Hankey GJ, Dans AL, Elsayed A, Mondo C, Wasay M, Czlonkowska A, Weimar C, Yusufali AH, Hussain FA, Lisheng L,

- Diener HC, Ryglewicz D, Pogossova N, Iqbal R, Diaz R, Yusoff K, Oguz A, Wang X, Penaherrera E, Lanas F, Ogah OS, Ogunniyi A, Iversen HK, Malaga G, Rumboldt Z, Magazi D, Nilanont Y, Rosengren A, Oveisgharan S, Yusuf S (2018) Practice patterns and outcomes after stroke across countries at different economic levels (INTERSTROKE): an international observational study. *Lancet* 391:2019-2027.
- Lee JY, Lee JD, Phipps S, Noakes PG, Woodruff TM (2015) Absence of toll-like receptor 4 (TLR4) extends survival in the hSOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroinflammation* 12:90.
 - Li Z (1997) A new member of the I kappaB protein family, I kappaB epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF-kappaB transcription. *Molecular and cellular biology* 17:6184-6190.
 - Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Munch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA (2017) Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541:481-487.
 - Liesz A, Dalpke A, Mracsko E, Antoine DJ, Roth S, Zhou W, Yang H, Na SY, Akhisaroglu M, Fleming T, Eigenbrod T, Nawroth PP, Tracey KJ, Veltkamp R (2015) DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35:583-598.
 - Lin MP (2016) Imaging of Ischemic Stroke. *Continuum (Minneapolis, Minn)* 22:1399-1423.
 - Liu A, Margail I, Zhang S, Labombarda F, Coqueran B, Delespierre B, Liere P, Marchand-Leroux C, O'Malley BW, Lydon JP, De Nicola AF, Sitruk-Ware R, Mattern C, Plotkine M, Schumacher M, Guennoun R (2012) Progesterone receptors: a key for neuroprotection in experimental stroke. *Endocrinology* 153:3747-3757.
 - Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275.
 - Machler P, Wyss MT, Elsayed M, Stobart J, Gutierrez R, von Faber-Castell A, Kaelin V, Zuend M, San Martin A, Romero-Gomez I, Baeza-Lehnert F, Lengacher S, Schneider BL, Aebischer P, Magistretti PJ, Barros LF, Weber B (2016) In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. *Cell metabolism* 23:94-102.
 - Manders EM, Verbiik FJ, Aten JA. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy* 169-3.
 - Magistretti PJ (2018) Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nature reviews Neuroscience* 19:235-249.
 - Marinelli C, Di Liddo R, Facci L, Bertalot T, Conconi MT, Zusso M, Skaper SD, Giusti P (2015) Ligand engagement of Toll-like receptors regulates their expression in cortical microglia and astrocytes. *Journal of neuroinflammation* 12:244.
 - Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, Rossetti C, Molteni M, Casalgrandi M, Manfredi AA, Bianchi ME, Vezzani A (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nature medicine* 16:413-419.
 - Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP (2009) Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 158:1007-1020.
 - Martin-Lopez E, Garcia-Marques J, Nunez-Llaves R, Lopez-Mascaraque L (2013) Clonal astrocytic response to cortical injury. *PLoS one* 8:e74039.
 - Masutani H, Bai J, Kim YC, Yodoi J (2004) Thioredoxin as a neurotrophic cofactor and an important regulator of neuroprotection. *Molecular neurobiology* 29:229-242.
 - Mathiesen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58:1094-1103.
 - Maysinger D, Piccardo P, Liberini P, Jalsenjak I, Cuervo C (1994) Encapsulated genetically engineered fibroblasts: release of nerve growth factor and effects in vivo on recovery of cholinergic markers after devascularizing cortical lesions. *Neurochemistry international* 24:495-503.
 - McCabe K, Concannon RM, McKernan DP, Dowd E (2017) Time-course of striatal Toll-like receptor expression in neurotoxic, environmental and inflammatory rat models of Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology* 310:103-106.

- McCarthy KD (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology* 85:890-902.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67:181-198.
- Muhammad S, Barakat W, Stoyanov S, Murikinati S, Yang H, Tracey KJ, Bendszus M, Rossetti G, Nawroth PP, Bierhaus A, Schwaninger M (2008) The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:12023-12031.
- Murta V, Pitossi FJ, Ferrari CC (2012) CNS response to a second pro-inflammatory event depends on whether the primary demyelinating lesion is active or resolved. *Brain, behavior, and immunity* 26:1102-1115.
- Murta V, Schilrreff P, Rosciszewski G, Morilla MJ, Ramos AJ (2018) G5G2.5 core-shell tecto-dendrimer specifically targets reactive glia in brain ischemia. *Journal of neurochemistry* 144:748-760.
- Nabavi SF, Daglia M, Tundis R, Loizzo MR, Sobarzo-Sanchez E, Orhan IE, Nabavi SM (2015) Genistein: A Boon for Mitigating Ischemic Stroke. *Current topics in medicinal chemistry* 15:1714-1721.
- Nakano Y, Furube E, Morita S, Wanaka A, Nakashima T, Miyata S (2015) Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Journal of neuroimmunology* 278:144-158.
- Niederberger E (2013) Proteomics and NF-kappaB: an update. *Expert review of proteomics* 10:189-204.
- Nixdorf-Bergweiler BE (2001) Lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) in the zebra finch: neuronal connectivity and the emergence of sex differences in cell morphology. *Microscopy research and technique* 54:335-353.
- Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, Zhang W, Juettler E, Karjalainen-Lindsberg ML, Weih F, Frank N, Schwaninger M, Koistinaho J (2004) Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke* 35:987-991.
- Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M (2012) Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol* 814:23-45.
- Offner H, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Vandenbark AA, Hurn PD (2006) Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26:654-665.
- Ogata K (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113:221-233.
- Okuda H (2018) A review of functional heterogeneity among astrocytes and the CS56-specific antibody-mediated detection of a subpopulation of astrocytes in adult brains. *Anatomical science international* 93:161-168.
- Orthmann-Murphy JL, Abrams CK, Scherer SS (2008) Gap junctions couple astrocytes and oligodendrocytes. *Journal of molecular neuroscience : MN* 35:101-116.
- Park GH, Ryu JR, Shin CY, Choi MS, Han BH, Kim WK, Kim HC, Ko KH (2006a) Evidence that protease-activated receptor-2 mediates trypsin-induced reversal of stellation in cultured rat astrocytes. *Neuroscience research* 54:15-23.
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E (2006b) High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *American journal of physiology Cell physiology* 290:C917-924.
- Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M (2006) Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell death and differentiation* 13:861-872.
- Pelham CJ (2014) Emerging roles for triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family signaling in inflammatory diseases. *Expert review of clinical immunology* 10:243-256.
- Petzold GC, Murthy VN (2011) Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* 71:782-797.

- Piccio L, Buonsanti C, Mariani M, Cella M, Gilfillan S, Cross AH, Colonna M, Panina-Bordignon P (2007) Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology* 37:1290-1301.
- Ponath G, Park C, Pitt D (2018) The Role of Astrocytes in Multiple Sclerosis. *Frontiers in immunology* 9:217.
- Prinz M (2017) The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nature neuroscience* 20:136-144.
- Qiu J, Nishimura M, Wang Y, Sims JR, Qiu S, Savitz SI, Salomone S, Moskowitz MA (2008) Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28:927-938.
- Qiu J, Xu J, Zheng Y, Wei Y, Zhu X, Lo EH, Moskowitz MA, Sims JR (2010) High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke* 41:2077-2082.
- Ramos AJ (2016) Astroglial heterogeneity: merely a neurobiological question? Or an opportunity for neuroprotection and regeneration after brain injury? *Neural regeneration research* 11:1739-1741.
- Ramos AJ, Rubio MD, Defagot C, Hirschberg L, Villar MJ, Brusco A (2004) The 5HT1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, protects neurons and reduces astroglial reaction after ischemic damage caused by cortical devascularization. *Brain research* 1030:201-220.
- Ren M, Leng Y, Jeong M, Leeds PR, Chuang DM (2004) Valproic acid reduces brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in rats: potential roles of histone deacetylase inhibition and heat shock protein induction. *Journal of neurochemistry* 89:1358-1367.
- Robe PA, Bentires-Alj M, Bonif M, Rogister B, Deprez M, Haddada H, Khac MT, Jolois O, Erkmén K, Merville MP, Black PM, Bours V (2004) In vitro and in vivo activity of the nuclear factor-kappaB inhibitor sulfasalazine in human glioblastomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:5595-5603.
- Robertson CL, Puskar A, Hoffman GE, Murphy AZ, Saraswati M, Fiskum G (2006) Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Experimental neurology* 197:235-243.
- Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson AL, Mauri D, Burns K, Riederer BM, Akira S, Calandra T (2009) Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2348-2352.
- Rosciszewski G, Cadena V, Murta V, Lukin J, Villarreal A, Roger T, Ramos AJ (2017) Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM-2) Activation Balance Astrocyte Polarization into a Proinflammatory Phenotype. *Molecular neurobiology*.
- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature neuroscience* 10:1377-1386.
- Salles A, Krawczyk MDC, Blake M, Romano A, Boccia MM, Freudenthal R (2017) Requirement of NF-kappa B Activation in Different Mice Brain Areas during Long-Term Memory Consolidation in Two Contextual One-Trial Tasks with Opposing Valences. *Frontiers in molecular neuroscience* 10:104.
- Santello M (2010) Neuroscience: Astrocytes as aide-memoires. *Nature* 463:169-170.
- Sauser K, Levine DA, Nickles AV, Reeves MJ (2014) Hospital variation in thrombolysis times among patients with acute ischemic stroke: the contributions of door-to-imaging time and imaging-to-needle time. *JAMA neurology* 71:1155-1161.
- Saver JL, Gornbein J, Starkman S (2010) Graphic reanalysis of the two NINDS-tPA trials confirms substantial treatment benefit. *Stroke* 41:2381-2390.
- Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M (1999) NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nature medicine* 5:554-559.
- Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghoumari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in neuroscience* 6:10.

- Shih RH, Wang CY, Yang CM (2015) NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Frontiers in molecular neuroscience* 8:77.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:9254-9262.
- Singh V, Roth S, Veltkamp R, Liesz A (2016) HMGB1 as a Key Mediator of Immune Mechanisms in Ischemic Stroke. *Antioxidants & redox signaling* 24:635-651.
- Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32:638-647.
- Sofroniew MV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119:7-35.
- Sofroniew MV (2014) Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 20:160-172.
- Sofroniew MV (2015) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature reviews Neuroscience* 16:249-263.
- Song H, Stevens CF, Gage FH (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417:39-44.
- Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S, Clemens J (2000) Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20:592-603.
- Stojanovic I, Cuzzocrea S, Mangano K, Mazzon E, Miljkovic D, Wang M, Donia M, Al Abed Y, Kim J, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S, Claesson M (2007) In vitro, ex vivo and in vivo immunopharmacological activities of the isoxazoline compound VGX-1027: modulation of cytokine synthesis and prevention of both organ-specific and systemic autoimmune diseases in murine models. *Clin Immunol* 123:311-323.
- Sugimoto K, Nishioka R, Ikeda A, Mise A, Takahashi H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J (2014) Activated microglia in a rat stroke model express NG2 proteoglycan in peri-infarct tissue through the involvement of TGF-beta1. *Glia* 62:185-198.
- Sweeney MD, Ayyadurai S, Zlokovic BV (2016) Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nature neuroscience* 19:771-783.
- Takahashi H, Sekino Y, Tanaka S, Mizui T, Kishi S, Shirao T (2003) Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:6586-6595.
- Takahashi K, Rochford CD, Neumann H (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of experimental medicine* 201:647-657.
- Takata N (2008) Cortical layer 1 and layer 2/3 astrocytes exhibit distinct calcium dynamics in vivo. *PloS one* 3:e2525.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 21:335-376.
- Taoufik E (2008) Ischemic neuronal damage. *Current pharmaceutical design* 14:3565-3573.
- Terai K, Matsuo A, McGeer EG, McGeer PL (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF-kappa B in human cerebral infarctions. *Brain research* 739:343-349.
- Thiel G (1993) Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol* 3:87-95.
- Tong E, Hou Q, Fiebach JB, Wintermark M (2014) The role of imaging in acute ischemic stroke. *Neurosurgical focus* 36:E3.
- Trias E, Diaz-Amarilla P, Olivera-Bravo S, Isasi E, Drechsel DA, Lopez N, Bradford CS, Ireton KE, Beckman JS, Barbeito L (2013) Phenotypic transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS. *Frontiers in cellular neuroscience* 7:274.
- Turnbull IR, Gilfillan S, Cella M, Aoshi T, Miller M, Piccio L, Hernandez M, Colonna M (2006) Cutting edge: TREM-2 attenuates macrophage activation. *J Immunol* 177:3520-3524.

- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.
- Vallabhapurapu S (2009) Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology* 27:693-733.
- van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW (2008) Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis* 11:91-99.
- VanPatten S (2018) High Mobility Group Box-1 (HMGB1): Current Wisdom and Advancement as a Potential Drug Target. *Journal of medicinal chemistry*.
- Verrijdt G, Haelens A, Schoenmakers E, Rombauts W, Claessens F (2002) Comparative analysis of the influence of the high-mobility group box 1 protein on DNA binding and transcriptional activation by the androgen, glucocorticoid, progesterone and mineralocorticoid receptors. *The Biochemical journal* 361:97-103.
- Villarreal A, Seoane R, Gonzalez Torres A, Rosciszewski G, Angelo MF, Rossi A, Barker PA, Ramos AJ (2014) S100B protein activates a RAGE-dependent autocrine loop in astrocytes: implications for its role in the propagation of reactive gliosis. *Journal of neurochemistry* 131:190-205.
- Villarreal A, Rosciszewski G, Murta V, Cadena V, Usach V, Dodes-Traian MM, Setton-Avruj P, Barbeito LH, Ramos AJ (2016) Isolation and Characterization of Ischemia-Derived Astrocytes (IDAs) with Ability to Transactivate Quiescent Astrocytes. *Frontiers in cellular neuroscience* 10:139.
- von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S (2016) The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *The Journal of comparative neurology* 524:3865-3895.
- Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *The Journal of clinical investigation* 101:1163-1174.
- Wallraff A, Kohling R, Heinemann U, Theis M, Willecke K, Steinhauser C (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:5438-5447.
- Wang C, Jiang J, Zhang X, Song L, Sun K, Xu R (2016) Inhibiting HMGB1 Reduces Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Diabetic Mice. *Inflammation* 39:1862-1870.
- Wang D, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M (2017) Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody inhibits hemorrhage-induced brain injury and improved neurological deficits in rats. *Scientific reports* 7:46243.
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285:248-251.
- Wanner IB, Anderson MA, Song B, Levine J, Fernandez A, Gray-Thompson Z, Ao Y, Sofroniew MV (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. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:12870-12886.
- Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A (1997) I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *The EMBO journal* 16:1413-1426.
- Xie L (2015) Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. *Brain research* 1623:63-73.
- Yamamoto Y (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation* 107:135-142.
- Yang CH, Yen TL, Hsu CY, Thomas PA, Sheu JR, Jayakumar T (2017) Multi-Targeting Andrographolide, a Novel NF-kappaB Inhibitor, as a Potential Therapeutic Agent for Stroke. *International journal of molecular sciences* 18.
- Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, Chavan S, Rosas-Ballina M, Al-Abed Y, Akira S, Bierhaus A, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Tracey KJ (2010a) A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:11942-11947.

- Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT (2010b) The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 17:6-10.
- Yang QW, Lu FL, Zhou Y, Wang L, Zhong Q, Lin S, Xiang J, Li JC, Fang CQ, Wang JZ (2011) HMGB1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31:593-605.
- Yang Y, Duan W, Li Y, Yan J, Yi W, Liang Z, Wang N, Yi D, Jin Z (2013) New role of silent information regulator 1 in cerebral ischemia. *Neurobiology of aging* 34:2879-2888.
- Yao L, Kan EM, Lu J, Hao A, Dheen ST, Kaur C, Ling EA (2013) Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *Journal of neuroinflammation* 10:23.
- You WC, Wang CX, Pan YX, Zhang X, Zhou XM, Zhang XS, Shi JX, Zhou ML (2013) Activation of nuclear factor-kappaB in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage and its potential role in delayed brain injury. *PloS one* 8:e60290.
- Yun SP, Kam TI, Panicker N, Kim S, Oh Y, Park JS, Kwon SH, Park YJ, Karuppagounder SS, Park H, Oh N, Kim NA, Lee S, Brahmachari S, Mao X, Lee JH, Kumar M, An D, Kang SU, Lee Y, Lee KC, Na DH, Kim D, Lee SH, Roschke VV, Liddelow SA, Mari Z, Barres BA, Dawson VL, Dawson TM, Ko HS (2018) Block of A1 astrocyte conversion by microglia is neuroprotective in models of Parkinson's disease. *Nature medicine* 24:931-938.
- Zalzman G, Federman N, de la Fuente V, Romano A (2015) Nuclear factor kappa B-dependent Zif268 expression in hippocampus is required for recognition memory in mice. *Neurobiology of learning and memory* 119:10-17.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:6391-6410.
- Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, Vogel H, Steinberg GK, Edwards MS, Li G, Duncan JA, 3rd, Cheshier SH, Shuer LM, Chang EF, Grant GA, Gephart MG, Barres BA (2016) Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* 89:37-53.
- Zhang YP, Fu ES, Sagen J, Levitt RC, Candiotti KA, Bethea JR, Brambilla R (2011) Glial NF-kappaB inhibition alters neuropeptide expression after sciatic nerve injury in mice. *Brain research* 1385:38-46.
- Zhao H, Chen Z, Xie LJ, Liu GF (2018) Suppression of TLR4/NF-kappaB Signaling Pathway Improves Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Molecular neurobiology* 55:4311-4319.
- Zurolo E, Iyer A, Maroso M, Carbonell C, Anink JJ, Ravizza T, Fluiter K, Spliet WG, van Rijen PC, Vezzani A, Aronica E (2011) Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain : a journal of neurology* 134:1015-1032.