#### ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL IN VITRO

Trabajo Final de Grado

del alumno

#### MARIA BELEN CIERI

Este trabajo ha sido presentado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Genética

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales. Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, Buenos Aires. Agosto de 2016.

#### ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL IN VITRO

Trabajo Final de Grado del alumno

#### MARIA BELEN CIERI

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

Dr.

Dr.

Dr.

Auzmendi, Jerónimo Director Pasquinelli, Virginia Co-director

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Pergamino, Buenos Aires. Agosto de 2016.

#### Agradecimientos:

A todos aquellos que en este largo camino de formación a nivel académico y gran crecimiento personal, hicieron posible convertir aquello que en 2011 solo era una meta anhelada en este trabajo final.

A mi director de tesis **Dr. Jerónimo Auzmendi**, por brindarme las herramientas que me permitieron realizar mis inicios en la investigación científica. Al jefe del laboratorio de Neuropatología Molecular del Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN) **Dr. Alberto Javier Ramos**, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme todo su apoyo desde el comienzo. Por todo lo que aprendí en las charlas con ambos, desde el diseño de un experimento, hasta la interpretación de los resultados, lograr relacionarlos y comprenderlos en un contexto biológico mucho más amplio. Siempre me transmitieron un gran entusiasmo y muchas ganas por continuar en este largo camino de la investigación científica.

A mis compañeros de laboratorio *los ramitos*: Med. Alicia Rossi, Lic. Gerardo Roscisewski, Med. Marianela López, Lic. Vanesa Cadena, Dra. Verónica Murta. Por enseñarme desde los manejos y cuidados en el trabajo de laboratorio, hasta las técnicas y protocolos experimentales, siempre con buena predisposición y gran compañerismo. Al Lic. Jerónimo Lukin, un ex compañero del laboratorio, por ayudarme a realizar los cultivos hipocampales. A todos ellos, además por compartir charlas, almuerzos diarios, eternas rondas de mates, tardes de té con *las ramitas*, alegrías, festejos y mantener un cálido ambiente de trabajo en equipo.

A todo el personal del Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN) Prof. Eduardo De Robertis. A los bioteristas, personal de limpieza, al personal técnico, de secretaria y su directora la Dra. Brusco. A los laboratorios del Dr. Falzone, del Dr. Paratcha, Dra. Ledda, por sus contribuciones en distintas técnicas o experimentos. En especial a la Dra. Analía Reines y a los miembros de su laboratorio, por su gran compañerismo, buena onda en las charlas y almuerzos diarios, así como su ayuda con reactivos y materiales para diferentes técnicas experimentales.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA) en las sedes de Junín y Pergamino, por haberme brindado una buena

formación académica durante la carrera de Lic. en Genética, en especial a sus **profesores** por su gran dedicación y desempeño. En especial a la **Dra. Virginia Pasquinelli**, por aceptar ser codirectora de este trabajo y quien a través de sus clases de Inmunología me transmitió muchas ganas y entusiasmo por la investigación y por conocer cómo funcionaba la respuesta inmune en el Sistema Nervioso Central. Esta curiosidad me Ilevó hacia el tema de investigación del laboratorio del Dr. Ramos, derivó en la realización de este trabajo, y sobre lo que continuaré trabajando durante las próximas etapas de mi formación en el futuro.

A todo el personal de la Escuela de Ciencias Naturales, Agrarias y Ambientales (ECANA), por haberme facilitado la realización de diferentes trámites con una gran predisposición.

A toda mi familia, por haberme apoyado en todo momento en mis decisiones haciendo lo imposible para ayudarme a lograrlo, siempre con palabras de motivación y confianza en mí durante toda esta etapa.

A mis **familias adoptivas** de Pergamino que me aceptaron abriéndome las puertas de sus hogares y tratándome como una integrante más, y me permitieron realizar mis estudios en esta ciudad en un ambiente muy cálido.

A **mis amigos**, de toda la vida, los que me llevo de la universidad, que con su apoyo y amistad incondicional hicieron mucho más fácil el estudio y llevar adelante esta etapa lejos de la familia.

A la Municipalidad de Chacabuco y al Centro de estudiantes de Chacabuco en Buenos Aires (C.E.Ch.B.A) que me permitieron alojarme en la residencia en Capital Federal, para facilitarme la realización de este trabajo. A mis compañeros del C.E.Ch.B.A, quienes me ayudaron durante mi estadía en Capital, muchos de los cuales hoy son muy buenos amigos y consejeros.

#### <u>Abreviaturas</u>

ATP	Adenosina tri-fosfato
BAY 11-7082	(E)-3-[(4-metilfenilsulfonil]-2-propenenitrilo
bTBI	Injuria cerebral traumática inducida por explosión (bTBI, por <i>Blast-induced Traumatic</i> <i>Brain Injury)</i>
CSPG4 o NG2	Proteoglicano-4 condroitín sulfato
CSPGs	Proteoglicanos de condroitin sulfato
DAMP	Patrón molecular asociado al daño (del inglés Damage associated molecular pattern)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés Epidermal Growth Factor)
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)- N,N,N'N'-tetraacético
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFAP	Proteína gliofibrilar acida (del inglés <i>Gliofibrilar Acidic Protein</i> )
HMGB1	Anfoterina (del inglés <i>High Mobility Group Box</i> 1)
HSCs	Células madres hematopoyéticas (del inglés Haematopoietic stem cells)
HSP	Proteínas de shock térmico
IDAs	Astrocitos derivados de la isquemia (del inglés <i>Ischemia-derived astrocytes)</i>
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1β	Interleuquina 1 β
IP <sub>3</sub>	Inositol-1, 4,5-trifofato
ІкВ	Inhibidor kappaB
KCa3.1	Canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MFA	Ácido meclofenámico
MMP	Metaloproteasa
NFκB	Factor Nuclear kappaB (del ingles Nuclear Factor kappaB)
NG2-OPC	Células NG2 progenitoras de oligodendrocitos (del inglés NG2- positive oligodendrocyte

	precursors)
NO	Óxido nítrico
p65	Subunidad p65 de NFκB
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
	(del inglés Pathogen-Associated Molecular
	Pattern)
PBS	Buffer fosfato salino
PDGFaR	Receptor alfa del factor de crecimiento
	derivado de plaquetas
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
	(del inglés Pattern Recognition Receptor)
RAGE	Receptor de productos avanzados de
	glicosilación (del inglés Receptor for
	advanced glycosilated end products)
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Suero normal equino
TGF-β	Factor de crecimiento tumoral-β
TLR	Receptores tipo Toll (del inglés, Toll-Like
	Receptors)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral

### <u>ÍNDICE</u>

<u>INT</u>	RODI	JCCIÓN	9
1.1	Las	células de la glía en el Sistema Nervioso Central	11
	1.1.1	Astrocitos	11
	1.1.2	Microglía	17
	1.2.3	Oligodendrocitos	18
	1.2.4	Células NG2 precursoras de células gliales	18
1.3	La r	espuesta glial a la injuria: gliosis reactiva	19
	1.3.1	Formación de la cicatriz glial y su papel en la injuria en el SNC	23
	1.3.2	Mecanismos moleculares reguladores de la astrogliosis	24
Hip	ótesis		
Obj	etivo g	general	
Obj	etivos	específicos	27
<u>MA</u>	TERI	ALES Y MÉTODOS	28
2.1	Anir	nales	29
2.2	Cult	ivos celulares primarios	
	2.2.1	Cultivos gliales mixtos de astrocitos y microglía	29
	2.2.2	Cultivos enriquecidos en astrocitos corticales	30
	2.2.3	Cultivos mixtos neuro-gliales de hipocampo	31
2.3	Mod	lelo de herida artificial o scratch wound healing assay	31
2.4	Trat	amientos	31
2.5	Fijao	ción de células en cultivo	32
2.6	Inm	unocitoquímica	32
2.7	Aná	lisis de datos	
	2.7.1	Visualización de la progresión del scratch por microscopía en vivo (live-imaging)	33
	2.7.2	Análisis de la expresión de la proteína astroglial GFAP	34
	2.7.3	Evaluación de la activación de NFkB por localización nuclear de p65	34
	2.7.4	Análisis de la orientación de los procesos astrogliales luego del scratch	35
2.8	Esta	ndística	35
3.1	Eva	luación de la respuesta astroglial frente a la injuria <i>in vitro</i>	
	3.1.1	Las células astrogliales tienden a invadir la zona del scratch	37

	3.1.2 El grado de reactividad inicial de las células gliales modula la respuesta migratoria hacia e scratch	) 7
	3.1.3 Influencia del calcio extracelular en la capacidad invasora astroglial hacia el <i>scratch</i>	2
3.2	Evaluación de la propagación de la gliosis reactiva4	4
	3.2.1 Análisis del perfil de expresión de GFAP astroglial luego del scratch	4
	3.2.2 Participación de la microglía ante la activación de los TLR en la propagación de la astrogliosi	s
	in vitro4	7
	3.2.3 La presencia de microglía determina la formación de un gradiente de astrogliosis independient	е
	de la comunicación vía uniones gap4	9
	3.2.4 Participación del factor de transcripción NFkB en el la propagación de la gliosis reactiva 5	0
3.3	Evaluación de formación de la cicatriz glial54	4
	3.3.1 El daño celular producido a partir del scratch genera la polarización de los procesos astrogliale	s
	hacia la zona de la lesión	4
	3.3.2 El tratamiento con LPS produce una reorientación de los procesos astrogliales a las 24 h de	əl
	scratch5	7
DIS	<u>6 SCUSIÓN</u>	1
4.1	Participación de diferentes vías de señalización en la respuesta astroglial frente a l	а
inju	ıria <i>in vit</i> ro6	4
12	Evaluación de diferentes vías de señalización nosiblemente involucradas en l	2
nro	Evaluación de la gliosis reactiva	a 0
pro	4.2.1 Análisis de propagación de la gliosis en el modelo de injuria <i>in vitro</i> por scratch	<b>9</b>
	4.2.2 Participación de la vía de los recentores TLR y la interacción astrocitos-microglía en l	э а
	propagación de la astrogliosis reactiva	0
	4.2.3 Participación del calcio extracelular y las uniones gap astrogliales en la astrogliosis	1
	4.2.4 La participación de NFκB en la propagación de la astrogliosis	1
4.3	Formación de la cicatriz glial <i>in vitro</i> 7	3
4.4	Limitaciones del enfoque	5
		-
<u>CO</u>	NCLUSIONES	6
DIE		R

# **INTRODUCCIÓN**

#### 1.1 Inmunidad innata

La respuesta inmune innata en el organismo es la primera línea de defensa que se activa de manera inespecífica frente a cualquier tipo de agente patógeno. El sistema inmune innato sensa potenciales patógenos y detecta disrupciones en la homeostasis por varias familias de receptores, colectivamente llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR del inglés *Pattern Recognition Receptor*), (Janeway 1992). Entre ellos, podemos destacar la familia de Receptores tipo Toll (del inglés, *Toll-Like Receptors*) o RAGE (del inglés, *Receptor for Advanced Glycated End products*) que reconocen moléculas derivadas de patógenos o moléculas del propio organismo liberadas ante situaciones de estrés o frente al daño tisular (Rosin y Okusa 2011).

La injuria tisular o el estrés celular, inducen la liberación de moléculas que estimulan la respuesta inmune innata. Mientras que las moléculas derivadas de patógenos se denominan PAMP (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), los componentes celulares del organismo, que pueden ser liberados desde las células o desde compartimientos celulares hacia el espacio extracelular, y son capaces de activar la inmunidad innata se denominan DAMP (del inglés *Damage-Associated Molecular Pattern*) (Tang *et al.* 2012) (ver Figura 1.1).

Los DAMP, antes llamados *alarminas*, son moléculas que en condiciones normales tienen funciones fisiológicas celulares determinadas, pero que al ser liberadas al medio extracelular actúan como señales de alarma activando una respuesta inmune innata. Entre la gran variabilidad de moléculas que pueden funcionar como DAMP, podemos incluir a proteínas de shock térmico (HSPs), ácidos nucleicos, ATP (adenosin-tri-fosfato), HMGB1 (del inglés *high mobility group box 1*), S100B, etc. (Bianchi 2007).

Como resultado de esta interacción entre PAMP o DAMP y PRR, algunas células son activadas para destruir al patógeno y/o reparar daños titulares. Esta activación también produce el reclutamiento de células inmunes profesionales e incluso pueden activar la respuesta inmune adaptativa (específica) a través de la comunicación con células T. En el Sistema Nervioso Central (SNC), la activación de la inmunidad innata está a cargo de microglía y astrocitos. La subsecuente, activación de la inmunidad adaptativa, depende de las citoquinas y quemoquinas liberadas desde estas células residentes del

SNC, que promueven el reclutamiento de linfocitos y células mieloides de la periferia para ayudar a eliminar al patógeno o reparar el tejido dañado (Ransohof y Brown 2012).



**Figura 1.1. Respuesta inmune innata.** El reconocimiento de DAMP provenientes de células dañadas, o PAMP de determinados patógenos, a través de receptores PRR tales como los TLR, pueden activar a las células del sistema inmune innato que en el SNC son los astrocitos y la microglía. Modificado de Cummings y Didier 2015.

#### 1.1 Las células de la glía en el Sistema Nervioso Central

#### 1.1.1 Astrocitos

Los astrocitos son células especializadas de la glía presentes en todas las regiones del SNC y constituyen entre el 20-40% del total de células del cerebro humano (Herculano-Houzel 2014). En el cerebro de mamíferos, los circuitos neuronales se construyen sobre redes de astrocitos. Recientemente se han encontrado diferentes proporciones de astrocitos respecto a la cantidad de neuronas entre distintas zonas del cerebro, por ejemplo, mientras que en la corteza cerebral los astrocitos superan a las neuronas, en el cerebelo son las neuronas quienes superan ampliamente a los astrocitos. Además, las células astrogliales son escasas en zonas con alta densidad de cuerpos neuronales, tales como las capas de células piramidales hipocampales, mientras que son muy numerosas en áreas con dendritas y axones. Por lo tanto, hay una diversidad regional en los volúmenes ocupados por los astrocitos pero aún la relevancia funcional permanece sin ser comprendida completamente (Khakh y Sofroniew 2015).

Si bien la astroglía se considera un único tipo celular, agrupa una cantidad de células muy heterogéneas cuya morfología y función varía ampliamente según la ubicación, el subtipo y la etapa del desarrollo en la que se estudie. Fundamentalmente, se reconocen dos clases principales de astrocitos: los protoplasmáticos y los fibrosos, basados en diferencias morfológicas y en su localización, pero aún no han sido demostradas diferencias funcionales in vivo (Miller y Raff 1984, Oberheim et al. 2012). Los astrocitos protoplasmáticos se caracterizan por estar distribuidos de manera uniforme en la sustancia gris y por tener una gran cantidad de finas ramificaciones con las que forman una compleja arborización en proximidad con las sinapsis neuronales y la microvasculatura (Arague et al. 1999, Ventura y Harris 1999, Kimelberg et al. 2010). Por otro lado, los astrocitos fibrosos, en la sustancia blanca, tienen una menor cantidad de prolongaciones muy alargadas y se encuentran orientadas longitudinalmente entremezcladas entre los axones mielinizados. También se han descrito otro tipo de astrocitos más especializados asociados a regiones específicas como a las células de Müller en la retina, la glía de Bergmann en el cerebelo y los pituicitos de la neurohipófisis (Matyash y Kettenmann 2010, Parmigiani et al. 2015).

Además, de las diferencias morfológicas que definen a los distintos fenotipos astrogliales, se han observado que dentro de las poblaciones astrogliales existe una gran heterogeneidad de células que difieren en los perfiles de expresión génica y en la respuesta a la injuria (Zhang y Barres 2010, Wanner *et al.* 2013). En este contexto, se han encontrado un subgrupo de astrocitos atípicos denominados astrocitos aberrantes (AbAs) que parecen derivar de una transición fenotípica microglía-astroglía, los cuales fueron purificados de médula espinal de ratas transgénicas que expresan la mutación SOD1<sup>G93A</sup> la cual produce una enfermedad similar a la esclerosis lateral amiotrófica en los roedores.

Estos astrocitos aberrantes, poseen una gran capacidad proliferativa, pérdida de senescencia replicativa y liberan factores solubles que inducen la muerte de neuronas motoras (Diaz-Amarilla *et al.* 2011, Trias *et al.* 2013). Recientemente, otro tipo de astrocitos atípicos, con características aberrantes similares a los AbAs, fueron extraídos *ex vivo* desde lesiones isquémicas focales del cerebro, denominados astrocitos derivados de la isquemia (IDAs, del inglés *Ischemia-derived astrocytes*) (Villarreal *et al.* 2016). Trasplantes de IDA en cerebros normales demostraron que esta subpoblación de astrocitos reactivos podría contribuir a la propagación de la gliosis reactiva (Villarreal *et al.* 2016).

La característica más utilizada para reconocer a un astrocito dentro de su gran heterogeneidad es la marcación astroglial específica con anticuerpos contra la Proteína Fibrilar Glial Ácida (GFAP, del Inglés *Glial Fibrillary Acidic Protein*) que es el principal filamento intermedio en astrocitos maduros. Existen otros marcadores moleculares de astrocitos que permiten diferenciar la astroglía de distintas zonas, ya que se expresan de manera diferencial entre astrocitos de distintas regiones del SNC, tales como los transportadores de glutamato GLT-1 y GLAST, las proteínas conexinas 30 y 43 de las uniones tipo gap (Cx30, Cx43), etc. (Lehre *et al.* 1995, Nagy *et al.* 1999). Además otros marcadores se han utilizado para la identificación Inmunohistoquímica de astrocitos y astrocitos reactivos, tales como S100B y glutamina sintasa (Norenberg *et al.* 1979, Goncalves *et al.* 2008), aunque no son exclusivos de astrocitos.

Los astrocitos fueron descriptos hace casi 140 años, pero durante mucho tiempo se los consideró como células de relleno del SNC, cuya única función era ser el soporte físico para las neuronas. Este rol pasivo cambió en las últimas décadas, y hoy se reconoce que las poblaciones astrogliales son de gran relevancia en el mantenimiento de la homeostasis del SNC (Barres 2008). Los astrocitos expresan canales de sodio y potasio, y son capaces regular los niveles extracelulares de iones, pero no son eléctricamente excitables como las neuronas, es decir que son incapaces de propagar potenciales de acción a lo largo de sus prolongaciones o procesos. Esto no significa que sean fisiológicamente silenciosos. El aumento en los niveles intracelulares de calcio, representa una forma de excitabilidad astrocitaria, que tiene relevancia funcional en la comunicación intercelular: astrocito-astrocito y astrocito-neurona. Los niveles elevados de calcio en los astrocitos pueden provenir de oscilaciones intrínsecas resultando en la liberación desde compartimientos intracelulares, y así regular diferentes procesos incluyendo la expresión de receptores en la membrana y la liberación de neurotransmisores como el glutamato hacia el espacio extracelular. Estas olas de calcio también pueden ser propagadas a astrocitos vecinos, ya que se encuentran conectados a través de uniones tipo gap formando redes multicelulares funcionales (Sofroniew y Vinters 2010, ver Figura 1.2.1).

Los astrocitos también forman parte de la barrera hematoencefálica, una barrera de permeabilidad selectiva que preserva el microambiente del SNC. La barrera hematoencefálica está formada, por una monocapa de células endoteliales unidas por uniones estrechas y adherentes. En contacto con la membrana basal de las células endoteliales se encuentran los pericitos y proyecciones astrogliales que envuelven a los capilares las cuales se denominan *pies chupadores*. Actualmente se considera que el endotelio vascular, los astrocitos, la microglía y las neuronas forman la denominada *Unidad Neurovascular* (Del Zoppo 2006). Este concepto hace referencia a la unidad funcional del SNC. Una falla en cualquiera de sus componentes celulares alteraría la funcionalidad del conjunto, perjudicando la viabilidad neuronal (Del Zoppo 2006).

Otra función astroglial importante es la regulación del flujo sanguíneo local. En contacto con los capilares, los astrocitos liberan al flujo sanguíneo diferentes mediadores moleculares como prostaglandinas, óxido nítrico y ácido araquidónico, capaces de regular el diámetro de los vasos y participando así en el control de micro-circulación local (Gordon *et al.* 2007, ladecola y Nedergaard 2007, Koehler *et al.* 2009, Sofroniew y Vinters 2010).

También, los astrocitos realizan un importante transporte de agua a través del canal Aquaporina 4 (Fukuda y Badaut 2012) que está fundamentalmente expresado en los *pies chupadores*. Además los procesos astrogliales son ricos en canales de K<sup>+</sup>, que les permite captar el K<sup>+</sup> proveniente de la despolarización neuronal, estas características constituyen otra de sus funciones que es el mantenimiento de la homeostasis iónica y del pH para una correcta transmisión sináptica (Simard y Nedergaard 2004).

Una función muy importante, pero actualmente controversial de los astrocitos es la participación en la sinapsis. Se estima que los procesos de solo un astrocito contactan más de 100.000 sinapsis en el SNC (Chung *et al.* 2015). Esta arquitectura que brindan los astrocitos, permitiría la integración de diferentes circuitos neuronales a través de las redes

astrogliales y las señales liberadas por estas células. Actualmente se considera que los astrocitos son fundamentales en procesos como la sinaptogénesis, la maduración sináptica y el mantenimiento de la sinapsis (Chung et al. 2015). Los astrocitos no están contactando las sinapsis solo para eliminar el exceso de glutamato a través de sus transportadores GLAST y GLT1, sino que además, los astrocitos tienen un rol activo en la transmisión sináptica liberando moléculas sinápticamente activas denominadas gliotransmisores como glutamato, purinas (ATP y Adenosina), GABA y D-serina en respuesta a la actividad neuronal sináptica. Al mismo tiempo, los astrocitos responden a los neurotransmisores de origen neuronal con cambios en sus niveles de calcio intracelular (Maragakis y Rothstein 2006, Perea et al. 2009). Esta comunicación bidireccional entre los astrocitos y las neuronas, originó el concepto de sinapsis tripartita, resaltando el rol de los astrocitos en la clásica sinapsis compuesta por la pre y la postsinapsis neuronal. Un tercer componente en este sistema serían los astrocitos como reguladores o moduladores de la neurotransmisión (Chung et al. 2015).

En contraposición, un trabajo publicado por Sloan y Barres (2014), generó controversias sobre el rol fisiológico de la sinapsis tripartita. En esta publicación, se manifestó que la mayoría de estudios que soportan fuertemente la gliotransmisión in vivo se han desarrollado en una línea de ratones transgénicos en la cual se inhibió la liberación vesicular a través de la expresión de un dominante negativo para el dominio vesicular de la proteína SNARE (dnSNARE) cuya expresión estaba bajo el control de GFAP, de manera que el transgén fuera específico para astrocitos. Los hallazgos de Fujita et al. 2014 mostraron que algunas neuronas corticales del ratón GFAP-dnSNARE también expresaban esta modificación y que esta leve expresión en neuronas podría ser responsable de las alteraciones en el comportamiento de esta línea de ratones. Si bien este trabajo no refuta la hipótesis de la sinapsis tripartita y su rol fisiológico en la modulación de la actividad sináptica neuronal, enciende luces de alarma sobre la primera demostración fisiológica del rol de la sinapsis tripartita. En el futuro se plantea realizar un análisis exhaustivo en la especificidad de los tipos celulares en modelos de mutantes condicionales en ratones y la necesidad de revisar las propiedades de los astrocitos y su rol en los procesos neurales utilizando un abordaje que sea independiente del promotor de GFAP para así asegurar la especificidad del tipo celular analizado (Fujita et al. 2014).



**Figura 1.2.1. Algunas de las principales funciones de los astrocitos. A)** Esquema de los componentes de la Unidad Neurovascular, modificado de Del Zoppo *et al.* 2006. **B)** Esquema de las principales funciones de los astrocitos. Participación de los astrocitos en la modulación de la función sináptica: *sinapsis tripartita*, los astrocitos pueden captar el glutamato en exceso y reponer el glutamato neuronal vía ciclo glutamato-glutamina.

El ATP liberado por los astrocitos es reconocido a través de receptores purinérgicos en astrocitos vecinos, lo que activa a la Fosfolipasa C (PLC), con la consecuente activación de  $IP_3$  y movilización de calcio, lo que podría generar la liberación de glutamato.

Las uniones tipo gap les permiten a los astrocitos formar un sincicio funcional.

La regulación de la microcirculación es modulada a través de los *pies chupadores* que contactan los vasos sanguíneos y la liberación de sustancias vasoactivas, así también los astrocitos pueden extraer glucosa desde la vasculatura. Abreviaciones: Glu: glutamato; Gln: glutamina;  $IP_3$ : inositol trifosfato; PLC: Fosfolipasa C. Modificado de Maragakis y Rothstein 2006.

#### 1.1.2 Microglía

La microglía son células del sistema inmune profesional que funcionan como macrófagos residentes en el SNC y representan entre un 10-20% del total de la población de las células gliales (Kettenmann et al. 2011). Forman parte de un grupo de fagocitos mononucleares que comprenden: los macrófagos de tejido periférico, macrófagos asociados al SNC, células dendritas y células derivadas de monocitos. Todas las células mononucleares, se originan de células madres hematopoyéticas (HSCs, del inglés Haematopoietic stem cells) y se desarrollan por diferentes vías en respuesta a estímulos endógenos y ambientales. El origen de la microglía fue controversial hasta hace unos años, inicialmente se consideraba que todos los monocitos derivados de la medula ósea, circulaban por la sangre e ingresaban al tejido y ahí se diferenciaban en macrófagos residentes de tejido, ya sea en condiciones fisiológicas y durante la inflamación (Prinz et al. 2011). Sin embargo, esta visión ha cambiado en los últimos años, como resultado del hallazgo de nuevos subtipos de fagocitos monucleares que tienen orígenes diferentes y funciones distintas en el SNC y además estudios recientes basados en expresión génica muestran la gran variabilidad de macrófagos existentes. Las células microgliales constituyen esta excepción en cuanto al origen ya que derivan de HSCs del saco vitelino en lugar de HSCs de la medula ósea o del hígado fetal (Prinz y Priller 2014). Además también se han descubierto marcadores moleculares distinguibles entre la microglía y los macrófagos de la periferia (Butovsky et al. 2012). La microglía y los macrófagos del SNC, representan dos poblaciones mieloides con diferente ontogenia que parecen tener diferentes funciones (Benakis et al. 2014, Prinz y Priller 2014).

La microglía tiene un rol fundamental en el desarrollo, la formación y la modulación de las redes neuronales. En las primeras semanas post-natales, hay altos niveles de plasticidad, con sinapsis en permanente formación y remodelación, y las neuronas establecen una cantidad de conexiones sinápticas mucho mayor de la que luego permanece en el cerebro adulto. Esta menor cantidad de sinapsis que se observa en el cerebro adulto se debe a que existe un proceso activo, posterior en el desarrollo, denominado *poda* o *pruning* de sinapsis donde se eliminan sinapsis inmaduras a la vez que se mantienen y fortalecen otros contactos sinápticos (Tremblay *et al.* 2011). En este contexto, la microglía cumple un rol clave en el desarrollo del SNC mediante la

eliminación de conexiones sinápticas inapropiadas durante la formación de los circuitos neuronales maduros (Kettenmann *et al.* 2011, Schafer *et al.* 2012).

La microglía como célula del sistema inmune, presenta receptores PRR tales como los receptores tipo Toll a través de los cuales pueden reconocer PAMP o DAMP (Ransohoff y Brown, 2012). Frente a una injuria, se produce la activación microglial, un proceso muy complejo y gradual, con cambios morfológicos y fisiológicos que generan diferentes perfiles de activación microgliales. Por analogía a la activación de los macrófagos de la periferia, la polarización microglial reconoce fenotipos extremos conocidos como perfil M1 proinflamatorio con secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , iNOS y CCL2, y en el otro extremo un perfil M2 neuroprotector, anti-inflamatorio con expresión de factores neurotróficos, citoquinas antiinflamatorias y activación de la fagocitosis de detritos celulares (Benakis *et al.* 2014). De esta forma la microglía puede contribuir a la respuesta a la injuria tanto para exacerbar la inflamación o bien facilitar la neuroprotección en situaciones de daño del SNC. No es menor también la interacción que existe entre la microglía y los astrocitos que contribuye a desencadenar la respuesta tisular frente al daño en el SNC (Zhang *et al.* 2010, Gao *et al.* 2013).

#### 1.2.3 Oligodendrocitos

Otro tipo de células gliales son los oligodendrocitos, que sintetizan y mantienen una de las estructuras celulares más altamente especializadas del organismo, las vainas de mielina, que recubren los axones neuronales facilitando la rapidez de la propagación del impulso nervioso. Un único oligodendrocito puede mielinizar entre unos 30-40 axones en el SNC, mientras que las células de Schwann en el SNP solo mielinizan un tramo de un axón (Chan *et al.* 2004). En el SNC adulto, los oligodendrocitos derivan de células gliales NG2 precursoras de oligodendrocitos, tal como describimos en la siguiente sección.

#### 1.2.4 Células NG2 precursoras de células gliales

Las células NG2 son consideradas la cuarta población glial en el SNC, que se distinguen de los astrocitos, oligodendrocitos maduros y de la microglía. Estas células expresan el proteoglicano-4 condroitín sulfato (CSPG4, o también denominado NG2) y el

receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFaR) (Nishiyama et al. 2009) y se encuentran ampliamente distribuidas en el parénguima del SNC (Hill y Nishiyama 2014). Estudios tanto in vitro, como in vivo (Hughes et al. 2013) han demostrado que estas células pueden originar oligodendrocitos, por lo que fueron denominadas células precursoras de oligodendrocitos (NG2-OPC, del inglés NG2positive oligodendrocyte precursors). Sin embargo estudios in vitro demostraron una multipotencialidad en las células NG2 ya que bajo determinados factores de crecimiento podían dar origen a astrocitos, oligodendrocitos e incluso neuronas (Belachew 2003). Estudios posteriores no pudieron reproducir este potencial multipotente de las células NG2 postnatales in vivo (Nishiyama et al. 2009, Richardson et al. 2011). Un trabajo muy reciente demostró la diferenciación de células NG2 a astrocitos reactivos mediado por la señalización vía Sonic Hedgehog, en un modelo in vivo de injuria isquémica por oclusión de la arteria cerebral media. Estos astrocitos diferenciados se encontraron formando la cicatriz glial alrededor de la zona de daño isquémico (Honsa et al. 2016). Por otro lado, se ha reportado que las células NG2-OPC pueden migrar hacia un sitio de injuria focal en el SNC (Hughes et al. 2013). En conjunto, estos resultados le atribuyen a las células NG2 un rol importante en la gliosis reactiva y formación de la cicatriz glial en respuesta al daño en el SNC.

#### 1.3 La respuesta glial a la injuria: gliosis reactiva

El SNC puede ser afectado por un amplio rango de desórdenes que comprenden desde estadíos patológicos agudos como la injuria traumática y la isquemia cerebral hasta patologías crónicas como las enfermedades neurodegenerativas. Tales afecciones provocan una gran variedad de respuestas que involucran a múltiples tipos celulares, en especial a las células gliales, quienes son consideradas las principales respondedoras frente a cualquier tipo de lesión en el SNC. Para diferenciar la activación fisiológica de las células gliales en el contexto del tejido sano, donde cumplen las funciones normales mencionadas anteriormente, la respuesta genérica de los glía frente al daño tisular se denomina "gliosis reactiva" (revisado en Burda y Sofroniew 2014).

En particular, los astrocitos responden a todas las formas de daño y enfermedades del SNC mediante un proceso caracterizado por cambios moleculares, morfológicos y funcionales conocido como *astrogliosis reactiva*. A nivel morfológico, el proceso de

astrogliosis reactiva se puede distinguir por un aumento en el tamaño celular (hipertrofia), en la complejidad de las prolongaciones y en la tasa de división celular. También a nivel molecular se pueden evidenciar cambios en el transcriptoma astroglial generado por modificaciones en la expresión génica de los astrocitos reactivos. Estudios a partir de análisis proteómicos y de transcriptómica muestran que los astrocitos, bajo diferentes estímulos, tienen el potencial de alterar la expresión de varios genes. Estos involucran prácticamente todos los aspectos de la actividad celular, incluyendo su estructura celular, metabolismo, señalización intracelular, transportadores de membrana, etc. (Sofroniew 2009). Un estudio reciente de transcriptómica de astrocitos reactivos muestra que alrededor del 50% de los genes activados en la astrogliosis son específicos al tipo de injuria y pueden generar fenotipos de astrocitos que podrían tener efectos opuestos ya sea benéficos o detrimentales según el daño desencadenante (Zamanian *et al.* 2012). Incluso diferentes estímulos pueden generar niveles de sobreexpresión de GFAP similares e idéntica morfología, pero presentan cambios sustanciales en el transcriptoma y la función celular (Hamby *et al.* 2012, Zamanian *et al.* 2012).

La astrogliosis no es un proceso a "todo o nada" sino que ocurre en forma continua y progresiva en el tiempo, y no presenta una manifestación uniforme sino que es dependiente del contexto. La severidad del daño, determina los cambios que varían en forma gradual, desde alteraciones en la expresión génica e hipertrofia celular moderada frente a daños leves, hasta proliferación celular pronunciada con formación de una cicatriz glial en condiciones de daño más severo (Sofroniew 2015).

La severidad de la astrogliosis reactiva se observa a lo largo de un continuo, donde los astrocitos pueden alcanzar diferentes estadios o niveles de activación en base a cambios en la estructura, expresión molecular, proliferación y funcionalidad de los astrocitos reactivos. Así, se pueden distinguir a lo largo de la astrogliosis reactiva, diferentes categorías en forma de gradiente que van desde una forma media a moderada, difusa severa hasta una astrogliosis severa con formación de la cicatriz glial (Figura 1.3) (Sofroniew y Vinters 2010, Sofroniew 2015, Burda *et al.* 2016).

Astrogliosis media a moderada: consiste en cambios en la expresión génica, junto con un grado variable de hipertrofia celular y en la complejidad de sus prolongaciones (también llamadas *procesos*). Aun así, debido a que no hay proliferación

celular, los astrocitos mantienen dominios individuales, es decir que no presentan solapamiento, tal como se observa en el tejido sano. También hay un incremento en los niveles de expresión de GFAP, que es proporcional al grado de reactividad. Debido a que no hay demasiada reorganización tisular, si la lesión desencadenante se resuelve, por ejemplo una activación de la inmunidad innata por infección bacteriana sistémica o viral, entonces este tipo de astrogliosis media a moderada tiene el potencial de resolverse, de manera que los astrocitos retornan a una apariencia similar a la que poseen en el tejido sano en el cual la extensa red de procesos ramificados de astrocitos individuales ocupan dominios contiguos pero no solapados (Sofroniew 2009, Sofroniew y Vinters 2010).

Astrogliosis difusa severa: en este caso ocurren cambios en la expresión génica principalmente una elevada sobreexpresión de GFAP y otros genes, hipertrofia en el cuerpo celular y en los procesos de los astrocitos, lo que sumado a la proliferación celular resulta en una extensión considerable de los procesos. Esto genera un solapamiento y entrecruzamiento de los procesos de astrocitos vecinos, y como consecuencia, la pérdida de los dominios celulares individuales. Estos cambios pueden extenderse difusamente más allá de las áreas sustanciales, y pueden ocurrir en varias situaciones, en general este tipo de astrogliosis se produce en zonas que rodean lesiones focales severas, infecciones, o en áreas que responden a factores desencadenantes neurodegenerativos crónicos. A diferencia de la astrogliosis media a moderada, en este caso hay una considerable reorganización tisular, por lo tanto el potencial para resolverse y retornar a la estructura normal es muy reducido, ya que hay una elevada tendencia hacia la reorganización del tejido de larga duración (Sofroniew y Vinters 2010, Sofroniew 2015).

Astrogliosis severa con formación de la cicatriz glial: la astrogliosis severa con formación de una cicatriz glial compacta incluye cambios como sobreexpresión de la proteína GFAP, pronunciada hipertrofia del cuerpo celular y de los procesos, de manera que se genera solapamiento de los procesos de astrocitos reactivos, con pérdida de los dominios individuales, elevada proliferación y formación de una cicatriz glial densa, estrecha y compacta. Esta cicatriz astroglial compacta deriva casi en su totalidad de astrocitos de proliferación reciente que comienzan a filamentarse perdiendo por completo su morfología original, se superponen y entrecruzan para formar los bordes de la lesión. Así actúan como una barrera neuroprotectora frente a células inflamatorias y agentes infecciosos. Los astrocitos que forman la cicatriz rodean y demarcan áreas de daño de tejido por necrosis, inflamación después de traumatismos, accidentes cerebrovasculares, infección, infiltraciones inflamatorias desencadenadas por autoinmnunidad, o enfermedades neurodegenerativas (Bush *et al.* 1999, Faulkner *et al.* 2004). Hay varias posibles fuentes de astrocitos que podrían formar la cicatriz glial: astrocitos maduros que vuelven a ingresar al ciclo celular y proliferan (Bardehle *et al.* 2013), células progenitoras NG2 en el parénquima local (Magnus *et al.* 2008), o células progenitoras ependimarias (Barnabe-Heider *et al.* 2010).

Una característica importante de los astrocitos reactivos del borde de la cicatriz glial es que interaccionan con otros tipos celulares en el centro de la lesión del tejido, incluyendo fibroblastos derivados del tejido perivascular, pericitos, fibrocitos y otras células gliales (Wanner *et al.* 2013, Abeysinghe *et al.* 2016). Además una característica importante de la cicatriz glial es la deposición de una matriz extracelular densa de proteoglucanos de condroitin sulfato que inhibe el crecimiento axonal produciendo el colapso del cono de crecimiento (Sofroniew 2009, Burda y Sofroniew 2014). Es importante destacar que la formación de la cicatriz glial se asocia con cambios sustanciales en la reorganización tisular y cambios estructurales de larga duración y persistencia incluso una vez resuelto el daño desencadenante (Vinter y Sofroniew 2010).

Por todo lo mencionado anteriormente, se puede concluir que la astrogliosis no es una respuesta uniforme y simple, ni es sinónimo de formación de cicatriz glial, sino que se trata de un proceso continuo gradual de cambios progresivos que van desde alteraciones reversibles en la expresión génica e hipertrofia celular, hasta en condiciones más severas, pronunciada proliferación celular con formación de la cicatriz glial y reorganización tisular permanente.



**Figura 1.3. Gliosis reactiva y formación de la cicatriz glial. A)** Esquema superior que muestra el gradiente de astrogliosis desde medio hasta la formación de la cicatriz. En la parte inferior se muestra el mismo gradiente por inmunohistoquimica para GFAP. Barra= 8 µm. Modificado de Sofroniew, 2009, 2014. B). El esquema muestra en detalle la formación de la cicatriz glial y las células que participan en este proceso. Abreviaciones: AS: *scar* cicatriz astroglial; LC: *core* de la lesión; PLP: perímetro perilesión (penumbra); HT: Tejido sano. Modificado de Burda *et al.* 2016.

#### 1.3.1 Formación de la cicatriz glial y su papel en la injuria en el SNC

La formación de la cicatriz glial es resultado de una interacción compleja entre distintos tipos celulares luego de la injuria. La dinámica de polarización de las diferentes poblaciones de células a lo largo del tiempo genera la formación, por parte de los astrocitos reactivos, de una pared de procesos astrogliales filamentosos denominada cicatriz glial que rodea el tejido necrótico y lo separa del tejido sano (Sofroniew y Vinters 2010, ver Figura 1.3). Entre los principales tipos celulares involucrados podemos citar: los astrocitos reactivos, la microglía activada, macrófagos infiltrantes, células NG2 progenitoras de oligodendrocitos (NG2-OPC) y células estromales/fibroblastos que expresan PDGF $\beta$  (Wanner *et al.* 2013, Cregg *et al.* 2014). La rotura de la barrera y el infiltrado de elementos del plasma y de la sangre en el parénquima del SNC se consideran claves en la formación de la cicatriz glial. La extravasación leucocitaria y la

formación de agregados de leucocitos fue demostrada por muchos trabajos (Aloisi *et al.* 2006, Metcalf *et al.* 2013). Los astrocitos que se encuentran dentro de la cicatriz glial, están densamente arborizados, y muestran un alto grado de procesos solapados que son intensamente teñidos para GFAP, (Abeysinghe *et al.* 2016). Además de los astrocitos preexistentes en el cerebro, células gliales radiales GFAP positivas son generadas en nichos neurogénicos de la zona subventricular después de la injuria, por lo cual los primeros días puede verse migración que intensifica aún más la cicatriz glial (Abeysinghe *et al.* 2014). Mientras que luego de 7-14 días de una lesión focal se pueden observar astrocitos inmunoreactivos para nestina, grandes y densamente arborizados rodeando la zona de la lesión, a los 28 días ya aparece una barrera física y química alrededor de la zona lesionada (Shen *et al.* 2005, Abeysinghe *et al.* 2016).

Los astrocitos reactivos que forman la cicatriz glial, no solo representan una barrera física para las neuronas que tratan de reformar las conexiones, sino que además son una fuente de moléculas inhibitorias que previenen el recrecimiento axonal como los proteoglicanos de condroitin sulfato (CSPGs), (McKeon *et al.* 1999, Yiu y He 2006, Sofroniew 2009). Sin embargo, un artículo muy reciente contradice esta postura, planteando que los astrocitos que forman la cicatriz glial permitirían la regeneración axonal (Anderson *et al.* 2016). Por otro lado, la formación de la cicatriz glial resulta además importante para evitar la expansión del daño hacia el tejido sano y el infiltrado masivo de células proinflamatorias de la periferia al SNC (Wanner *et al.* 2013). Por sus implicancias fisiológicas y fisiopatológicas, hay un creciente interés en conocer cuáles son los mecanismos moleculares que regulan funciones específicas o efectos de la astrogliosis que puedan a futuro servir de blancos terapéuticos para intervenciones específicas.

#### 1.3.2 Mecanismos moleculares reguladores de la astrogliosis

La astrogliosis no es un programa estereotipado regulado por simples cambios en el encendido o apagado molecular, sino que como se mencionó anteriormente es un amplio espectro de cambios que ocurren de manera dependiente del contexto, la naturaleza y severidad del insulto del SNC. Se conocen actualmente varias cascadas de señalización inter e intracelulares así como una amplia variedad de moléculas extracelulares, que pueden estar involucradas en la regulación de diferentes aspectos de la astrogliosis reactiva (Sofroniew 2015):

-Factores de crecimiento y citoquinas: secretados por células gliales o macrófagos infiltrantes: tales como IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferón (IFN- $\gamma$ ), IL-6, factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), etc.

-Mediadores de la inmunidad innata como PAMP entre ellos las endotoxinas bacterianas como lipopolisacáridos (LPS) y DAMP (por ejemplo ácidos nucleicos, proteínas de shock térmico (HSPs), ATP, HMGB1, proteínas de unión a calcio de la familia S100, etc.) que pueden activar receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como el receptor para RAGE y receptores tipo Toll (TLR) (Villarreal *et al.* 2014). Trabajos previos han demostrado la importancia de los receptores PRR, tales como TLR y RAGE en el reconocimiento de DAMP y la respuesta glial frente a la injuria (Kigerl *et al.* 2013, Angelo *et al.* 2014, Villarreal *et al.* 2014). A su vez el efector de la vía de los TLRs el factor de transcripción NFκB se ha encontrado activado en diversas situaciones de daño en el SNC (Gabriel *et al.* 1999, Pizzi *et al.* 2009, Engelman y Haenold 2014).

-Neurotransmisores como glutamato y noradrenalina

-Purinas como ATP

-Especies reactivas del Oxigeno incluyendo al Óxido Nítrico (NO)

-Condiciones de hipoxia y deprivación de glucosa

-Productos asociados a la neurodegeneración

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la propagación de la astrogliosis reactiva desde el sitio de injuria focal en el SNC. Uno de ellos considera que en el núcleo o *core* de la lesión las células sufren rápidamente necrosis y liberan proteínas intracelulares como S100B, HMGB1, pequeños fragmentos de ADN y ARN, que actúan como DAMP, los cuales, por simple difusión, serían los responsables de la propagación de la gliosis reactiva. Según este modelo el gradiente de DAMP originado desde la lesión focal del SNC sería suficiente para inducir una gliosis reactiva gradual como se observa en los ensayos *in vivo* (Burda y Sofroniew 2014). Por otro lado, un modelo alternativo

considera que los DAMP liberados son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR) expresados por las células inmunocompetentes y la misma glía, las cuales inducen la secreción de moléculas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , (Akira *et al.* 2004, Clausen *et al.* 2008, Lambertsen *et al.* 2009). Estas moléculas serían capaces de facilitar la propagación de la señal (Auzmendi *et. al* 2015). Estudios utilizando cultivos bi y tridimensionales, así como resultados preliminares con modelos matemáticos basados en estadística Bayesiana aplicada a cerebros con injuria isquémica focal muestran que la difusión de DAMP *per se* no es capaz de generar un gradiente de gliosis reactiva que simule la observada luego de lesiones focales (Auzmendi *et al.* 2015, Mannava *et al.* 2015), demostrando una mayor complejidad del proceso.

Recientemente, se ha demostrado que luego de una injuria en el SNC se produce un cambio en los niveles intracelulares de calcio en los astrocitos que se propaga como una ola a través de las uniones gap a toda la red astroglial (Gao *et al.* 2013, Ravin *et al.* 2016). Estas olas de calcio astrogliales han sido asociadas al aumento de la reactividad astroglial observable por un aumento en la expresión de GFAP (Gao *et al.* 2013), sugiriendo un posible rol importante de la señalización del calcio en la propagación de la gliosis reactiva.

En base a las evidencias reportadas en la literatura y comentadas en esta sección, en este trabajo de tesis de licenciatura planteamos la **hipótesis** de trabajo que indica que la formación de la cicatriz glial por parte de los astrocitos reactivos depende directamente del grado de reactividad glial inicial, probablemente relacionado al nivel de actividad de NFkB, efector de la ruta DAMP/TLR.

El <u>objetivo general</u> de este trabajo es conocer los mecanismos que subyacen a la propagación de la gliosis reactiva y la formación de la cicatriz glial luego de la injuria focal en el SNC. Conocer estos mecanismos y los puntos de control permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tendientes a detener la expansión de la gliosis reactiva y la neuroinflamación en múltiples desórdenes del SNC.

Los objetivos específicos propuestos son:

- Establecer un modelo in vitro para el estudio de la respuesta astroglial a la injuria. Para ello se utilizó el modelo de herida artificial o scratch wound healing assay sobre cultivos gliales mixtos y de astrocitos corticales. Para establecer la respuesta astroglial frente a la lesión artificial se evaluó por microscopia de contraste de fase a distintos tiempos el grado de invasión astroglial hacia la zona de daño.
- Empleando el modelo de herida artificial o scratch wound healing assay determinar el papel del estado inicial de reactividad glial en la propagación de la gliosis reactiva. Previo al scratch se realizaron distintos tratamientos: con LPS y HMGB1 estimulantes de las vías de TLR, BAY 11-7082 un bloqueante de NFκB, EGTA un quelante de calcio extracelular y MFA un bloqueante de uniones gap en cultivos gliales mixtos y de astrocitos corticales. Se evaluó su participación en la propagación de la gliosis reactiva en forma de gradiente a través de la cuantificación de la expresión de GFAP astroglial desde el borde del scratch.
- Mediante la utilización del modelo de herida artificial o scratch wound healing assay estudiar la relación existente entre diferentes grados de reactividad y niveles de NFκB. En base al preponderante rol de NFκB en la gliosis reactiva (Villarreal *et al.* 2014) y su rol clave como acople de la interacción DAMP/TLR se estudiaron los efectos de la inhibición de NFκB en propagación de la gliosis reactiva. Se realizaron los distintos tratamientos al igual que en el objetivo anterior y se determinó la activación de NFκB a distintas distancias desde el borde del scratch.
- Estudiar la participación de interacciones celulares más complejas en la formación de la cicatriz glial. Se realizaron experimentos sobre cultivos neurogliales hipocampales en el modelo de *scratch* y bajo distintos tratamientos con DAMPs y/o lipopolisacárido (LPS) para variar el nivel de reactividad inicial. Se evaluó morfológicamente la formación de la cicatriz mediante inmunofluorescencia para la proteína GFAP específica de astrocitos. Se determinaron la orientación de los procesos astrogliales midiendo el ángulo θ respecto de la herida. En el caso de que el ángulo este entre 0°-30° se consideró como una estructura símil cicatriz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Animales

Se utilizaron las crías de ratas de la cepa Wistar (250-300 g) mantenidas en condiciones controladas de humedad y temperatura, con un periodo de 12 horas de luz y suministro de agua y comida *ad libitum*, en la sala de animales del Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN) "Prof. De Robertis". La manutención de los animales, los apareos y el sacrificio de las crías fue realizada bajo las normas internacionales y los 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).

#### 2.2 Cultivos celulares primarios

Los cultivos primarios mixtos fueron obtenidos de ratas 3-5 días postnatales. Se decapitaron los animales y se colocaron las cabezas en una solución de iodopovidona para su desinfección y posterior lavado en alcohol etílico. Inmediatamente, los cerebros fueron removidos quirúrgicamente y lavados en una placa de Petri con medio de cultivo comercial Dulbecco's Modified Eagle Medium de alta glucosa y glutamina (DMEM, Invitrogen-119965092). Luego bajo lupa se eliminaron las meninges y se disecaron las regiones de interés ya sea el hipocampo o las cortezas cerebrales a partir de las cuales se obtuvieron los cultivos finales.

#### 2.2.1 Cultivos gliales mixtos de astrocitos y microglía

Los cultivos gliales mixtos se obtuvieron, a partir de cortezas cerebrales disecadas como se describió más arriba. Las cortezas cerebrales se disgregaron mecánicamente empleando tijeras de cirugía estériles y pipetas de 10 ml y distintos tips de micropipetas de mayor a menor diámetro sucesivamente para favorecer la disgregación. Se dejaron decantar los restos de tejido unos segundos y luego de varios lavados en DMEM, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino 10% (Natocor) y el antibiótico penicilina/estreptomicina 100 µg/ml (Sigma-P4333), mencionado a partir de ahora como DMEM completo, al cual se le agregó el antimicótico Funguizona (1 µg/ml). El cultivo obtenido con astrocitos, microglía y cantidades bajas de oligodendrocitos se colocó en botellas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> recubiertas 12 h antes con poli-L lisina (poli-L; Sigma-P4707). Las botellas fueron mantenidas en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Una vez que los cultivos llegaron a confluencia, se lavaron y disociaron con tripsina 0.025% (Sigma-T6567) y fueron resembrados en placas de 24 pocillos recubiertas 12 h antes con poli-L. Se sembraron 100000 células por pocillo, excepto en los experimentos de microscopía en vivo donde se emplearon cultivos en alta densidad con 300000 células por pocillo. Los cultivos obtenidos en este punto contienen astrocitos y microglía y se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, a partir de aquí nos referiremos a ellos como cultivos gliales mixtos. El medio DMEM completo fue reemplazado cada 48 h hasta alcanzar el 100% de confluencia (7-9 días).

#### 2.2.2 Cultivos enriquecidos en astrocitos corticales

Los cultivos se realizaron según lo descrito por Villarreal *et al.* 2014 con algunas modificaciones. Una vez que los cultivos mixtos llegaron a confluencia, las botellas fueron mantenidas en agitación (180 RPM) durante 48 h para remover la microglía que crece por encima de la monocapa de astrocitos. Para eliminarla completamente, se les cambió el medio por DMEM completo fresco cada 24 h y se continuó con la agitación. Considerando que la tasa de división mitótica de la microglía es superior a la de los astrocitos, para depletar los restos de microglía en el cultivo, se agregó el inhibidor mitótico 5-Fluorouracilo 0.125 µl/ml (5-FU; Sigma-F6627). Luego de 24 h, el 5-FU fue removido completamente del cultivo y se agregó medio DMEM completo fresco, en el cual permanecieron los astrocitos por otras 48 h antes de ser utilizados para los experimentos. Posteriormente, se tripsinizaron y sembraron, en placas de 24 pocillos previamente recubiertas con poli-L, entre 100.000 y 200.000 células por pocillo.

Ensayos de inmunofluorescencia mostraron que más de un 95% de las células obtenidas mediante este protocolo fueron inmunopositivas para GFAP, confirmando el enriquecimiento de astrocitos en los cultivos.

#### 2.2.3 Cultivos mixtos neuro-gliales de hipocampo

Se realizaron cultivos primarios neuro-gliales a partir de hipocampos obtenidos como se mencionó anteriormente. Posteriormente, los hipocampos fueron lavados 2 veces con DMEM e incubados por una hora en una solución de papaína (20 UE/mL) en DMEM a 37° con 5% CO<sub>2</sub>. Luego se reemplazó la solución de papaína por DMEM completo, se incubó por 5 minutos para detener la reacción con papaína y se realizó un lavado con este mismo medio para eliminar el remanente de papaína en solución. En medio completo, los hipocampos fueron disgregados delicadamente con pipeta Pasteur de vidrio. Una vez disgregadas las células, se sembraron en placas de 24 pocillos (previamente incubadas 12 h con Poli-L) con abundante medio DMEM completo. Se las dejó en estufa (a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>) por 3 h y pasado ese tiempo, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM completo nuevo para eliminar el debris celular. Este proceso se repitió al día siguiente, y luego cada 3 días se reemplazó el medio de cultivo. Las células fueron tratadas entre los 17-18 días *in vitro*.

#### 2.3 Modelo de herida artificial o scratch wound healing assay

Una vez que los cultivos sembrados en las placas de 24 pocillos llegaron al 100% de confluencia se realizó una lesión artificial (mencionado a partir de aquí como *scratch*) que consistió en deslizar la punta de un tip plástico estéril de micropipeta P10 por la superficie de la placa, a lo largo del diámetro del pocillo. Se visualizaron los cultivos en microscopio invertido, para comprobar la ausencia de células en el trayecto marcado por el tip en cada pocillo, debido al daño generado en esa zona (Villarreal *et al.* 2014).

#### 2.4 Tratamientos

Los cultivos celulares fueron sometidos a distintos tratamientos dependiendo del experimento, ya sea con los estimulantes de TLR: el lipopolisacárido bacteriano LPS (25 ng/ml, Sigma-L3755) y HMGB1 (500 ng/ml, Sigma-H4652); el bloqueante de NF $\kappa$ B: BAY-117082 (10  $\mu$ M, Sigma-B5556); el quelante de Calcio extracelular EGTA (20  $\mu$ M, Sigma); un bloqueante de uniones gap MFA (100  $\mu$ M, Sigma) y con medios de cultivo DMEM o

DMEM completo utilizados como vehículos según corresponda en cada protocolo experimental.

Distintos esquemas experimentales fueron empleados:

A) *Esquema de tratamientos post-lesión*: en el cual se produce el *scratch* sobre el cultivo, se lava con DMEM completo para eliminar el debris celular e inmediatamente se realiza el tratamiento el cual permanece hasta la fijación a 12 o 24 h. Este procedimiento fue utilizado en los cultivos neuro-gliales hipocampales. En estos experimentos los tratamientos se realizaron en medio de cultivo DMEM completo.

B) *Esquema de tratamientos pre-lesión:* donde se realiza una pre-incubación de los cultivos con el tratamiento durante 30 minutos. Luego se realiza el *scratch,* se continúa la incubación por 3 h más, se les realiza un lavado y se conservan en DMEM completo. Además, solo en los experimentos de microscopía en vivo, luego de las 48 h del *scratch* se les realiza un nuevo cambio de medio por DMEM completo. Este protocolo experimental fue utilizado en los cultivos gliales mixtos y de astrocitos purificados, en este caso los tratamientos se realizaron en DMEM sin suplementos de suero.

#### 2.5 Fijación de células en cultivo

La fijación de los cultivos se llevó a cabo incubándolos 15 minutos a temperatura ambiente con una solución que contiene paraformaldehído 4% (Sigma-P6148), y sacarosa 4% (Anedra-7118) en buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,2. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y se conservaron a 4°C en PBS según se describe en (Villarreal *et al.* 2011).

#### 2.6 Inmunocitoquímica

La células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 1% (v/v) (Natocor) en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS y se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos incubando las células, por 30 minutos a temperatura ambiente, con una solución de bloqueo que contiene suero normal equino (SNE, Natocor) al 5% en PBS. Luego, se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante 18 h a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS, y las células se incubaron con los anticuerpos secundarios también diluidos en solución de bloqueo durante 4 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se

 $\sim 32 \sim$ 

realizaron tres lavados en PBS y en determinados casos, además se incubaron con 4',6diamidino-2-fenilindol diclorhidrato 0,1 µg/ml (DAPI, Sigma-D9542) durante 30 minutos a temperatura ambiente para teñir los núcleos celulares y luego se realizaron otros 3 lavados. Posteriormente, las células se observaron y fotografiaron en un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-81.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-GFAP (hecho en ratón, Sigma-63893 y hecho en conejo, DAKO-Z0334, dilución 1:1500), anti-p65 (policional, hecho en conejo, dilución 1:800, Santa Cruz- sc-372), y los anticuerpos secundarios: anti-IgG de ratón (hecho en oveja, dilución 1:800, longitud de onda FITC verde, Sigma-F2883) y anti-IgG de conejo (hecho en cabra, dilución 1:800, longitud de onda Alexa 594 rojo, Jackson-11-585-144).

#### 2.7 Análisis de datos

Las imágenes tomadas por microscopía en vivo y las imágenes de inmucitoquímica de fluorescencia fueron tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX 81 del que dispone el instituto donde se desarrolló la tesis. Las imágenes de las inmunofluorescencias y de contraste de fase fueron perfeccionadas usando Adobe Photoshop 7.0 e ImageJ.

### 2.7.1 Visualización de la progresión del *scratch* por microscopía en vivo (*live-imaging*)

Para evaluar la dinámica de invasión de las células hacia el *scratch*, los cultivos gliales mixtos a los distintos *tratamientos pre-lesión* (ver esquema experimental B), fueron fotografiados a las 2, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h del *scratch*, por microscopía en vivo. Las imágenes (con un aumento primario de 10X) representativas del *scratch* por cada pocillo fueron analizadas con el programa ImageJ. En cada una de las imágenes, se cuantificó el área libre de astrocitos trazando el contorno delimitado por los procesos astrogliales que invaden el *scratch*.

#### 2.7.2 Análisis de la expresión de la proteína astroglial GFAP

Los cultivos gliales mixtos y de astrocitos, sometidos a los *tratamientos pre-lesión*, fueron fijados a las 12 h posteriores al *scratch*, y se les realizó una inmunocitoquímica para la proteína astroglial GFAP. Los cultivos fueron fotografiados y las imágenes analizadas en el programa ImageJ. Cada una de las imágenes (10X) representativas de cada pocillo, fue convertida en imagen de 8-bit en escala de grises y se le mejoró el contraste. Se trazaron transectas de 40 µm de espesor desde el borde del *scratch* hasta 90 µm de profundidad. Este procedimiento se realizó a lo largo de todo el *scratch*. En cada transecta, se calculó para cada valor de distancia desde el borde del *scratch*, el valor medio de la intensidad de gris en escala de 0-256, donde mayor valor indica más luminosidad. Luego se hizo un promedio de la intensidad media de luminosidad en función de la distancia por cada imagen y pocillo evaluado.

#### 2.7.3 Evaluación de la activación de NFkB por localización nuclear de p65

En el análisis utilizamos la composición de cada imagen con marca para GFAP en verde, p65 en rojo y DAPI. Se delimitó el borde del *scratch* y se trazaron transectas de 10  $\mu$ m de espesor a 10, 40 y 70  $\mu$ m del borde del *scratch*. El mismo proceso fue realizado para ambos bordes del *scratch*. La activación de NFKB fue cuantificada contando en cada transecta los núcleos positivos para p65 respecto a los núcleos totales, como se detalla a continuación.

La localización de p65 (una de las subunidades de NF $\kappa$ B) en el núcleo es un indicador de la activación de NF $\kappa$ B tal como se describió en Angelo *et al.* 2014 y Villarreal *et al.* 2014. En el citoplasma NF $\kappa$ B se encuentra secuestrado por su inhibidor I $\kappa$ B, solo al liberarse de su inhibidor, queda expuesta su señal de localización nuclear, así puede migrar al núcleo y actuar como factor de transcripción. El anticuerpo policional contra p65 que se utilizó reconoce al antígeno independientemente de la unión de la subunidad p65 con otras proteínas como el complejo inhibidor I $\kappa$ B. Entonces, para determinar la activación de NF $\kappa$ B con este anticuerpo, se evaluó la localización de la marca de p65 en las células y utilizando la co-marcación (color rosa) con DAPI se pudo determinar si p65 se encontraba en el núcleo y por lo tanto NF $\kappa$ B activado.

#### 2.7.4 Análisis de la orientación de los procesos astrogliales luego del scratch

Los cultivos neuro-gliales hipocampales, sometidos al *scratch* y a los distintos *tratamientos post-lesión* (ver esquema experimental A) fueron fijados a las 12 y 24 h posteriores al scratch. Se tomaron imágenes sucesivas (magnificación primaria 20X) de la longitud total del *scratch*, de las cuales se seleccionaron 5 imágenes representativas de cada pocillo. Luego de extraer el *background* de la imagen (Sternberg 1983), se analizó la orientación de los procesos de los astrocitos respecto al borde del *scratch*. Para ello se trazaron transectas de 100 µm de espesor a partir del borde del *scratch* y se analizaron en profundidad los procesos astrogliales presentes en las dos primeras transectas. Para cada proceso se determinó la longitud y el ángulo respecto al *scratch*. La orientación de los procesos se definió como paralela al *scratch* cuando el ángulo medido fue menor a 30 grados; perpendicular al *scratch* con ángulos esté entre 60 y 90 grados, y aquellos con ángulos entre 30 y 60 grados se consideraron con orientación indefinida.

#### 2.8 Estadística

Los resultados se presentan en gráficos que expresan la media y el error estándar medio (SEM) con un n de entre 2 y 5 pocillos por tratamiento. En todos los casos, la comparación estadística de los diferentes grupos se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de un post-test de Dunnet para comparaciones contra el control o de un post-test de Tukey para comparaciones múltiples. Un p<0.05 fue considerado como estadísticamente significativo. Para realizar el ANOVA, se testearon el cumplimiento de los supuestos del test para todos los datos, por un lado, la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Bartlett y la normalidad fue testeada con el test D'Agostino & Pearson.

Los asteriscos ubicados sobre las barras muestran diferencias con distintos grados de significancia respecto del control (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). Los numerales indican diferencias significativas entre distintos tratamientos (#p<0.05; ##p<0.01, ###p<0.001).

Los análisis estadísticos y los gráficos presentados se realizaron utilizando el software GraphPadPrism 5.0 y SigmaPlot 10.0.

### **RESULTADOS**
En este trabajo se evaluaron los posibles mecanismos de señalización que llevan a la adquisición del fenotipo astroglial reactivo, permiten la propagación de la astrogliosis, y finalmente llevan a la formación de la cicatriz glial.

#### 3.1 Evaluación de la respuesta astroglial frente a la injuria in vitro

#### 3.1.1 Las células astrogliales tienden a invadir la zona del scratch

Las células gliales responden de forma general ante la injuria mediante su conversión al fenotipo reactivo ya sea *in vitro* e *in vivo*. Para simular una injuria tisular *in vitro* se utilizó el modelo de injuria artificial o *scratch* sobre cultivos gliales mixtos. El *scratch* genera un área libre de células, donde la muerte celular por ruptura induce liberación de DAMP provocando que los astrocitos periféricos a la lesión artificial se vuelvan reactivos y migren para invadir el área lesionada (Etienne-Manneville 2006). Para evaluar la respuesta astroglial frente a una lesión por *scratch*, se tomaron fotos representativas a las 2, 6, 12 h y luego cada 12 horas posteriores al *scratch* durante 3 días por microscopía en vivo sobre el cultivo celular y se representó el área libre de células astrogliales (Figura 3.1.1).

La Figura 3.1.1 A muestra que en la lesión inicialmente libre de células (2 h) comienza a aparecer un puntillado correspondiente a células de la microglía ya que por su capacidad fagocítica tienden a invadir rápidamente la lesión para eliminar los restos celulares. Posteriormente, a las 12 h, algunos astrocitos de la periferia del *scratch* comienzan a extender sus procesos hacia la lesión y a invadirla notoriamente a partir de las 24 h. La invasión astroglial presentó una dinámica temporal bifásica donde a partir de las 12 y 48 h se presentaron las disminuciones más marcadas en la superficie libre de astrocitos (Figura 3.1.1 B). A pesar de que esta respuesta parece ser sutil a tiempos tempranos y más marcada a tiempos mayores, la tasa de disminución de superficie libre es muy similar, siendo 15% a las 12 h, del 10% entre las 12 y 24 h, asimismo entre las 60 y las 72 h la tasa fue del 12.5% (Figura 3.1.1 B).





Figura 3.1.1. Capacidad de las células astrogliales de invadir la zona del scratch. A) Imágenes (10X magnificación primaria) representativas de la invasión de las células hacia el scratch realizado en un cultivo glial mixto luego de 2, 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h. Barra= 500 µm. Las líneas punteadas amarillas representan los bordes del scratch a tiempo cero. B) Cuantificación del área libre de astrocitos para cada uno de los tiempos analizados luego del scratch. Los datos se muestran como media y error estándar de la media (SEM), n=3. Las diferencias fueron evaluadas a través de un ANOVA de una vía (F=19.31, p<0.0001) seguido del post-test de Dunnett. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las 2 h luego del scratch (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001).

### 3.1.2 El grado de reactividad inicial de las células gliales modula la respuesta migratoria hacia el *scratch*

Las células gliales pueden reconocer señales de daño (DAMP) liberadas desde la zona de injuria, a través de receptores de la inmunidad innata, tales como los receptores tipo Toll (TLR) (Kigerl *et al.* 2014). Esto les permitiría a los astrocitos responder genéricamente a diferentes tipos de injuria. Por esta razón, nos propusimos estudiar si el grado de reactividad inicial de las células gliales, mediado por la activación de estos receptores, influye en la respuesta migratoria de los astrocitos hacia el *scratch*. Para el abordaje experimental se empleó el esquema de *tratamientos pre-lesión*: con LPS como un PAMP que estimula a los receptores TLR4; HMGB1 como un DAMP que estimula a los receptores TLR4; HMGB1 como un DAMP que estimula a los receptores TLR4; Y 11-7082 un bloqueante de NFkB. Al igual que en la sección precedente se midió el área libre de células astrogliales, a las 24, 48 y 72 h posteriores al *scratch* sobre imágenes de microscopía en vivo de los cultivos gliales mixtos (Figura 3.1.2).

La estimulación de las vías de TLR con HMGB1 generó una dinámica migratoria diferente a la generada solo por la lesión. Se observó un aumento del 25% en la capacidad de invasión astroglial a las 24 h (Figura 3.1.2 B), pero luego se estabilizó en el tiempo (Figuras 3.1.2 C-D). Mientras que la estimulación con LPS no adicionó ningún efecto sobre la capacidad migratoria de los astrocitos inducida por la lesión (Figuras 3.1.2 B-D). A las 72 h, todas las condiciones presentaron un nivel similar de superficie cubierta (Figura 3.1.2D) evidenciando que si bien las dinámicas temporales de migración inicialmente son diferentes, en todos los casos se llega a un máximo nivel en la capacidad migratoria (Figura 3.2.1 A). Esto ocurre, probablemente, porque se detiene la migración por señales inhibitorias emitidas por las células que migran desde el otro borde del *scratch*.

En conjunto, los resultados de la Figura 3.1.2, muestran que el grado de reactividad inicial que tienen las células gliales influye sobre la respuesta migratoria astroglial hacia el área lesionada, particularmente mediante la señalización inducida por el DAMP HMGB1. Se conoce que HMGB1 aumenta la extensión de los procesos de los astrocitos, de manera que aumentaría la posibilidad de invadir la zona dañada (Mannava *et al.* 2015). La Figura 3.1.2E muestra la lesión a las 24 h sobre cultivos pretratados con HMGB1 o

vehículo. En el cultivo control, la zona dañada se encuentra tapizada por células de la microglía, procesos de los astrocitos que se extienden desde el borde del *scratch* y algunos astrocitos individuales (Figura 3.1.2 E). Por otro lado, el tratamiento con HMGB1 indujo una mayor cantidad y longitud en las prolongaciones celulares que se extienden hacia el borde del *scratch*, las cuales incluso lo cruzan desde ambos lados (Figura 3.1.2 E).

Teniendo en cuenta que la preactivación de los astrocitos por HMGB1 parecería influir en la capacidad astroglial para invadir la zona dañada, nos propusimos estudiar si este efecto de HMGB1 depende de las vías de señalización mediadas por receptores tipo Toll (TLR) y su efector, el factor de transcripción NFkB. Como ya comentamos, NFkB normalmente está secuestrado a nivel citoplasmático por la proteína inhibitoria I-kB que lo mantiene inactivo. La fosforilación de I-kB y su degradación permite la liberación de NF-kB el cual se transloca al núcleo donde, luego de unirse a los promotores blanco, activa a diversos genes entre los que se incluyen citoquinas proinflamatorias (Engelmann et al. 2014). Para evaluar la participación de este factor de transcripción en la capacidad de las células astrogliales de migrar e invadir la zona del scratch, realizamos un pretratamiento de los cultivos mixtos gliales con BAY11-7082, un bloqueante de NFkB que impide la fosforilación del inhibidor I-κB, de manera que éste no se degrada y mantiene secuestrado en el citosol al factor de transcripción. Luego del pretratamiento con BAY 11-7082 y posterior scratch, observamos que a las 24 h hay una mayor superficie libre de células astrogliales respecto a los demás pretratamientos (Figuras 3.1.2 A-B), no así a las 48 y 72 h donde no hay diferencias significativas entre ellos (Figuras 3.1.2 A, C-D). Esto indicaría que NFkB se requiere al menos en el estadío inicial de la migración de las células astrogliales, aunque la dependencia de TLR aún no la determinamos.



~ 41 ~

Figura 3.1.2. Influencia del grado de reactividad inicial celular en la capacidad migratoria hacia el scratch. A) Imágenes 10X (magnificación primaria), en cultivos gliales mixtos representativas, luego de los pretratamientos con DMEM (vehículo), LPS (25 ng/ml), HMGB1 (500 ng/ml), BAY 11-7082 (10 µM). Las imágenes fueron tomadas a las 24, 48 y 72 h posteriores al scratch. Las líneas punteadas representan los bordes de scratch a tiempo cero. Barra=500 µm. Cuantificación del área libre de astrocitos luego de 24 h (B), 48 h (C), 72 h (D) del scratch. Los datos provienen de imágenes representativas de los pocillos en los que se hizo el scratch, se muestran como media ±SEM, n=3. Las diferencias fueron evaluadas a través de un ANOVA de una vía (comparación entre tratamientos a las 24 h, F= 37.12, p<0.0001; a las 48 h, F=6.655, p=0.0021, a las 72 h, F=2.549, p=0.0923) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*p<0.05; \*\*p<0.01; ns= no significativo). Los numerales indican diferencias significativas entre tratamientos, (#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001).E) Imágenes (20X) representativas del scratch a las 24 h en cultivos mixtos gliales pretratados con DMEM (control) y HMGB1 (500 ng/ml). Nótese que con HMGB1 hay prolongaciones celulares de mayor longitud que buscan invadir el scratch. Las líneas punteadas representan los bordes del scratch. Barra= 200 µm.

## 3.1.3 Influencia del calcio extracelular en la capacidad invasora astroglial hacia el scratch

*In vivo*, los astrocitos se disponen formando redes astrogliales interconectadas, a través de uniones gap, por las cuales pueden intercambiar sustancias, tales como calcio, inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y otras moléculas pequeñas. Esto le permite a las redes astrogliales *in vivo* funcionar como un sincicio funcional (Jin y Chen 2011). Recientemente se ha postulado que el calcio sería responsable de la propagación del fenotipo reactivo en astrocitos a través de las ondas de calcio (Gao *et al.* 2013). Entonces, evaluamos la participación de las uniones gap y del calcio extracelular en la capacidad de las células astrogliales para migrar e invadir la zona del *scratch*. Nuevamente el esquema experimental empleado fue el de tratamientos pre-lesión sobre cultivos gliales mixtos, con el bloqueante de las uniones gap MFA y el quelante de calcio extracelular EGTA y se evaluó a 24, 48 y 72 h el área libre de astrocitos (Figura 3.1.3).

Observamos que el pretratamiento con el EGTA produce una disminución significativa en la capacidad de las células astrogliales de migrar e invadir la zona del *scratch* luego de 24 h (Figuras 3.1.3 A-B), mientras que a las 48 h (Figuras 3.1.3 A-C) y 72 h (Figuras 3.1.3 A-D) no se observan diferencias entre los pretratamientos. En el caso del tratamiento con MFA, no se observan diferencias significativas respecto al control (Figuras 3.1.3). Concluimos que el calcio extracelular sería necesario para la migración

inicial de las células astrogliales hacia el *scratch*, las uniones gap no parecerían estar involucradas en la invasión.

![](_page_42_Figure_3.jpeg)

Figura 3.1.3. Participación del calcio extracelular en la capacidad migratoria astroglial hacia el scratch. Imágenes 10X (magnificación primaria), de cultivos gliales mixtos representativas luego de los pretratamientos con DMEM (control), EGTA ( $20 \mu$ M), y MFA ( $100 \mu$ M). Las imágenes fueron tomadas a las 24, 48 y 72 h posteriores al scratch. Las líneas punteadas representan los bordes de scratch a tiempo cero. Barra=500 µm. Cuantificación del área libre de astrocitos luego de 24 h (B), 48 h (C) y 72 h (D) del scratch. Los datos provienen de imágenes representativas de los pocillos en los que se hizo el scratch, se muestran como media  $\pm$  SEM, n=3. Las diferencias fueron evaluadas a través de un ANOVA de una vía (comparación entre tratamientos a las 24 h, F=9.913, p=0.0013; a las 48 h, F=0.5269, p=0.5993; a las 72 h, F=3.557, p=0.0612.) seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\*p<0.05, \*\*p<0.01; ns= no significativo). Los numerales representan diferencias significativas entre tratamientos, (#p<0.05, ##p<0.01).

#### 3.2 Evaluación de la propagación de la gliosis reactiva

#### 3.2.1 Análisis del perfil de expresión de GFAP astroglial luego del scratch

La astrogliosis reactiva *in vivo* está caracterizada por cambios morfológicos y bioquímicos de los astrocitos. Un aumento del volumen y complejidad celular como también en la expresión del principal filamento intermedio astroglial (GFAP), se reflejan en forma de gradiente desde el sitio de la injuria hacia la periferia. En esta serie de experimentos nos propusimos evaluar si el *scratch in vitro* produce un gradiente de gliosis reactiva detectable a través de la expresión de GFAP tal como lo describieron Gao *et al.* 2013, ya que se ha hipotetizado que los astrocitos más reactivos delimitan la posición de la cicatriz glial. Además analizamos algunas rutas de señalización candidatas para mediar esta propagación de la gliosis reactiva (Burda y Sofroniew 2014).

Teniendo en cuenta los resultados publicados por Gao *et al.* 2013, analizamos los niveles de expresión de GFAP a las 12 h posteriores al *scratch* a distintas distancias desde el borde de la lesión, de tal manera de evaluar la formación de un gradiente de astrogliosis. Para llevarlo a cabo, en cultivos mixtos gliales realizamos el *scratch*, y estudiamos a las 12 h la expresión de GFAP como intensidad de fluorescencia tal como se describe en materiales y métodos (Figuras 3.2.1).

Nuestros experimentos mostraron que la expresión de la proteína GFAP aumenta a distancias cortas desde el borde del *scratch*, hasta alcanzar un máximo aproximadamente a los 30 µm, a partir del cual hay una disminución hacia las zonas alejadas de la lesión (Figura 3.2.1 B-C). Para el análisis cuantitativo de la formación de un gradiente de expresión de GFAP, elegimos analizar tres distancias que representan un punto cercano al máximo de expresión (30 µm), un punto de distancia intermedia (60 µm) y uno alejado del *scratch* (90 µm). Al comparar los niveles de expresión se observó que hay una tendencia hacia una leve disminución en la expresión de GFAP a 60 y 90 µm del *scratch*, lo que se correspondería con un gradiente de gliosis reactiva desde el borde de la lesión (Figura 3.2.1 D).

Considerando que en los cultivos mixtos, con presencia astrocitos y microglía, ocurren interacciones entre ambos tipos celulares que podrían tener un rol en la propagación de la astrogliosis, nos pareció interesante evaluar la participación de la microglía en la generación del gradiente de propagación dela gliosis reactiva. Para ello, utilizamos el modelo de *scratch* en cultivos primarios de astrocitos, depletados de microglía, en los que analizamos la expresión de GFAP a distintas distancias desde el borde del *scratch*, de la forma antes mencionada (Figura 3.2.1 E-F).

Encontramos que, en ausencia de microglía, los niveles de expresión de GFAP aumentan desde el borde del *scratch* con un máximo alrededor de los 20 µm, a partir del cual hay una marcada caída hasta los 50 µm, y una disminución más suave hacia zonas más alejadas de la lesión (Figura 3.2.1 E). Comparando los niveles de expresión de GFAP entre las distancias evaluadas desde el *scratch*, podemos ver que hay una tendencia hacia una disminución en la expresión a medida que nos alejamos de la zona de daño, de manera que, en este caso también podemos hablar de un gradiente de astrogliosis reactiva desde el *scratch* aún en ausencia de microglía (Figura 3.2.1 F).

Cuando comparamos los patrones de expresión de GFAP entre ambos tipos de cultivos, vemos que si bien en ambos casos hay una tendencia a formar un gradiente en la expresión de GFAP, la diferencia radica en la forma en la que éste se produce, ya que por un lado, en los cultivos mixtos la caída en los niveles de GFAP es mucho más suave y sostenida hacia las zonas alejadas del *scratch* (Figuras 3.2.1 C-D), mientras que en los cultivos de astrocitos es más pronunciada desde distancias cercanas al borde de la lesión (Figura 3.2.1 E-F).

![](_page_45_Figure_2.jpeg)

**Figura 3.2.1. Perfil de expresión de GFAP luego de 12 h del scratch. A)** Imagen de magnificación primaria10X representativa de la marca de GFAP en un cultivo mixto glial, GFAP=verde, DAPI=azul, barra= 500 µm **B)** Representación en 3D de la intensidad de luminosidad de la marca de GFAP desde el borde del *scratch* (de la imagen de la Figura A) en escala de temperatura de color.

Intensidad de luminosidad de la inmunomarcación para GFAP, a distintas distancias desde el borde del *scratch*, en cultivos mixtos gliales **(C)**, y en cultivos de astrocitos **(E)**.Representación de intensidad de luminosidad de la inmunomarcación para GFAP a 30, 60 y 90 µm desde el borde del *scratch* en cultivos mixtos **(D)**, y en cultivos de astrocitos **(F)**. Los datos fueron analizados a partir de imágenes representativas de cada pocillo, se muestran como media  $\pm$ SEM, n=5 en cultivos mixtos, n=3 en cultivos de astrocitos. Las diferencias fueron evaluadas con un ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, en ambos sin diferencias significativas, (F=0.8183, p=0.4643) en los cultivos mixtos, (F=0.5771, p=0.5899) en los cultivos de astrocitos.

### 3.2.2 Participación de la microglía ante la activación de los TLR en la propagación de la astrogliosis *in vitro*

Teniendo en cuenta que en el modelo de *scratch in vitro* observamos un gradiente de astrogliosis desde el sitio de injuria, el cual mostró algunas diferencias entre cultivos mixtos (astrocitos-microglía) y cultivos astrogliales (depletados de microglía) (Figura 3.2.1); nos pareció interesante intentar comprender el papel que cumple la microglía en la propagación de la gliosis reactiva *in vitro*. Por otro lado, se evaluó la participación de la vía TLR/NFκB en la propagación de la gliosis reactiva en estas condiciones. Los cultivos mixtos gliales y de astrocitos corticales purificados fueron pretratados con moléculas activadoras de las vías de señalización de los TLR: HMGB1 y LPS. Se evaluó la astrogliosis por inmunofluorescencia contra GFAP (Figura 3.2.2).

Previamente se estableció que la presencia de la microglía generaba diferencias sutiles en el perfil de astrogliosis reactiva (Figura 3.2.1). A diferencia del control, los tratamiento con LPS o HMGB1 sobre cultivos gliales mixtos generaron un perfil de astrogliosis más abrupto (Figura 3.2.2 A). Estos mismos tratamientos, sobre cultivos enriquecidos en astrocitos no modificaron sustancialmente el perfil de astrogliosis, aunque si incrementó la fluorescencia máxima (Figura 3.2.2 B). Contrariamente a lo esperado el tratamiento con BAY 11-7082, en el cultivo glial mixto, generó sobre el perfil de astrogliosis un incremento similar a la estimulación de la vía TLR (Figura 3.2.2A, trazo rojo). Sin embargo, en ausencia de microglía el tratamiento con BAY 11-7082 limitó levemente la expresión de GFAP y no modificó la forma del perfil de expresión.

De forma similar a lo realizado en la sección anterior se eligieron tres distancias (30; 60 y 90 μm) desde el borde de la lesión para evaluar la formación del gradiente. Sobre cultivos gliales mixtos los tratamientos de estimulación como la inhibición de NFκB

generaron un gradiente con un incremento en la fluorescencia máxima de 10-20% (Figura 3.2.2 C). Por otra parte los mismos tratamientos aplicados sobre un cultivo enriquecido en astrocitos generaron un aumento de la fluorescencia máxima de 7-11%, aunque no modificaron la tendencia del control con respecto a la formación del gradiente de GFAP (Figura 3.2.2 D). Estos resultados indican que la microglía juega un papel preponderante en la señalización de la injuria y en la adquisición del fenotipo reactivo. Aún más, en presencia de la microglía se formó un gradiente de astrogliosis lo que sugiere un rol de la microglía en la señalización del posicionamiento en la formación de la cicatriz glial.

![](_page_47_Figure_3.jpeg)

Figura 3.2.2. Participación de las vías de TLR en el patrón de expresión de GFAP luego del scratch. Intensidad de luminosidad de la inmunomarcación para GFAP, a distintas distancias desde el borde del scratch luego de 12 h en cultivos mixtos gliales (A) y cultivos de astrocitos (B) sometidos a distintos pretratamientos: DMEM (vehículo); LPS (25 ng/ml), HMGB1 (500 ng/ml), BAY 11-7082 (10  $\mu$ M). Se muestra la media de la intensidad de marca de GFAP para cada valor de distancia.

Representación de la intensidad de la marca para GFAP a 30, 60 y 90 μm desde el borde del *scratch* para cada uno de los pretratamientos en cultivos mixtos **(C)** y depletados de microglía **(D)**.

Los datos fueron analizados a partir de imágenes representativas de cada pocillo, se muestran como media ±SEM, n=5(control de cultivos mixtos), n=2 (LPS y HMGB1 de cultivos mixtos) y para el resto de los pretratamientos n=3. Para determinar la formación de gradiente las diferencias en los niveles de GFAP entre

las diferentes distancias fueron evaluadas con un ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. (\*p<0.05; ns=p>0.05). **CONTROL** (cultivos mixtos: F=0.8183, p=0.4643; astrocitos: F=0.5771, p=0.5899); **LPS** (cultivos mixtos: F=16.48, p=0.0241; astrocitos: F=0.7244, p=0.5226); **HMGB1** (cultivos mixtos: F=9.413, p=0.0510; astrocitos: F=0.3388, p=0.7062); **BAY** (cultivos mixtos: F=8.729, p=0.0167; astrocitos: F=0.3961, p=0.6894).

### 3.2.3 La presencia de microglía determina la formación de un gradiente de astrogliosis independiente de la comunicación vía uniones gap

Luego de una injuria, se produce un aumento en los niveles de calcio intracelular en los astrocitos, que se propaga a través de las uniones gap que mantienen a los astrocitos formando redes astrogliales (Gao *et al.* 2013). Se ha propuesto que estas olas de calcio tendrían un rol en la propagación de la gliosis reactiva y por tal motivo podrían delimitar la región en donde se formaría la cicatriz glial. Por ello, nos propusimos evaluar la importancia del calcio extracelular y las uniones gap en la propagación de la astrogliosis en cultivos en presencia y ausencia de microglía. Al igual que en las secciones anteriores utilizamos cultivos gliales mixtos y de astrocitos corticales, los cuales fueron sometidos al esquema experimental de *tratamientos pre-lesión* con el quelante de calcio extracelular EGTA y el bloqueante de uniones gap MFA. Posteriormente, se evaluó la expresión de GFAP por inmunofluorescencia y se analizó la presencia de un gradiente de astrogliosis como se comentó en secciones precedentes.

Tanto el tratamiento con MFA como con EGTA provocaron un aumento del 30-35% en la fluorescencia máxima en cultivos gliales mixtos (Figura 3.2.3 A), mientras que sobre cultivos enriquecidos en astrocitos generaron un incremento que rondó el 15% (Figura 3.2.3 B). El bloqueo de las uniones gap y el quelado del calcio no alteró el perfil de astrogliosis observado en ausencia de microglía (Figuras 3.2.3 B; D). Mientras que cuando la microglía estuvo presente el bloqueo de las uniones gap generó un gradiente de astrogliosis muy leve, y el quelado de calcio no produjo un gradiente de gliosis significativo (Figuras 3.2.3 A; C). Nuevamente la presencia de la microglía resultó clave para la formación del gradiente de astrogliosis, mientras que el quelado de calcio y el impedimento de la comunicación entre astrocitos son responsables del incremento en la expresión de GFAP pero no así de la formación del gradiente.

![](_page_49_Figure_2.jpeg)

FIGURA 3.2.3. Participación del Calcio extracelular y las uniones gap en los perfiles de expresión de GFAP astroglial. Intensidad de luminosidad de la inmunomarcación de GFAP, a distintas distancias desde el borde del *scratch* luego de 12 h en cultivos mixtos gliales (A) y cultivos de astrocitos (B) sometidos a los siguientes pretratamientos: CONTROL, MFA (100  $\mu$ M), EGTA (20  $\mu$ M). El control fue pretratado con medio de cultivo DMEM y posterior *scratch* en cada caso. Se muestra la media de la intensidad de marca de GFAP para cada valor de distancia. Representación de la intensidad de la marca para GFAP a 30, 60 y 90  $\mu$ m desde el borde del *scratch* para cada uno de los pretratamientos en cultivos mixtos (C) y depletados de microglía (D).

Los datos fueron analizados a partir de imágenes representativas de cada pocillo, se muestran como media  $\pm$ SEM, n=5 (control mixtos), n=3 para el resto de los pretratmientos. Para determinar la formación de gradiente, las diferencias en los niveles de GFAP entre las diferentes distancias fueron evaluadas con un ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; ns=p>0.05). **CONTROL** (cultivos mixtos: F=0.8183, p=0.4643; astrocitos: F=0.5771, p=0.5899), MFA (cultivos mixtos: F=27.91, p=0.0009; astrocitos: F=1.132, p=0.3828), EGTA (cultivos mixtos: F=4.209, p=0.0721; astrocitos: F=0.9053, p=0.4533).

### 3.2.4 Participación del factor de transcripción NFKB en el la propagación de la gliosis reactiva

Para estudiar los niveles de activación de NFkB a lo largo del gradiente de gliosis reactiva *in vitro*, se expusieron cultivos gliales mixtos o enriquecidos en astrocitos a

estímulos para las vías de señalización de los TLR (LPS y HMGB1) y al bloqueante de NF $\kappa$ B, BAY 11-7082 con el esquema experimental de *tratamientos pre-lesión*. Se determinó la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B por la translocación nuclear de la subunidad p65, la cual activa la transcripción de genes proinflamatorios. Se cuantificó la activación de NF $\kappa$ B como el número de núcleos celulares que presentan p65 nuclear en función del número de núcleos totales representado en un área de 1 $\mu$ m<sup>2</sup> (Figura 3.2.4). La activación de NF $\kappa$ B fue evaluada a 10; 30 y 70 µm desde el borde del *scratch*.

Observamos que ante una lesión la presencia de la microglía no influye en forma apreciable sobre la proporción de núcleos con NF $\kappa$ B activo. Pero si se encontraron diferencias entre ambos tipos de cultivos en la zona de máxima activación de NF $\kappa$ B, siendo cercana al borde del scratch en los cultivos de astrocitos, y más alejada en presencia de microglía. Aun así, no se detectó la formación de un gradiente significativo en la activación del factor de transcripción (Figura 3.2.4 B).

Cuando se estimuló la vía TLR con LPS en cultivos mixtos conteniendo microglía, la activación de NFκB resultó aumentada, mientras que en los cultivos de astrocitos, se mantuvo constante en bajos niveles (Figura 3.2.4 C). En el caso del pretratamiento con HMGB1, en los cultivos mixtos, la activación de NFκB, ocurre en la zona cercana al *scratch*, y luego disminuye (Figura 3.2.4 D). En cambio, los astrocitos responden con una menor activación del factor de transcripción, y no parecen mantener un gradiente en la activación del mismo (Figura 3.2.4 D). Esto sugiere una importante participación de la microglía frente a estímulos de la vía de TLR, mientras que en su ausencia los astrocitos parecen tener una menor capacidad de respuesta.

Cuando se inhibió la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo mediante el pretratamiento de BAY 11-7082 tanto en presencia y ausencia de microglía, observamos que en ambos casos hay una baja activación de NF $\kappa$ B tal como es esperable en presencia de este bloqueante químico de NF $\kappa$ B que afecta a ambos tipos celulares (Figura 3.2.4 E).

El tratamiento con el quelante de calcio EGTA en cultivos mixtos conteniendo microglía, generó un marcado aumento en la activación de NFKB en la zona cercana al *scratch*, y luego disminuyó a distancias más alejadas (Figura 3.2.4G). Este efecto sería compatible con una incapacidad de estos cultivos de propagar la gliosis reactiva a

mayores distancias (Figuras 3.2.4 C, F). Por otro lado, en ausencia de microglía, se vio que prácticamente no hay activación de NFκB (Figura 3.2.4 G).

El bloqueo de uniones tipo gap con MFA, en cultivos mixtos conteniendo microglía parece anular los gradientes de activación de NFkB. Lo mismo ocurre en los cultivos de astrocitos depletados de microglía (Figura 3.2.4 F).

![](_page_52_Figure_2.jpeg)

Figura 3.2.4. Activación del factor de transcripción NFkB luego del scratch en presencia y ausencia de microglía. A) Imagen 10X (magnificación primaria, de un cultivo glial mixto luego de 12 hs. del scratch, al cual se le realizó una tinción para GFAP= verde, p65=rojo, DAPI= azul y se muestra la composición de las tres imágenes (merge), barra=500 μm. Nótese la localización nuclear de la subunidad p65 de NFκB en las cercanías del scratch, por la coloración rosada de los núcleos celulares, lo cual indica la activación de este factor de transcripción. Proporción de los núcleos celulares p65 con localización nuclear (p65+), en función de los núcleos totales a distancias de 10, 40 y 70 µm del scratch representados en un área de  $1\mu m^2$ , en cultivos mixtos y de astrocitos, sometidos al scratch y pretratados con DMEM (B), LPS (25 ng/ml) (C), HMGB1 (500 ng/ml)(D), BAY 11-7082 (10 μM) (E), MFA (100μM) (F), EGTA (20μM) (G). Los datos fueron analizados a partir de imágenes representativas de cada pocillo, se muestran como media ±SEM, n=3.Para determinar las diferencias entre los niveles de activación de NFkB entre las diferentes distancias, fueron evaluadas con un ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001; ns=p>0.05).**CONTROL** (mixtos: F=0.4252, p=0.6719; astrocitos: F=0.6494, p=0.5555); LPS (mixtos: F=3.842, p=0.1488; astrocitos: F=0.2949, p=0.7641); HMGB1 (mixtos: F=7.505, p=0.0680; astrocitos:

F=0.8869, p=0.4598); **BAY** (mixtos: F=1.043, p=0.4086; astrocitos: F=0.3724, p=0.7040); **MFA** (mixtos: F=0.1237, p=0.8858; astrocitos: F=0.1151, p=0.8932); **EGTA** (mixtos: F=2.905, 0.1311; astros: F=0.1840, p=0.8365).

#### 3.3 Evaluación de formación de la cicatriz glial

### 3.3.1 El daño celular producido a partir del *scratch* genera la polarización de los procesos astrogliales hacia la zona de la lesión

La astrogliosis se desencadena como una respuesta genérica a la injuria en el SNC donde, a partir de la zona lesionada, se produce un gradiente de reactividad astroglial. Si la lesión es lo suficientemente intensa, ocurre la formación de una cicatriz glial que delimita la región dañada (Sofroniew 2009). La participación astroglial resulta clave en el complejo proceso de formación de la cicatriz glial, ya que los astrocitos reactivos orientan sus prolongaciones de manera tal de bordear la lesión y así formar una barrera física frente al daño (Wanner *et al.* 2013).

Para intentar comprender aún más este proceso, se analizó la orientación de las prolongaciones astrogliales a fin de determinar si ocurre la formación de esta barrera ante una situación de daño inducida por *scratch in vitro*. Además, en este proceso, no solo están involucrados los astrocitos, sino que también otros tipos celulares podrían estar participando (Sofroniew 2015). Entonces se realizó el estudio en cultivo neuro-gliales hipocampales de 17-18 días *in vitro* (DIV), los cuales contienen distintos tipos celulares, tales como astrocitos, microglía, neuronas, e incluso células NG2 progenitoras de

oligodendrocitos, un ambiente mucho más complejo en cuanto a interacciones celulares, pero más cercano a la situación *in vivo*, respecto a los cultivos gliales mixtos corticales con los que veníamos trabajando. En estos cultivos neuro-gliales hipocampales, se evaluó la orientación de los procesos astrogliales desde el borde del *scratch* hasta una distancia de 200 µm, a las 12 y 24 h después de la lesión (Figura 3.3.1).

Para determinar la orientación de cada uno de los procesos, se midieron los ángulos de los mismos respecto al borde del *scratch* (ver materiales y métodos). Cabe aclarar que se definieron la orientación paralela al borde del *scratch* cuando los procesos presentan ángulos comprendidos entre 0–30 grados; perpendicular al *scratch* cuando contienen ángulos entre 60–90 grados, mientras que cuando los procesos presentan ángulos se consideraron con orientación indefinida.

Se observó que, a las 12 h, una gran proporción de los procesos astrogliales que presentes a una distancia de hasta 100  $\mu$ m del borde del *scratch*, mostraron una orientación perpendicular al mismo (Figuras 3.3.1 A-C). A su vez, la orientación perpendicular en los procesos más cercanos al *scratch*, también ocurrió en forma significativa a las 24 h, respecto a los procesos más alejados (Figuras 3.3.1 A-C). Este efecto sería independiente de la longitud de los procesos astrogliales (Figura 3.3.1 B). Por otro lado, para aquellos procesos que se encontraron a una distancia de entre 100 y 200  $\mu$ m del *scratch* se observó una gran variabilidad en los ángulos medidos tanto a las 12 como a las 24 h. Esto indica que no hay una orientación definida de los procesos hacia el *scratch* a una distancia superior a los 100  $\mu$ m, independientemente de la longitud que presenten (Figuras 3.3.1 A-C).

Estos resultados mostraron que los procesos de los astrocitos más próximos al *scratch*, a las 12 h, tienden a orientarse en forma perpendicular al borde del mismo, lo cual también ocurre en forma más pronunciada a las 24 h del *scratch* (Figuras 3.3.1 A-C). Por lo tanto, para los próximos análisis se evaluaron solo los procesos más cercanos al *scratch*.

![](_page_55_Figure_2.jpeg)

Figura 3.3.1. Orientación de los procesos astrogliales a 12 y 24 h luego del *scratch.* A) Imágenes (20X) representativas de un cultivo mixto neuro-glial hipocampal a las 12 y 24 h posteriores al *scratch.* Tinción para GFAP en verde. Barra= 200  $\mu$ m. La estrella indica la zona del *scratch.* B) Representación de la orientación de los procesos astrogliales (ángulos) hacia el *scratch*, en función de la longitud. Datos extraídos de una imagen representativa a las 12 h (izquierda) y 24 h (derecha) del *scratch*, los puntos se corresponden con procesos individuales a 100  $\mu$ m (negros) y hasta 200  $\mu$ m (rojos) desde el borde del *scratch.* C) Representación del número de procesos más cercanos al *scratch* (barras negras a 100  $\mu$ m) y alejados (hasta 200  $\mu$ m, barras rojas) con determinada orientación a las 12 h (izquierda) y 24 h (derecha) del *scratch.* Se muestra la media ±SEM, n=5 (12 h), y n=10 (24 h). Las diferencias entre la orientación de procesos cercanos y

alejados del *scratch*, fueron determinadas mediante un ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, en el caso de 12 h, ANOVA F= 0.4237, p=0.8299 (no significativo); en el caso de 24 h, ANOVA F= 14.04, p<0.0001. (\*p< 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

### 3.3.2 El tratamiento con LPS produce una reorientación de los procesos astrogliales a las 24 h del *scratch*

Actualmente, se considera que a partir del borde de una lesión *in vivo* ocurre un gradiente de astrogliosis, donde el punto de máxima reactividad se corresponde con la zona donde se formará la cicatriz glial, en la cual los astrocitos reactivos presentan los mayores niveles de expresión de la proteína GFAP, mayor hipertrofia y complejidad de sus prolongaciones (Sofroniew 2009). Los gradientes de astrogliosis reactiva pueden ser aún más marcados, tal como observamos en los cultivos mixtos gliales, en presencia de moléculas señales de daño, HMGB1, y PAMP como LPS. Se puede pensar que estas moléculas podrían estar involucradas en el proceso de formación de la cicatriz glial *in vitro*.

Para evaluarlo, cultivos neuro-gliales hipocampales fueron sometidos al *tratamiento post-lesión* con HMGB1 y LPS. Luego de 12 y 24 h posteriores al *scratch* analizamos las orientaciones de los procesos de los astrocitos más cercanos al borde el *scratch* (100  $\mu$ m).

A solo 12 h luego del *scratch* y tratamiento con HMGB1, la mayoría de los procesos presentan una orientación perpendicular al *scratch* similar al control (Figuras 3.3.2 A-C), asimismo en el caso de LPS a las 12 h hay un aumento significativo de los procesos perpendiculares al *scratch* (Figuras 3.3.2 A-C). Este efecto se mantiene a lo largo de todo el *scratch*, ya que para ambos tratamientos, entre un 70 y 80% de la superficie del borde del *scratch* se encuentra cubierta por procesos perpendiculares al mismo (Figuras 3.3.2 D-E). Este comportamiento parece ser independiente de la longitud de los procesos astrogliales para ambos tratamientos (Figura 3.3.2 B). Luego de 24 h, con HMGB1 se ve incrementado el mismo efecto anterior, ya que la mayor parte de los procesos son perpendiculares al *scratch*, en forma similar al control (Figuras 3.3.2 A-C). Aun así, igualmente solo la mitad de la superficie del borde del *scratch* está cubierta por procesos

perpendiculares, mientras que la otra parte está ocupada por procesos paralelos al *scratch* (Figura 3.3.2 E).

En el caso particular de LPS, mientras que a 12 h, los procesos se observan perpendiculares al borde del *scratch*, por otro lado, a las 24 h, sorpresivamente hay una cantidad significativa de procesos con orientación paralela al *scratch*, en detrimento de los procesos perpendiculares, los cuales se encuentran en una cantidad significativamente menor que en el control (Figuras 3.3.2 A-C). Esto se observa a lo largo de toda la superficie del *scratch*, ya que a las 24 h, alrededor de un 80% de la superficie está cubierta por procesos paralelos al *scratch* (Figura 3.3.2 D). Así, el agregado de LPS generaría una reorientación de los procesos astrogliales, desde casi la totalidad de los procesos perpendiculares a las 12 h, hasta procesos en capas paralelas al borde del *scratch* a las 24 h, lo cual podría llegar a tratarse de la formación de una estructura semejante a una cicatriz glial (Figura 3.3.2 D).

![](_page_58_Figure_2.jpeg)

![](_page_59_Figure_2.jpeg)

Figura 3.3.2. Orientación de los procesos astrogliales luego del scratch y tratamientos con LPS y HMGB1. A) Imágenes (20X) representativas del scratch en cultivos mixtos hipocampales con distintos tratamientos: medio de cultivo DMEM (control), LPS (25 ng/ml), HMGB1 (500 ng/ml), a las 12 y 24 h. Tinción para GFAP en verde. Barra= 200 µm. B) Representación de la orientación de los procesos astrogliales (ángulos) hacia el scratch, en función de la longitud. Datos extraídos de una imagen representativa a las 12 h (izquierda) y 24 h (derecha) del scratch para cada tratamiento, los puntos se corresponden con procesos individuales a 100 µm del scratch. C) Representación del número de procesos con determinada orientación a las 12 h (izquierda) y 24 h (derecha) del scratch para cada uno de los tratamientos. Se muestra la media  $\pm$ SEM, n=5 (12 h), v n=10 (24 h). Las diferencias en la orientación de los procesos entre tratamientos fueron evaluadas mediante un ANOVA de dos vías seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, en el caso de 12 h, ANOVA F=6.178, p=0.0033; en el caso de 24 h, ANOVA F=23.51, p<0.0001 (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). Composición del borde del scratch con imágenes (20X), para los tratamientos: LPS (25 ng/ml) (D) y HMGB1 (500 ng/ml) (E) luego de 12 h (izquierda) y 24 h (derecha). Barra= 200 μm. Las estrellas indican la zona del scratch.

# **DISCUSIÓN**

La inmunidad innata puede ser activada por la liberación de DAMP al medio extracelular, los cuales son capaces de activar a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Kigerl *et al.* 2014). Las células gliales, microglía y astrocitos, forman parte del sistema inmune innato en el SNC, por lo tanto, frente a una situación de daño, son las principales encargadas de llevar a cabo la respuesta inflamatoria (Ransohoff y Brown 2012). Aún hoy, resta comprender eventos clave del proceso de inflamación en el SNC y su regulación. Este conocimiento es clave para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que logren, un equilibrio entre la eliminación del debris necrótico mediado por las células inflamatorias, y a su vez restringir la expansión de la inflamación citotóxica para preservar al tejido sano. Por lo tanto, resulta de gran importancia estudiar los mecanismos celulares y moleculares que controlan la inflamación en el SNC.

Luego de una injuria en el SNC se produce un gradiente continuo de astrogliosis que se extiende desde el foco o core de la lesión hacia el tejido sano. La astrogliosis involucra cambios complejos en los astrocitos reactivos tales como sobreexpresión de la proteína GFAP y consecuentes rearreglos en el citoesqueleto, hipertrofia y solapamiento en los procesos astrogliales, lo que finalmente permite la formación de la cicatriz glial que limita la zona dañada (Wanner et al. 2013). Actualmente, se continúa tratando de entender de qué manera ciertas moléculas solubles, tales como DAMP, liberadas desde el core necrótico de un sitio de lesión focal en el SNC son capaces de inducir la activación astroglial en la penumbra isquémica propagando la inflamación a zonas más distales del cerebro (Burda y Sofroniew 2014). Estudios previos de nuestro laboratorio, utilizando modelos matemáticos a partir de cerebros con lesiones isquémicas y cultivos in vitro tridimensionales, muestran que la simple difusión de DAMP no sería capaz de generar el gradiente de gliosis reactiva observado luego de lesiones focales (Auzmendi et al. 2015, Mannava et al. 2015). Esto se corresponde con las hipótesis actuales que muestran a la astrogliosis como un proceso mucho más complejo dependiente de múltiples vías de señalización e interacciones celulares (Sofroniew 2015).

Diferentes estudios, incluyendo los de nuestro laboratorio, han mostrado la importancia de los receptores de la inmunidad innata (PRR) en el reconocimiento de DAMP para producir la activación glial frente a la injuria en el SNC (Ransohoff y Brown 2012, Villarreal *et al.* 2014). Entre los PRR mas estudiados se encuentra la familia de los receptores tipo Toll (TLR), los cuales luego de reconocer PAMP o DAMP, pueden iniciar

una cascada de eventos intracelulares que llevan a la producción de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias de manera dependiente del factor de transcripción NFkB (Kaisho y Akira 2006, Engelmann *et al.* 2014). La injuria en el SNC induce un aumento en la expresión de los TLR y de sus efectores, lo que genera una mayor liberación de mediadores proinflamatorios (Kigerl *et al.* 2007). A su vez, la expresión de los receptores TLR2-4 se vio aumentada en astrocitos que forman la cicatriz glial *in vitro* (Mannava *et al.* 2015).

Los DAMP en condiciones fisiológicas se encuentran en el interior celular, pero ante la injuria las células dañadas los liberan al medio extracelular y funcionan como señales de alarma que pueden activar a los TLR. Entre ellos, podemos destacar a HMGB1, una molécula de unión al ADN, que en condiciones patológicas, puede activar a los receptores TLR2-4 (Leifer y Medvedev 2016) al ser liberada desde células necróticas o células estimuladas como astrocitos reactivos, células endoteliales y microglía activada (Hayakawa et al. 2012). A su vez, pacientes con isquemia cerebral presentan niveles elevados de HMGB1 en el suero hasta 7 días luego del episodio isquémico (Nakahara et al. 2009). Se ha demostrado este mismo aumento en otras situaciones patológicas donde existen lesiones en el SNC, tanto en modelos experimentales en diferentes especies como en humanos (Qiu et al. 2008, Huang et al. 2013, Laird et al. 2014, Kang et al. 2014). Además, se ha encontrado que HMGB1 contribuye en un aumento de la gliosis reactiva luego de la injuria (Murakami et al. 2011) y en la liberación de moléculas que promueven la expansión del daño como la metaloproteasa MMP-9 desde astrocitos y neuronas vía TLR4 (Qiu et al. 2010). Todos estos motivos convierten a HMGB1 en una molécula de interés en la modulación de este proceso de gliosis reactiva en el SNC (Kang et al. 2014).

Frente a la complejidad del fenómeno de la propagación de la astrogliosis, y la suposición de que existiría cierta redundancia en el proceso para asegurar su generalidad frente a diferentes noxas en el SNC, se comenzaron a estudiar otros mecanismos que podrían estar involucrados. Por un lado, las vías de señalización mediadas por calcio, ya que cumplen un papel importante en la fisiología y patofisiología de los astrocitos (Cheng *et al.* 2006). Además, la implicancia de las uniones gap astrogliales, debido a que a través de ellas, los astrocitos se encuentran conectados en redes formando un sincicio funcional (Jin y Chen 2011). Inicialmente, se han encontrado ondas de calcio en los astrocitos (Cornell-Bell *et al.* 1990), involucradas no solo en la comunicación entre células

astrogliales, sino también entre astrocitos y neuronas (Fields 2008). A su vez, un estudio en un modelo de injuria cerebral traumática inducida por explosión (bTBI, por Blastinduced Traumatic Brain Injury) en cultivos mixtos de neuronas y astrocitos corticales humanos, demostró que en respuesta a la explosión simulada se propagan ondas de elevado calcio intracelular a través de los astrocitos. Estas ondas de calcio son dependientes de vías de señalización purinérgica debido al ATP liberado desde las células frente a la injuria traumática (Ravin et al. 2016). A su vez los astrocitos sometidos a lesión traumática presentan alteraciones en su morfología características del fenotipo reactivo y elevados niveles de expresión de marcadores de reactividad como GFAP y la metaloproteasa MMP-9 (Ravin et al. 2016). En otro modelo de injuria traumática inducida por scratch en cultivos de astrocitos, se observó que el scratch induce la entrada de calcio desde el medio extracelular, y la formación de olas de calcio intercelulares (Gao et al. 2013). Estas olas de calcio se diseminan entre los astrocitos vecinos a través de uniones gap mediante la difusión de inositol-1, 4,5-trifofato (IP<sub>3</sub>) (Ravin et al. 2016). Además, se propuso que la señalización de calcio podría estar relacionada con el aumento de la expresión de los niveles de GFAP de los astrocitos luego del scratch (Gao et al. 2013).

Teniendo en cuenta la implicancia de la señalización inducida por DAMP/PAMP mediada por los receptores tipo Toll y su efector NFkB en la respuesta glial frente a la injuria, como así también la importancia de la señalización del calcio y las uniones gap astrogliales, en esta tesis se evaluó la participación de estos mecanismos en la propagación de la astrogliosis reactiva y formación de la cicatriz glial. Se realizó un abordaje *in vitro*, utilizando el modelo de *scratch* en cultivos gliales y neuro-gliales, para analizar posibles funciones e interacciones celulares involucradas en este proceso.

#### 4.1 Participación de diferentes vías de señalización en la respuesta astroglial frente a la injuria *in vitro*

Para evaluar la respuesta astroglial ante una situación de daño y las posibles vías de señalización involucradas, se utilizó el modelo de injuria *in vitro* por *scratch*. En este modelo, las células son dañadas por una lesión traumática artificial que produce muerte celular y liberación de DAMP, lo cual lleva en el caso de astrocitos a una sobreexpresión de GFAP, hipertrofia, proliferación, y migración celular hacia la zona dañada, (Yu *et al.* 

~ 64 ~

1993, Ghirnikar *et al.* 1994, Kornyei *et al.* 2000, Lanosa y Colombo, 2007). Así este modelo relativamente simple, reproduce muchas de las características claves en la activación astroglial *in vivo* (Sofroniew 2009).

Los resultados por microscopía en vivo mostraron que luego de la lesión por *scratch*, los astrocitos tienden a reocupar la zona lesionada. Se conoce que la invasión astroglial hacia la zona de la lesión requiere de una polarización de la maquinaria intracelular que depende de las proteínas G pequeñas Rac1 y Cdc42, que permiten la orientación celular y la protrusión de largos procesos hacia el *scratch* (Etienne-Manneville 2008, Villarreal *et al.* 2014). Además, se ha demostrado que el tratamiento con un inhibidor mitótico 5-FU en un cultivo de astrocitos primarios sometidos a *scratch*, no bloquea la invasión astroglial hacia el área dañada (Villarreal *et al.* 2014). Esto indica que la proliferación de los astrocitos no estaría implicada en la invasión hacia el *scratch*, mientras que si lo estaría la migración polarizada hacia esa zona mediante la señalización vía Rac1-Cdc42.

En cuanto a la dinámica temporal de invasión astroglial hacia el scratch se distinguieron un temprano aumento a las 24 h, y otro más tardío recién a partir de las 48 h. Mientras que entre las 24 y 48 h prácticamente no hubo migración hacia la zona de daño. Esto se puede correlacionar con que a las 48 h post-lesión, se les realizó un cambio de medio a los cultivos gliales mixtos, por DMEM completo fresco, el cual contiene suplementos de suero fetal bovino 10%. Se ha observado que factores solubles como quemoquinas o factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, del inglés *Fibroblast Growth Factor*), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermal Growth Factor*), favorecen la migración de los astrocitos hacia la zona de daño (Faber-Elman *et al.* 1996). Esto sugiere que factores de crecimiento presentes en el suero pueden estar involucrados en la migración astroglial.

Luego, se evaluó cómo influye el grado de reactividad inicial de los astrocitos, mediado por la señalización a través de los receptores TLR, en la respuesta ante la injuria. Encontramos que el tratamiento con LPS no produjo cambios en la invasión astroglial hacia el *scratch*. El estímulo con HMGB1 generó en los astrocitos una rápida capacidad migratoria hacia la zona lesionada a las 24 h, pero a tiempos posteriores no ocurrió una mayor invasión. Además, con este tratamiento se observó una mayor longitud

en las prolongaciones astrogliales orientadas hacia el scratch. En relación a esto, en otros trabajos, se ha demostrado que HMGB1 promueve el crecimiento invasivo y la metástasis de muchos tipos de tumores (Chung *et al.* 2009), entre ellos los gliomas (Bassi *et al.* 2008; Angelopoulou *et al.* 2016). En ensayos *in vitro*, se ha encontrado que HMGB1 genera un aumento significativo de la movilidad celular y migración utilizando el modelo de *scratch* en cultivos celulares de glioblastomas (Bassi *et al.* 2008). Además, se observó que la supresión de la expresión de HMGB1 mediante un ARN de interferencia, reduce la migración de las células derivadas de gliomas, tanto en ensayos utilizando *transwells* o realizando un *scratch* en el cultivo (Zhang *et al.* 2014, Yang *et al.* 2015). Si bien HMGB1 ha sido relacionada con el aumento de la proliferación celular (Sun *et al.* 2013), aun así el potencial migratorio de las células derivadas de gliomas mediado por HMGB1, no se ha visto influenciado por el tratamiento con agentes anti-mitóticos (Bassi *et al.* 2008), de manera que ambos serían eventos independientes.

Para comprobar si el factor de transcripción NFkB se encuentra implicado en tal efecto de favorecer la migración astroglial, se bloqueó su activación mediante el agregado de BAY 11-7082. En este caso, la capacidad astroglial de invadir el scratch se vio afectada en las primeras 24 h, lo que podría relacionar a NFkB con la capacidad invasora de las células gliales. En base a la evidencia de HMGB1 activa la ruta TLR/NFkB, es probable que la facilitación de la invasión por HMGB1 sea también dependiente de NFkB, aunque ello no fue evaluado en este trabajo. En relación a esto, hay muchos reportes que muestran la participación de HMGB1 en la capacidad invasiva de células de gliomas mediante la interacción con varias familias de receptores de la inmunidad innata, los cuales comparten como efector al factor de transcripción NFkB (Bassi et al. 2008, Chen et al. 2014, Deng et al. 2014). Por un lado, HMGB1 a través de los receptores TLR2-4 genera la liberación de metaloproteasas de la matriz que aumentan la adhesión celular (Vinnakota et al. 2013). A su vez, la interacción de HMGB1 con los receptores RAGE y la activación de las vías de señalización de las Rho GTPasas promueven la migración celular (Bassi et al. 2008, Angelopoulou et al. 2016). Sin embargo, como comentamos antes, no podemos en este trabajo establecer una acción directa de HMGB1 mediante la vía HMGB1-TLR2/4-NFkB para promover la invasión astroglial hacia el scratch observada, sino que para determinarla son necesarios futuros experimentos planeados con ratones TLR2<sup>-/-</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>.

Se evaluó la participación del calcio extracelular en la respuesta de los astrocitos frente a la injuria, teniendo en cuenta su posible papel en la conversión hacia el fenotipo reactivo. Se encontró que el calcio extracelular sería necesario para que los astrocitos puedan invadir la zona de daño. En relación con esto, se ha encontrado que los canales de potasio activados por calcio de conductancia intermedia (KCa3.1) contribuyen a la migración mediada por Calcio de células dendríticas humanas, células T y microglía (Chimote et al. 2013, Ferreira et al. 2014). Recientemente, se ha demostrado que estos canales KCa3.1 expresados en astrocitos corticales contribuyen en la migración astroglial en respuesta a la injuria inducida por scratch. En este trabajo observaron que la migración astroglial luego del scratch es dependiente del aumento del calcio intracelular, proveniente del medio extracelular, y el efecto se pierde en astrocitos que no expresan KCa3.1. Además, encontraron que el bloqueo de estos canales, genera luego del scratch una menor fosforilación de las proteínas JNK y c-Jun (Yi et al. 2016) lo que se relaciona con menores niveles de expresión de GFAP astroglial (Gao et al. 2013). A su vez, en un modelo in vivo de isquemia cortical en ratones KCa3.1<sup>-/-</sup> demostraron que la deleción de estos canales reduce la expresión de GFAP en los astrocitos (Yi et al. 2016). Esto demuestra la importancia de estos canales y del calcio en la reactividad astroglial y en la movilización de los astrocitos en respuesta al daño. Otro trabajo remarcó la importancia de la entrada de calcio desde el medio extracelular en respuesta al estrés mecánico inducido por scratch en astrocitos aislados de retina. En esta publicación encontraron que el calcio ingresa luego de la injuria a través de los canales iónicos TRPV1, lo cual contribuye a rearreglos del citoesqueleto mediado por el calcio y aumento de la migración astroglial hacia la zona de daño (Ho et al. 2014). En conjunto estos trabajos demuestran la implicancia del calcio en los astrocitos para responder ante la injuria por scratch y probablemente en la conversión al fenotipo astroglial reactivo.

Por otro lado, se evaluó si las redes de astrocitos conectados a través de uniones gap por donde se propagan las olas de calcio, influyen en la capacidad astroglial de invadir la zona dañada. Se encontró que el bloqueo de las uniones gap no produjo cambios en la respuesta astroglial frente al *scratch*, lo que sugiere que, en las condiciones de nuestro experimento, este tipo de uniones no participaría en la capacidad de los astrocitos de invadir la zona de daño. Estudios de perdida de función adicionales serían necesarios para descartar completamente las uniones gap en este proceso de migración

al *scratch*. En cambio, se ha visto que las uniones adherentes serían importantes en el proceso de migración astroglial hacia el *scratch*. Un estudio mostró que ante una situación de injuria ocurre una liberación de calcio desde el retículo endoplasmático mediante la señalización dependiente de inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). Este aumento de calcio intracelular sería necesario para incrementar los niveles de expresión de N-cadherina, una molécula de adhesión celular transmembrana dependiente de calcio. El aumento de N-cadherina en la membrana celular astroglial los autores lo relacionaron con el proceso de astrogliosis reactiva y neuroprotección luego de la injuria por *scratch* (Kanemaru *et al.* 2013). Otro trabajo encontró que los contactos celulares mediados por N-cadherina serían los que controlan la velocidad y polaridad celular durante la migración astroglial. Las células derivadas de glioblastoma presentan bajos niveles de esta molécula por lo que al carecer de adhesiones focales, la migración es mucho más rápida y sin una orientación definida (Camand *et al.* 2012).

Nuestros resultados mostraron que a las 72 h los astrocitos sometidos a todos los tratamientos lograron recubrir la zona del scratch casi en su totalidad. Especulamos que los astrocitos migrantes se detienen al alcanzar las prolongaciones de sus congéneres que migran desde el otro borde del scratch, en un típico efecto de inhibición por contacto. Esto se corresponde con un concepto relacionado a la migración celular colectiva denominado inhibición de la locomoción por contacto. Este es el proceso por el cual una célula cambia la dirección de su migración tras el contacto con otra, debido a que la protuberancia que hace el contacto celular inhibe su migración, se produce una nueva más lejos del contacto. Hay moléculas de superficie celular que interactúan en el sitio de contacto célula-célula tales como N-cadherinas, miembros de la vía de WNT11, efrinas, entre otras, y por último, se llega a la activación de RhoA y la inhibición de Rac1 en el contacto celular. Esto se traduce en desestabilización de microtúbulos, desmontaje de las adhesiones focales, y la contractilidad actinomiosina en el contacto, provocando el colapso de las protrusiones. En el extremo opuesto de la célula, la activación de Rac1 conduce a la polimerización de microtúbulos, microfilamentos y estabilización de las adhesiones focales, con la consiguiente formación de las nuevas protuberancias (Mayor et al. 2016).

Cabe aclarar en estos experimentos solo fue considerada la migración astroglial en respuesta a la injuria por *scratch*, si bien la microglía también estaba presente en el cultivo. Para evaluar la participación de la misma en tal proceso y las dinámicas temporales de invasión y de respuesta entre ambos tipos celulares se planean futuros experimentos. Los mismos serán realizados utilizando cultivos de ratas Wistar-GFP tanto de microglía como de astrocitos purificados, para hacer un seguimiento en microscopía en vivo de la invasión hacia el *scratch*.

## 4.2 Evaluación de diferentes vías de señalización posiblemente involucradas en la propagación de la gliosis reactiva

### 4.2.1 Análisis de propagación de la gliosis en el modelo de injuria *in vitro* por scratch

Luego de una injuria, los astrocitos sufren cambios en su expresión génica, morfológicos, bioquímicos, que los llevan a adquirir un fenotipo reactivo caracterizado principalmente por sobreexpresión de la proteína GFAP. Pero en estudios in vivo se ha observado que la reactividad astroglial va disminuyendo en forma de gradiente a medida que los astrocitos se alejan del sitio de la injuria (Sofroniew y Vinter 2010, Burda y Sofroniew 2014). Actualmente, se considera que el punto máximo de astrogliosis reactiva se corresponde con aquellos astrocitos cercanos al borde de la lesión, los cuales presentan los mayores niveles de expresión de GFAP. Estos astrocitos de fenotipo más reactivo serían los encargados de delimitar la zona donde formaran la cicatriz glial (Sofroniew 2009, Burda y Sofroniew 2014). De ahí, la importancia de reproducir un gradiente de astrogliosis luego de una lesión en un modelo in vitro, así poder estudiar posibles mecanismos moduladores de la propagación de la gliosis reactiva y de la formación de la cicatriz glial in vitro. En el modelo de scratch se pudo observar una tendencia hacia un gradiente de gliosis reactiva desde el borde de la lesión artificial, a través de la expresión de la proteína GFAP astroglial. De manera que, a pesar de las limitaciones, resultó ser un modelo útil para estudiar la propagación de la gliosis reactiva in vitro tanto en cultivos gliales mixtos como en cultivos enriguecidos en astrocitos.

### 4.2.2 Participación de la vía de los receptores TLR y la interacción astrocitosmicroglía en la propagación de la astrogliosis reactiva

Dado que se ha demostrado que los receptores de la inmunidad innata, tales como la familia de receptores RAGE y TLR, participan en la propagación de la gliosis reactiva (Villarreal et al. 2014), se evaluó la implicancia en este proceso de las vías mediadas por la activación de los receptores TLR. En cultivos gliales mixtos lesionados por scratch, los tratamientos con LPS y HMGB1 generaron un perfil de astrogliosis con un marcado gradiente de GFAP desde el borde de la lesión, mostrando la posible implicancia de los receptores TLR en la propagación de la gliosis. En contraposición, la estimulación de estas vías con LPS y HMGB1 en cultivos de astrocitos, no modificó el perfil de astrogliosis observado en la condición control. Esto demuestra que hay una respuesta diferencial entre ambos cultivos, donde la presencia de microglía resulta necesaria para lograr un aradiente de astrogliosis mucho más marcado luego de la estimulación de las vías de los receptores TLR. Hay muchos trabajos que documentan sobre la capacidad de la microglía en responder rápidamente frente a una situación de daño, mediante la estimulación de los receptores de la inmunidad innata. Luego, interaccionan con los astrocitos a través de la liberación de citoquinas proinflamatorias tal como TNF-α, promoviendo la conversión al fenotipo astroglial reactivo frente a una situación de injuria (Zhang et al. 2010, Chen et al. 2015). Esto sugiere que los astrocitos no tendrían la plena capacidad de reconocer directamente los estímulos de la inmunidad innata, haciendo su respuesta más retardada ya que dependerían del ambiente proinflamatorio generado por la microglía luego de una situación de daño (Gao et al. 2013). En este contexto, varios trabajos han demostrado que la inhibición de la activación de la microglía, genera menores niveles de astrogliosis. En un modelo isquemia cerebral en ratas, la astrogliosis inducida por hipoxia-isquemia se vio reducida, luego de la administración de minociclina, un inhibidor selectivo de la activación de la microglía (Leonardo et al. 2008). En un modelo de injuria de médula espinal en ratas, el inhibidor del ciclo celular olomoucina, el cual suprime significativamente la proliferación microglial, generó una marcada reducción en la expresión de GFAP astroglial. Además debido a una disminución de la proliferación astroglial también se vio atenuada la formación de la cicatriz glial (Tian et al. 2007). Estos trabajos destacan un papel preponderante de la microglía en la astrogliosis sugiriendo una posible modulación terapéutica sobre la microglía para frenar la propagación de la gliosis reactiva luego de una injuria en el SNC.

En contexto, todos los estos resultados indicaron que la presencia de microglía resultó importante en la propagación de la gliosis reactiva.

### 4.2.3 Participación del Calcio extracelular y las uniones gap astrogliales en la astrogliosis

Como se comentó en secciones precedentes, los astrocitos se encuentran organizados formando un sincicio funcional, a través de uniones gap que permiten la comunicación intercelular. El bloqueo de las uniones gap con MFA, en el modelo de *scratch in vitro* mantuvo un gradiente de gliosis reactiva solo en cultivos en presencia de microglía. De manera que esto nuevamente indica que el bloqueo de la comunicación intercelular entre astrocitos obliga a que la propagación de la gliosis reactiva dependa de la interacción con la microglía (Zhang *et al.* 2010, Gao *et al.* 2013).

El tratamiento con el quelante del calcio extracelular EGTA generó una atenuación del gradiente de astrogliosis en presencia y ausencia de microglía, de tal forma que el gradiente resultó estadísticamente no significativo. Existen evidencias de que la presencia de calcio extracelular es necesaria para la propagación de la gliosis reactiva (Gao *et al.* 2013). Recientemente se publicó un trabajo que muestra que en condiciones proinflamatorias la microglía activada puede aumentar los niveles de calcio intracelular liberado desde compartimientos intracelulares. A su vez, en estas mismas condiciones también libera ATP desde canales de Panexina-1 (Panx-1) pero no a través de canales de conexinas (Orellana *et al.* 2013). El ATP liberado puede incluso generar una retroalimentación positiva con más aumento de calcio intracelular tanto en la microglía como en astrocitos (Ravin *et al.* 2016). En el caso de los cultivos de astrocitos, también se conoce que además de las olas de calcio propagadas mediante uniones gap, pueden aumentar los niveles de calcio intracelular luego de la injuria a través de receptores de ATP extracelular (Ravin *et al.* 2016).

#### 4.2.4 La participación de NFKB en la propagación de la astrogliosis

El factor de transcripción NFkB, es el efector de varias vías de señalización de receptores de la inmunidad innata, tales como TLR, RAGE. Luego de su activación y

translocación al núcleo NFκB genera la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias (Engelmann *et al.* 2014). Muchas de estas vías de señalización se han visto involucradas en la propagación de la gliosis reactiva, por lo que se evaluó la participación de este factor de transcripción en este proceso luego de la injuria *in vitro*.

En los cultivos mixtos se encontró un pico de activación de NFĸB a distancias más alejadas del borde del scratch, mientras que en los cultivos de astrocitos la mayor activación se encuentra cercana al borde de la lesión. Esto puede indicar que en los cultivos en presencia de microglía hay una propagación de la activación de NFĸB mucho más rápida y a las 12 h el máximo ya se encuentra a los 40 µm del scratch. Seguramente mucha de esa activación de NFĸB se corresponda con células microgliales, que a diferencia de los astrocitos, responden fácilmente a estímulos de la inmunidad innata (Zhang *et al.* 2010). Mientras que, en los cultivos astrogliales en ese mismo tiempo, la activación de NFĸB permanece en el borde de la lesión, tal vez porque en esa misma ventana temporal se encuentra más retrasada que en los cultivos mixtos o la activación solo se restringe a los astrocitos del borde. Esto es concordante con que los astrocitos responden mejor a la estimulación vía TLR en presencia de microglía que cuando se encuentran en cultivos purificados (Holm *et al.* 2012).

El estímulo de las vías de señalización de TLR4 con LPS generó un aumento en la activación de NFkB que se vio mucho más marcado en los cultivos mixtos, que en los cultivos de astrocitos. Esto es lógico teniendo en cuenta los menores niveles de expresión de TLR4 astrogliales en comparación con la microglía, y por lo tanto la menor respuesta frente al estímulo con LPS en ausencia de microglía (Holm *et al.* 2012). No se observó el mismo efecto con el estímulo con HMGB1, donde se mantuvo bajo en astrocitos y restringido solo al borde del scratch en cultivos en presencia de microglía. Este resultado muestra que si bien el LPS como PAMP y HMGB1 como DAMP activarían la misma ruta de señalización, sus efectos parecen diferir en cuanto a la astrogliosis inducida.

En el caso de BAY 11-7082 un bloqueante de NFkB no se observó activación del factor de transcripción en ninguno de los dos tipos de cultivos, tal como era esperable. Mientras que el bloqueo de las uniones gap generó una leve activación de NFkB en los cultivos mixtos similar al control, en los astrocitos prácticamente no hay activación. El bloqueo del calcio extracelular por un lado en los cultivos mixtos generó una mayor
activación de NFkB en el borde del *scratch*; mientras que en los cultivos enriquecidos en astrocitos no produjo activación.

## 4.3 Formación de la cicatriz glial in vitro

La propagación de la astrogliosis reactiva que se estudió en las secciones anteriores, mostró que con los diferentes estímulos de las vías de TLR se logró generar un marcado gradiente de expresión de GFAP astroglial luego de la lesión por scratch in vitro. Aun así, con ninguno de los tratamientos y en los distintos tipos de cultivos gliales corticales utilizados se observó la formación de una estructura similar a una cicatriz glial. Teniendo en cuenta estos resultados, se utilizaron cultivos neuro-gliales hipocampales que contenían todos los tipos celulares del SNC adulto. Estos cultivos cuentan con la presencia de neuronas. astrocitos. microglía, células NG2 progenitoras de oligodendrocitos, lo que genera un ambiente de mayor complejidad en cuanto a las interacciones celulares que pueden estar involucradas en el proceso de formación de cicatriz glial, pero a la vez representa más fielmente la situación in vivo.

En el modelo de injuria por *scratch* se observó que en estos cultivos, hubo una orientación de los procesos cercanos a la lesión, en forma perpendicular al borde del scratch a las 12 y más aun a las 24 h. Esto mismo se ha visto en otros trabajos, lo cual puede estar relacionado a la migración polarizada de los astrocitos dependiente de las vías de Rac1-Cdc42 (Etienne-Manneville 2008, Villarreal *et al.* 2011). El mismo efecto se vio incrementado cuando se sobreestimularon las vías de TLR mediante el agregado de HMGB1. Esto puede estar relacionado con la capacidad invasora de HMGB1, observada en varios trabajos en diferentes tipos de gliomas no solo mediante la señalización a través de TLR2-4 sino además mediante el receptor RAGE (Hudson *et al.* 2008).

El caso más llamativo fue observado bajo el estímulo con LPS sobre los cultivos neurogliales. En este caso se produjo una reorientación de los procesos astrogliales desde perpendiculares hacia paralelos al *scratch* a las 24 h, formando una estructura similar a una cicatriz glial en el borde del *scratch*. Esta estructura no fue observada en los cultivos corticales ya sea gliales mixtos o cultivos enriquecidos en astrocitos. Por un lado, esto puede explicarse porque el estímulo con LPS en este caso fue sostenido durante 12

h hasta la fijación del cultivo, mientras que en los cultivos corticales era solo de 3 h. Por otro lado, los astrocitos hipocampales presentes en esta estructura podrían tener un comportamiento diferencial respecto a los corticales, que les permita responder de manera diferente frente a una situación de injuria (Khakh y Sofroniew 2015). Sin embargo, los astrocitos corticales forman cicatrices gliales in vitro cuando están en contacto con leucocitos (Mannava et al. 2015). A su vez, recientemente se ha descubierto que las células NG2 positivas, pueden diferenciarse mediante la vía de señalización de Sonic Hedhehog en astrocitos reactivos. Esto fue observado no solo por cambios morfológicos y de expresión proteica mediante inmunocitoquímica, sino además a través de cambios electrofisiológicos que permiten diferenciar los distintos tipos celulares (Honsa et al. 2016). En este contexto, y considerando que los cultivos neuro-gliales hipocampales presentan una abundancia considerable de células NG2 positivas, se puede sugerir un posible rol de este tipo celular en la formación de la cicatriz glial in vitro. Como se ha comentado, la interacción astrocitos-microglía también sería importante en la propagación de la astrogliosis y formación de la cicatriz glial luego de una injuria en el SNC (Zhang et al. 2010). Es importante también destacar que, la interacción celular entre astrocitos y neuronas sería importante en la activación glial. Las neuronas emiten señales de "help me" por ejemplo a través de la liberación de lipocalina-2 frente a una injuria. Estas señales generan la activación tanto de microglía como de astrocitos con elevada sobreexpresión de GFAP (Xing et al. 2014), lo que podría sugerir un rol de esta interacción neuro-glial en la propagación del fenotipo astroglial reactivo. Estos trabajos muestran a los procesos de astrogliosios y formación de la cicatriz glial como eventos muy complejos y finamente regulados. Tal como se observó en los resultados de esta tesis, no son dependientes de una única vía de señalización sino que involucrarían múltiples mecanismos moduladores e interacciones celulares más complejas Entre ellas se pueden mencionar las interacciones entre astrocitos, microglía, astrocitos reactivos derivados de células NG2, glía-neuronas, células inmunes infiltrantes la periferia, etc. Un conocimiento más profundo sobre la implicancia de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en este proceso sería necesario para lograr su modulación y futuras intervenciones terapéuticas luego de diferentes lesiones del SNC.

## 4.4 Limitaciones del enfoque

Si bien este enfoque utilizando cultivos *in vitro* y el modelo de lesión por *scratch* ha sido y continúa siendo de gran utilidad para explorar respuestas celulares a la injuria, migración celular y la efectividad de utilidad terapéutica, es importante tener en cuenta cuales son las limitaciones del enfoque.

Las limitaciones en particular de la propagación de la gliosis reactiva y la formación de la cicatriz glial provienen del diseño bidimensional en monocapa de los cultivos celulares. Esto genera que los astrocitos crezcan en condiciones diferentes a las observadas in vivo, superponiendo dominios individuales, expresando mayores niveles de GFAP y de astrogliosis basales. Por otro lado, la difusión de DAMP desde las células eliminadas por el scratch carece de gradiente (tal como ocurriría in vivo) por la difusión casi instantánea en el medio de cultivo que cubre la monocapa de células. Finalmente, los cultivos de tipos celulares aislados son necesarios para determinar las características del proceso en cada tipo celular, pero ello genera una situación todavía más anómala para las células deprivadas de interacciones celulares con otros tipos celulares. De hecho, el cultivo hipocampal conteniendo todos los tipos celulares nos mostró una repuesta más aproximada a la fisiológica y la formación de cicatrices gliales inducidas. A pesar de estas limitaciones el modelo de lesión por scratch es una herramienta muy empleada ya que puede aplicarse a cultivos celulares de un único tipo celular como también a cultivos mixtos, permitiendo realizar distintos tipos de análisis farmacológicos, moleculares, electrofisiológicos, biofísicos y puede ser seguido en tiempo real de forma rápida, efectiva y replicable (Lim et al. 2007, O'Toole et al. 2007, Zhu et al. 2007, Perez-Ortiz et al. 2008, Homkajorn et al. 2010, Puschmann et al. 2010, Liu et al. 2011, Ebrahimi et al. 2012, Hsuchou et al. 2012, Yuan et al. 2012).

## **CONCLUSIONES**

- Se pudo determinar que el modelo de injuria *in vitro* por *scratch* es una buena metodología para el estudio de la propagación de la gliosis reactiva *in vitro*.
- Hay un papel preponderante de la microglía en el proceso de astrogliosis reactiva.
- La vía de TLR/NFκB está parcialmente involucrada, ya que otros mecanismos estarían participando teniendo en cuenta la complejidad del proceso.
- Las redes astrogliales y la presencia de calcio extracelular son más importantes en el proceso de astrogliosis en ausencia de microglía.
- Los cultivos hipocampales conteniendo todos los tipos celulares y neuronas fueron los únicos que mostraron la formación de la cicatriz glial *in vitro* al ser estimulada la ruta TLR/NFκB.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abeysinghe, HC; Bokhari, L; Dusting, GJ; Roulston, CL. 2014. Brain remodelling following endothelin-1 induced stroke in conscious rats. PLoS One. 9(5):e97007.

Abeysinghe, HC; Phillips, EL; Chin-Cheng, H; Beart, PM; Roulston, CL. 2016. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. Int J Mol Sci. 17(3):288.

Akira, S; Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling.Nat Rev Immunol. 4(7):499-511.

Aloisi, F; Pujol-Borrell, R. 2006. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 6(3):205-217.

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(7598):195-200.

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(9):e107901.

Angelopoulou, E; Piperi, C; Adamopoulos, C; Papavassiliou, AG. 2016. Pivotal role of high-mobility group box 1 (HMGB1) signaling pathways in glioma development and progression. J Mol Med (Berl). 94(8):867-874.

Araque, A; Parpura, V; Sanzgiri, RP; Haydon, PG. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends Neurosci. 22(5):208-215.

Auzmendi, J; Rosciszewski, G; Moffatt, L; Ramos, AJ. 2015. XXX Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

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. Nat Neurosci. 16(5):580-586.

Barnabe-Heider, F; Goritz, C; Sabelstrom, H; Takebayashi, H; Pfrieger, FW; Meletis, K; Frisen, J. 2010. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. Cell Stem Cell. 7(4):470-482.

Barres, BA. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron. 60(3):430-440.

Bassi, R; Giussani, P; Anelli, V; Colleoni, T; Pedrazzi, M; Patrone, M; Viani, P; Sparatore, B; Melloni, E; Riboni, L. 2008. HMGB1 as an autocrine stimulus in human T98G glioblastoma cells: role in cell growth and migration. J Neurooncol. 87(1):23-33.

Belachew, S; Chittajallu, R; Aguirre, AA; Yuan, X; Kirby, M; Anderson, S; Gallo, V. 2003. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. J Cell Biol. 161(1):169-186.

Benakis, C; Garcia-Bonilla, L; Iadecola, C; Anrather, J. 2014.The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. Front Cell Neurosci. 8(461)

Bianchi, ME. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. J Leukoc Biol. 81(1):1-5.

Burda, JE; Bernstein, AM; Sofroniew, MV. 2016. Astrocyte roles in traumatic brain injury. Exp Neurol. 275(Pt 3):305-315.

Burda, JE; Sofroniew, MV. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Neuron. 81(2):229-248.

Bush, TG; Puvanachandra, N; Horner, CH; Polito, A; Ostenfeld, T; Svendsen, CN; Mucke, L; Johnson, MH; Sofroniew, MV. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron. 23(2):297-308.

Butovsky, O; Siddiqui, S; Gabriely, G; Lanser, AJ; Dake, B; Murugaiyan, G; Doykan, CE; Wu, PM; Gali, RR; Iyer, LK; Lawson, R; Berry, J; Krichevsky, AM; Cudkowicz, ME; Weiner, HL. 2012. Modulating inflammatory monocytes with a unique microRNA gene signature ameliorates murine ALS. J Clin Invest. 122(9):3063-3087.

Camand, E; Peglion, F; Osmani, N; Sanson, M; Etienne-Manneville, S. 2012. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. J Cell Sci. 125(Pt 4):844-857.

Chan, JR; Watkins, TA; Cosgaya, JM; Zhang, C; Chen, L; Reichardt, LF; Shooter, EM; Barres, BA. 2004. NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. Neuron. 43(2):183-191.

Chen, RC; Yi, PP; Zhou, RR; Xiao, MF; Huang, ZB; Tang, DL; Huang, Y; Fan, XG. 2014. The role of HMGB1-RAGE axis in migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell lines. Mol Cell Biochem. 390(1-2):271-280.

Chen, SH; Oyarzabal, EA; Sung, YF; Chu, CH; Wang, Q; Chen, SL; Lu, RB; Hong, JS. 2015. Microglial regulation of immunological and neuroprotective functions of astroglia. Glia. 63(1):118-131.

Cheng, HP; Wei, S; Wei, LP; Verkhratsky, A. 2006. Calcium signaling in physiology and pathophysiology. Acta Pharmacol Sin. 27(7):767-772.

Chimote, AA; Hajdu, P; Kucher, V; Boiko, N; Kuras, Z; Szilagyi, O; Yun, YH; Conforti, L. 2013. Selective inhibition of KCa3.1 channels mediates adenosine regulation of the motility of human T cells. J Immunol. 191(12):6273-6280.

Chung, HW; Lee, SG; Kim, H; Hong, DJ; Chung, JB; Stroncek, D; Lim, JB. 2009. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer. J Transl Med. 7(38).

Chung, WS; Allen, NJ; Eroglu, C. 2015. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. Cold Spring Harb Perspect Biol. 7(9):a020370.

Clausen, BH; Lambertsen, KL; Babcock, AA; Holm, TH; Dagnaes-Hansen, F; Finsen, B. 2008. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. J Neuroinflammation. 5(46).

Cornell-Bell, AH; Finkbeiner, SM; Cooper, MS; Smith, SJ. 1990. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. Science. 247(4941):470-473.

Cregg, JM; Depaul, MA; Filous, AR; Lang, BT; Tran, A; Silver, J. 2014. Functional regeneration beyond the glial scar. Exp Neurol. 253:197-207.

Cummings, JS; Didier, C. 2015. Project Innate Immunity and HIV infection. Disponible en el sitio web del Instituto Pasteur: https://research.pasteur.fr/en/project/innate-immunity-and-hiv-infection/.

Del Zoppo, GJ. 2006. Stroke and neurovascular protection. N Engl J Med. 354(6):553-555.

Deng, S; Zhu, S; Qiao, Y; Liu, YJ; Chen, W; Zhao, G; Chen, J. 2014. Recent advances in the role of toll-like receptors and TLR agonists in immunotherapy for human glioma. Protein Cell. 5(12):899-911.

Diaz-Amarilla, P; Olivera-Bravo, S; Trias, E; Cragnolini, 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. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(44):18126-18131.

Ebrahimi, F; Koch, M; Pieroh, P; Ghadban, C; Hobusch, C; Bechmann, I; Dehghani, F. 2012. Time dependent neuroprotection of mycophenolate mofetil: Effects on temporal dynamics in glial proliferation, apoptosis, and scar formation. J Neuroinflammation. 9:89.

Engelmann, C; Weih, F; Haenold, R. 2014. Role of nuclear factor kappa B in central nervous system regeneration. Neural Regen Res. 9(7):707-711.

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

Etienne-Manneville, S. 2008. Polarity proteins in glial cell functions. Curr Opin Neurobiol. 18(5):488-494.

Faber-Elman, A; Solomon, A; Abraham, JA; Marikovsky, M; Schwartz, M. 1996. Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation. J Clin Invest. 97(1):162-171. Faulkner, JR; Herrmann, JE; Woo, MJ; Tansey, KE; Doan, NB; Sofroniew, MV. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. J Neurosci. 24(9):2143-2155.

Ferreira, R; Lively, S; Schlichter, LC. 2014. IL-4 type 1 receptor signaling up-regulates KCNN4 expression, and increases the KCa3.1 current and its contribution to migration of alternative-activated microglia. Front Cell Neurosci. 8(183).

Fields, RD. 2008. Visualizing calcium signaling in astrocytes. Sci Signal. 3:tr5.

Fujita, T; Chen, MJ; Li, B; Smith, NA; Peng, W; Sun, W; Toner, MJ; Kress, BT; Wang, L; Benraiss, A; Takano, T; Wang, S; Nedergaard, M. 2014. Neuronal transgene expression in dominant-negative SNARE mice.J Neurosci. 34(50):16594-16604.

Fukuda, AM; Badaut, J. 2012. Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation. J Neuroinflammation.9(279).

Gabriel, C; Justicia, C; Camins, A; Planas, AM. 1999. Activation of nuclear factor-kappaB in the rat brain after transient focal ischemia. Brain Res Mol Brain Res. 65(1):61-69.

Gao, K; Wang, CR; Jiang, F; Wong, AY; Su, N; Jiang, JH; Chai, RC; Vatcher, G; Teng, J; Chen, J; Jiang, YW; Yu, AC. 2013. Traumatic scratch injury in astrocytes triggers calcium influx to activate the JNK/c-Jun/AP-1 pathway and switch on GFAP expression. Glia. 61(12):2063-2077.

Gao, Z; Zhu, Q; Zhang, Y; Zhao, Y; Cai, L; Shields, CB; Cai, J. 2013. Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury.Mol Neurobiol. 48(3):690-701.

Ghirnikar, RS; Yu, AC; Eng, LF. 1994. Astrogliosis in culture: III. Effect of recombinant retrovirus expressing antisense glial fibrillary acidic protein RNA. J Neurosci Res. 38(4):376-385.

Goncalves, CA; Leite, MC; Nardin, P. 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. Clin Biochem. 41(10-11):755-763.

Gordon, GR; Mulligan, SJ; Macvicar, BA. 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. Glia. 55(12):1214-1221.

Hamby, ME; Coppola, G; Ao, Y; Geschwind, DH; Khakh, BS; Sofroniew, MV. 2012. Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. J Neurosci. 32(42):14489-14510.

Hayakawa, K; Pham, LD; Katusic, ZS; Arai, K; Lo, EH. 2012. Astrocytic high-mobility group box 1 promotes endothelial progenitor cell-mediated neurovascular remodeling during stroke recovery. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(19):7505-7510.

Heiman, A; Pallottie, A; Heary, RF; Elkabes, S. 2014. Toll-like receptors in central nervous system injury and disease: a focus on the spinal cord. Brain Behav Immun. 42(232-245).

Herculano-Houzel, S. 2014. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. Glia. 62(9):1377-1391.

Hill, RA; Nishiyama, A. 2014. NG2 cells (polydendrocytes): listeners to the neural network with diverse properties. Glia. 62(8):1195-1210.

Ho, KW; Lambert, WS; Calkins, DJ. 2014. Activation of the TRPV1 cation channel contributes to stress-induced astrocyte migration. Glia. 62(9):1435-1451.

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(4):630-638.

Homkajorn, B; Sims, NR; Muyderman, H. 2010. Connexin 43 regulates astrocytic migration and proliferation in response to injury. Neurosci Lett. 486:197–201.

Honsa, P; Valny, M; Kriska, J; Matuskova, H; Harantova, L; Kirdajova, D; Valihrach, L; Androvic, P; Kubista, M; Anderova, M. 2016. Generation of reactive astrocytes from NG2 cells is regulated by sonic hedgehog. Glia. 64(9):1518-1531.

Hsuchou, H; Kastin, AJ; Pan, WH. 2012. Blood-borne metabolic factors in obesity exacerbate injury-induced gliosis. J Mol Neurosci. 47:267-277.

Huang, JM; Hu, J; Chen, N; Hu, ML. 2013.Relationship between plasma high-mobility group box-1 levels and clinical outcomes of ischemic stroke.J Crit Care. 28(5):792-797.

Hudson, BI; Kalea, AZ; Del Mar Arriero, M; Harja, E; Boulanger, E; D'agati, V; Schmidt, AM. 2008. Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42. J Biol Chem. 283(49):34457-34468.

Hughes, EG; Kang, SH; Fukaya, M; Bergles, DE. 2013. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. Nat Neurosci. 16(6):668-676.

ladecola, C; Nedergaard, M. 2007.Glial regulation of the cerebral microvasculature. Nat Neurosci. 10(11):1369-1376.

Janeway, CA, Jr. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. Immunol Today. 13(1):11-16.

Jin, MM; Chen, Z. 2011. Role of gap junctions in epilepsy. Neurosci Bull. 27(6):389-406.

Kaisho, T; Akira, S. 2006. Toll-like receptor function and signaling.J Allergy Clin Immunol. 117(5):979-987.

Kanemaru, K; Kubota, J; Sekiya, H; Hirose, K; Okubo, Y; Iino, M. 2013. Calciumdependent N-cadherin up-regulation mediates reactive astrogliosis and neuroprotection after brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 110(28):11612-11617.

Kang, R; Chen, R; Zhang, Q; Hou, W; Wu, S; Cao, L; Huang, J; Yu, Y; Fan, XG; Yan, Z; Sun, X; Wang, H; Wang, Q; Tsung, A; Billiar, TR; Zeh, HJ, 3rd; Lotze, MT; Tang, D. 2014. HMGB1 in health and disease. Mol Aspects Med. 40:1-116.

Kettenmann, H; Hanisch, UK; Noda, M; Verkhratsky, A. 2011. Physiology of microglia. Physiol Rev. 91(2):461-553.

Khakh, BS; Sofroniew, MV. 2015. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. Nat Neurosci. 18(7):942-952.

Kigerl, KA; De Rivero Vaccari, JP; Dietrich, WD; Popovich, PG; Keane, RW. 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. Exp Neurol. 258:5-16.

Kigerl, KA; Lai, W; Rivest, S; Hart, RP; Satoskar, AR; Popovich, PG. 2007. Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. J Neurochem. 102(1):37-50.

Kimelberg, HK. 2010. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. Neuroscientist. 16(1):79-106.

Koehler, RC; Roman, RJ; Harder, DR. 2009. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. Trends Neurosci. 32(3):160-169.

Kornyei, Z; Czirok, A; Vicsek, T; Madarasz, E. 2000. Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. J Neurosci Res. 61(4):421-429.

Laird, MD; Shields, JS; Sukumari-Ramesh, S; Kimbler, DE; Fessler, RD; Shakir, B; Youssef, P; Yanasak, N; Vender, JR; Dhandapani, KM. 2014. High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4. Glia. 62(1):26-38.

Lambertsen, KL; Clausen, BH; Babcock, AA; Gregersen, R; Fenger, C; Nielsen, HH; Haugaard, LS; Wirenfeldt, M; Nielsen, M; Dagnaes-Hansen, F; Bluethmann, H; Faergeman, NJ; Meldgaard, M; Deierborg, T; Finsen, B. 2009. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. J Neurosci. 29(5):1319-1330.

Lanosa, XA; Colombo, JA. 2007. Astroglial injury in an ex vivo model: contributions to its analysis in enriched cell cultures. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 43(5-6):186-195.

Lehre, KP; Levy, LM; Ottersen, OP; Storm-Mathisen, J; Danbolt, NC. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. J Neurosci. 15(3 Pt 1):1835-1853.

Leifer, CA; Medvedev, AE. 2016. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. J Leukoc Biol.

Leonardo, CC; Eakin, AK; Ajmo, JM; Collier, LA; Pennypacker, KR; Strongin, AY; Gottschall, PE. 2008. Delayed administration of a matrix metalloproteinase inhibitor limits progressive brain injury after hypoxia-ischemia in the neonatal rat. J Neuroinflammation. 5(34).

Lim, JH; Gibbons, HM; O'Carroll, SJ; Narayan, PJ; Faull, RLM; Dragunow, M. 2007. Extracellular signal-regulated kinase involvement in human astrocyte migration. Brain Res. 1164:1-13.

Liu, C; Wu, ZZ; Shu, CL; Li, DF; Zeng, YJ; Cui, Q; Jiang, WH. 2011. Experimental investigation of HGF inhibiting glial scar in vitro. Cell Mol Neurobiol. 31:259-268.

Magnus, T; Carmen, J; Deleon, J; Xue, H; Pardo, AC; Lepore, AC; Mattson, MP; Rao, MS; Maragakis, NJ. 2008. Adult glial precursor proliferation in mutant SOD1G93A mice. Glia. 56(2):200-208.

Mannava, S; Murta, V; Mertelsmann, R; Ramos, AJ. 2015. The study of glial scar formation aftern brain ischemia using in vitro strategies. Tesis M. Sc. International Master Program in Biomedical Sciences (IMBS). 76.

Maragakis, NJ; Rothstein, JD. 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. Nat Clin Pract Neurol. 2(12):679-689.

Matyash, V; Kettenmann, H. 2010. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. Brain Res Rev. 63(1-2):2-10.

Mayor, R; Etienne-Manneville, S. 2016. The front and rear of collective cell migration. Nat Rev Mol Cell Biol. 17(2):97-109.

Mckeon, RJ; Jurynec, MJ; Buck, CR. 1999. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. J Neurosci. 19(24):10778-10788.

Metcalf, TU; Baxter, VK; Nilaratanakul, V; Griffin, DE. 2013. Recruitment and retention of B cells in the central nervous system in response to alphavirus encephalomyelitis. J Virol. 87(5):2420-2429.

Miller, RH; Raff, MC. 1984. Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. J Neurosci. 4(2):585-592.

Murakami, K; Koide, M; Dumont, TM; Russell, SR; Tranmer, BI; Wellman, GC. 2011. Subarachnoid Hemorrhage Induces Gliosis and Increased Expression of the Proinflammatory Cytokine High Mobility Group Box 1 Protein. Transl Stroke Res. 2(1):72-79.

Nagy, JI; Patel, D; Ochalski, PA; Stelmack, GL. 1999. Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. Neuroscience. 88(2):447-468.

Nakahara, T; Tsuruta, R; Kaneko, T; Yamashita, S; Fujita, M; Kasaoka, S; Hashiguchi, T; Suzuki, M; Maruyama, I; Maekawa, T. 2009. High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage. Neurocrit Care. 11(3):362-368.

Nishiyama, A; Komitova, M; Suzuki, R; Zhu, X. 2009.Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. Nat Rev Neurosci. 10(1):9-22.

Norenberg, MD. 1979. Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. J Histochem Cytochem. 27(3):756-762.

O'Toole, DA; West, AK; Chuah, MI. 2007. Effect of olfactory ensheathing cells on reactive astrocytes in vitro. Cell Mol Life Sci. 64:1303-1309.

Oberheim, NA; Goldman, SA; Nedergaard, M. 2012. Heterogeneity of astrocytic form and function. Methods Mol Biol. 814(23-45).

Orellana, JA; Montero, TD; Von Bernhardi, R. 2013. Astrocytes inhibit nitric oxidedependent Ca(2+) dynamics in activated microglia: involvement of ATP released via pannexin 1 channels. Glia. 61(12):2023-2037.

Parmigiani, E; Leto, K; Rolando, C; Figueres-Onate, M; Lopez-Mascaraque, L; Buffo, A; Rossi, F. 2015. Heterogeneity and Bipotency of Astroglial-Like Cerebellar Progenitors along the Interneuron and Glial Lineages. J Neurosci. 35(19):7388-7402.

Perea, G; Navarrete, M; Araque, A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. Trends Neurosci. 32(8):421-431.

Perez-Ortiz, JM; Serrano-Perez, MC; Pastor, MD; Martin, ED; Calvo, S; Rincon, M; Tranque, P. 2008. Mechanical lesion activates newly identified NFATc1 in primary astrocytes: Implication of ATP and purinergic receptors. Eur J Neurosci. 27:2453-2465.

Pizzi, M; Sarnico, I; Lanzillotta, A; Battistin, L; Spano, P. 2009. Post-ischemic brain damage: NF-kappaB dimer heterogeneity as a molecular determinant of neuron vulnerability. FEBS J. 276(1):27-35.

Prinz, M; Mildner, A. 2011. Microglia in the CNS: immigrants from another world. Glia. 59(2):177-187.

Prinz, M; Priller, J. 2014. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nat Rev Neurosci. 15(5):300-312

Puschmann, TB; Dixon, KJ; Turnley, AM. 2010. Species differences in reactivity of mouse and rat astrocytes in vitro. Neurosignals. 18:152–163.

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. J Cereb Blood Flow Metab. 28(5):927-938.

Ransohoff, RM; Brown, MA. 2012. Innate immunity in the central nervous system. J Clin Invest. 122(4):1164-1171.

Ravin, R; Blank, PS; Busse, B; Ravin, N; Vira, S; Bezrukov, L; Waters, H; Guerrero-Cazares, H; Quinones-Hinojosa, A; Lee, PR; Fields, RD; Bezrukov, SM; Zimmerberg, J. 2016. Blast shockwaves propagate Ca(2+) activity via purinergic astrocyte networks in human central nervous system cells. Sci Rep. 6(25713.

Richardson, WD; Young, KM; Tripathi, RB; Mckenzie, I. 2011. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? Neuron. 70(4):661-673.

Rosin, DL; Okusa, MD. 2011. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. J Am Soc Nephrol. 22(3):416-425.

Schafer, DP; Lehrman, EK; Kautzman, AG; Koyama, R; Mardinly, AR; Yamasaki, R; Ransohoff, RM; Greenberg, ME; Barres, BA; Stevens, B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron. 74(4):691-705.

Shen, CC; Yang, YC; Chiao, MT; Cheng, WY; Tsuei, YS; Ko, JL. 2010. Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke. Curr Neurovasc Res. 7(1):6-14.

Simard, M; Nedergaard, M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis.Neuroscience. 129(4):877-896.

Sloan, SA; Barres, BA. 2014. Looks can be deceiving: reconsidering the evidence for gliotransmission. Neuron. 84(6):1112-1115.

Sofroniew, MV. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. Trends Neurosci. 32(12):638-647.

Sofroniew, MV. 2015. Astrogliosis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 7(2):a020420.

Sofroniew, MV; Vinters, HV. 2010. Astrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 119(1):7-35.

Sternberg, S. 1983. Biomedical Image Processing. Computer. 16(1):22-34.

Sun, KK; Ji, C; Li, X; Zhang, L; Deng, J; Zhong, N; Wu, XY. 2013. Overexpression of high mobility group protein B1 correlates with the proliferation and metastasis of lung adenocarcinoma cells. Mol Med Rep. 7(5):1678-1682.

Tang, D; Kang, R; Coyne, CB; Zeh, HJ; Lotze, MT. 2012. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity. Immunol Rev. 249(1):158-175.

Tian, DS; Dong, Q; Pan, DJ; He, Y; Yu, ZY; Xie, MJ; Wang, W. 2007. Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. Brain Res. 1154:206-214.

Tremblay, ME; Majewska, AK. 2011. A role for microglia in synaptic plasticity? Commun Integr Biol. 4(2):220-222.

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. Front Cell Neurosci. 7(274).

Ventura, R; Harris, KM. 1999. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes.J Neurosci. 19(16):6897-6906.

Villarreal, A; Aviles Reyes, RX; Angelo, MF; Reines, AG; Ramos, AJ. 2011. S100B alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF-kappaB signaling. J Neurochem. 117(2):321-332.

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. Front Cell Neurosci. 10(139).

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. J Neurochem. 131(2):190-205.

Vinnakota, K; Hu, F; Ku, MC; Georgieva, PB; Szulzewsky, F; Pohlmann, A; Waiczies, S; Waiczies, H; Niendorf, T; Lehnardt, S; Hanisch, UK; Synowitz, M; Markovic, D; Wolf, SA; Glass, R; Kettenmann, H. 2013. Toll-like receptor 2 mediates microglia/brain macrophage MT1-MMP expression and glioma expansion. Neuro Oncol. 15(11):1457-1468.

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. J Neurosci. 33(31):12870-12886.

Xing, C; Wang, X; Cheng, C; Montaner, J; Mandeville, E; Leung, W; Van Leyen, K; Lok, J; Lo, EH. 2014. Neuronal production of lipocalin-2 as a help-me signal for glial activation. Stroke. 45(7):2085-2092.

Yang, Y; Huang, JQ; Zhang, X; Shen, LF. 2015. MiR-129-2 functions as a tumor suppressor in glioma cells by targeting HMGB1 and is down-regulated by DNA methylation. Mol Cell Biochem. 404(1-2):229-239.

Yi, M; Dou, F; Lu, Q; Yu, Z; Chen, H. 2016. Activation of the KCa3.1 channel contributes to traumatic scratch injury-induced reactive astrogliosis through the JNK/c-Jun signaling pathway. Neurosci Lett. 624(62-71).

Yiu, G; He, Z. 2006. Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nat Rev Neurosci. 7(8):617-627.

Yu, AC; Lee, YL; Eng, LF. 1993. Astrogliosis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. J Neurosci Res. 34(3):295-303.

Yuan, YM; Su, ZD; Pu, YY; Liu, XJ; Chen, JJ; Zhu, F; Zhu, YL; Zhang, H; He, C. 2012. Ethyl pyruvate promotes spinal cord repair by ameliorating the glial microenvironment. Br J Pharmacol. 166:749-763.

Zamanian, JL; Xu, L; Foo, LC; Nouri, N; Zhou, L; Giffard, RG; Barres, BA. 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. J Neurosci. 32(18):6391-6410.

Zhang, D; Hu, X; Qian, L; O'callaghan, JP; Hong, JS. 2010. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? Mol Neurobiol. 41(2-3):232-241.

Zhang, J; Liu, C; Hou, R. 2014. Knockdown of HMGB1 improves apoptosis and suppresses proliferation and invasion of glioma cells. Chin J Cancer Res. 26(6):658-668.

Zhang, Y; Barres, BA. 2010. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. Curr Opin Neurobiol. 20(5):588-594.

Zhu, Z; Zhang, QA; Yu, ZY; Zhang, LA; Tian, DS; Zhu, SQ; Bu, BT; Xie, MJ; Wang, W. 2007. Inhibiting cell cycle progression reduces reactive astrogliosis initiated by scratch injury in vitro and by cerebral ischemia in vivo. Glia. 55:546-558.