



Università degli Studi di Udine

In collaborazione con
INSERM U1141, Robert Debré Hospital, Paris

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CELLULARE E MOLECOLARE
CICLO XXIX**

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**STUDIO DEL RUOLO DELL'INFIAMMAZIONE E DELLE
ALTERAZIONI DELLA BARRIERA EMATOENCEFALICA
(BBB) IN TRE MODELLI MURINI DI DANNO CEREBRALE
PERINATALE**

Dottoranda:
Dr.ssa Raffaella Moretti

Tutore:
Pr. Giuseppe Damante

Coordinatori:
Pr. Luigi Titomanlio
Dott.ssa Anna Pusiol

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

I. TITOLO	Pag. 4
II. PREFAZIONE	Pag. 5
III. INTRODUZIONE	Pag 7
I principali danni cerebrali perinatali	Pag 7
L'ischemia cerebrale acuta.....	Pag 7
Il trauma cranico in età pediatrica.....	Pag 8
I danni diffusi della sostanza bianca e la leucomalacia periventricolare.....	Pag 9
Meccanismi cellulari ed infiammatori nelle lesioni cerebrali	Pag 11
Le cellule infiammatorie del SNC.....	Pag 11
i. La microglia.....	Pag 11
ii. I mastociti.....	Pag 24
iii. Le altre cellule del sistema nervoso centrale.....	Pag 27
La BBB e la neurovascular unit nella patologia del cervello in via di sviluppo.....	Pag 28
Cenni di fisiopatologia.....	Pag 36
i. La fisiopatologia del danno ipossico ischemico.....	Pag 36
ii. La fisiopatologia del traumatismo cranico.....	Pag 43
iii. L'eccitotossicità.....	Pag 47
I modelli sperimentali per lo studio delle patologie del SNC	Pag 48
I vari modelli animali di HI e quello usato nel mio studio.....	Pag 48
I vari modelli animali di TBI e il modello utilizzato nel mio studio.....	Pag 52

Il modello ibotenato come modello di leucomalacia periventricolare.....	Pag 55
Strategie di neuroprotezione.....	Pag 57
Il sildenafil.....	Pag 57
La minociclina	Pag 58
Il cromoglicato	Pag 58
IV. SCOPO DELLO STUDIO.....	Pag 59
V. STUDIO I. RUOLO DEI MASTOCITI IN UN MODELLO MURINO DI TRAUMATISMO CRANICO PEDIATRICO MODERATO	Pag 61
a. Introduzione	
b. Risultati	
c. Articolo	
VI. STUDIO II: RUOLO DELLE CELLULE GLIALI IN UN MODELLO MURINO DI ISCHEMIA CEREBRALE PERINATALE	Pag 66
a. Introduzione	
b. Risultati	
c. Articolo	
VII. STUDIO III: RUOLO DELLA MICROGLIA IN UN MODELLO MURINO DI TRAUMATISMO CRANICO PEDIATRICO MODERATO.....	Pag 72
a. Introduzione	
b. Risultati	
c. Articolo	

VIII. STUDIO IV: COMPORTAMENTO DELLA BARRIERA

EMATOENCEFALICA IN UN MODELLO MURINO DI TRAUMATISMO

CRANICO PEDIATRICO MODERATO..... Pag 76

a. Introduzione

b. Materiali e metodi

c. Risultati

d. Conclusione

IX. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE..... Pag 97

X. BIBLIOGRAFIA..... Pag 105

**XI. ANNESSO 1: STUDIO SULL'APERTURA DELLA BARRIERA
EMATOENCEFALICA SECONDARIA AL DANNO ECCITOTOSSICO IN
UN MODELLO MURINO DI LEUCOMALACIA PERIVENTRICOLARE**

a. Introduzione

b. Risultati

**XII. ANNESSO 2: ALTRI LAVORI EFFETTUATI NEL CORSO DEL
DOTTORATO**

I. TITOLO:

**“Studio del ruolo dell’infiammazione e delle alterazioni della
barriera ematoencefalica (BBB) in tre modelli murini di danno
cerebrale perinatale”**

II. PREFERAZIONE

Il cervello in via di sviluppo presenta delle caratteristiche peculiari che lo rendono più vulnerabile o diversamente suscettibile ad eventuali danni perinatali.

I più importanti danni cerebrali perinatali sono quelli di natura vascolare, come l'ipossischemia, l'emorragia della matrice germinale (Germinal Matrix Hemorrhage, GMH) e lo stroke neonatale, quelli di natura eccitotossica, che coinvolgono prevalentemente la sostanza bianca, che possiamo definire in termine generale danni diffusi della sostanza bianca (Diffuse white matter diseases), quelli infettivi, ed infine quelli traumatici (Traumatic brain injury, TBI). Nonostante gli sviluppi in termini di prevenzione e follow-up prenatale e di tecniche di rianimazione neonatale degli ultimi decenni, tali problematiche restano ad oggi un grosso problema socio-sanitario a livello mondiale.

Indipendentemente dal tipo di insulto, è ormai riconosciuto che al di là del danno acuto, più o meno grave e più o meno reversibile, si associano tutta una serie di conseguenze a lungo termine, alla cui origine risiede l'attivazione delle cellule immunitarie, residenti o sistemiche. Tali cellule, attraverso la secrezione di citochine e/o fattori di crescita o chemotattici, non solo si addizionano ai meccanismi fisiopatologici acuti, ma generano delle modificazioni strutturali che sono associate a problemi cognitivo-comportamentali a lungo termine.

Mentre i meccanismi fisiopatologici acuti sono stati a lungo esplorati, in particolare nell'adulto, solo recentemente gli sforzi della comunità scientifica si sono rivolti allo studio dell'infiammazione e delle cellule immunomodulatrici del sistema nervoso centrale (SNC). Ancora minori sono le conoscenze riguardo a tali fenomeni nel cervello in via di sviluppo.

Un altro argomento di studio che sta assumendo sempre maggiore importanza negli ultimi decenni è la cosiddetta Unità Neurovascolare (NeuroVascular Unit, NVU), la barriera che

divide il microambiente cerebrale da quello sistemico. Le proprietà di impermeabilità selettiva della NVU sono garantite dalla Barriera Ematoencefalica (Blood-Brain Barrier, BBB), e dall'interazione di questa con la matrice extracellulare e le cellule del SNC, tra cui, per l'appunto, le cellule gliali. La compromissione delle proprietà di tale barriera agisce di pari passo con l'attivazione delle cellule infiammatorie nella creazione del danno perinatale, e spesso i due processi si influenzano reciprocamente.

Da qui l'importanza del mio studio, che valuta, attraverso l'utilizzo di tre modelli murini di danno cerebrale perinatale (stroke perinatale, TBI e leucomalacia periventricolare), l'entità e la modificazione temporale del danno, ed esplora il ruolo delle cellule immunitarie residenti, ed in particolare della microglia, e le modificazioni della BBB.

Accanto ad uno studio puramente descrittivo, peraltro indispensabile per un'ottimale conoscenza dei meccanismi fisiopatologici alla base del danno e quindi per lo sviluppo di nuove e mirate tecniche di neuro protezione, durante questi tre anni ho anche testato, nei vari rispettivi modelli, alcune possibili molecole neuroprotettrici (sildenafil, minociclina, cromoglicato e melatonina).

III. INTRODUZIONE

I principali danni cerebrali perinatali

I più importanti danni cerebrali perinatali sono quelli di natura vascolare, come l'ipossischemia, l'emorragia della matrice germinale (Germin Matrix Hemorrhagy, GMH) e lo stroke neonatale, quelli di natura eccitotossica, che coinvolgono prevalentemente la sostanza bianca, che possiamo definire in termine generale danni diffusi della sostanza bianca (Diffuse White Matter Diseases), quelli infettivi, ed infine quelli traumatici (Traumatic Brain Injuries, TBI).

A seguire una breve descrizione dei danni perinatali di cui mi sono occupata nel mio lavoro.

L'ischemia cerebrale acuta

Per quanto riguarda gli eventi ischemici arteriosi (detti anche accidenti cerebrovascolari, ACV) acuti, essi sono la seconda forma classica di ischemia cerebrale del neonato a termine, dopo l'encefalopatia neonatale ipossico-ischemica (ENII). Si tratta di una patologia frequente perché la sua forma arteriosa, che riguarda il 70 % dei casi, è ritrovata in 1-3/5000 neonati. L'ACV perinatale, in occasione di un Workshop Internazionale svoltosi nel 2006, è stato definito come "un gruppo di condizioni eterogenee in cui vi è un' interruzione focale del flusso ematico cerebrale secondaria a trombosi o embolia arteriosa o venosa cerebrale, tra le 20 settimane di vita fetale fino al 28° giorno post-natale, confermata da studi neuroradiologici o neuropatologici"¹. Tale occlusione acuta di un'arteria cerebrale induce un'ischemia nel suo territorio di irrorazione. L'arteria più spesso coinvolta è l'arteria silviana o arteria cerebrale media ("Middle Cerebral Artery", MCA) oppure una delle sue ramificazioni. Il meccanismo dell'occlusione è nella maggior parte dei casi trombo-embolico,

favorito da una patologia innata della coagulazione o da un'incompatibilità piastrinica tra la madre e il feto. Numerose informazioni provenienti in particolare dai dati sull'RMN precoce, suggeriscono che l'occlusione avvenga più spesso durante il periodo perinatale. I sintomi, invece, cominciano spesso molte ore dopo la nascita (probabilmente in un intervallo che va da 4 a 48 ore). Si tratta quasi sempre di convulsioni spesso focali che si manifestano clinicamente con delle clonie controlaterali alla lesione oppure delle apnee o convulsioni generalizzate. La prognosi è migliore rispetto a quella dell'ENII: le forme più gravi riguardano i casi che coinvolgono anche le regioni talamiche e la capsula interna, che evolvono verso l'emiplegia di intensità variabile; tuttavia nella più parte dei casi le sequele sono moderate, spesso a tipo monoplegia spastica, o addirittura minori. Nonostante la sua frequenza elevata, l'ACV perinatale non è adeguatamente studiato nella ricerca sulla neuroprotezione. Le ragioni risiedono da un lato nel fatto che la diagnosi è troppo tardiva per sperare in una neuroprotezione efficace, e d'altro lato dal fatto che il costo morale e sociale di questa patologia è più lieve di quello della ENII o dell'ACV dell'adulto.

Il Trauma Cranico in età pediatrica

Il TBI è la prima causa di mortalità e di handicap nei giovani adulti nei paesi sviluppati. Negli Stati Uniti la sua incidenza annuale è stata stimata dal Center for Disease Control (CDC) a 403/100.000 accessi in Pronto Soccorso per tale motivo, e a 85/100.000 ricoveri². Secondo le Raccomandazioni della Società Italiana di Medicina d'Emergenza e Urgenza Pediatrica (SIMEUP), l'incidenza di TC in Italia viene stimata pari a 1/50/anno per la fascia d'età 0-4 anni, di 1/100/anno per la fascia 5-9 anni e di 1/100/anno per la fascia 10-14 anni. Uno studio multicentrico condotto negli Stati Uniti su 43.399 accessi pediatrici per TC in pronto soccorso, ha riscontrato che il 25% di essi avviene in bambini al di sotto dei 2 anni di età, mentre il 54% tra i 2 e i 12 anni³. Per quanto riguarda i bambini di meno di 15 anni, secondo l'analisi della CDC che considera il periodo tra il 1995 ed il 2001, l'incidenza

annuale era di 731/100.000 accessi in Pronto Soccorso, 63/100.000 ricoveri e 4,5/100.000 decessi ⁴.

Osservazioni cliniche hanno suggerito come l'età in cui si verifica un TC sia inversamente correlata alla gravità delle sequele. Il TC nei primi 4 anni è gravato da esiti neurologici a distanza più severi che nelle successive epoche della vita ed i pazienti possono presentare deficit cognitivi e funzionali, anche in seguito ad un TC lieve ⁴⁻⁷. I bambini, inoltre, sono a rischio di andare incontro a deficit cognitivi o funzionali più tardivi anche a seguito di un traumatismo cranico leggero ^{8,9}.

Le cause di TBI nel bambino sono età-dipendenti. Nel periodo neonatale, i traumatismi cranici sono per lo più dovuti al parto, mentre, non appena l'infante comincia a muoversi nello spazio autonomamente, le cause principali sono le cadute. In età scolare, gli spostamenti più numerosi e la pratica dello sport creano ulteriori situazioni a rischio, in particolare con l'uso della bicicletta. Nell'adolescenza, così come nell'età adulta, i traumi cranici sono principalmente dovuti agli incidenti della strada, che si tratti di coinvolgimento di pedone, di veicolo a due ruote o di autovetture ¹⁰. Al di là dei traumi accidentali, non si devono trascurare i traumatismi cranici da maltrattamento, che costituiscono un problema importante, in particolare nel neonato fino all'anno di età. In uno studio condotto nel Nord Carolina l'incidenza annuale dei TBI indotti era di 17/10000 casi di TBI, con un'incidenza maggiore nel primo anno di vita (29/100.000) ¹¹. In generale, se ci si riferisce a tutti i gruppi d'età, la prevalenza del TBI da maltrattamento è del 10% di tutti i traumatismi cranici.

I danni diffusi della sostanza bianca e la leucomalacia periventricolare

Durante la vita fetale il cervello in via di sviluppo è sensibile a vari fattori che, assieme a un corredo genetico particolare, possono comportare uno spettro di patologie funzionali o strutturali che si manifesteranno nel corso della vita. Più del 10% dei bambini con un molto basso peso alla nascita (VLBW) presentano deficit motori spastici come la paralisi cerebrale

^{12,13}, ed il 25-50% svilupperà disturbi di comprensione, comportamento, attenzione e socializzazione ¹⁴⁻¹⁶. Analogamente, nel neonato a termine, un insulto ipossico-ischemico perinatale causa conseguenze sullo sviluppo neurologico e motorio ¹⁷⁻¹⁹. Il deficit cognitivo senza danni motori maggiori è la conseguenza neurologica di gran lunga più frequente nei VLBW. La protezione del cervello neonatale o fetale verso tali insulti è di sempre maggiore importanza, in quanto vi è un sempre maggior numero di “very preterm” che sopravvivono, e di questi una percentuale rilevante presenta sequele dal punto di vista neurologico. In questo contesto la percentuale di disabilità sale al 50%²⁰. Il correlato neuropatologico di queste patologie comprende svariati danni, in particolare la leucomalacia periventricolare (LPV) e i deficit assionali/neuronali associati, che coinvolgono la sostanza bianca, il talamo, i gangli della base, la corteccia cerebrale, il tronco encefalico ed il cervelletto .

Prima dell'avvento della Risonanza Magnetica Cerebrale e dello sviluppo delle tecniche istologiche per lo studio del danno cerebrale nel pretermine, veniva focalizzata l'attenzione sulla sostanza bianca, in quanto la sua compromissione era la caratteristica principale nel materiale autoptico umano. Attualmente è tuttavia riconosciuto che anche la sostanza grigia corticale e quella subcorticale sono coinvolte significativamente. Dal 2005 Volpe introdusse il termine “encefalopatia della prematurità”, per definire tutta la costellazione di eventi che si susseguono al danno cerebrale e che comprendono “gli eventi distruttivi primitivi e la secondaria fase di difetto di maturazione e trofismo”²¹ che non coinvolgono solo la sostanza bianca, bensì anche i neuroni di svariati distretti cerebrali. Queste alterazioni della sostanza grigia, identificate inizialmente da studi volumetrici in RMN, comprendono difetto di crescita della corteccia cerebrale e delle strutture nucleari più profonde, in particolare il talamo e gangli della base ²². Uno studio del 2007 condotto su 41 neonati pretermine ha identificato perdite neuronali e gliosi nel 40-45% dei neonati, nei gangli della base nel 40-55% e nella corteccia cerebrale nel 30-50%. È importante notare che i deficit neuronali furono identificati

quasi esclusivamente nei neonati con LPV, ed in particolare LPV non cistica, ed erano poco comuni in cervelli che presentavano esclusivamente gliosi diffusa della sostanza bianca o sostanza bianca normale, a sottolineare una stretta correlazione tra danno della sostanza bianca e difetti neuronali ²³. Per quanto riguarda il neonato a termine, nel quale si riteneva che il danno neuronale fosse quello prevalente, è stata recentemente dimostrata la presenza della stessa associazione tra sostanza bianca e sostanza grigia nella genesi del danno neurocognitivo ²⁴.

Meccanismi cellulari ed infiammatori nelle lesioni cerebrali

Le cellule infiammatorie del SNC

i. La microglia

Le origini

La microglia è stata descritta per la prima volta come elemento cellulare del sistema nervoso centrale da Pio del Rio-Hortega nel 1932 in un capitolo del libro “Cytology and Cellular Pathology of the Central Nervous System”. In tale capitolo, chiamato appunto “microglia”, troviamo una descrizione istologica accurata di tale popolazione cellulare che resta a tutt’oggi estremamente attuale ²⁵:

- la microglia colonizza il parenchima cerebrale precocemente durante lo sviluppo fetale
- le cellule colonizzatrici hanno un aspetto ameboide e sono di origine mesodermica
- esse usano i vasi sanguigni e le fibre della sostanza bianca come guida alla migrazione e per invadere tutte le regioni cerebrali
- Tali cellule evolvono verso una morfologia sempre più ramificata (nota come “resting” microglia) nel cervello maturo

- nel cervello maturo le troviamo disperse in tutto il SNC, con piccole variazioni
- ogni cellula sembra occupare un territorio definito
- a seguito di un evento patologico queste cellule si trasformano
- le cellule trasformate acquisiscono una morfologia ameboide, simile a quella osservata nei primi stadi di sviluppo
- tali cellule hanno la capacità di migrare, proliferare e fagocitare.

Le cellule microgliali rappresentano il 5-12% delle cellule cerebrali e si localizzano soprattutto a livello dell'ippocampo, dei gangli della base e della *substantia nigra*, mentre il cervelletto ed il tronco cerebrale sono i distretti con la minor densità²⁶.

Sebbene descritta ormai un secolo fa, la derivazione di queste cellule è ancora in discussione. Attualmente si ritiene che esistano differenti tipi di cellule microgliali di differenti origini, soprattutto in condizioni patologiche²⁷. Contrariamente alle altre cellule gliali (oligodendrociti, astrociti) ed ai neuroni che nascono dal neuro-ectoderma, la microglia residente deriva dal mesoderma, ed in particolare dal sacco vitellino^{28,29}. Il sacco vitellino è un annesso extra-embriionario che ha essenzialmente un ruolo nutritivo, ma che svolge anche funzioni ematopoietiche durante la vita embrionaria. Nel topo, durante la vita embrionale, ed in particolare al nono giorno (E9) la microglia si differenzia a partire da un progenitore eritro-mieloide CD45⁻ c-kit⁺, che va progressivamente maturando passando per differenti stadi (CD45⁺, c-kit[°], CX3CR1⁻) fino alla microglia matura caratterizzata da un fenotipo CD45⁺ c-kit⁻ CX3CR1⁺, sotto l'influsso della via di segnalizzazione Pu.1 e Irf8³⁰. Queste cellule vanno successivamente incontro a migrazione e colonizzazione delle strutture cerebrali attorno al 10mo giorno e ½ di vita embrionaria (E10,5). Nell'essere umano questi eventi avvengono nel corso dei primi due trimestri di gravidanza^{31,32}. Tali cellule però non

sono le sole capaci di colonizzare il SNC: recenti evidenze, infatti, dimostrano la presenza di un'altra popolazione cellulare di derivazione midollare in grado di penetrare nel SNC, differenziarsi in cellule microgliali^{32,33}. Questa infiltrazione sembra giocare un ruolo chiave nella modulazione della patologia cerebrale del cervello adulto, che va incontro a neurodegenerazione o insulto neurologico, ed è favorita (ma non avviene solo in quel caso) dall'apertura della BBB²⁷. Le caratteristiche immunologiche di queste due popolazioni microgliali sembrano essere diverse: la microglia residente sembra esprimere bassi livelli del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II e dimostrare bassa capacità di presentare l'antigene. Al contrario la popolazione di derivazione midollare esprime l'MHC II ad alti livelli e sembra avere un'elevata capacità di presentare l'antigene²⁷. Le due popolazioni sono difficili da distinguere dal punto di vista morfologico, funzionale e dei markers di superficie. Tuttavia le cellule di derivazione midollare si possono distinguere si possono distinguere dalla microglia residente per delle differenze fenotipiche, in particolare per un marcaggio CCR2⁺ che persiste per più settimane dopo un'aggressione cerebrale³⁴.

Le funzioni

La microglia è una popolazione cellulare fagocitica mononucleata residente del cervello, e rappresenta il principale elemento del sistema immunitario innato nel sistema nervoso centrale³⁰. Come i macrofagi, le cellule microgliali hanno proprietà di fagocitosi e di digestione enzimatica, mediata dai lisosomi. Sono delle cellule presentanti l'antigene, che agiscono sull'immunità acquisita e possono attivare i linfociti T³⁵. In accordo con la prima definizione di Hortega, si definisce la microglia come esistente in due possibili stadi: “a riposo, resting” e “attivata”. In realtà la microglia detta “resting” non è realmente “a riposo”. La microscopia a 2 fotoni ha dimostrato che essa è implicata in una costante sorveglianza ambientale, con una perlustrazione del parenchima che la circonda al fine di garantire l'omeostasi³⁶. La microglia può attivarsi in seguito a numerosi stimoli, andando incontro ad

un processo di proliferazione e di trasformazione in microglia “reattiva”. Durante l’attivazione la microglia passa da un fenotipo ramificato ad un fenotipo iper ramificato e successivamente assume una morfologia ameboide, che sembrerebbe aiutarla ad invadere la lesione ³⁷. Una volta sul sito del danno, la microglia produce e secreta citochine e chemochine pro- ed anti-infiammatorie, fattori di stress ossidativo come l’Ossido Nitrico (NO) e fattori di crescita.

Ruolo dualistico della microglia: i patterns di attivazione microgliale

La transizione tra uno stato di sorveglianza, definito “resting”, e uno stato esecutivo, definito come microglia “attivata”, è un fenomeno complesso ed ancora oggetto di studio. Lo stato di attivazione, infatti, non è univoco, ma può dare origine a distinti fenotipi effettori in risposta a stimoli diversificati ³⁸.

La presenza di multipli patterns di attivazione microgliale è un concetto relativamente recente ed ancora dibattuto, che ha origine dall’analogia della microglia con la popolazione monocitica circolante. Nel 1992, infatti, Stein e il suo gruppo dimostrarono che l’Interleuchina-4 (IL-4), nei macrofagi, mediante il recettore del mannosio, induceva un fenotipo immunologico di tipo anti-infiammatorio. Tale comportamento si discostava dunque dal pathway infiammatorio fino ad allora sempre descritto, e venne definito “alternativo”. Tuttavia, mentre il comportamento dei macrofagi periferici è oggetto di studio da più di 20 anni, il complesso stato di attivazione microgliale comincia ad essere studiato solo di recente ³⁹.

È ormai acquisito che la microglia attivata possa esistere in due differenti forme: la forma di attivazione “classica” (M1), fenotipo prevalentemente pro-infiammatorio, e la forma di attivazione “alternativa” (M2), fenotipo prevalentemente anti-infiammatorio ³⁹.

Le denominazioni M1 ed M2, per indicare il differente pattern citochinico della microglia attivata, sono state coniate per sottolineare il parallelismo con la terminologia utilizzata per i

linfociti T. M1 corrisponde all'assetto pro-infiammatorio di tipo Th (T helper) 1, M2 corrisponde al pattern anti-infiammatorio di tipo Th2³⁹.

La forma di attivazione "classica" (M1, Figura 1), definita di tipo citotossico, agisce come prima linea di difesa stimolando la risposta immunitaria acquisita di tipo citotossico. In risposta ad uno stimolo pro-infiammatorio, come l'Interferon- γ (INF- γ), la microglia esprime CD86, CD16, CD32, e produce radicali liberi e citochine pro-infiammatorie come Interleuchina-6 (IL-6), Interleuchina-12 (IL-12), Tumor Necrosi Factor- α (TNF- α), IL-1 β e INF- γ .

Questo processo svolge un ruolo primario nella difesa nei confronti di patogeni o di cellule tumorali, ma può complicarsi con dei fenomeni collaterali strettamente associati al danno neuronale e alla gliosi^{29,40}.

La forma "alternativa" (M2, Figura 1), è caratterizzata da un fenotipo anti-infiammatorio con un ruolo importante nella down-regolazione dell'infiammazione e con la capacità di promuovere la riparazione tissutale, la clearance delle scorie e l'angiogenesi^{29,39-41}.

Recentemente il fenotipo M2 è stato, a sua volta, suddiviso in 3 categorie: M2a, M2b e M2c.

Il fenotipo M2a, definito alternativo o di rigenerazione, viene stimolato da citochine di tipo Th2, come IL-4 ed Interleuchina-13 (IL-13), che interagiscono con il recettore del mannosio espresso sulla superficie cellulare, con la conseguente produzione di citochine e chemochine prevalentemente anti-infiammatorie. L'espressione di molecole MHC II favorisce la presentazione dell'antigene e stimola i linfociti. Questo tipo di attivazione differisce dalla microglia M1 proprio per la scarsa produzione di citochine pro-infiammatorie e radicali liberi, è meno efficace nell'eliminare germi intracellulari, ma possiede buona capacità di risposta nelle infezioni da nematodi ed elminti^{39,40,42}.

Il fenotipo M2b, definito immuno-regolatorio, è implicato in complessi meccanismi di immuno-modulazione. E' attivato da numerosi stimoli, tra cui immuno-complessi ed agonisti dei TLR e di IL-1 β . Generalmente questo fenotipo viene espresso in seguito ad una doppia stimolazione, ovvero della secrezione dell'Interleuchina-10 (IL-10), che inibisce citochine pro-infiammatorie, e della riduzione dell'IL-12. Tale sottopopolazione, come il fenotipo M2a, può presentare l'antigene ai linfociti T ed è implicata in modo diretto ed indiretto nella gestione di infezioni batteriche, parassitarie o virali ^{39,42}.

Il fenotipo M2c, definito di disattivazione, stimolato da IL-10 e glucocorticoidi, svolge un rimodellamento della matrice extracellulare, aumentando l'espressione di proteine come la fibronectina ^{39,40}.

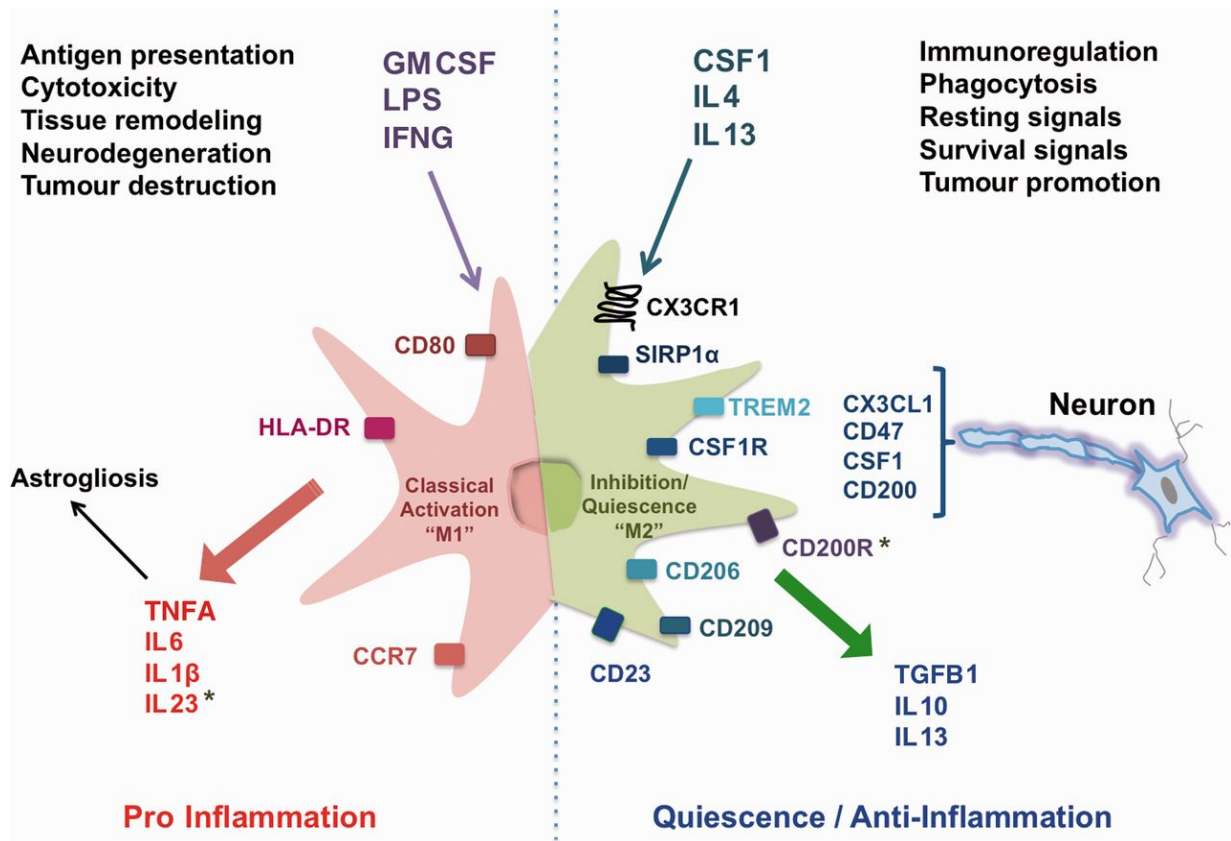


Figura 1. Fenotipi di attivazione microgliale.e tipi di citochine prodotti.

La microglia svolge dunque un importante ruolo di neuro-protezione caratterizzato dalla fagocitosi di patogeni e di detriti cellulari, attivazione dell'immunità acquisita, produzione di fattori trofici, promozione della neurogenesi e mielinizzazione^{29,40}.

In parallelo a tali effetti benefici, l'attivazione microgliale prolungata o sregolata può condurre a neuro-degenerazione. Le citochine pro-infiammatorie secrete dalla microglia di tipo M1 inibiscono, infatti, le comunicazioni tra gli astrociti, alterandone la funzione di supporto neuronale. I radicali liberi, inoltre, non solo uccidono i patogeni fagocitati, ma possono indurre ulteriore danno neuronale, diffusa gliosi e predisposizione neoplastica. Infine la popolazione microgliale attivata rilascia glutammato, responsabile dell'innesco dell'eccitotossicità e della morte di altre cellule gliali; tale fenomeno risulta ancora più dannoso nel cervello in via di sviluppo, particolarmente sensibile ai danni da eccitotossicità^{29,43} (vedi par. "il modello ibotenato come modello di eccitotossicità", pag 56).

Il fenotipo M2a, sostenendo la riparazione tissutale, può indurre fibrosi tissutale, accentuare risposte allergiche ed inibire la risposta immunitaria nei confronti di germi intracellulari. La microglia M2c, se attivata in modo abnorme, può favorire l'evoluzione di infezioni e di neoplasie²⁹.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'attivazione della microglia si modifica nel corso del tempo; nel cervello maturo; si assiste, infatti, ad una progressiva riduzione dell'espressione del fenotipo microgliale M2 con la conseguente maggiore predisposizione a sviluppare fenotipo M1 e, dunque, neuro-infiammazione⁴⁴.

Nelle differenti condizioni patologiche, l'attivazione microgliale è eterogenea e il ruolo del fenotipo pro-infiammatorio o anti-infiammatorio della microglia non è ben definito. Descrivere le funzioni effettrici della microglia ed in particolare il suo ruolo dicotomico nel processo infiammatorio, possiede il fine ultimo di poterne manipolare l'attività per influire sugli esiti di numerose condizioni patologiche^{38,45}.

Markers di attivazione microgliale

La microglia è caratterizzata da un'ampia varietà di molecole di superficie che ne permettono l'identificazione ⁴⁶. Tra questi, alcuni, come Iba-1 (ionized Calcium Binding Adapter Molecole 1), sono markers di attivazione aspecifica, mentre altri aiutano a distinguere i diversi fenotipi.

Sono stati, infatti, effettuati studi in vitro su linee microgliali pure primarie, sottoposte a stimoli pro- ed anti-infiammatori mediante pattern citochinici diversificati, con lo scopo di valutare l'espressione genica dei vari markers mediante Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). L'insieme delle molecole presentate dalla microglia stimolata con citochine pro-infiammatorie è stato definito appartenente al gruppo M1; i markers espressi in seguito a stimolazione anti-infiammatoria sono stati considerati di tipo M2 ⁴⁷. Segue una breve descrizione di tali markers, utilizzati in molti dei miei lavori.

Markers del fenotipo M1:

- *Nos2* (Ossido Nitrico Sintetasi 2), enzima citosolico che, utilizzando substrati come L-Arginina e specie reattive dell'azoto, produce ossido nitrico in risposta a stimoli pro-infiammatori ^{39,47}.
- *Ptgs2* (Cox2, Ciclo-Ossigenasi 2) appartiene alle ciclo-ossigenasi, enzimi che convertono l'acido arachidonico in prostaglandine ed ecosanoidi. La ciclo-ossigenasi 2, in particolare, è una forma inducibile e viene prodotta in risposta a stimoli pro-infiammatori ⁴⁷.
- *CD32/CD86*, markers pro-infiammatori espressi dalla cellula microgliale stimolata da assetto citochinico Th1. CD32 è un recettore di membrana espresso dalle cellule fagocitiche e svolge un ruolo nel processo di fagocitosi. CD86 interagisce con i linfociti T nell'attivazione della cascata infiammatoria ⁴⁷.

Markers del fenotipo M2a:

- *Arg-1* (Arginasi-1) enzima in competizione con NO sintetasi che, a partire dalla L-Arginina, sintetizza prolina e poliammine, favorendo la ricrescita cellulare, la produzione di collagene e down-regolando la produzione di ossido nitrico ³⁹.
- *CD206*, molecola di membrana che riconosce proteine legate a catene carboidratiche contenenti mannosio, è una lectina di tipo C. Si localizza nelle cellule macrofagiche e dendritiche, nei fibroblasti, nei cheratinociti e a livello cerebrale è espresso principalmente da macrofagi perivascolari e cellule del plesso corioideo. Ha un ruolo nel processo di endocitosi, nella presentazione dell'antigene a molecole MHC II e nella secrezione di citochine ⁴⁰.
- *IGF1* (Insuline Growth Factor-1) è un potente fattore mitogeno per la "resting" microglia dopo un insulto cerebrale. La sua espressione è influenzata da Gal-3; nel topo privato del gene che codifica per Gal-3 si assiste, infatti, ad una corrispettiva riduzione di IGF1 ⁴⁸.
- *Lgals3* (Lectin Galactoside-Binding, Soluble 3), è un gene che codifica per la Galectina-3, lectina che si lega ai galattosidi e che si localizza nelle cellule epiteliali e nelle cellule presentanti l'antigene. Da un recente studio è emerso che tale molecola non è espressa dalla "resting" microglia, suggerendo dunque un possibile ruolo di tale marker nell'attivazione microgliale. È stato inoltre dimostrato che i topi privati di questo gene presentano una ridotta proliferazione microgliale e sviluppano una lesione ischemica più estesa rispetto ai controlli nel modello murino di ipossi-ischemia perinatale ⁴⁸.

Markers del fenotipo M2b:

- *IL1-Rn* (Interleukin 1 Receptor Antagonist) gene che produce un antagonista del recettore di IL-1. Tale molecola è secreta da microglia, macrofagi, neutrofilo, cellule epiteliali, endotelio ed astrociti. Il ruolo di tale proteina è quello di contrastare la secrezione di IL-1.

L'alterazione del suo funzionamento può condurre a patologie auto-infiammatorie dove IL-1 viene prodotta in modo abnorme in risposta a lesioni cerebrali ⁴⁰.

- *IL4-Ra* (recettore a di IL-4), catena a del recettore condiviso da IL-4 ed IL-13, citochine che modulano un assetto anti-infiammato ⁴⁰.

- *SPHK1* (Sfingosino-chinasi-1), enzima che fosforila la sfingosina, componente della matrice cellulare e che permette di disattivare i macrofagi riducendone l'attività apoptotica ⁴⁷.

- *SOCS3* (Soppressore del Segnale Citochinico 3), è una proteina che down-regola la sintesi di citochine (IL-6, IL-12), della leptina e dell'eritropoietina ⁴⁰.

Microglia e insulti cerebrali

La microglia orchestra numerosi elementi della risposta infiammatoria e, proprio per questo, le ricerche si sono concentrate su tale aspetto di questa popolazione cellulare e sul suo ruolo nelle complicanze post-traumatiche ⁴⁹.

Microglia e trauma

Dopo un neurotrauma, la microglia residente si attiva, stimolata dai cambiamenti del mezzo intercellulare, assumendo forma ameboide e secernendo citochine ⁴⁹.

Gli studi autoptici su modelli animali e sull'uomo hanno evidenziato un'attivazione microgliale persistente per anni dopo un trauma cranico, dimostrata dall'aumentata espressione di molecole MHCII che correla con la parallela degenerazione della sostanza bianca repertata alle indagini strumentali ⁵⁰.

L'infiammazione cerebrale è stata studiata in vivo per mezzo della tomografia ad emissione di positroni che capta, mediante un ligando, una proteina espressa dal mitocondrio della microglia attivata. L'attivazione cellulare avviene pochi minuti dopo il trauma e, nel corso del tempo, scompare dall'area lesionata e persiste in strutture profonde, distanti ma

strettamente connesse ad essa. Questo potrebbe essere dovuto sia all'attivazione astrocitaria, che circonda l'area cerebrale alterata, isolandola, sia al diverso pattern recettoriale microgliale, nelle varie regioni cerebrali. L'entità dell'attivazione microgliale, inoltre, correla con il grado del danno cognitivo, spesso proporzionale alla lesione talamica ⁴⁹.

Come precedentemente descritto, il significato clinico dell'attivazione microgliale post-traumatica è ancora incerto, in quanto la risposta immunomediata ha in sé un potenziale sia benefico che dannoso. Da una parte, l'attivazione microgliale contribuisce alla riparazione tissutale e all'eliminazione dei detriti di scarto, dall'altra l'infiammazione prolungata può complicarsi con una sregolata risposta citotossica, con il danno neuronale e la predisposizione a patologie neurodegenerative ⁵¹.

Recenti ricerche hanno, dunque, come oggetto di studio il dicotomico stato di attivazione microgliale dopo un neurotrauma.

Nel traumatismo midollare è stato osservato che la microglia esprime, inizialmente, fenotipo pro-infiammatorio M1 e che tale modulazione persiste, nel sito della lesione, per numerose settimane. In parallelo al progressivo aumento delle citochine proinfiammatorie, vi è anche una transitoria, sebbene inferiore, attivazione M2 tra il terzo ed il settimo giorno dopo il trauma, che permane per circa 14 giorni. Questa cinetica di attivazione è confermata da altri studi che hanno documentato come l'attivazione microgliale e l'infiltrazione macrofagica sistemica avvengano nelle successive 12-24 ore dopo un trauma, con un picco massimo da 4 a 8 giorni dopo ^{39,51,52}.

Nel TC alcuni studi sembrano evidenziare un'attivazione microgliale inizialmente di tipo M2, seguita dall'istaurarsi di un'attivazione M1 nei giorni successivi. La produzione di Arg1 inizia dopo 24 ore dal trauma, è massima dopo 4 giorni e, dopo circa una settimana, si riduce. Parallelamente, dal terzo giorno, aumenta l'espressione di molecole proinfiammatorie, che

risultano infine predominanti. L'importanza dei danni a livello della sostanza bianca sembra essere correlata all'entità dell'attivazione microgliale di tipo M1 ^{39,51,52}.

In considerazione del dibattuto ruolo della microglia nella patogenesi di sequele post-traumatiche, sono attualmente in studio tecniche e molecole terapeutiche che possano modulare l'attività della microglia, con lo scopo di contrastarne gli effetti dannosi ³⁹. In *vitro* è stato dimostrato che è possibile polarizzare la microglia in senso pro- o anti-infiammatorio per mezzo di citochine come INF- γ ,

Tuttavia sembra che la microglia nel TBI esprima dei marcatori M1 ed M2 simultaneamente, ma che si distinguano per la loro produzione di arginasi 1 e chemochine ⁵¹. Inoltre, l'importanza dei danni a livello della sostanza bianca cerebrale sembrano essere correlati con l'entità dell'attivazione microgliale di tipo M1 predominante ⁵³. Inoltre, in modelli di topo senescente, in cui è noto che le funzioni microgliali sono differenti da quelle del giovane) il TBI induce un'attivazione microgliale più importante (sia di tipo M1 che M2) accompagnati da uno stress ossidativo, lesioni cerebrali e disturbi funzionali più importanti rispetto a quelli riscontrati nel topo di 3 mesi (giovane adulto).

L'utilizzo di neuroprotettori, come le cellule staminali multipotenti ⁵⁴ o l'utilizzo di WWL70, un inibitore selettivo dell' α/β *hydrolase domain 6*, che aumenta il tasso di 2-arachidonilglicerolo (endocannabinoide) il cui effetto neuroprotettore è noto ⁵⁵, nei modelli sperimentali di TBI si associava ad una modulazione microgliale verso il fenotipo M2 responsabile di un effetto neuroprotettore.

Altri protocolli che utilizzano cellule staminali multipotenti ⁵⁶, delle cellule staminali mesenchimali ⁵⁷, o anticorpi diretti contro IL-6 ⁵⁸, dimostrano un effetto neuroprotettore che potrebbe essere dovuto ad una modulazione dell'attivazione microgliale da un fenotipo M1 verso un fenotipo M2.

Microglia ed ischemia cerebrale acuta

Nell'infarto arterioso acuto, l'attivazione microgliale è classicamente considerata come deleteria a causa della produzione di citochine pro infiammatorie, radicali liberi, ed altre tossine ⁵⁹; un aumento della microglia si accompagna ad una compromissione della maturazione dei precursori oligodendrocitari responsabili di una corretta mielinizzazione, ancora in atto in epoca perinatale ⁶⁰, [...] ed una sua inibizione ha dimostrato essere protettiva in numerosi studi sperimentali ^{59,61}. Infine la caspasi-1 è espressa prevalentemente dalla microglia, e la delezione genetica di caspasi-1 comporta una riduzione del danno ischemico ⁶². Tuttavia dati recenti dimostrano che la microglia ha piuttosto un ruolo dualistico, che dipende dall'eterogeneità della popolazione microgliale, ma che varia nel tempo a seguito dell'insulto. Pare, infatti, che dopo un'iniziale fase pro infiammatoria, la microglia contribuisca più tardivamente ai meccanismi di riparo. Un'inibizione selettiva della microglia prima di un insulto ipossico-ischemico, anziché ridurre l'entità del danno, porta a un aumento dei livelli delle citochine pro infiammatorie cerebrali (probabilmente secrete dalle altre cellule cerebrali), e ad un aumento dell'area infartuata ⁶³.

L'utilizzo di un antagonista dei recettori cannabinoidi di tipo 2 (JWH-133) migliora le lesioni ischemiche ed induce l'attivazione microgliale, sia di tipo M1 che di tipo M2. Purtroppo, mentre la polarizzazione di tipo M2 sembra essere neuro protettrice in un modello organotipico di ippocampo, l'iniezione delle stesse cellule nel cervello 3 giorni dopo l'ischemia cerebrale *in vivo* non ha dato effetti ⁶⁴.

Questi dati indicano che almeno una sottopopolazione di cellule microgliali attivate agisce come "tampono" regolando la risposta pro ed anti infiammatoria indotta a seguito dello stroke.

I mastociti

Scoperti nel 1878 da Paul Erlich, i mastociti derivano dalle cellule progenitrici ematopoietiche provenienti dal midollo osseo. Contrariamente alla maggior parte delle cellule immunitarie, la differenziazione dei precursori mastocitari (mastopoiesi) può durare più mesi ed avviene direttamente in sede tissutale. I precursori, infatti, colonizzano i differenti organi e poi si differenziano. La loro distribuzione è ubiquitaria, con una predilezione per i tessuti in diretto contatto con l'ambiente esterno, come la pelle, i polmoni, il sistema digestivo, o i seni paranasali. La loro presenza nel SNC è nota da oltre 100 anni. I mastociti si localizzano nel parenchima cerebrale in corrispondenza delle zone perivascolari, e nelle meningi (Figura 2).

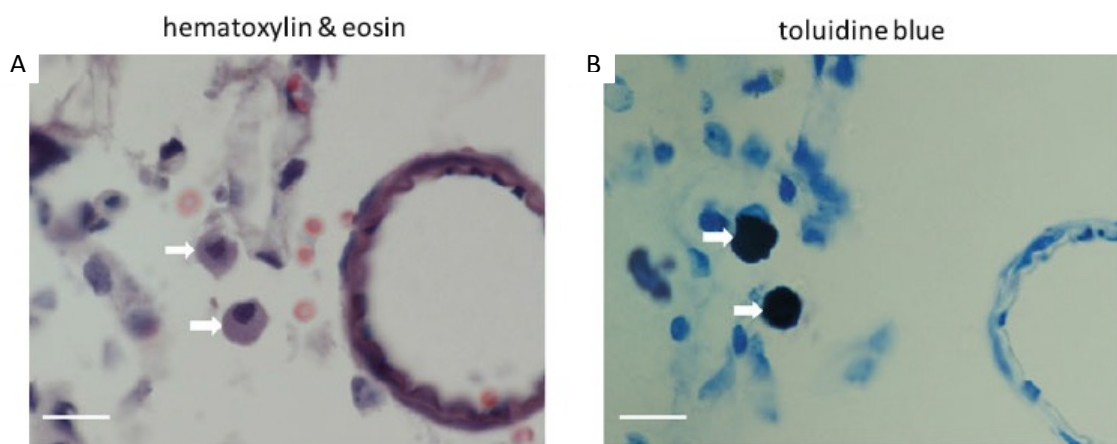


Figura 2: Mastociti (MCs) nelle leptomeningi delle formazioni ippocampali di un ratto. A: ematossilina-eosina. B: blu di toluidina. Dimensioni della barra: 15 μ m.

Nel topo esistono due tipi di mastociti: mucosi e sierosi. Il mastocita sieroso presenta numerosi e voluminosi granuli nel citoplasma. Si localizza preferibilmente nelle superfici sierose, come la pelle o la cavità peritoneale, e contiene, all'interno dei suoi granuli, eparina, triptasi, chimasi ed istamina. Il monocita mucoso, invece, presenta un nucleo cisellato e delle granulazioni fini. Si trova nella mucosa intestinale o nasale, ed i suoi granuli si caratterizzano per la presenza di chimasi e per la scarsa presenza di istamina ed eparina ⁶⁵. In contatto

diretto con il mondo esterno, essi formano una delle prime barriere da valcare per un antigene, mentre i mastociti sierosi sarebbero piuttosto localizzati a livello delle terminazioni nervose e dei vasi sanguigni.

Nell'uomo, i mastociti sono classificati in base al loro contenuto in proteasi: triptasi (T) o chimasi (C); I mastociti contenenti triptasi (MCT) sono un equivalente dei mastociti mucosi murini, mentre quelli contenenti chimasi (MCC) o triptasi/chimasi (MCTC) sono simili ai mastociti mucosi (vedi tabella 1).

Specie	Sottotipi di mastociti	Differenze nel contenuto di granuli
Roditori	Mastociti del tessuto connettivo (sierosi)	Eparina Istamina (elevate concentrazioni) Triptasi Chimasi Carbossipeptidasi A
	Mastociti mucosi	No eparina Istamina (a bassi livelli) chimasi
Umani	Mastociti triptasi chimasi (MC _{TC})	Triptasi Chimasi
	Mastociti triptasi chimasi (MC _T)	Triptasi
	Mastociti triptasi chimasi (MC _C)	Chimasi

Tabella 1: I mastociti (MC) nei roditori e negli uomini posso essere sottoclassificati in base alla loro localizzazione anatomica e/o al loro contenuto in mediatori⁶⁵

Le funzioni

I mastociti sono implicati nell'immunità innata ed acquisita, ed hanno un'azione di fagocitosi e battericida ⁶⁶.

Esistono più modi di attivazione mastocitaria (vedi figura 3) ⁶⁷

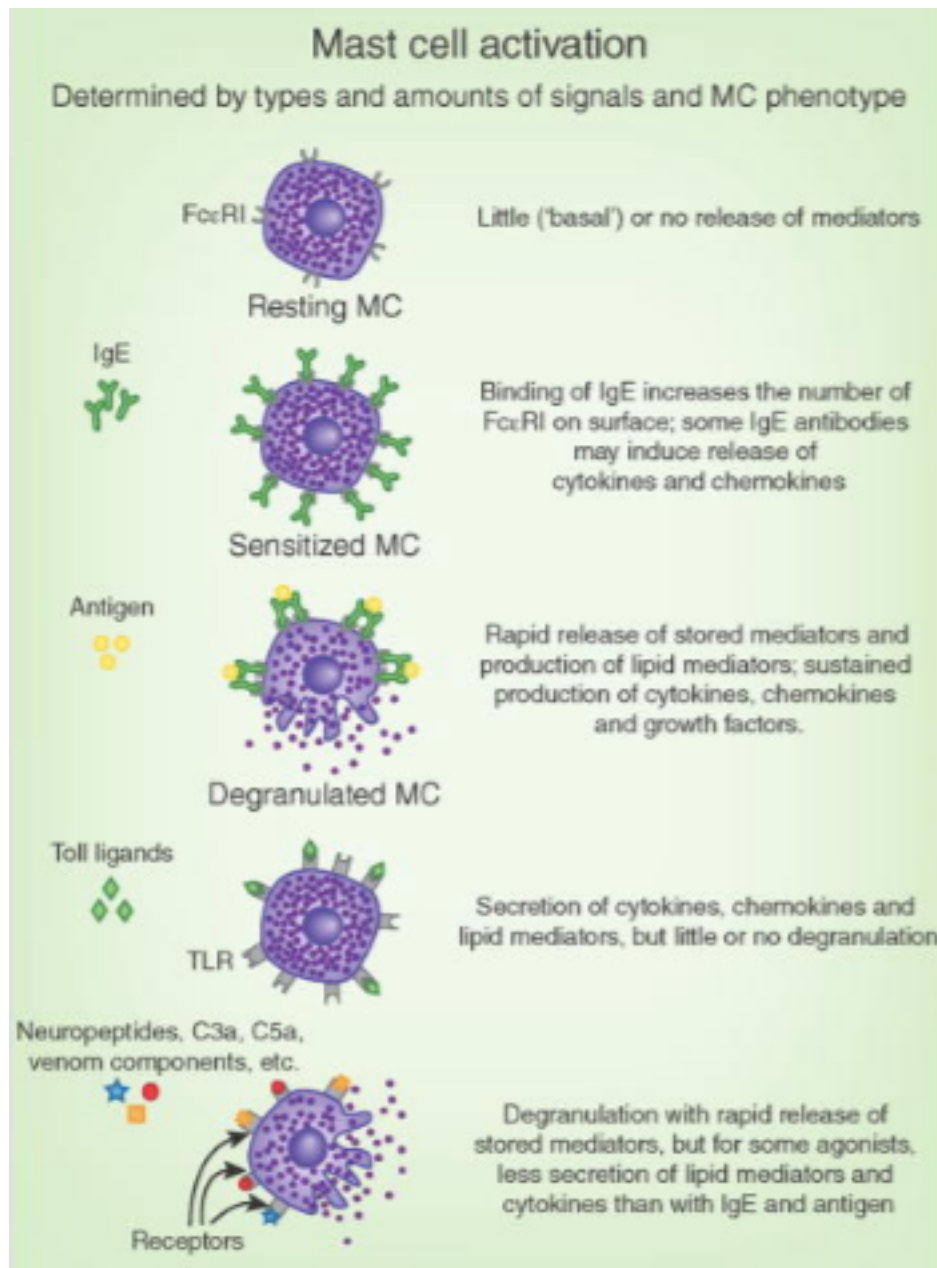


Figura 3: diiferente attivazione mastocitaria a seconda dello stimolo di attivazione, tratto da Galli et al. ⁶⁷.

In particolare, tre sono i fenomeni che si possono innescare: una degranulazione rapida, seguita da una sintesi rapida dei mediatori lipidici, ed, in un terzo tempo, una sintesi dei mediatori infiammatori citochinici⁶⁵. Per esempio, durante una reazione d'ipersensibilità immediata, le immunoglobuline IgE secrete si fissano sul loro recettore FcεRI e formano un ponte con l'antigene responsabile. Questa attivazione mastocitaria causa una degranulazione dei mediatori preformati contenenti TNFα⁶⁸, proteasi, istamina e proteoglicani. In un secondo tempo, l'attivazione provoca la sintesi di mediatori lipidici (prostaglandine e leucotrieni) e di citochine, chemochine e fattori di crescita.

Al contrario, se il mastocita è attivato da neuropeptidi o dal veleno della vipera, o dalle opsonine (frammenti del complemento C3a o C5a), la cellula degranula ma la sintesi degli altri mediatori sarà meno importante se non assente.

I mastociti possono infine essere attivati da microorganismi che si legano al Toll Like Receptor (TLR), e in tal caso non avviene la degranulazione, ma piuttosto la sintesi di citochine e mediatori lipidici

ii. Le altre cellule del SNC

Gli astrociti: rappresentano il tipo gliale predominante nel SNC. Nel SNC normale gli astrociti sono classicamente divisi in tre tipi, secondo la loro morfologia e localizzazione spaziale: astrociti protoplasmatici nella sostanza grigia, astrociti fibrosi nella sostanza bianca, e astrociti radiali nelle zone periventricolari. La up-regolazione della proteina gliale fibrillare acidica (Glial Fibrillar Acidic Protein, GFAP) e l'espressione ex-novo della vimentina a seguito di un danno sono utilizzati come indice di attivazione astrocitaria reattiva. Tale risposta è estremamente complessa, e nonostante l'abbondanza degli studi in merito, non ancora completamente chiarita⁶⁹. Inoltre, la credenza (derivata da evidenze in vitro) che le cellule astrocitarie fossero relativamente resistenti all'insulto si è completamente

ridimensionata negli ultimi decenni, e studi in vivo dimostrano che la morte astrocitaria precede la perdita neuronale e può aggravare il danno cerebrale. A seguito di un evento ischemico gli astrociti reattivi formano una intricata rete che delimita la lesione già a partire dalle prime 24 ore, e la loro attivazione perilesionale rimane elevata fino a un mese dopo l'evento, e le cellule GFAP-positive esprimono proteine proapoptotiche probabilmente responsabili del rimodellamento del citoscheletro. Le ricerche più recenti hanno però concluso che il ruolo degli astrociti in seguito ad un danno cerebrale, è consistente ma non primario nell'innesco e nel mantenimento della neuroinfiammazione a lungo termine^{69,70}.

La BBB e la neurovascular unit nella patologia del cervello in via di sviluppo

La Barriera Ematoencefalica rappresenta i meccanismi anatomici, fisico-chimici e biochimici che controllano gli scambi di materiale tra circolo sanguigno ed encefalo e tra circolo e liquor cefalorachidiano⁷¹. Le principali interfacce tra ambiente interno cerebrale e circolo sanguigno sono essenzialmente 5 (vedi figura 4): 1. La barriera ematoencefalica propriamente detta, che viene chiamata col termine inglese Blood Brain Barrier, BBB, e si trova a livello dell'endotelio dei capillari cerebrali; 2. L'aracnoide, una delle meningi cerebrali, che funge da barriera tra liquor dello spazio subaracnoideo e dura madre⁷²; 3. Il passaggio di liquor tra pia madre e glia verso lo spazio extracellulare cerebrale, molto più complesso a livello embrionale; 4. Il passaggio tra liquido cefalorachidiano (CSF) e parenchima cerebrale, che costituisce una barriera solo a livello embrionale, per la presenza di giunzioni specifiche, le strap junctions, che delimitano il liquor dei ventricoli dallo spazio extracellulare cerebrale e si trovano a livello del neuro endipima^{73,74}; 5. La barriera sangue-liquor, a livello dei plessi corioidei. Di queste 5 le più significative ed importanti a partire dal periodo perinatale sono sicuramente la BBB e la barriera sangue-CSF dei plessi corioidei. Tali barriere hanno ciascuna le sue proprietà, tanto che la concentrazione delle sostanze a

livello dell'interstizio cerebrale può variare enormemente rispetto alla concentrazione delle stesse sostanze a livello del CSF, la cui composizione è determinata dai processi secretivi attivi dei plessi corioidei. Per semplicità la maggior parte degli autori parlano di Blood Brain Barrier (o barriera Ematoencefalica) come dell'insieme di tutte queste strutture.

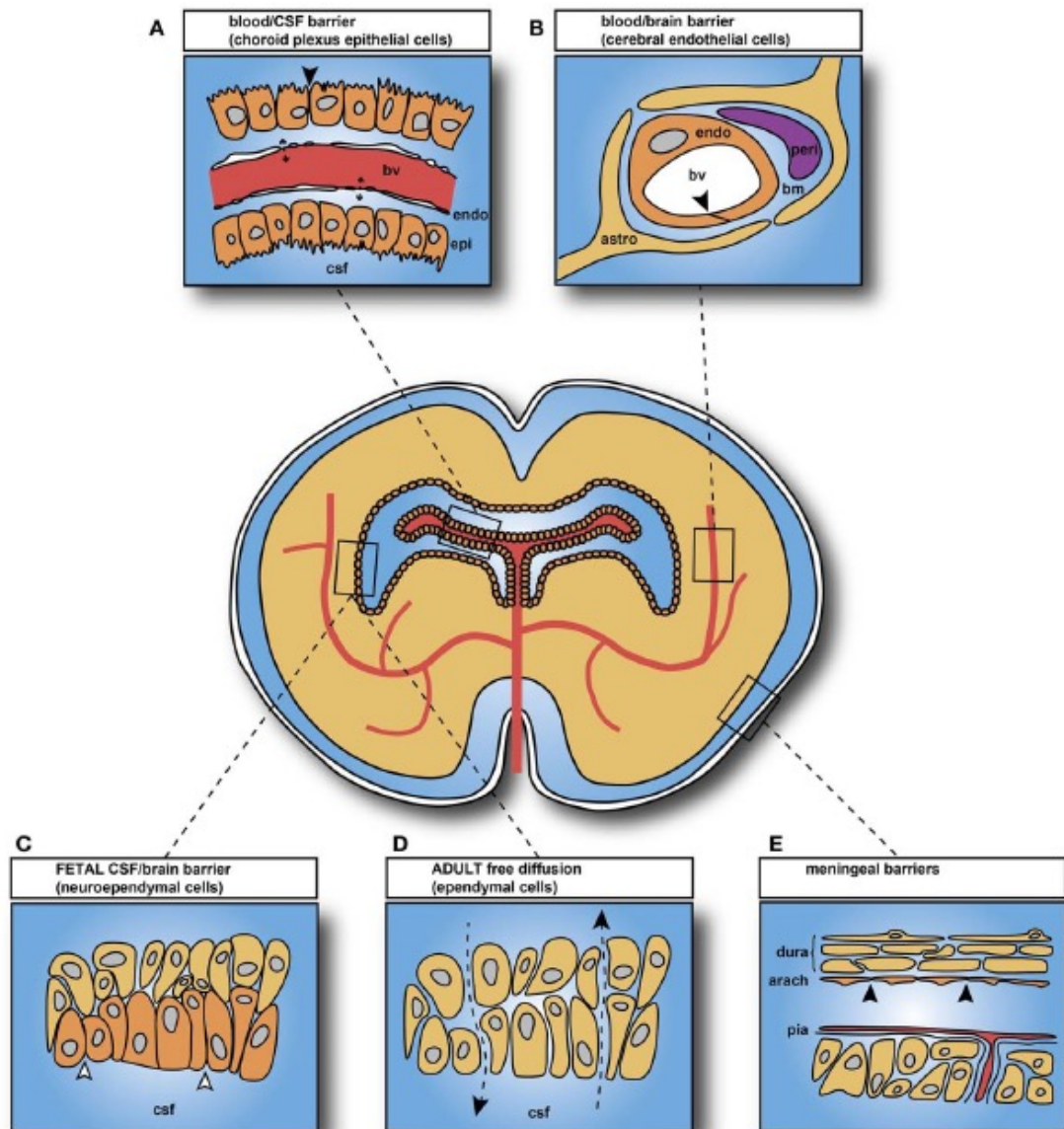


Figura 4: Rappresentazione schematica delle differenti Barriere Cerebrali: la barriera tra circolazione sistemica e liquor rappresentata dai plessi corioidei (A), la BBB vera e propria, tra capillari cerebrali e parenchima cerebrale (B), il neuroependima della circolazione cerebrale fetale (C), che non costituisce più una barriera nell'età adulta (D) e l'aracnoide a livello meningeo (E).

Funzioni della Barriera Ematoencefalica

Il ruolo della Barriera Ematoencefalica è quello di trasformare le proprietà di trasporto di una singola cellula in una interfaccia unica tra sangue e cervello (BBB) e tra sangue e liquor e grazie a ciò è in grado di (1) consentire un corretto sviluppo cerebrale attraverso pathways e signaling differenti a seconda delle differenti zone cerebrali e fasi dello sviluppo (2) forzare il traffico della gran parte delle molecole a prendere una strada transcellulare anziché paracellulare come avviene nella maggior parte degli epitelii, in modo da favorire (attraverso sistemi di trasporto specifici nelle membrane luminali ed abluminali) il trasporto di determinati nutrienti, ed escludere l'ingresso o facilitare la fuoriuscita di molecole potenzialmente nocive; (3) mantenere una precisa concentrazione ionica nel microambiente sinaptico ed assonale, critiche per il signaling neuronale (4) mantenere separati i pools centrale e locale di neurotrasmettitori minimizzando i danni neuroeccitatori o un'erronea stimolazione (5) mantenere il microambiente cerebrale "stabile" e non sottoporlo alle continue fluttuazioni ioniche, endocrine e metaboliche caratteristiche della circolazione sistemica, altamente influenzata dagli stimoli ambientali.⁷⁵⁻⁷⁷

Le caratteristiche che distinguono i vasi cerebrali da quelli extracerebrali, e che conferiscono alla BBB le sue proprietà strutturali, sono la presenza delle tight junctions, la presenza di una minor concentrazione di vescicole a livello del plasmalemma, e l'aumentato numero di mitocondri⁷⁸.

Le tight junctions

La Microscopia elettronica a trasmissione (TEM) evidenzia come le giunzioni tra cellule endoteliali cerebrali adiacenti siano caratterizzate dalla fusione degli orletti esterni delle membrane plasmatiche, ad intervalli che costituiscono delle strutture pentalaminari dette tight junctions o giunzioni occludenti. Tali strutture impediscono il passaggio dei soluti per via

paracellulare e sono situate nella zona più apicale del cosiddetto complesso giunzionale, che include anche la giunzioni aderenti (adherens junctions), situate più in profondità (vedi figura 5)⁷⁹. Numerose proteine compongono il complesso delle tight junctions. In breve, troviamo delle proteine transmembrana, che sono l'*occludina*, la famiglia delle *clodine* e quella delle proteine *JAM*. Esse sono situate sotto forma di dimeri o oligomeri a livello della membrana plasmatica, in aree, dette zattere lipidiche, caratterizzate da una composizione in colesterolo e sfingolipidi, dove è presente una concentrazione molto più elevata di proteine rispetto alla norma⁸⁰. L'*occludina* è una proteina di 60-65 kDa che forma dimeri che interagiscono in maniera omofilica, ed è costituita da due anse extracellulari, 4 domini transmembrana e sia il dominio amino-terminale che quello carbossi-terminale a livello del citosol. Il dominio carbossi (C)-terminale è in grado di legare la proteina *Zonula Occludens 1 (Zo1)*, vedi oltre). Sebbene sia stato dimostrato che la sua presenza non sia necessaria alla formazione delle TJs, la funzione principale dell'*occludina* pare essere quella di proteina regolatrice, agendo da tampone allo shock e mediando la risposta delle TJs a cambiamenti acuti delle dinamiche vascolari^{81,82}. È verosimilmente il suo grado di fosforilazione a determinarne l'associazione e la localizzazione sulla membrana endoteliale, essendo la sua forma più fosforilata legata ad una localizzazione membranaria e correlata con una intatta permeabilità della Barriera⁸². Le *clodine* sono una famiglia di proteine composte da almeno 24 membri, che contribuiscono alla formazione delle TJs. Sono più piccole dell'*Occludina* (20-24 KDa), ma hanno una conformazione simile, si localizzano sulla membrana sotto forma di oligomeri, e le loro due anse extracellulari interagiscono con quelle delle *clodine* della cellula adiacente, formando il primo "sigillo" delle TJ. Nella BBB l'espressione delle *clodine* sembra contribuire all'elevata capacità isolante propria delle membrane endoteliali^{77,83}. Tra tutte la *Clodina 5* sembra la più direttamente responsabile del mantenimento dell'integrità della barriera, com'è dimostrato dal fatto che topi knock-out per la *clodina 5* mostrano un perdita dell'integrità della Barriera

per molecole fino a 800 Da⁸³. Le molecole di adesione giunzionale, Junctional Adherens Molecules o *JAM A (JAM-1)*, *JAM B (JAM-2)*, *JAM C (JAM-3)*, sono presenti nelle cellule endoteliali cerebrali, presentano un solo dominio transmembrana e il loro segmento extracellulare forma una doppia ansa simile a quella delle immunoglobuline; Jam-1 in particolare sembra essere coinvolta nella stabilizzazione della membrana e nella riduzione della permeabilità paracellulare⁸². Le proteine transmembrana sono collegate al versante citoplasmatico attraverso una complessa rete di proteine di membrana che formano un ampio complesso proteico chiamato placca citoplasmatica. Le proteine coinvolte nella placca sono le *Zonuline (Zo1, Zo2 e Zo3)*, le proteine Serin-Kinasi Ca²⁺ dipendenti (CASK), le Guanilato Kinasi Associate alla Membrana con domini proteina-proteina invertiti (MAGI-1, MAGI-2, MAGI-3) le proteine difettive di partizione (PAR-3 e PAR-6) e le proteine multi-PDZ (MUPP1); tali proteine contengono svariati domini di interazione proteina-proteina e aiutano a collegare le proteine transmembrana ad una seconda classe di proteine della placca. Le zonuline in particolare sembrano legarsi con il loro dominio carbossi-terminale all'actina in vitro, fungendo quindi da molecola di riconoscimento per il corretto posizionamento delle TJ e da legame con il citoscheletro di actina. Sembrerebbe inoltre che queste siano implicate anche nel reclutamento delle proteine e nell'indirizzamento di queste verso la loro finale localizzazione sulla membrana⁸⁴.

L'interazione cellula-cellula a livello delle zone giunzionali, infine, è garantita dalle cosiddette *giunzioni aderenti (Adherens Junctions)*, che formano una cinta continua localizzata vicino all'orletto giunzionale apicale, subito al di sotto delle Tight Junctions. Tali barriere sembrano svolgere un ruolo di contenimento fisico e stabilizzazione delle TJ, e le *caderine* (es. *caderina 5*) sono le proteine più rappresentative⁸⁵ (vedi figura 5). Risulta interessante notare come recenti evidenze, riportate da A.Taddei et Al, dimostrino che la

caderina upregoli la clodina-5, suggerendo una interazione diretta tra Tight e Adherens Junctions⁸⁶.

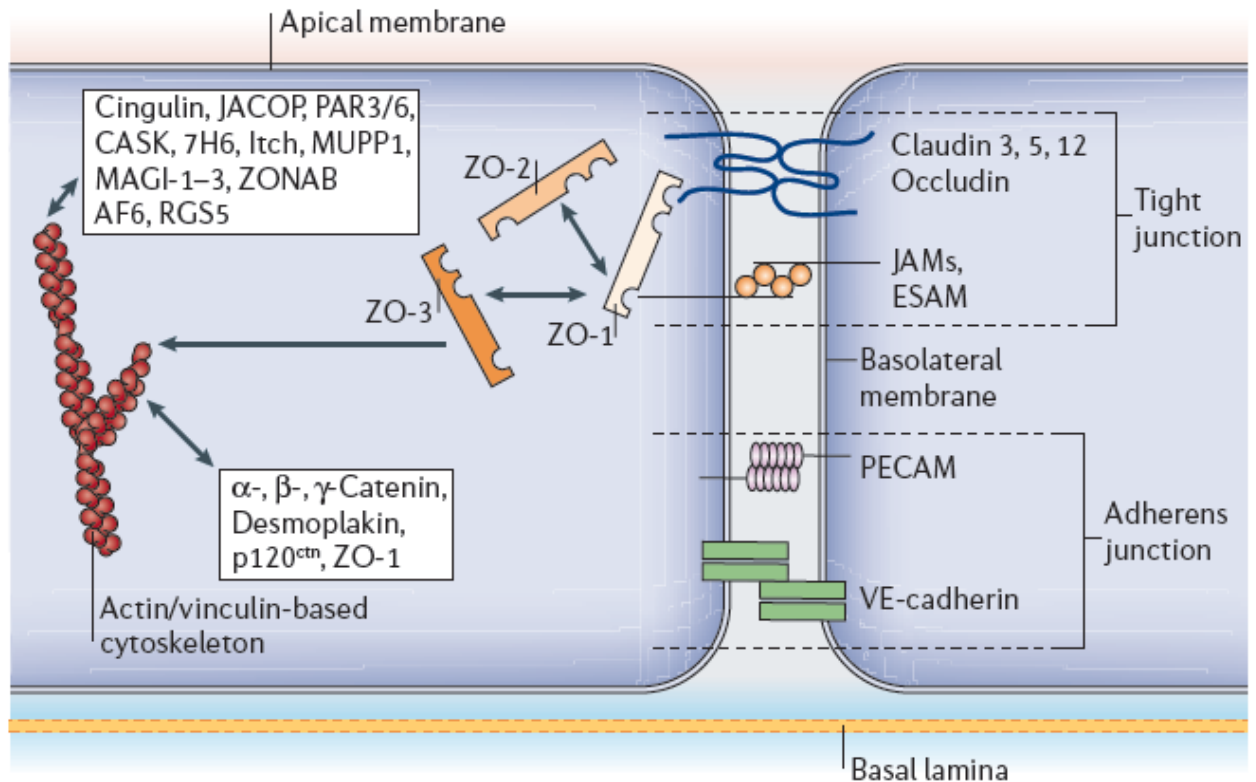


Figura 5: Rappresentazione schematica delle proteine costituenti le Tight Junctions e le Adherens Junctions. Occludine: Occludina, Clodine3,5,12: Clodina 3,5,12; JAMs: Junctional Adherens Molecules; ZO1,2,3: Zonula Occludens 1,2,3; cingulin: cingulina; JACOP: Junction-Associated Coiled-coil Protein ; MAGI: Guanilato Kinasi Associate alla Membrana con domini proteina-proteina invertiti;

La Barriera Ematoencefalica come “trasporto selettivo”

Il termine di “barriera” è un concetto in un certo qual modo fuorviante poiché la BBB, oltre a provvedere all’isolamento del Sistema Nervoso Centrale (SNC) dal circolo sistemico, garantisce anche una serie di meccanismi di afflusso ed efflusso tra i due compartimenti. Per comprendere appieno la rilevanza fisiologica della BBB dobbiamo dunque conoscere sia i meccanismi di barriera che mantengono le sostanze fuori dal SNC, sia i meccanismi di trasporto verso l’interno, che forniscono al cervello i nutrienti che necessita e che

provvedono a mantenere stabile l'ambiente ionico, condizione indispensabile al funzionamento cerebrale. Tali meccanismi sono largamente studiati e comprendono proteine di trasporto (carriers) per molecole specifiche, come il glucosio, gli aminoacidi ed alcuni farmaci, la transitosi mediata da recettori, come per l'insulina o la transferrina, e l'endocitosi e la transitosi non mediata, come avviene per l'albumina e altre proteine plasmatiche^{77,85,87}. Una buona parte dei soluti liposolubili è però in grado di diffondere autonomamente attraverso la membrana cellulare, con una velocità e facilità tanto più elevata quanto maggiore è il loro grado di liposolubilità. Questi soluti non si trovano nel liquor o nel parenchima ad una concentrazione proporzionale al loro grado di diffusibilità, e questo perché essi stessi o i loro soluti vengono attivamente rimossi da un altro tipo di trasporto selettivo altrettanto importante: il sistema di efflusso. Molti sono gli enzimi ed i trasportatori coinvolti in questo sistema.

Per quanto riguarda gli enzimi, troviamo, nel citosol delle cellule della barriera, gli *enzimi di fase I*, appartenenti alla famiglia dei Citocromi P450^{88,89} e gli *enzimi di fase II*, tra cui i più studiati sono rispettivamente la glutatione s-transferasi (che pare essere iperespressa nei plessi corioidei fetali⁹⁰), UDP-glucuroniltransferasi (UGTs), e 3-fosfadenosin-5-fosfosolfato sintasi e sulfotransferasi (enzimi SULT). Le molecole, dopo l'azione di tali enzimi, perdono la loro liposolubilità e, una volta espulse dalla cellula, non sono più in grado di re-diffondere attraverso la membrana.

Le proteine trasportatrici della famiglia delle ATP-Binding Cassette (ABC) svolgono il ruolo principale, presentano una bassa specificità nei confronti del substrato con un grado considerabile di sovrapposizione tra diversi recettori. La *glicoproteina-p* (*P-gp* detta anche *ABCBI*) è la più particolare in quanto il suo sito di legame è situato direttamente sulla membrana luminale dei vasi sanguigni cerebrali, ed intercetta il substrato liposolubile non appena questo supera il foglietto interno, e lo pompa all'esterno, immodificato. Tale proteina

pare essere molto meno rappresentata a livello dei plessi corioidi, suggerendo un ruolo minore di P-gp a livello della barriera sangue-CSF rispetto al suo ruolo nella BBB. Topi knock out per il gene *Mdr1a* (che codifica per *P-gp1a*) dimostrano essere 100 volte più sensibili all'invermectina, un pesticida neurotossico, e come evidenziano successivi studi, presentano livelli molto più elevati di tossine e svariati farmaci quali ciclosporina A, etoposide, digossina e desametasone^{91,92}. Al contrario le *Breast Cancer Related Proteins* (*BCRP* o *ABC-G2* o *P-gpg2*) seppur agendo in buona parte sugli stessi substrati delle ABCB, legano i substrati nel versante citosolico dopo che questi hanno attraversato la membrana plasmatica e sono stati modificati da enzimi di fase I e II, oppure si siano legati al glutatione o all'acido glucuronico. Tali proteine, scoperte per la prima volta in una linea cellulare di cancro al seno, da cui prendono il nome, sono espresse in maniera molto più importante nei plessi corioidi durante la vita fetale⁹³, con una successiva diminuzione in corso di sviluppo, probabilmente perché l'ipossia causa una loro sovraespressione (come dimostrano studi in vitro⁹⁴).

La BBB nel cervello in via di sviluppo

Senza la restrizione alla diffusione effettuata dalle Tight Junctions a livello delle barriere non sarebbe possibile stabilire meccanismi di controllo di afflusso ed efflusso come quelli che regolano il gradiente ionico tra sangue e liquor. Questo passaggio dal sangue al cervello e al liquor avviene per svariate molecole ed è noto essere presente già durante i primi stadi dello sviluppo cerebrale per un cospicuo numero di molecole importanti dal punto di vista metabolico, quali glucosio^{95,96}, aminoacidi⁹⁷ e ormoni⁹⁸. In uno studio del 2006 è stato inoltre analizzato il passaggio dell'albumina umana rispetto a quella bovina attraverso la barriera in del ratto in diverse età gestazionali, ed è stato in tal modo dimostrato che proteine considerate "endogene" e verosimilmente utili al cervello in via di sviluppo avevano un rate di ingresso attraverso la membrana molto superiore alle altre, avvalorando l'ipotesi che vi sia

un sistema di trasporto proteico “età specifico”⁹⁹. Una review molto completa del 2012 analizza lo stato dell’arte delle conoscenze sui sistemi di trasporto, sui meccanismi di passaggio transmembranario e paracellulare, sulle interazioni cellula cellula della neurovascular unit ed evidenzia come anche per la barriera di trasporto selettiva e per i sistemi enzimatici, valgano le considerazioni suddette⁸⁷. In conclusione la BBB, lungi dall’essere “incompleta”, è piuttosto adattata all’ambiente fetale. Svitati sono i meccanismi noti che evidenziano dei meccanismi feto-specifici differenti rispetto all’adulto, che riflettono l’adattamento dell’organismo alla vita fetale (es. l’emoglobina fetale). Allo stesso modo, in corso di sviluppo, la BBB sembra presentare delle differenze importanti rispetto a quella dell’adulto, soprattutto a livello dei sistemi di trasporto; tali differenze probabilmente sono meccanismi importanti per il cervello in via di sviluppo piuttosto che segno di immaturità¹⁰⁰.

Cenni di fisiopatologia

i. La fisiopatologia del danno ipossico-ischemico

Il cervello è un organo altamente vascolarizzato che riceve il 20% dell’apporto sanguigno, e un flusso medio di 100 ml/min/g di tessuto cerebrale. La sua caratteristica però, è che è dotato di una scarsa riserva energetica-funzionale, per cui ha bisogno di un continuo flusso sanguigno, per soddisfare le sue richieste metaboliche.

La circolazione arteriosa cerebrale

La circolazione cerebrale arteriosa si compone di tre arterie principali interconnesse tra loro che formano il poligono del Willis (Figura 6)¹⁰¹. L’arteria carotide comune (ACC) fornisce due rami: un’arteria carotide esterna (ACE) e un’arteria carotide interna (ACI). Le arterie carotidi interne vascolarizzano il cervello, le arterie vertebrali posteriormente formano il

tronco basilare (TB) che vascolarizza le strutture della fossa cranica posteriore (cervelletto, tronco cerebrale, mesencefalo). Il primo ramo dell'ACI è l'arteria oftalmica, successivamente vi è l'arteria cerebrale anteriore (ACA) che irrora anteriormente il lobo frontale. Dall'ACI, successivamente, origina l'arteria cerebrale media (ACM) o arteria silviana che percorre la superficie corticale lungo il solco rolandico. Essa vascolarizza la corteccia fronto-parietale. Posteriormente l'ultimo ramo dell'ACI è l'arteria comunicante posteriore che vascolarizza la corteccia occipitale e i nuclei grigi centrali. Il TB da luogo a numerose arterie cerebellari (superiore, media e inferiore) e all'arteria cerebrale posteriore (ACP) che vascolarizza la corteccia parieto-occipitale.

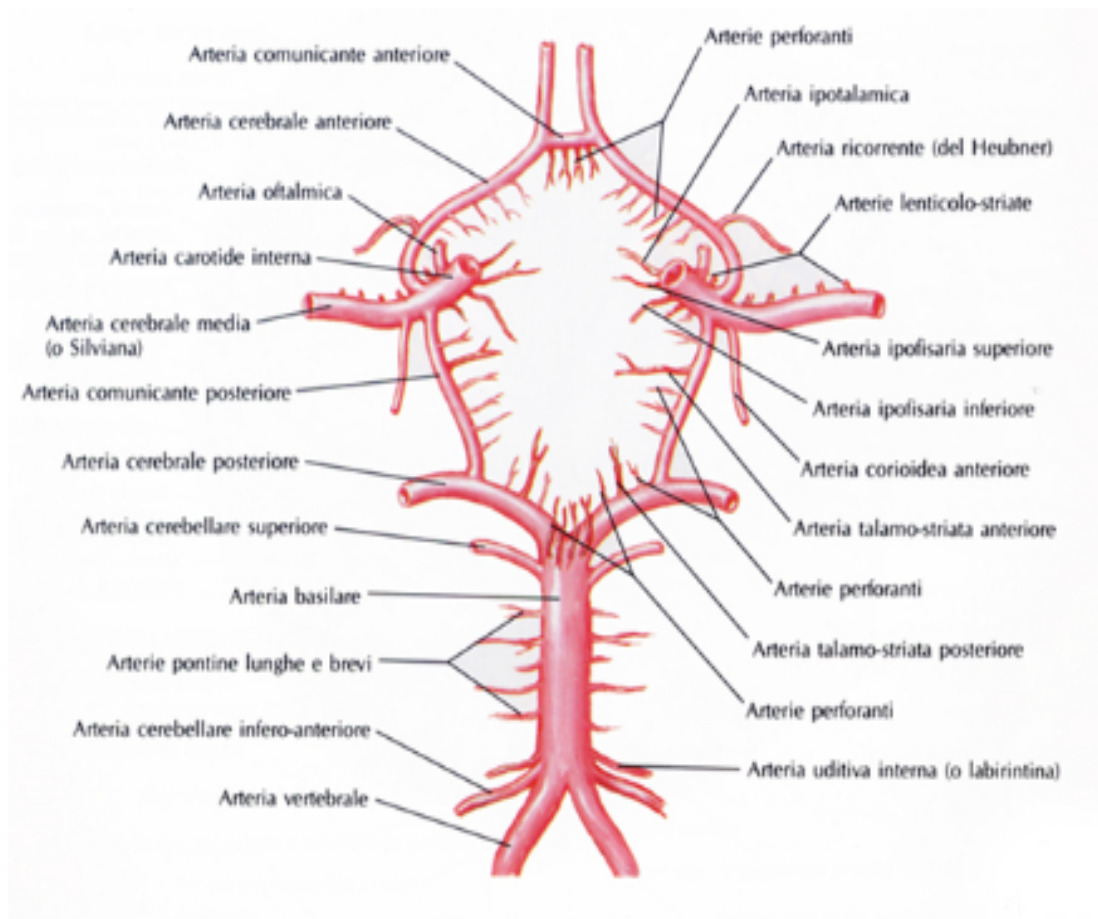


Figura 6: circolo cerebrale, poligono del Willis

Questa rete arteriosa si divide poi in arterie leptomeningee o piali che circolano lungo la superficie corticale. Le arterie piali possiedono un endotelio circondato da una parete muscolare liscia e da una innervazione perivascolare. Le arterie piali danno luogo a delle arteriole più piccole che penetrano nella corteccia a livello degli spazi di Virchow-Robin. Le arteriole e i capillari formano la microcircolazione cerebrale. La loro struttura istologica si compone di un endotelio circondato da uno strato di cellule muscolari lisce (arteriole) o da uno strato di periciti senza cellule muscolari lisce (capillari).

La circolazione cerebrale collaterale

Le anastomosi arteriose, o collaterali, costituiscono un sistema complesso di vasi, il cui ruolo è di poter supplire alla vascolarizzazione di un territorio cerebrale in caso di ischemia o ipoperfusione. Nel XIX secolo, Heubner fu il primo a descrivere l'esistenza di queste strutture tra l'ACA, l'ACM e l'ACP, chiamandole anastomosi leptomeningee. Esse sono costitutive ma possono anche svilupparsi in corso di processi ischemici cronici. Si distinguono i collaterali prossimali a livello delle arterie della circolazione cerebrale, i collaterali distali a livello delle arteriole e i collaterali che si trovano tra la circolazione intra ed extra cranica (figura 7) ¹⁰².

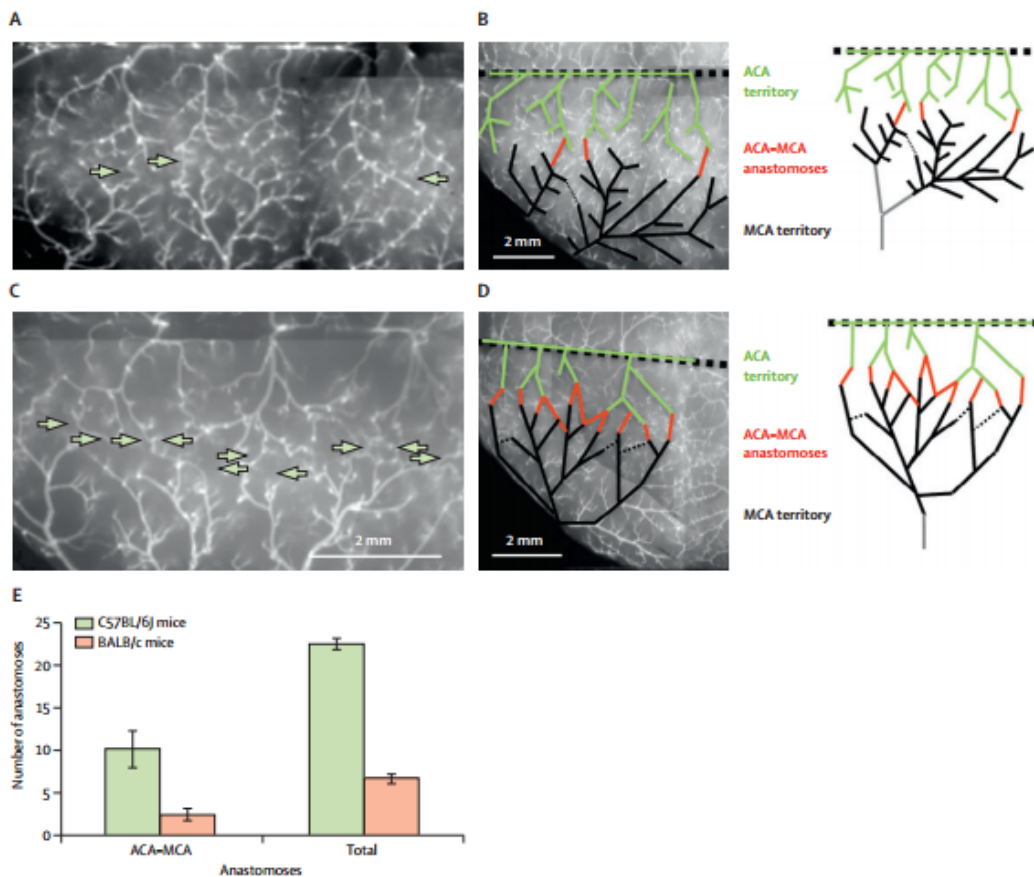


Figura 7: rappresentazione della microcircolazione cerebrale. Collaterali piali corticali tra le arterie ACA e MCA nei topi C57BL/6J con robusti vasi collaterali, contro topi BALB / c con minori collaterali. (A, C) Le anastomosi piali sono identificate dalle frecce. (B, D) Una tecnica-vessel tracing colore è stato utilizzato per quantificare la connessione piale nei topi C57BL/6J, (D) e quelli con meno collaterali piali (topi BALB / c, B). (E) Numero di collegamenti nelle due razze. ACA = arteria cerebrale anteriore MCA = arteria cerebrale media. Adattato da DeFazio e colleghi, 48 con il permesso di Springer.

La circolazione collaterale extracranica nasce dai rami della carotide esterna.¹⁰³ La circolazione collaterale intracranica prossimale si compone del poligono di Willis e fa comunicare la circolazione cerebrale anteriore (arterie carotidi interne) con quella posteriore e (arterie vertebrali e TB). Le ACA sono anastomizzate tramite un'arteria comunicante anteriore e le ACM e ACP tramite le arterie comunicanti posteriori¹⁰¹. A livello della fossa cranica posteriore, le arterie vertebrali si uniscono a formare il TB. Quest'ultimo dà luogo alle ACP e alle arterie cerebellari. I collaterali intracranici distali (arteriole piali) mettono in comunicazione dei rami dell'ACA con i rami dell'ACM, e dei rami dell'ACP con rami

dell'ACM. I collaterali dell'ACA suppliscono soprattutto ai rami superiori e anteriori dell'ACM; i collaterali dell'ACP suppliscono ai rami posteriori e inferiori dell'ACM¹⁰².

I vasi collaterali giocano un ruolo maggiore durante i processi ischemici poiché permettono di limitare la gravità dell'ipoperfusione. Per esempio in caso di occlusione dell'ACM, il flusso sanguigno può essere ridirezionato verso i collaterali distali, e per perfusione retrograda, ripristinare parzialmente l'apporto sanguigno tissutale del territorio silviano^{104,105}.

Il poligono del Willis è il fulcro anastomotico principale della rete arteriosa ma sembra che sia completo solo nel 25% dei pazienti^{106,107}. Lo studio dei collaterali in modelli animali deve tenere in considerazione le differenze anatomico funzionali specifiche della specie, cosa che rende a volte delicata l'estrapolazione all'uomo (Figura 7). Nel ratto per esempio, l'anatomia vascolare cerebrale differisce per la presenza di una sola arteria cerebrale anteriore¹⁰⁴.

Al di là dell'anatomia di questa rete anastomotica, altri fattori possono influenzare l'efficienza della rete collaterale durante l'ischemia. I lavori effettuati nell'animale mostrano il coinvolgimento di fattori come la variabilità interindividuale, la perfusione cerebrale, l'età, la presenza di un edema cerebrale, il modello sperimentale, la specie utilizzata e i fattori genetici^{104,108-110}. Tuttavia i modelli sperimentali di ACV mostrano una forte relazione tra il numero, la densità, il diametro dei collaterali e il volume lesionale^{111,112}.

Nell'uomo le tecniche moderne di imaging permettono di conoscere il reclutamento della rete dei collaterali durante l'ischemia. In corso di ischemia, il grado di reclutamento dei collaterali viene valutato attraverso l'angio-RMN¹¹³. È stato notato che l'entità del reclutamento è inversamente proporzionale al volume della lesione ischemica. Il doppler transcranico permette di studiare la qualità della perfusione delle arterie cerebrali. Silvestrini et al. hanno studiato questa riperfusione a 24 ore da una ACV ischemico conseguente ad una dissecazione

carotidea. I risultati hanno dimostrato che il numero dei collaterali reclutati è un fattore prognostico positivo per le sequele neurologiche a lungo termine ¹¹⁴.

La regolazione della perfusione cerebrale:

Il cervello ha messo in atto un certo numero di sistemi di regolazione e di protezione per limitare i rischi di riduzione brutale dell'apporto sanguigno cerebrale ¹¹⁵. La regolazione dell'apporto sanguigno è quindi sotto controllo della microcircolazione cerebrale, che integra numerosi livelli d'informazione (vasi sanguigni, neuroni, sinapsi, microglia, afferenze nervose perivascolari). Il compartimento intravascolare (globuli rossi, leucociti, piastrine, proteine della coagulazione) interagisce in maniera complessa con l'endotelio vascolare e partecipa anch'esso alla regolazione dell'apporto sanguigno cerebrale (Figura 8).

L'endotelio è un sito importante di sintesi di mediatori vasoattivi, in particolare la sintesi e liberazione di NO ¹¹⁶. I principali mediatori vasoattivi sintetizzati sono l'NO, le prostaglandine e l'endotelina ¹¹⁷. L'NO è sintetizzato grazie ad una NO-sintasi (NOS) di origine endoteliale (eNOS). Sono state messe in evidenza altre NOS: l'NOS neuronale (nNOS) e la NOS inducibile (iNOS). L'NO diffonde facilmente nelle cellule muscolari lisce. Agisce su una guanilato ciclasi che permette la sintesi di GMP ciclico (cGMP). Il cGMP è responsabile di un rilassamento della fibra muscolare liscia (pathway di PKG, apertura dei canali del K⁺, fuoriuscita di Ca⁺⁺) (Figura 9).

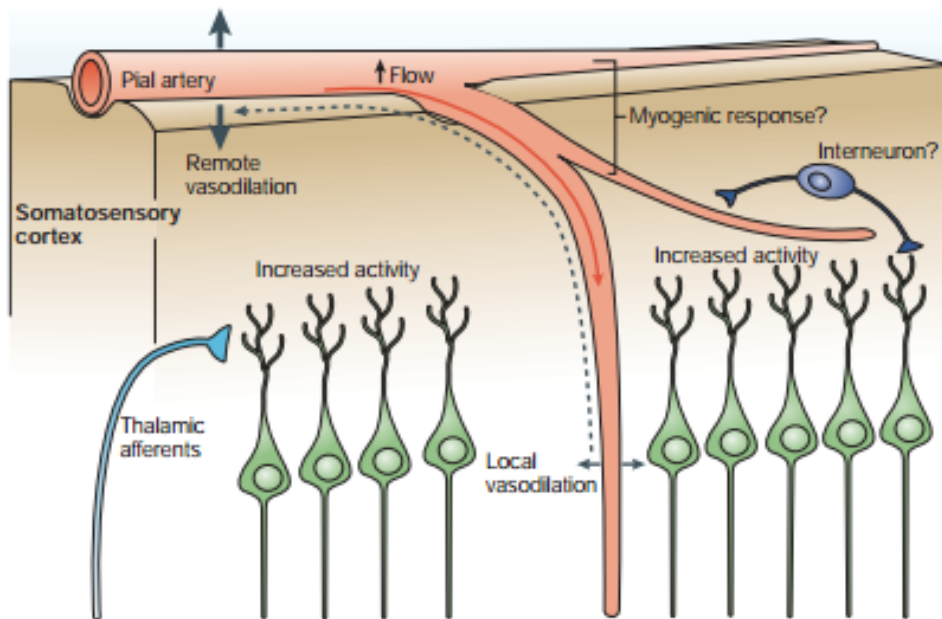


Figura 8: risposte microvascolari locali, propagate in seguito all'attivazione della corteccia somatosensoriale. L'aumentata attività presso il sito delle terminazioni delle afferenze talamiche produce vasodilatazione nei vasi dintorni (vasodilatazione locale), che poi si propaga a monte nella arterie piali, vasi di resistenza che controllano il flusso di sangue neocorticale. La dilatazione arteriosa piale aumenta il flusso sanguigno cerebrale in rami a valle, comprese quelle che forniscono il territorio attivato.

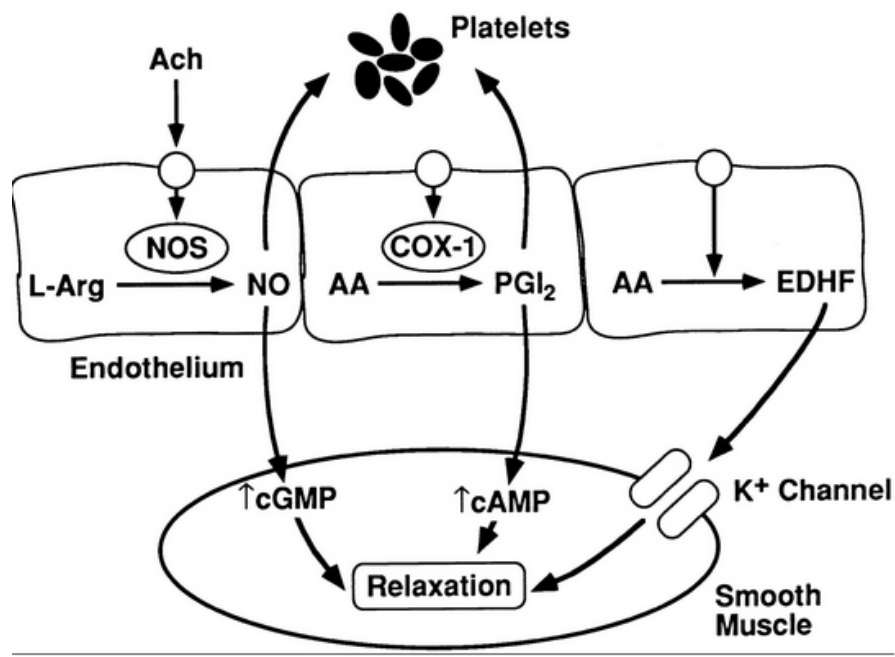


Figura 9: meccanismo d'azione dell'No e sua regolazione. Gli inibitori dell'NO bloccano questo effetto vasodilatatore¹¹⁸. L'NO è anche implicato nella trasmissione del segnale di vasodilatazione retrograda per diffusibilità verso le cellule endoteliali e le cellule muscolari lisce adiacenti.

L'acido arachidonico è un precursore di più mediatori vasoattivi come le prostaglandine. La Cox degrada l'acido arachidonico in prostaglandine PGE2 e PGI2. Questi mediatori sono diffusibili e inducono una vasodilatazione; infine l'endotelina (ET) è una sostanza vasoattiva anch'essa sintetizzata dalle cellule endoteliali. Possiede più isoforme di cui l'ET-1 è la forma più frequente a livello dei capillari cerebrali. In situazioni fisiologiche induce una vasodilatazione.

ii. La fisiopatologia del traumatismo cranico

Esistono differenze anatomiche tra l'encefalo e il cranio del bambino e quelli dell'adulto. L'elevato rapporto testa/corpo, tipico dell'età pediatrica, rende più frequente l'impatto del capo rispetto al resto del corpo. L'aumento della pressione intracranica è più tollerato nel lattante poichè le suture craniche non sono ancora saldate e le fontanelle non ancora chiuse. In età pediatrica si ha, d'altra parte, un'incompleta pneumatizzazione dei seni intracranici, una maggior flessibilità ossea, una fisiologica ipotonia della muscolatura assiale con una conseguente ridotta capacità di ammortizzare un trauma. Il contenuto d'acqua dell'encefalo è, infine, inversamente correlato al grado di mielinizzazione e questo rende il cervello in via di sviluppo meno compatto e dunque più esposto ai danni da accelerazione-decelerazione ¹¹⁹.

Il danno cerebrale primario si instaura al momento del trauma; può manifestarsi come danno diretto al parenchima, da impatto contro le protuberanze ossee del cranio o da lesione penetrante, oppure come danno da contraccolpo. Si può avere inoltre una lesione della sostanza bianca attraverso il meccanismo di accelerazione-decelerazione, che può provocare lesione assonale e quindi morte cellulare.

Il danno secondario è rappresentato da alterazioni infiammatorie e fisiopatologiche (formazione di radicali liberi, rilascio di neurotrasmettitori eccitatori come glutammato e

aspartato), che portano ad alterazioni nella microcircolazione cerebrale con danno citotossico, modificazioni morfofunzionali della barriera ematoencefalica, insorgenza di edema cerebrale e successivo danno ischemico secondario. Nel danno secondario sono compresi inoltre ipotensione, ipossia e ipercapnia, come possibile conseguenza di un danno diretto al SNC, oppure dovuti a shock in paziente con traumi multipli. Le lesioni secondarie sono a loro volta responsabili dell'amplificazione dell'evento iniziale ed, in particolare, di demielinizzazione, morte neuronale ed apertura della BEE ¹²⁰.

In letteratura sono stati ampiamente descritti gli esiti neurologici e le complicanze acute associate a TC severi; meno note sono invece le complicanze a lungo termine dei TC più lievi. I TC lievi e moderati sono molto più frequenti dei TC severi, dunque possono avere un impatto maggiore a livello di popolazione⁹.

Il TC nei primi 4 anni è gravato da esiti neurologici a distanza più severi che nelle successive epoche della vita. In particolare nel TC moderato e severo la precocità è correlata alla gravità degli esiti a distanza. L'impatto di un TC in un cervello in via di sviluppo sembra essere maggiore poiché interferisce direttamente con l'acquisizione delle abilità non ancora raggiunte, alterando processi di memorizzazione, apprendimento e funzioni cognitive. Anche i TC lievi possono essere associati a disturbi dell'apprendimento e a problemi comportamentali come il Deficit di Attenzione ed Iperattività^{5,121}.

Barriera emato-encefalica e trauma cranico: Recenti ricerche hanno rinnovato l'interesse per lo studio della BEE, ipotizzando che essa possa giocare un ruolo chiave nella patofisiologia di alcune condizioni neuropatologiche, in particolare nel cervello in via di sviluppo ¹⁰⁰.

Come precedentemente descritto, un TC è caratterizzato da un danno primario, dovuto all'impatto diretto di una forza applicata al tessuto nervoso, e da un danno secondario, che

perdura nel tempo, amplifica il danno primario e comprende edema cerebrale, aumento della pressione intracranica, ipoperfusione tissutale ed innesco della cascata infiammatoria¹²².

L'importanza dello studio della BEE dopo un neurotrauma nasce dall'evidenza che la barriera possa svolgere un ruolo chiave in acuto nello sviluppo dell'edema cerebrale posttraumatici (annesso II, Moretti et al, Brain edema in developing brain disease); tuttavia, recentemente si è posta sempre maggiore attenzione alla barriera come porta d'ingresso delle cellule immunomodulatrici e di molecole infiammatorie sistemiche, responsabili del processo neuroinfiammatorio post-traumatico, ritenuto responsabile del mantenimento del danno cerebrale nel tempo e dello sviluppo di complicanze a lungo termine⁷².

In seguito all'evento acuto si verifica un danno vascolare con la conseguente compromissione dell'integrità di barriera a livello fisico, metabolico e di trasporto¹²². A tale danno diretto di TJ, membrana basale, astrociti e periciti si associa anche un'aumentata espressione, da parte della cellula endoteliale, di trasportatori di citochine pro-infiammatorie^{50,72}.

In letteratura è stata descritta un'apertura della BEE, mediante il blu di Evans o l'immunomarcaggio IgG dopo alcune ore dal trauma, e un aumento della permeabilità contribuisce alla formazione dell'edema. A lungo si è ritenuto che tale apertura fosse un fenomeno transitorio della durata di circa una settimana. Recentemente invece alcuni studi hanno dimostrato che, in un modello d'ischemia, la BEE può restare aperta fino a 30 giorni dall'evento. E' stata descritta, inoltre, in un modello TC, un'apertura di BEE bifasica con un iniziale aumento di permeabilità alcune ore dopo il trauma ed un'apertura ritardata a distanza di 3-7 giorni¹²³.

A livello delle TJ, è stata osservata una riduzione della Claudina-5 nei primi due giorni dopo un trauma, seguita da una sua iperespressione nelle due settimane successive, parallelamente alla riparazione della barriera. Non ci sono studi che descrivano il comportamento post-

traumatico di altri costituenti del complesso giunzionale di membrana, come la proteina Zo-1 o le proteine JAM¹²³.

Il passaggio dal circolo di molecole infiammatorie e di cellule immunomodulatrici sistemiche, come monociti circolanti e neutrofilii, da una parte induce fenomeni riparativi, dall'altra esacerba il processo di neuroinfiammazione. In modelli di topo adulto, dopo 12 ore dal trauma si verifica un'infiltrazione leucocitaria che amplifica il processo infiammatorio^{50,72,123}.

Le alterazioni della NVU, soprattutto nel cervello in via di sviluppo, favoriscono l'accumulo di proteine aberranti che persistono nel tempo e che inducono processi degenerativi. Le molecole maggiormente responsabili di tale fenomeno sono la proteina P-gp e la proteina ABCA1; nei topi knock-out per il corrispettivo gene di P-gp, si verifica un accumulo di proteina α/β amiloide¹²³.

Habgood et al. hanno descritto che, nelle prime ore dopo un TC, si documenta un'aumentata permeabilità di barriera per molecole di piccole e grandi dimensioni. Dopo 5 ore viene ripristinata la selettività per molecole più grandi, mentre la permeabilità a molecole di piccole dimensioni (280-10000 Da) persiste per 4 giorni¹²⁴.

Il ruolo della BEE nel processo post-traumatico nel cervello in via di sviluppo non è ancora completamente chiaro, in considerazione dei differenti meccanismi di trasporto, dei peculiari sistemi giunzionali e della diversa espressione enzimatica.

Descrivere le tempistiche e le modalità con cui avvengono le modificazioni della BEE dopo un neurotrauma ha lo scopo non solo di identificare la finestra temporale in cui il SNC è a maggior rischio di danno secondario, ma anche di individuare i meccanismi e il timing con cui i farmaci hanno maggior probabilità di penetrare nell'encefalo⁷².

iii. L'eccitotossicità

L'eccitotossicità è la morte cellulare conseguente ad un eccesso di calcio intracellulare, da prolungata attivazione dei canali voltaggio-sensibili associati agli aminoacidi eccitatori. Gli aminoacidi eccitatori implicati sono l'adenosina ma soprattutto il glutammato. I recettori per il glutammato sono overespressi in corso di sviluppo pertanto ogni fluttuazione anche lieve di questo neurotrasmettitore può creare conseguenze importanti¹²⁵. Il danno ischemico porta ad un eccesso di glutammato extracellulare derivante da varie fonti, quali gli assoni danneggiati intra e perilesionali, l'inversione del verso del trasportatore di glutammato nei preOL (dovuto al mancato funzionamento della pompa Na⁺/k⁺), il glutammato derivato dagli astrociti¹²⁶ ed un ridotto reuptake di questi ultimi dovuto ad una carenza di ATP¹²⁷. Un'altra potenziale fonte di glutammato può essere durante l'infiammazione la potente inibizione del trasportatore del glutammato da parte del TNF α e dell'IL1 β . Il principale meccanismo di tossicità del glutammato è quello recettore/dipendente. Il più studiato è il recettore acido 3-idrossi metil 4-isoxazosil propionico e kainato (AMPA/Kainate), la cui stimolazione prolungata indotta dal glutammato in eccesso porta a morte cellulare tramite un'ulteriore influsso di calcio all'interno della cellula. Più recentemente è stato identificato un secondo tipo di recettore, il recettore N-Methyl-D-Aspartato (NMDA), che si trova nei pedicelli degli oligodendrociti. Il ruolo fisiologico di tali recettori sarebbe quello di fornire, a concentrazioni extracellulari di glutammato fisiologiche, un signaling oligo-assonale indispensabile per la produzione della mielina. In seguito ad eccesso di glutammato, tuttavia, il loro ruolo diventerebbe patologico, portando alla perdita dei processi terminali degli oligodendrociti se attivato eccessivamente¹²⁸. Tali affermazioni possono spiegare il danno alla sostanza bianca periventricolare causato in modelli murini e di coniglio da parte dell'Ibotenato, un analogo del glutammato selettivo per i recettori NMDA (vedi oltre). Non solo: l'eccitotossicità agisce,

in concomitanza con altri fattori, anche nel trauma cranico e nell'ischemia cerebrale acuta, come citato nei vari capitoli dedicati.

I modelli sperimentali per lo studio delle patologie del SNC

I vari modelli animali di HI e quello usato nel mio studio.

I modelli animali di encefalopatia ipossico/ischemica che utilizzano roditori di laboratorio, si riferiscono in maggioranza all'induzione acuta di un evento ipossico/ischemico nella fase postnatale, con l'obiettivo di produrre danni neurologici maggiori, e di caratterizzarne i meccanismi patogenetici. La tecnica descritta da Levine nel 1960 per indurre un'ischemia cerebrale nel ratto adulto, è stata modificata e applicata al ratto neonato da Rice: ratti di 7 giorni di età venivano sottoposti in anestesia a legatura unilaterale dell'arteria carotidea e in seguito esposti per tre ore a una miscela di O₂ all'8%. I piccoli venivano sacrificati 48 ore dopo l'induzione dell'insulto ipossico/ischemico, e il cervello esaminato per la valutazione di alterazioni morfologiche¹²⁹. Nonostante le conoscenze acquisite, e la relativa riproducibilità dei modelli d'ischemia utilizzati, rimane una importante variabilità nella taglia della lesione e nelle aree di cervello danneggiate non solo inter-specie ma anche tra campioni di uno stesso esperimento. Come nel neonato, esiste, infatti, un'estrema eterogeneità nella risposta all'ischemia, che può essere spiegata dal grado di sviluppo cerebrale dell'animale utilizzato, e dallo stadio emodinamico del cervello in quella specifica specie a quella specifica età. Nel corso del tempo, sono stati effettuati studi che hanno permesso di comparare molte specie animali, con lo scopo di studiare i diversi aspetti della neurogenesi¹³⁰.

Gli animali utilizzati maggiormente e comparati per lo studio del danno ipossico-ischemico neonatale sono :

- Ratto P7 (settimo giorno del periodo neonatale): corrispondente al neonato/feto nella prima parte del 3° trimestre.
- Ratto P14 e topo P12: corrispondente al neonato a termine.

A P10 corrisponde il picco di proliferazione endoteliale, il periodo che va tra il P18 e il P21 corrisponde all'aumento di densità vascolare, mentre nel periodo P15-P25 si raggiunge un plateau nella formazione dei collaterali.

Per quanto riguarda la vascolarizzazione cerebrale, in tutte le specie ci sono 2 arterie carotidi e 2 arterie vertebrali che contribuiscono al flusso cerebrale. Solo che quanto queste sono interconnesse tra loro e quanto l'una supplisca all'eventuale danno dell'altra, è molto variabile¹³¹.

Modelli di ipossi-ischemia:

Modello Rice Vannucci: questo modello, come già anticipato, è ottenuto con l'occlusione permanente di un'arteria carotide comune e l'esposizione in una camera all'8% di ossigeno. Il modello utilizzato è lo stesso per i ratti e per i topi, in particolare per questi ultimi, il modello Vannucci è stato trasferito su topi nei vari stadi evolutivi, ottenendo:

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| I. Topo: | Topo P7 (Derugin 1998) |
| | Topo P8 (Oshima 2012) |
| | Topo P9-P10 (Hagberg 2004) |
| | Topo P12 (Tsuji 2013) |
| II. Ratto: | Ratto P7 (Vannucci) |

Analizzando i risultati ottenuti in termini di estensione della lesione, è stato visto che l'occlusione della carotide comune da sola non sarebbe sufficiente ad indurre una lesione ischemica nel ratto, ad indicare una ottima compensazioni circolatoria in questa specie.

Modelli di ischemia:

- I. **Ratto:** Ratto P7 (Renolleau 1998)
Ratto P10 (Mitsufuji 1996)
Ratto P7 (Derugin 1998)
Ratto P14-P18 (Ashwal 1995)

Questi modelli hanno tutti utilizzato l'occlusione temporanea della CCA più l'occlusione definitiva dell'arteria cerebrale media (MCAo) (RENOLLEAU), o l'occlusione della biforcazione tra carotide esterna e interna (DERUGIN ASHWALL). Proprio grazie alla capacità compensatoria del ratto, è necessaria l'occlusione di entrambe le arterie per creare una riduzione del circolo, sufficiente perché le anastomosi che si creano col circolo di Willis non siano efficienti e si crei la lesione.

- II. **Topo:** Topo P9 (Tsuji 2013)

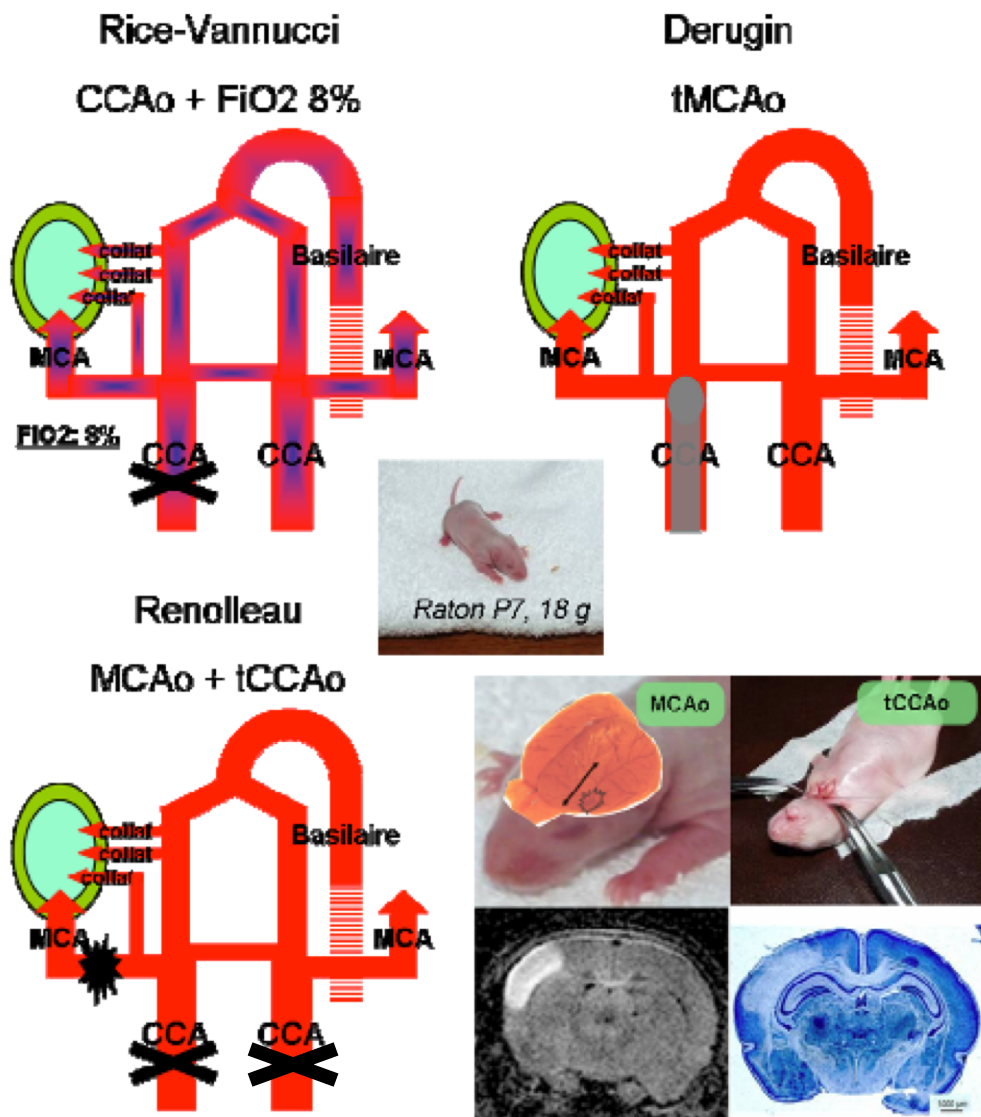
Non tutti i ceppi di topi hanno questa suscettibilità. Nel modello Tsuji 2013 sembra essere sufficiente la sola occlusione permanente della MCA per creare un danno ischemico riproducibile e costante in topi C57Bl/6, mentre un altro sperimentatore dello stesso gruppo di Tsuji, Taguchi, nel 2010, ha dimostrato che lesioni riproducibili con sopravvivenza aumentata, erano possibili con topi CB-17 e SCID ma non con topi C57BL/6.

Dalla descrizione appena fatta, si evince che i ratti e i topi hanno caratteristiche differenti dal punto di vista emodinamico. Tali differenze sono state a lungo studiate e alcuni studi sono ancora in corso.

Modelli utilizzati nel nostro laboratorio:

Sulla base delle considerazioni suddette, nel nostro laboratorio i modelli utilizzati sono essenzialmente 4 (vedi figura 10).

L'ultimo, derivato dal modello iniziale di Tsuji, è quello utilizzato per il mio lavoro.



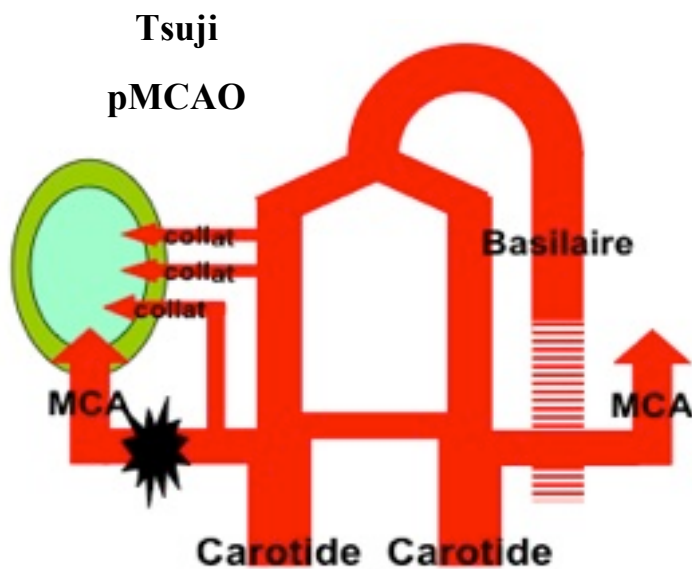


Figura 10. Rappresentazione schematica dei quattro modelli classicamente utilizzati nel nostro laboratorio. L'ultimo, che consiste nell'utilizzo della sola occlusione permanente dell'arteria cerebrale media nel topo a 9 giorni di vita, è quello utilizzato per il mio lavoro.

I vari modelli animali di TBI e il modello utilizzato nel mio studio

I modelli in vivo più utilizzati sono i seguenti:

Modelli di caduta di un peso

Questo modello consiste nel far cadere un peso per gravità sul cranio dell'animale. Svariati fattori permettono di modificare l'intensità del traumatismo cranico, ad esempio la dimensione dell'impactor, il suo peso, e l'altezza dalla quale esso viene lasciato cadere ¹³². Inoltre tale peso può essere lasciato cadere in contatto diretto con il cranio (a cranio chiuso), o con la dura madre (cranio aperto), a seconda che l'esperimentatore abbia effettuato o meno la craniotomia. In questi modelli è da tenere in considerazione un certo rischio di decesso post-traumatismo dovuto essenzialmente al rischio di arresto respiratorio.

I modelli attuali di caduta di peso derivano da tre modelli storici:

- Modello di Feeney, nel quale un peso cade sulla dura madre provocando una contusione corticale localizzata con emorragia e lesione della barriera emato-encefalica ¹³³

- Modello di Shohami, nel quale un peso cade lateralmente su un lato della calotta cranica producendo danni simili a quelli del modello precedente ¹³⁴

- Modello di Marmarou, nel quale una placca in acciaio è fissata sulla linea mediana della calotta cranica, ed un peso viene fatto cadere su di esso, attraverso un tubo in plexiglass. Questo modello permette di generare delle lesioni diffuse (rispetto alle lesioni focali dei due modelli precedentemente descritti), ed in particolare delle lesioni assonali diffuse ¹³⁵.

Modelli di percussione laterale o mediale da fluido (Fluid Percussion Injury)

La percussione da fluido consiste nel proiettare un liquido sotto pressione attraverso un orifizio in contatto con la dura madre, o sulla linea mediana (percussione mediale) ¹³⁶ o più localizzato (percussione laterale) ¹³⁷. Questa proiezione è generata da un peso legato ad un pendolo che percuote il pistone di una siringa riempita di liquido e che andrà a deformare la dura madre corrispondente. Le lesioni generate sono focali (percussione laterale) o diffuse (percussione mediale). Questo modello genera una contusione o un'emorragia intracranica associata ad un edema cerebrale. L'entità delle lesioni è inoltre modulabile e dipende dall'importanza della pressione iniziale generata.

Modelli di impatto corticale controllato (Controlled Cortical Impact)

In questo modello il trauma necessita di un impactor rigido guidato da un sistema pneumatico o elettromagnetico per generare una deformazione una deformazione della dura madre ¹³⁸. Le lesioni indotte consistono in una perdita neuronale, in un ematoma subdurale, in delle lesioni assonali, in delle contusioni cerebrali, ed in una disfunzione della BBB. Il

sistema permette un controllo meticoloso dell'intensità del traumatismo regolando la velocità e la durata dell'impatto, e di conseguenza l'importanza della deformazione. Inoltre, a differenza dei modelli per caduta di peso, si abolisce il rischio di avere una seconda lesione da rimbalzo dell'impactor¹³⁹. Tale tipo di traumatismo può essere localizzato ad uno dei due emisferi, ed indurre una lesione focale, o al contrario, se effettuato sulla linea mediana, generare delle lesioni diffuse.

Modelli di lesioni criogeniche

Questo modello induce una lesione cerebrale grazie all'applicazione sulla dura madre o sulla calotta cranica di un filamento ghiacciato; l'importanza della lesione è proporzionale alla durata del contatto del filamento con i tessuti¹⁴⁰. La lesione focale generata provocherà una distruzione della barriera ematoencefalica e la formazione di un edema citotossico e vasogenico. Seppur non producendo lesioni assinali diffuse (che si trovano invece frequentemente nell'uomo) questo modello ha il grosso vantaggio dell'estrema riproducibilità.

Tali modelli provocano lesioni differenti e riproducono più o meno fedelmente ciò che avviene a seguito di un traumatismo cranico nell'uomo. La tabella 2 schematizza questi differenti aspetti.

	Contusione	Lesioni assonali diffuse	Emorragia intracranica	Frattura del cranio
Caduta di un peso a cranio chiuso (Sohami/Marmarou)	++	+++	++	+
Caduta di un peso a cranio aperto (Feeney)	+++	++	++	0
Percussione laterale da fluido	+++	++	++	0
Impatto corticale controllato	+++	++	++	0

Tabella 2: affidabilità della riproduzione delle lesioni osservate nel traumatismo cranico umano a seconda del modello animale utilizzato (ripreso da ¹³⁹). 0= affidabilità nulla; + = affidabilità possibile; ++ = affidabilità probabile; +++= affidabilità elevata.

Il modello ibotenato come modello di eccitotossicità

Il modello ibotenato: Il glutammato è la tossina eccitatoria principale in corso di sviluppo. Tra i differenti tipi di recettori ionotropici per il glutammato è l’N-metil-D-Aspartato a mediare il danno eccitotossico neuronale. Nel topo, se iniettato a livello intracranico, produce una disgenesia corticale e della sostanza bianca sottocorticale diversa a seconda dell’età a cui le iniezioni vengono effettuate. Se iniettato il primo giorno dopo la nascita (P0) crea un prototipo di microgiria, in quanto causa la morte completa dei neuroni dello strato V e VI, ed una redistribuzione degli strati più profondi, senza particolare gliosi. Se iniettato 5 giorni dopo la nascita (P5), causa la morte quasi completa di tutti i neuroni nell’area coinvolta, con estensione del danno in maniera gradualmente meno importante nelle zone adiacenti, dove i neuroni dello strato sopragranulare sono più affetti di quelli dello strato infragranulare, ed a livello dello strato sopragranulare si trovano delle cellule piramidali più grosse, indice di una parziale migrazione residua. Sempre a P5 si assiste ad una astrogliosi marcata e diffusa, nell’area di iniezione e nelle regioni circostanti. A livello periventricolare si assiste alla

formazione di una cisti, che correla con il danno assonale. Tali anomalie sono le stesse che si ritrovano nella leucomalacia periventricolare. Se iniettato a 10 giorni dalla nascita (P10), tutti gli strati corticali vengono egualmente danneggiati, creando una demarcazione netta tra l'area sottoposta all'insulto e l'area circostante. L'astrogliosi e la cisti sono presenti anche a questo livello maturativo. Tale differenza età-dipendente della lesione è legata al grado maturativo dei neuroni e degli astrociti circostanti, che cominciano a presentare i recettori per il glutammato solamente dopo le 28 sg nell'uomo, e non in maniera uniforme, bensì dapprima gli strati I e II, poi via via tutti gli strati corticali. La scelta dell'età P5 per il nostro modello è dettata da studi precedenti di correlazione tra differenti specie riguardo allo sviluppo cerebrale (Figura 11). Secondo studi di istochimica, la composizione della matrice germinale periventricolare e lo sviluppo cerebrale globale del ratto a P6 sono simili allo stadio di sviluppo cerebrale umano alla 38esima-40esima settimana di gestazione, mentre lo sviluppo cerebrale alla nascita corrisponde a quello di un feto di 22-24 settimane di gestazione^{141,142}; pertanto P5 corrisponderebbe allo sviluppo cerebrale di un neonato pretermine, picco di incidenza della leucomalacia periventricolare.

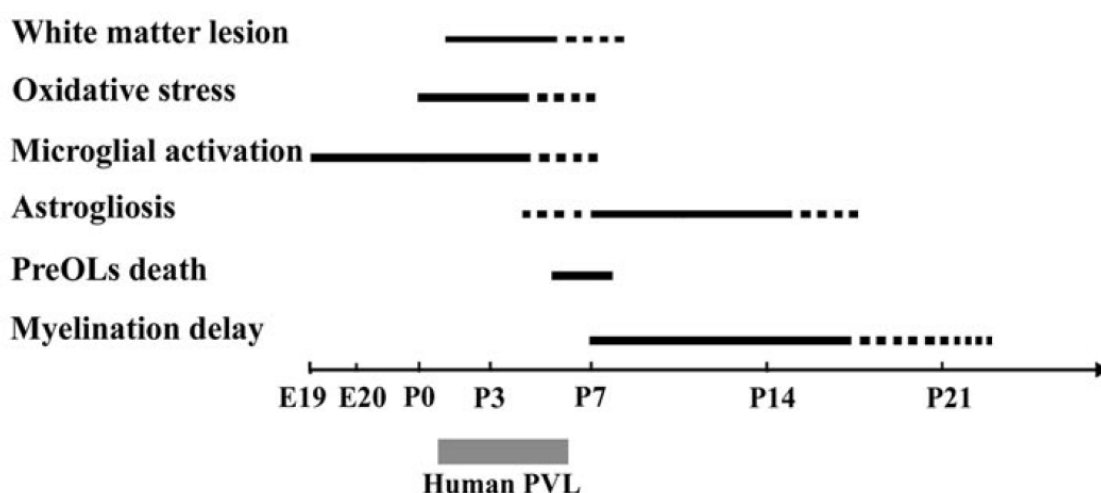


Figura 11. Schema rappresentante l'età pre (E) e post (P) concezionale del ratto alla quale avvengono le principali modificazioni indotte dalla LPV (linee nere scure), e l'epoca di insorgenza delle leucomalacia periventricolare in un cervello umano (linea grigia).

Strategie di neuroprotezione

Il sildenafil

Il sildenafil citrato (Viagra®) è un inibitore selettivo delle fosfodiesterasi 5A (PDE5A). Le fosfodiesterasi 5A sono una superfamiglia di fosfodiesterasi che inattiva il secondo messaggero intracellulare GMPciclico (cGMP). Le PDEA5 sono espresse principalmente nel muscolo liscio, in particolare in quello vascolare, dove tali enzimi regolano il rilassamento vascolare mediato dal NO/cGMP (vedi introduzione) ¹⁴³. È proprio il rilassamento della muscolatura liscia nel corpo cavernoso del pene, e il conseguente miglioramento della funzione erettile, che ha portato alla commercializzazione di questa molecola per il trattamento della disfunzione erettile maschile ^{144,145}. Grazie alla presenza di elevati livelli di PDEA5 nella muscolatura liscia vascolare polmonare e nelle cellule endoteliali, gli inibitori di PDEA5 riducono inoltre la resistenza vascolare polmonare, giustificandone l'utilizzo nell'ipertensione polmonare ^{146,147}. Il largo impiego di tale farmaco fa sì che vi sia una sufficiente esperienza clinica che indica che gli inibitori della PDEA5 sono ben tollerati nella più parte della popolazione, compresi i pazienti con seri problemi vascolari cronici ¹⁴⁸. Per quanto riguarda il loro impiego in studi sperimentali, sildenafil ed altre molecole analoghe innalzano il livello di GMPc a livello cerebrale, dando effetti neuroprotettivi in termini di miglioramento della funzione cognitiva e della memoria ¹⁴⁹, riduzione della morte cellulare in seguito ad eventi ischemici ¹⁵⁰, riduzione di danno alla sostanza bianca e regolazione della risposta infiammatoria in un modello di sclerosi multipla ^{151,152}. Recentemente il gruppo di Chopp, e il nostro gruppo, hanno evidenziato che l'inibizione delle PDEA5 induce un recupero funzionale in un modello sperimentale di infarto embolico o di ischemia riperfusione nel ratto ^{153,154}. Tale effetto può essere in parte spiegato dalle proprietà vasodilatatorie del sildenafil, che potrebbe favorire la rivascolarizzazione cerebrale, ma non solo. Nel lavoro di Chopp e dei suoi collaboratori la molecola agiva anche se somministrata a

distanza dall'evento ischemico, in un lasso di tempo in cui la lesione ischemica nel ratto si è già stabilizzata¹⁵³. Numerose possibili spiegazioni molecolari sono state addotte, tra cui una aumentata neurogenesi o un aumentato flusso cerebrale, ma spiegazioni certe non si sono ancora ottenute.

La minociclina

La minociclina è una tetraciclina che ha delle proprietà antiinfiammatorie indipendenti dalla sua azione antibatterica. È nota la sua azione inibitoria sull'attivazione microgliale¹⁵⁵, la sua capacità di ridurre la secrezione di citochine pro-infiammatorie¹⁵⁶, e le sue proprietà neuroprotettrici in modelli di ischemia cerebrale¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ o di traumatismo midollare¹⁶⁰. Il suo ruolo nel traumatismo cranico è però controverso: in certi lavori è riportato un effetto neuroprotettore transitorio, in altri un effetto protettore che persiste a lungo termine¹⁶¹

Il cromoglicato

Il cromoglicato è un cromone il cui meccanismo d'azione non è ancora del tutto elucidato. Esso inibisce la de granulazione mastocitaria, stabilizzandone la membrana ed impedendo la penetrazione cellulare del Calcio. Per questa ragione ha delle proprietà anti-infiammatorie ed anti-allergiche, ed è utilizzato in particolare nei fenomeni allergici o nell'asma. Non è mai stato studiato nel traumatismo cranico, mentre in modelli di ischemia cerebrale dell'adulto o del cervello in via di sviluppo ha dimostrato effetti benefici^{162,163}.

VII.SCOPO DELLO STUDIO

Questo lavoro di tesi s'interessa al ruolo dell'infiammazione cerebrale mediata dai mastociti o dalle cellule gliali, e prime fra tutte le cellule microgliali in differenti modelli di lesioni acute del sistema nervoso centrale neonatale, la cui gestione terapeutica resta a tutt'oggi quasi esclusivamente sintomatica. L'ultima parte del mio lavoro ha inoltre cominciato ad esplorare il possibile ruolo della BBB, o meglio della NVU, in tale infiammazione.

Gli obiettivi di questa tesi sono stati i seguenti:

1) Caratterizzare l'emodinamica cerebrale e l'infiammazione cerebrale mediata dalle cellule gliali e valutare gli effetti di un inibitore selettivo della fosfodiesterasi V (vasodilatatore e modulatore dell'infiammazione), in un modello pediatrico d'ischemia cerebrale permanente (PMCAO)

2) Studiare il ruolo dei mastociti, e valutare gli effetti di una loro inibizione, in un modello pediatrico di traumatismo cranico per caduta di peso a cranio chiuso.

3) Caratterizzare l'infiammazione cerebrale mediata dalle cellule microgliali e valutare gli effetti di una loro inibizione, in un modello pediatrico di traumatismo cranico per caduta di peso a cranio chiuso.

4) Studiare le caratteristiche e il timing di apertura della Barriera Ematoencefalica in un modello pediatrico di traumatismo cranico per caduta di peso a cranio chiuso.

Lo studio della barriera ematoencefalica in questa fascia di età e l'identificazione del protocollo ideale per lo studio dell'apertura della barriera permetteranno in seguito di estendere le ricerche anche agli altri due modelli, le cui cinetiche e la cui evoluzione non sono ancora altrettanto chiariti. Avere un buon protocollo da applicare permetterà così di studiare a) le modificazioni della barriera in seguito ad un traumatismo cranico (lavoro in corso), o di ischemia cerebrale b) di comparare questa cinetica con la cinetica dei differenti patterns di attivazione microgliale, per riuscire a spiegare alcune delle particolarità che caratterizzano la risposta microgliale neonatale e la differenziano da quella dell'adulto (prospettive future).

VII. STUDIO I. RUOLO DEI MASTOCITI IN UN MODELLO MURINO DI TRAUMATISMO CRANICO PEDIATRICO MODERATO

Introduzione:

Il traumatismo cranico (Traumatic Brain Injury, TBI) in età pediatrica causa deficit cognitivi e comportamentali più severi e persistenti rispetto al traumatismo cranico in età adulta. Comprendere le ragioni di questa particolare sensibilità del bambino è fondamentale, tanto più che i bambini al di sotto dei 4 anni sono quelli che vanno incontro maggiormente a tale problematica. Uno dei primi eventi che seguono un TBI è l'infiltrazione e la degranolazione dei mastociti, che rilasciano nel milieu cerebrale una serie di sostanze immunomodulatrici. L'inibizione mastocitaria si è rilevata neuroprotettrice in altri modelli di insulto neonatale.

Lo scopo di tale lavoro è quello di:

- 1) Studiare per la prima volta il comportamento delle cellule mastocitarie in un modello di traumatismo cranico nel topo a 7 giorni di vita.
- 2) Studiare l'istamina, uno dei componenti principali dei granuli di secrezione mastocitaria, ed in particolare valutare quali cellule ne possiedono i recettori membranari (e quindi potrebbero subirne gli effetti), e le conseguenze dell'esposizione in vitro delle cellule neuronali all'istamina.
- 3) Studiare gli effetti di un'eventuale inibizione mastocitaria, attraverso a) il cromoglicato, molecola che impedisce la loro degranolazione b) l'utilizzo dei topi knock-out per il recettore c-kit, quindi privi di mastociti.

Risultati:

- 1. I recettori per l'istamina sono presenti nelle cellule neuronali, nella microglia e negli astrociti, e le cellule neuronali in coltura esposte a danno eccitotossico vanno maggiormente incontro a morte in presenza di istamina, in maniera dose-dipendente.**

L'istamina è una delle principali sostanze immunomodulatrici secrete dai mastociti, e presente nei loro granuli. Per tale ragione, per valutare il contributo dei mastociti nel danno traumatico, abbiamo per prima cosa valutato se le cellule cerebrali contengono i recettori per l'istamina, e quali. 4 tipi di recettori (H1-4) sono stati misurati in colture primarie di astrociti, neuroni e microglia; tutte le popolazioni cellulari studiate contengono tutti i recettori, ed in particolare il recettore H2 (H2R) (vedi figura 2 A-C nell'articolo). In presenza di uno stimolo eccitotossico (come quello che si verifica dopo un trauma), rappresentato in coltura dal trattamento con NMDA (un agonista del glutammato), l'istamina aumenta la morte neuronale in maniera dose dipendente (vedi figura 2D nell'articolo). Tali dati suggeriscono che i mastociti, con il rilascio dei loro granuli, possono giocare un ruolo dannoso modulando la risposta eccitotossica e favorendo la morte neuronale. Abbiamo dunque proseguito i nostri studi attraverso un modello in vivo.

2. La somministrazione di cromoglicato prima del traumatismo impedisce la degranulazione mastocitaria e modifica i processi neuroinfiammatori, in particolare lo stato di attivazione microgliale.

Abbiamo quindi scelto di utilizzare il cromoglicato, una molecola che impedisce la degranulazione mastocitaria, per valutare un'eventuale neuroprotezione. Somministrato per via intraperitoneale 1 ora (1h) prima del TBI, il cromoglicato 1) impedisce la degranulazione mastocitaria (vedi figura 3 A,B nell'articolo), ed induce una modulazione dell'attivazione microgliale. La microglia, infatti, è una delle cellule chiave della risposta infiammatoria post-traumatica (vedi introduzione). Basandoci su dei pattern fenotipici microgliali validati (vedi introduzione), abbiamo analizzato dei markers di attivazione in senso citotossico (M1), in senso riparatorio/rigenerativo (M2a), ed in senso immunomodulatorio (M2b). Il cromoglicato contrasta l'aumento TBI-indotto di due marcatori M1, iNOS e Cox2, e la riduzione TBI-indotta di CD32 e CD86 (Vedi figura 4A

nell'articolo). Il cromoglicato influenza inoltre le modificazioni indotte sul fenotipo M2b, ed in particolare SOCS3 ed IL1Rn, riducendo ulteriormente questi marcatori, la cui espressione genica era già ridotta dal trauma (vedi figura 4A, nell'articolo).

Abbiamo inoltre analizzato i livelli di citochine su omogeneizzati di corteccia, e abbiamo visto che il cromoglicato induce una riduzione significativa di $TNF\alpha$, che era aumentato in seguito al TBI, e di CCL3 o MIP1 α ; per quanto riguarda le citochine antiinfiammatorie, il cromoglicato induce una ulteriore riduzione dell'IL-10 (vedi figura 4B nell'articolo).

3. La somministrazione di cromoglicato dopo il TBI non previene la perdita tissutale e non impedisce le modificazioni neuropatologiche a livello cellulare

Abbiamo dunque somministrato tale molecola dopo il traumatismo, per poterne valutare la possibile applicazione terapeutica. In particolare, dopo il TBI, abbiamo iniettato il cromoglicato a 1ora (+1h) di distanza.

Un traumatismo cranico induce, nel nostro modello, un danno parenchimale che può essere misurato attraverso il marcaggio con CCasp3, indice di morte cellulare in atto, o misurando il volume del ventricolo cerebrale laterale, che aumenta rispetto al ventricolo dell'emisfero controlaterale (non traumatizzato) in maniera proporzionale alla perdita di parenchima della corteccia circostante (vedi figura 5A,B e 5 E,F nell'articolo). Nel nostro modello la somministrazione di cromoglicato non impedisce tali danni, ed in particolare non riduce la morte cellulare a 24 ore (1d) dal TBI, né la dilatazione ventricolare a 5 giorni (5d) dal trauma (vedi figura 5 C,D e 5 E,F nell'articolo).

Abbiamo quindi analizzato la popolazione microgliale, che sembrava subire delle modificazioni da parte del cromoglicato. Tale molecola, se somministrata dopo il trauma, non modifica in maniera significativa il numero di cellule Iba1 positive (Iba1 è un marcatore di microglia attivata) a 2' ore e 5 giorni dal TBI (vedi figura 6 A,B nell'articolo).

Abbiamo infine studiato in maniera specifica le altre popolazioni cellulari: i marcaggi neuronale MAP2, astrocitario GFAP, e mielinico MBP (indice di funzionalità degli oligodendrociti), non erano differenti in termini quantitativi nei topi trattati con cromoglicato rispetto ai controlli (vedi figura 6 C,D nell'articolo).

Questi dati dimostrano che inibendo la degranolazione dei mastociti 1 ora dopo il TBI non otteniamo alcuna neuroprotezione in termini di attivazione microgliale ed astrocitaria, di perdita neuronale o di morte cellulare.

4. La somministrazione di cromoglicato prima del traumatismo non previene la perdita tissutale e non impedisce le modificazioni neuropatologiche a livello cellulare.

Abbiamo dunque verificato che non si trattasse di una somministrazione troppo tardiva del farmaco.

Ripetendo lo stesso esperimento somministrando il cromoglicato 1 ora (1h) prima del trauma, non abbiamo trovato differenze negli animali trattati rispetto ai controlli, in nessuno dei parametri precedentemente illustrati (Vedi figura 7 A,B,C,D nell'articolo)

5. Topi geneticamente privi di mastociti non sono più protetti contro i danni morfologici e neuropatologici indotti dal TBI

Trovandoci davanti a tale discrepanza tra i dati di biologia molecolare ed immunohistologici (modificazione del fenotipo microgliale indotta dal cromoglicato e assenza di neuroprotezione di tale molecola in termini di morte cellulare, perdita neuronale e attivazione gliale), abbiamo studiato gli effetti del TBI in topi geneticamente privi di mastociti funzionanti. Tali topi, doppi eterozigoti C-kit^{Wv/W}, presentano un recettore c-Kit non funzionante, che causa una deplezione dei mastociti a livello periferico. Se sottoposti a traumatismo a 7 giorni di vita (P7), questi topi non hanno conseguenze istopatologiche differenti dai topi controllo (eterozigoti C-kit^{Wv/+} o C-kit^{+/W}) se sacrificati a 24 ore dal trauma (vedi figura 8A nell'articolo), mentre sembrano addirittura andare incontro a un

aumento di volume ventricolare (riflesso di una perdita parenchimale circostante), se sacrificati 5 giorni dopo il trauma (vedi figura 8B nell'articolo).

In maniera coerente, a 1 giorno dal traumatismo non sono state trovate differenze nel marcaggio CCasp 3 (morte cellulare), Iba-1 (attivazione microgliale) tra i topi C-kit^{Wv/W} ed i controlli; Anche il marcaggio Map 2 (cellule neuronali) ed MBP (mielinizzazione e quindi funzionalità degli oligodendrociti) non differiscono tra topi C-kit^{Wv/W} e controlli, sacrificati a 5 giorni dal traumatismo (vedi figura 9 A, B, C e D).



Contribution of Mast Cells to Injury Mechanisms in a Mouse Model of Pediatric Traumatic Brain Injury

Raffaella Moretti,^{1,2,3} Vibol Chhor,^{1,2,4} Donatella Bettati,^{1,2,3} Elena Banino,^{1,2,3} Silvana De Lucia,^{1,2,3} Tifenn Le Charpentier,^{1,2} Sophie Lebon,^{1,2} Leslie Schwendimann,^{1,2} Julien Pansiot,^{1,2} Sowmyalakshmi Rasika,^{1,2} Vincent Degos,^{1,2,5} Luigi Titomanlio,^{1,2} Pierre Gressens,^{1,2,6} and Bobbi Fleiss^{1,2,6*}

¹PROTECT, INSERM, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

²PremUP, Paris, France

³Università degli studi di Udine, Udine, Italy

⁴Department of Anesthesia and Intensive Care, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

⁵Department of Anesthesia and Intensive Care, Pitié Salpêtrière Hospital, Paris, France

⁶Department of Perinatal Imaging and Health, Division of Imaging Sciences and Biomedical Engineering, King's College London, King's Health Partners, St. Thomas' Hospital, London, United Kingdom

The cognitive and behavioral deficits caused by traumatic brain injury (TBI) to the immature brain are more severe and persistent than injuries to the adult brain. Understanding this developmental sensitivity is critical because children under 4 years of age of sustain TBI more frequently than any other age group. One of the first events after TBI is the infiltration and degranulation of mast cells (MCs) in the brain, releasing a range of immunomodulatory substances; inhibition of these cells is neuroprotective in other types of neonatal brain injury. This study investigates for the first time the role of MCs in mediating injury in a P7 mouse model of pediatric contusion-induced TBI. We show that various neural cell types express histamine receptors and that histamine exacerbates excitotoxic cell death in primary cultured

neurons. Cromoglycate, an inhibitor of MC degranulation, altered the inflammatory phenotype of microglia activated by TBI, reversing several changes but accentuating others, when administered before TBI. However, without regard to the time of cromoglycate administration, inhibiting MC degranulation did not affect cell loss, as evaluated by ventricular dilatation or cleaved caspase-3 labeling, or the density of activated microglia, neurons, or myelin. In double-heterozygous cKit mutant mice lacking MCs, this overall lack of effect was confirmed. These results suggest that the role of MCs in this model of pediatric TBI is restricted to subtle effects and that they are unlikely to be viable neurotherapeutic targets. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

SIGNIFICANCE

Traumatic brain injury (TBI) is a leading cause of acquired disability and death in infants and children. We assess mast cell (MC) stabilization as a therapeutic strategy in a model of pediatric TBI using the immature mouse. MCs infiltrated the brain after TBI, neurons and glia expressed receptors for a histamine (an important factor released from MCs), and histamine aggravated neuronal excitotoxic death in vitro. However, manipulations of MCs in vivo with pharmacologic or genetic approaches revealed that MCs have marginal effects on TBI neuropathology. This suggests that the actions of MCs may be of less importance in the immature brain compared with the mature brain.

R. Moretti and V. Chhor are joint first authors.

P. Gressens and B. Fleiss are joint last authors.

Contract grant sponsor: INSERM, Université Paris Diderot, Université Sorbonne-Paris-Cité, Investissement d'Avenir; Contract grant number:

ANR-11-INBS-0011 NeurATRIS; Contract grant sponsor: ERA-NET Neuron (Micromet); Contract grant sponsor: DHU PROTECT; Contract grant sponsor: PremUP; Contract grant sponsor: Fondation de France; Contract grant sponsor: Fondation pour la Recherche sur le Cerveau; Contract grant sponsor: Fondation des Gueules Cassées; Contract grant sponsor: Roger de Spoelberch Foundation; Contract grant sponsor: Grace de Monaco Foundation; Contract grant sponsor: Leducq Foundation; Contract grant sponsor: Cerebral Palsy Alliance Research Foundation Australia; Contract grant sponsor: Wellcome Trust; Contract grant number: WSCR P32674; Contract grant sponsor: National Institute for Health Research (NIHR) (to Guy's & St Thomas' NHS Foundation Trust in partnership with King's College London and King's College Hospital NHS Foundation Trust).

*Correspondence to: Bobbi Fleiss, INSERM U1141, Hôpital Robert Debré, 48 Blvd. Sérurier, F-75019 Paris, France. E-mail: bobbi.fleiss@inserm.fr

Received 3 June 2016; Revised 9 August 2016; Accepted 10 August 2016

Published online 10 September 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.23911

Key words: neuroinflammation; histamine; apoptosis; myelin; neuron; microglia

Children under the age of 4 years sustain traumatic brain injury (TBI) more frequently than any other age group (Koepsell et al., 2011), and, in children under 2 years of age, rates of TBI serious enough to be fatal or to require intensive care support are as high as 50 per 100,000 (Keenan et al., 2003). This is of particular concern because the cognitive and behavioral deficits caused by TBI to the immature brain are more severe and persistent than those observed after comparable injuries to the mature (adult) brain (Anderson et al., 2005; Rivara et al., 2012), despite the superior potential for repair of the former (Bennet et al., 2013). This likely is due to the combined effect of disrupted normal development and the direct effects of injury. TBI in the pediatric population is caused by a diverse range of injuries and insults. These include acceleration/deceleration injuries (shaken-baby syndrome) as well as contusion injuries (direct impact to the skull such as car accidents or falls), both inflicted and accidental (Pinto et al., 2012).

The primary injury process in TBI is mechanical damage (i.e., shear forces inducing vascular damage and bleeding), followed by secondary pathological processes including excitotoxicity, ischemia, and neuroinflammation (Hagberg et al., 2012; Xiong et al., 2013), which lead to mitochondrial dysfunction and cell death. Among the first events of the injury response, in both the adult and the developing brain, is the degranulation of mast cells (MCs; Stokely and Orr, 2008), whereby these long-lived and self-replicating effectors of the immune system (Dropp, 1979; Galli et al., 2005) release numerous inflammatory mediators such as histamine, cytokines, lipid metabolites, and nitric oxide (Silver et al., 1996). MCs enter the brain in the early postnatal period as part of normal development (Panula et al., 2014). MC degranulation is toxic to neurons and glia *in vitro* and *in vivo* (Dean et al., 2010; Hendrix et al., 2013), whereas their stabilization has been shown to be neuroprotective in animal models of neonatal excitotoxicity (Patkai et al., 2001) and hypoxia-ischemia (Jin et al., 2007) as well as in adult TBI (Hendrix et al., 2013) and stroke (Strbian et al., 2006). However, little is known regarding the involvement of MCs in the injury process triggered by TBI in the developing brain.

The current study examines the role of MCs in pediatric TBI with animal and cellular models. In rodents, during the first 30 days of life, injury to the brain is maximal when TBI occurs on postnatal day (P) 7 (Bittigau et al., 1999). The first 3 postnatal weeks also coincide with the infantile period in humans, characterized by several crucial developmental processes (e.g., maximal brain growth, synaptogenesis, and myelination) in addition to a heightened sensitivity to excitotoxicity (Bittigau et al., 1999). We first examine whether neural cells in the brain of P7 mice could respond to histamine, the primary molecule released by MC degranulation, to determine whether

this could be a valid injury mechanism. Next, we examine the effects of cromoglycate, an inhibitor of MC degranulation, administered at different time points relative to TBI, on tissue loss, neuroinflammation, and the loss of myelin. Finally, we confirm our observations in genetically modified mice deficient in *cKit*, also known as *MC growth factor receptor* or *CD117*, a receptor tyrosine kinase essential for the differentiation of MCs.

MATERIALS AND METHODS

Experimental protocols were approved by the Bichat and Robert Debré Hospital ethics committee (No. 2011-14/676-0050). Protocols were as previously described (Patkai et al., 2001; Husson et al., 2005; Favrais et al., 2011; Chhor et al., 2013) and adhered to European Union guidelines for the care and use of animals. *In vivo* procedures were typically carried out between 10:00 AM and 1:00 PM (light phase 7:00 AM–7:00 PM daily); all animals were monitored daily during experimentation. Each experimental unit corresponds to a single animal, with groups spread among and across litters. Animals were housed in Plexiglas cages (30 × 18 × 15 cm) together with littermates and their dam for the entire experiment, with woodchip bedding and shredded paper for nesting (Pharmaserv). Animals had access to standard chow and water *ad libitum*.

Primary Microglial, Astrocytic, and Neuronal Cultures

Microglia. Primary mixed glial cultures were prepared from the cortices of wild-type (WT) OF1 mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) on P0 and P1, as previously described (Kaindl et al., 2007; Chhor et al., 2013). An entire litter was used for a culture (for all cell types), and approximately equal numbers of males and females were identified. In brief, the cortices were dissected after removal of the meninges and mechanically dissociated before resuspension and plating in low-glucose DMEM (31885; Gibco, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% FBS (Gibco) and 0.01% penicillin-streptomycin (Gibco). Microglia were isolated from the primary mixed glial cultures by shaking on day *in vitro* (DIV) 14 and resuspended at a concentration of 4×10^5 cells/ml in six-well culture plates. Culture purity was verified by immunolabeling ($n = 5$ wells) with cell type-specific antibodies to microglia, astrocytes, and neurons as previously described (Chhor et al., 2013) and revealed > 99% purity for microglia.

Astrocytes. On DIV14, after shaking off of microglia from the primary mixed glial cultures described above, the microglial cell medium was removed, the plates were treated for 5 min with 0.25% trypsin (Gibco), and the remaining cells (astrocytes) were resuspended in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% FBS (Gibco) with 0.01% penicillin-streptomycin at a concentration of 6×10^5 cells/ml and plated in six-well culture plates.

Neurons. Primary neuronal cultures were derived from the cerebral cortex of embryonic day 14.5 C57Bl/6 mice, as previously described (Chhor et al., 2013). In brief, after dissection of the cortices and removal of the meninges, the cortices were minced and chemically dissociated with 0.0125%

TABLE I. Primer Sequences and NCBI References

Gene	Sense	Antisense	NCBI reference
<i>Gapdh</i>	GGC CTT CCG TGT TCC TAC	TGT CAT CAT ATC TGG CAG GTT	NM_008084.2
<i>Rpl13</i>	ACA GCC ACT CTG GAG GAG AA	GAG TCC GTT GGT CTT GAG GA	NM_016738.5
<i>iNos</i>	CCC TTC AAT GGT TGG TAC ATG G	ACA TTG ATC TCC GTG ACA GCC	NM_010927.3
<i>CD32</i>	CTG GAA GAA GCT GCC AAA AC	CCA ATG CCA AGG GAG ACT AA	NM_010187.2
<i>CD86</i>	GAG CGG GAT AGT AAC GCT GA	GGC TCT CAC TGC CTT CAC TC	NM_019388.3
<i>Ptgs2</i>	TCA TTC ACC AGA CAG ATT GCT	AAG CGT TTG CGG TAC TCA TT	NM_011198.3
<i>CD206</i>	CTT CGG GCC TTT GGA ATA AT	TAG AAG AGC CCT TGG GTT GA	NM_008625.2
<i>Arg1</i>	GTG AAG AAC CCA CGG TCT GT	GCC AGA GAT GCT TCC AAC TG	NM_007482.3
<i>Lgals3</i>	GAT CAC AAT CAT GGG CAC AG	ATT GAA GCG GGG GTT AAA GT	NM_010705.3
<i>Igf1</i>	TGG ATG CTC TTC AGT TCG TG	GCA ACA CTC ATC CAC AAT GC	NM_010512.4
<i>Sphk1</i>	TCC AGA AAC CCC TGT GTA GC	CAG CAG TGT GCA GTT GAT GA	NM_001172475.1
<i>Il1m</i>	TTG TGC CAA GTC TGG AGA TG	TTC TCA GAG CGG ATG AAG GT	NM_031167.5
<i>Il4ra</i>	GGG TAA GCA GAC CCG AAG C	ACT CTG GAG AGA CTT GGT TGG	NM_001008700.3
<i>Socs3</i>	CGT TGA CAG TCT TCC GAC AA	TAT TCT GGG GGC GAG AAG AT	NM_007707.3
<i>IL1b</i>	GGG CCT CAA AGG AAA GAA TC	TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG	NM_008361.3
<i>IL-6</i>	CAA AGC CAG AGT CCT TCA GA	GCC ACT CCT TCT GTG ACT CC	NM_031168.1
<i>IL10</i>	CTC CCC TGT GAA AAT AAG AGC	GCC TTG TAG ACA CCT TGG TC	NM_010548.2
<i>IL-12a</i>	TCA CAA CCA TCA GCA GAT CA	TGC AGA GCT TCA TTT TCA CTC	NM_001159424.1
<i>IL-12b</i>	ATC CAG CGC AAG AAA GAA AA	AAT AGC GAT CCT GAG CTT GC	NM_008352.2
<i>IL-18</i>	TTC GTT GAC AAA AGA CAG CC	TAT CAG TCT GGT CTG GGG TTC	NM_008360.1
<i>Tnf-α</i>	GCC TCT TCT CAT TCC TGC TT	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	NM_013693.3
<i>Cxcl1</i>	GCA CCC AAA CCG AAG TCA TA	AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT	NM_008176.3
<i>Cxcl10</i>	GGG TAA AGG GAG GTG GAG AG	GCT TAT TGA AAG CGG TGA GC	NM_021274.2
<i>Ccl2</i>	CAT CCA CGT GTT GGC TCA	TCA TTG GGA TCA TCT TGC TG	NM_011333.3
<i>Ccl3</i>	TTT TGA AAC CAG CAG CCT TT	CTG CCT CCA AGA CTC TCA GG	NM_011337.2
<i>Hrh1</i>	GGG CTC AAA GGC CAA TGA C	ACT GTC GAT CCA CCA AGG TC	NM_008285.3
<i>Hrh2</i>	CTG GCT GTC AGC TTG AAT CG	CCA AAG CTC CAC TTG AAG GA	NM_001010973.2
<i>Hrh3</i>	CCA TCT CCG ACT TCC TCG T	AGT CTA CCA CCA GCC ACA GC	NM_133849.3
<i>Hrh4</i>	GCT ACG ATC GAT ACC AGT CA	AAG AAA GCC AGT ATC CAA ACA G	NM_153087.2
<i>Mbp</i>	CCG GAC CCA AGA TGA AAA C	CTT GGG ATG GAG GTG GTG T	NM_010777.3
<i>Gfap</i>	CTC CTG GTA ACT GGC CGA CT	AAG CCA AGC ACG AAG CTA AC	NM_010277.3
<i>NeuN</i>	CGA TGC TGT AGG TTG CTG TG	CAG ATA TGC TCA GCC AGC AG	NM_001039168.1
<i>CD11b</i>	CTG GTG CTC TTG GCT CTC AT	GGC AGC TTC ATT CAT CAT GT	NM_001082960.1

trypsin (Gibco), and cells were seeded in 96-well culture plates precoated with poly-DL-ornithine (Sigma, St. Louis, MO) and laminin $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Sigma) at a density of 5×10^4 cells and a final volume of $100 \mu\text{l}$ per well. Cells were cultured in neurobasal medium (Invitrogen, Illkirch, France) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), $300 \mu\text{M}$ glutamine (Sigma), and 1% streptomycin/amphotericin B 100X (Invitrogen). Half the culture medium was replaced by fresh medium three times per week, and $5 \mu\text{M}$ arabinocytidine hydrochloride (Sigma) was added on DIV3 to kill dividing progenitors. Primary cultured microglia, astrocytes, and neurons were harvested, and RNA was extracted for gene expression analysis as described below.

RNA Extraction and Quantification of Gene Expression by qRT-PCR

Preparation of microglial qRT-PCR, primer design, and PCR protocols were similar to those previously described (Husson et al., 2005; Chhor et al., 2013; Schang et al., 2014). Primer sequences are given in Table I. *Gapdh* for microglia and neurons and *Rpl13* for astrocytes were used to standardize gene expression levels in quantitative experiments based on prior reference gene suitability testing. The relative quantities are expressed as the ratio between the gene of interest and the reference gene. For characterization of CD11b-positive cells ex

vivo (see below), genes were grouped into cytotoxic (CytoT), reparatory/regenerative (R-Regen), and immunomodulatory (ImmunoM) types based on standard classification in the literature (Ransohoff and Perry, 2009; Colton and Wilcock, 2010) and on previous work from our group (Chhor et al., 2013). Analyses were performed in CFX manager 2.1 (RRID:SCR_003375; Bio-Rad, Hercules, CA).

MTT Mitochondrial Activity (Cell Viability) Assays

Primary cultured neurons (DIV11) prepared as previously described were subjected to a 1-hr treatment with $50 \mu\text{M}$ N-methyl D-aspartate (NMDA), followed by a 24-hr treatment with different concentrations of histamine (1, 10, $100 \mu\text{M}$; Sigma). They were then subjected to the MTT assay, in which the bioreduction of MTT, a yellow tetrazolium salt, to formazan by mitochondrial enzymes reflects the proportion of living cells. In brief, MTT solution (Sigma) was added to a final concentration of 0.85 mg/ml to each well of a 96-well plate for 1 hr. Medium was then replaced by dimethylsulfoxide ($50 \mu\text{l/well}$). The absorbance of formazan was measured at 560 nm and 750 nm with the Glomax-Multi detection system (Promega, Southampton, United Kingdom). Data were normalized to the vehicle group.

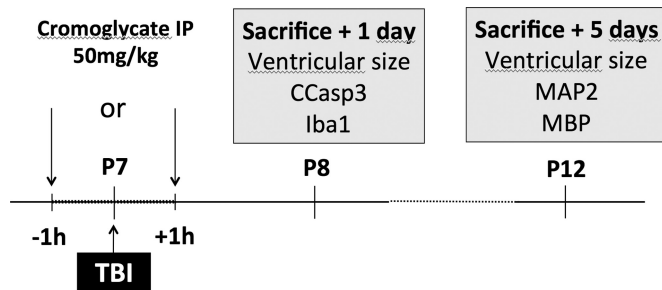


Fig. 1. Schematic representation of experimental protocols. Cromoglycate was administered either before or after TBI. cKit mice underwent TBI but not cromoglycate treatment.

TBI Model and Experimental Procedure

In a TBI model previously described by Kaindl et al. (2007), 7-day-old (P7) WT OF1 mice of both sexes weighing 4 or 5 g (Charles River Laboratories) were randomly (alternating animals) allocated to TBI, sham control, or TBI + treatment (PBS or drug) groups. Injury profiles were not different between males and females, and data were pooled. In a separate experimental workspace within the animal facility, mice were anesthetized with isoflurane (8% induction) and subjected to a closed-head weight-drop head trauma in a process that took no longer than a total of 3 min. Briefly, the head was fixed to a stereotaxic frame, the skull surface was exposed with a skin incision, and the contusion device was oriented perpendicular to the parietal bone with the center of the footplate (2-mm diameter) positioned 2 mm anterior and 1 mm lateral to lambda on the parietal bone. The footplate was first allowed to touch the skull and was then further depressed by 0.5 mm. The contusion device consisted of a hollow stainless-steel cylinder 20 cm in length, perforated at 1-cm intervals to prevent air compression, guiding a 10-g weight falling from a height of 10 cm onto the footplate. The contusion was delivered unilaterally to the left side of the skull by the same operator for all animals in a given experiment; cortical contusions were of comparable severity in all animals. Body temperature was kept constant via the use of a heating pad maintained at 37°C until pups were returned to their dams approximately 15 min after TBI. A single intraperitoneal injection of cromoglycate (50 mg/kg in PBS; Sigma) or PBS was administered 1 hr before or 1 hr after TBI (Fig. 1). All tissue processing and analyses were carried out by investigators blind to the treatment group.

cKit Mice

Double-heterozygous cKit^{W^v/W} mice on a C57Bl/6 background (RRID:IMSR_JAX:000049; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), such as those used previously in our laboratory (Patkai et al., 2001), were subjected to TBI experiments according to the protocol previously described. In this colony, the homozygous condition is lethal, heterozygotes for both alleles are white in color and lack MCs, heterozygotes for either allele alone have various degrees of white spotting and functional MCs, and WT mice are black (Meininger et al., 1992). To limit variability between mutant animals and controls, we chose single-heterozygous mice (cKit^{W^v/+} or cKit^{W/+}) as

controls for MC-deficient double-heterozygotes after initial comparisons between cKit^{W^v/+} and cKit^{W/+} mice and between single-heterozygous and WT mice revealed no significant differences among experimental parameters. Phenotype-genotype correlations were confirmed before experimentation by PCR and restriction enzyme digestion (Nsi1) and revealed a 100% match.

Tissue Preparation and Histology

Assessment of MC numbers. Four hours after TBI, mice were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde/0.12 M PBS, scalps were removed, and heads with skulls were postfixed in 4% formol overnight (to preserve the meninges) before immersion in a 5% nitric acid bath for 1 hr to decalcify the skull. Brains were then postfixed in 4% formol for an additional 4 days before being embedded in paraffin, and 16- μ m coronal sections were cut and collected on Superfrost Plus slides and stained with 1% toluidine blue (Fisher Scientific, Leicestershire, United Kingdom), which labels MC granules rich in heparin and histamine, as previously described (Patkai et al., 2001). The numbers of MCs in the brain and meninges were calculated from counts under a $\times 10$ objective on a Leica DM6000 B microscope (RRID:SCR_000011; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in two entire sections from the area of maximum lesioning at approximately bregma -1.50 mm and -3.50 mm. Data shown are average counts per section (both hemispheres) for each treatment group.

Nissl staining and immunohistochemistry. One or five days after TBI, animals were sacrificed by decapitation, brains were immersion fixed (4% formol for 5 days) and embedded in paraffin, and 16- μ m coronal sections were cut from the frontal pole to the occipital lobes. One series of sections was stained with cresyl violet for the determination of ventricular area, as described previously (Kaindl et al., 2007). In short, the border of each lateral ventricle from three sections at 192- μ m intervals spanning the hippocampus and the mid-striatum was outlined, the cross-sectional ventricular areas were determined in ImageJ version 1.43 (RRID:SCR_003070; NIH, Bethesda, MD), and the ratio between ventricular areas in the traumatized (ipsilateral, left) and the nontraumatized (contralateral, right) hemispheres was determined as previously described (Turner et al., 2003; Kaindl et al., 2012). No differences were noted in ventricular areas between the contralateral hemispheres of sham and TBI mice. Immunohistochemistry was performed as previously described by Fleiss et al. (2012) with the following antibodies (see Table II): rabbit monoclonal anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1; 1:1,000; Wako Chemicals, Richmond, VA), rabbit monoclonal anticleaved caspase-3 (CCasp-3; 1:200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA), mouse monoclonal antimyelin basic protein (MBP; 1:500; Millipore, Billerica, MA), and mouse monoclonal anti-MAP2 (1:2,000; Sigma). After overnight incubation with primary antibodies and washing, sections were incubated with appropriate fluorescent secondary antibodies (Vector Laboratories, Burlingame, CA) at 1:200. The number of immunolabeled cells or the area of immunolabeling was assessed as previously described (Fleiss et al., 2012). Briefly, for Iba1 and CCasp-3 immunolabeling, two images were captured

TABLE II. Antibodies Used

Name of antibody	Immunogen	Manufacturer, catalog No., RRID, monoclonal/polyclonal, species	Concentration
Anti-Iba-1	Iba1 carboxy-terminal sequence	Wako, 019-19741, AB_839504, polyclonal, rabbit	1:1,000
Anti-CCasp-3	Amino-terminal residues adjacent to Asp175 in human caspase-3	Cell Signaling Technology, 9661, AB_331440, monoclonal, rabbit	1:200
Anti-MBP	Amino acids 129–138 of MBP	Millipore, MAB382, AB_94971, monoclonal, mouse	1:500
Anti-MAP2	Rat brain MAPs	Sigma, M4403, AB_477193, monoclonal, mouse	1:2,000

at the level of maximum lesion (approximately -1.50 mm) on a Leica DM6000 B microscope (RRID:SCR_000011; Leica Microsystems) with a $\times 10$ objective. Counts were performed of the numbers of labeled cells in the parietal cortex and the striatum of each hemisphere in ImageJ; cell numbers within a given region are expressed as cells per square millimeter. For MAP2 and MBP, labeling was measured in four to six levels per brain (one $16\text{-}\mu\text{m}$ -thick section every $576\text{ }\mu\text{m}$), as previously described (Fleiss et al., 2012). Volumes of MAP2- and MBP-positive brain tissue were calculated from area measurements according to Cavalieri's principle with the following formula: $V = SA \times P \times T$, where V is the total volume, SA is the sum of the areas measured, P is the inverse of the sampling fraction, and T is section thickness. The difference between the two hemispheres is expressed as the ratio between values for the ipsilateral and the contralateral hemispheres.

Isolation of CD11b-Positive Cells With Magnetic Bead-Coupled Antibodies

At 24 hr and at 5 days after TBI, CD11b-positive cells were extracted from the whole cortex of unfixed brains with a magnetic bead-coupled antibody system (MACS; RRID:AB_244268; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). In brief, the olfactory bulbs and the cerebellum were removed, and for each data point three or four hemispheres were pooled (for sufficient RNA yields) and mechanically and enzymatically digested with the Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec). Homogenized and digested tissue was incubated with PE-conjugated anti-CD11b antibodies, and CD11b-positive cells were separated in a magnetic field before being counted and frozen at -80°C . The purity of the separation was assessed with qRT-PCR for GFAP (astrocytes), MBP (oligodendrocytes), NeuN (neurons), and CD11b (microglia) and showed levels of contamination of less than 5%.

Statistical Analysis

Data are from three or more independent experiments and are presented as mean \pm SEM. No animals were excluded from the analysis. The appropriate statistical tests were chosen based on data normality (Kolmogorov-Smirnov test). One-way ANOVA was used to compare qRT-PCR results. Mann-Whitney U tests or Kruskal-Wallis tests followed by Dunnett's post hoc test were used for all other experiments. The statistical test (performed in GraphPad 5.0; RRID: SCR_002798; San Diego, CA) performed on each data set is indicated in the

figure legend or within the text, and statistically significant results with threshold set at $P \leq 0.05$ are indicated by asterisks.

RESULTS

Histamine Receptors Are Present on Neural Cells, and Histamine Aggravates Excitotoxic Neuronal Death

As a first step in determining any role of MC degranulation in TBI, we examined whether various neural cell types could respond to histamine, one of the principal immunomodulatory substances released by MCs. qRT-PCR for histamine receptors 1–4 revealed the expression of several receptors, with particular abundance of the histamine H2 receptor, in primary cultures of neurons, microglia, and astrocytes ($n = 3$; Fig. 2A–C). We next examined whether histamine could affect neuronal death because of excitotoxicity, one of the major injury mechanisms involved in TBI, by treating primary neuronal cultures (DIV11) with the glutamate agonist NMDA. MTT assays for cell viability revealed that NMDA-mediated neuronal death was aggravated in a dose-dependent manner by histamine (one-way ANOVA; $F_{3,76} = 25.27$, $n = 16\text{--}24$ wells/group, $n = 5\text{--}6$ independent cultures; NMDA vs. NMDA + histamine $1\text{ }\mu\text{M}$, non-significant; NMDA vs. NMDA + histamine $10\text{ }\mu\text{M}$, $P < 0.001$; NMDA vs. histamine $100\text{ }\mu\text{M}$, $P < 0.001$; Kruskal-Wallis posttest; Fig. 2D). Histamine added to healthy neuronal cultures did not significantly affect their viability (data not shown). Together these data suggest that histamine released by MC degranulation could indeed play a role in the pathogenesis of TBI, either by directly modulating excitotoxic neuronal death or by acting through glial cells such as microglia or astrocytes activated as part of the injury response.

Cromoglycate Administration Before TBI Prevents MC Degranulation and Modifies Neuroinflammatory Processes

Next we assessed whether an inhibitor of MC degranulation, cromoglycate, could enter the brain and prevent the deleterious consequences of TBI. In OF1 pups at P7, TBI induced a significant increase in the number of toluidine blue-stained MCs in the brain (cortex, striatum, thalamus) and meninges 4 hr after injury compared with sham-operated pups, suggesting an influx

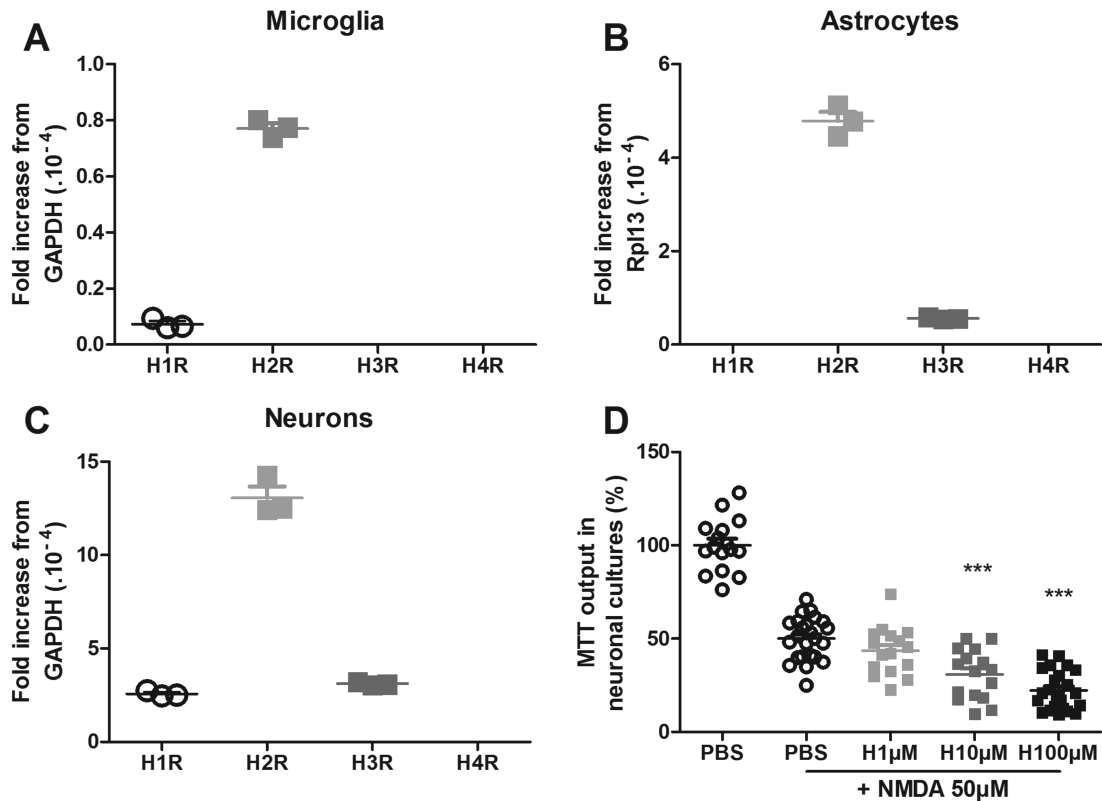


Fig. 2. Histamine receptor expression in neural cells and histamine-mediated potentiation of excitotoxic neuronal death. Expression of histamine receptor subunits in primary cultured microglia (A), astrocytes (B), and neurons (C) as measured by qRT-PCR. D: Effects of histamine on NMDA-mediated neuronal death in vitro. Data are mean \pm SEM ($n = 16$ wells/group in three different experiments). *** $P < 0.001$, one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test, compared with NMDA treatment only.

of circulating MCs (sham vs. TBI 2.1 ± 0.4 vs. 8.8 ± 1.9 in the brain parenchyma [$U = 19.5$, $n = 7$, $P = 0.0009$] and 5.4 ± 0.8 vs. 10.3 ± 1.6 in the meninges [$U = 35.5$, $n = 7$, $P = 0.01$], respectively; Mann-Whitney U test; Fig. 3A,B). Cromoglycate 50 mg/kg administered intraperitoneally 1 hr before TBI further increased the number of toluidine blue-positive MCs in the meninges ($U = 27$, $n = 12$, $P = 0.004$; Mann-Whitney U test; Fig. 3A,B), with a similar but nonsignificant increase in the brain.

Because one of the mechanisms triggered by TBI is microglial activation with neuroinflammation, we then used qRT-PCR at 24 hr to evaluate the expression of a previously validated panel of microglial phenotype markers (Chhor et al., 2013), broadly divided for ease of analysis into CytoT, R-Regen, or ImmunoM types as well as cytokines/chemokines on MACS-sorted CD11b-positive cells (verified to be $> 95\%$ pure for microglia) to assess the effect of cromoglycate on microglial activation (Fig. 4). Cromoglycate significantly reversed the TBI-induced increase in two markers of cytotoxic phenotype activation in microglia, inducible nitric oxide synthase (iNOS; $F_{9,3.50}$, $n = 5-6$, $P = 0.007$) and cyclooxygenase-2 (Cox-2; $F_{9,2.47}$,

$n = 5-6$, $P = 0.04$), and the TBI-induced decrease of two others, CD32 ($F_{9,5.90}$, $n = 5-6$, $P = 0.0002$) and CD86 ($F_{9,2.36}$, $n = 5-6$, $P = 0.04$; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test; Fig. 4A, top). Although no R-Regen phenotype markers studied were affected (Fig. 4A, middle), cromoglycate further reduced two immunomodulatory phenotype markers whose expression was reduced by TBI, suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3; $F_{9,2.67}$, $n = 5-6$, $P = 0.03$) and interleukin (IL)-4R α ($F_{9,2.23}$, $n = 5-6$, $P = 0.05$; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test; Fig. 4A, bottom). Among the cytokines/chemokines assayed, cromoglycate significantly reduced levels of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α ; $F_{9,2.20}$, $n = 5-6$, $P = 0.05$; reversing its TBI-induced increase) and reduced levels of the chemokine CCL3 (or MIP1 α ; $F_{9,3.22}$, $n = 5-6$, $P = 0.01$) in addition to further reducing levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 ($F_{9,2.84}$, $n = 5-6$, $P = 0.02$; all analysis by one-way ANOVA, with Dunnett's post hoc test; Fig. 4B). To summarize, cromoglycate administration before TBI did indeed inhibit TBI-induced MC degranulation and altered the inflammatory status of activated microglia.

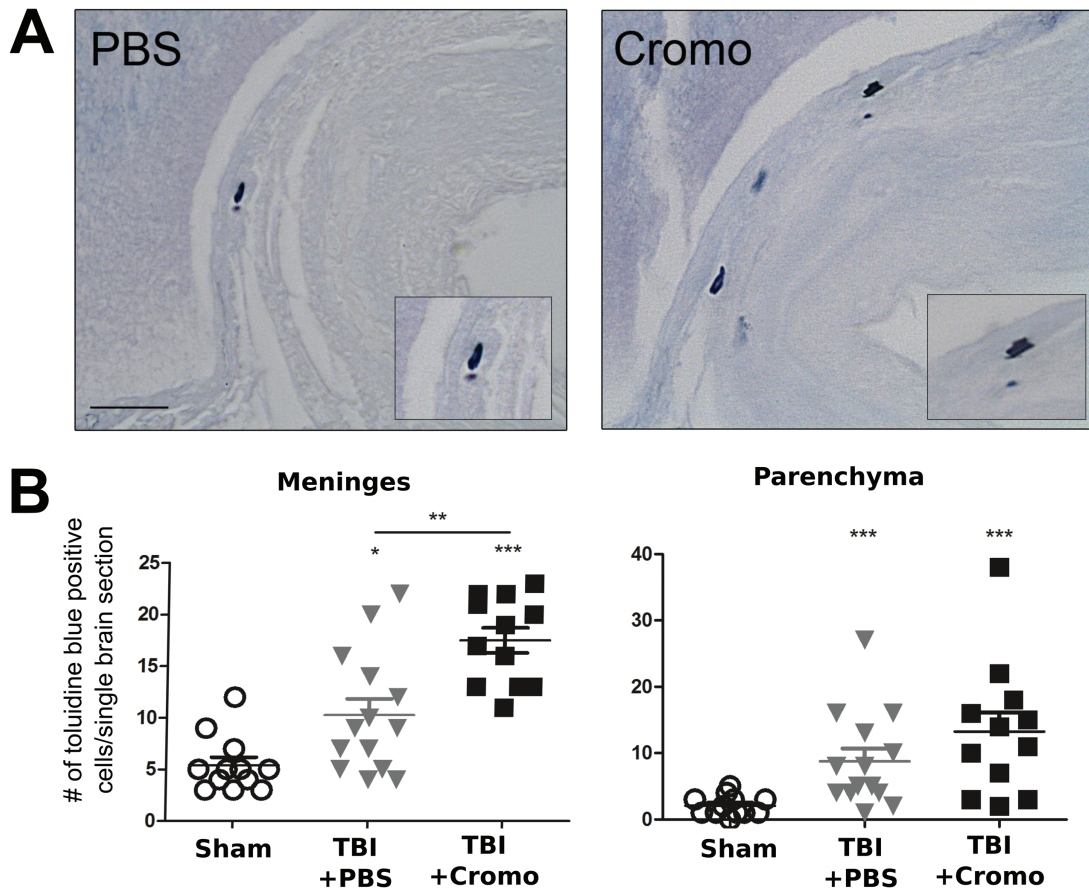


Fig. 3. Induction of MC recruitment by TBI and prevention of MC degranulation by cromoglycate (Cromo). **A**: Representative images of toluidine blue-positive MCs in the periventricular parenchyma at bregma 1.5. **Insets** show closeups. **B**: Quantification of toluidine

blue-positive cells in the meninges and total brain parenchyma. Data are mean \pm SEM ($n = 7$ animals/group). Groups were compared by Mann-Whitney U test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bar = 100 μ m.

Cromoglycate Administration After TBI Does Not Prevent Tissue Loss or Neuropathological Changes at the Cellular Level

Because any neuroprotective molecule destined for therapeutic application must be effective when administered after injury, we assessed the effects of cromoglycate given 1 hr after TBI. As an index of tissue loss after TBI, ventricular dilatation was assessed 1 day and 5 days after TBI (i.e., on P8 and P12) by calculating the size of the ventricle in the lesioned ipsilateral hemisphere as a percentage of the size of the ventricle of the contralateral hemisphere in cresyl violet-stained sections (Fig. 5A,B). TBI induced an increase in ventricular volume on the ipsilateral side compared with the contralateral side 5 days after TBI. However, cromoglycate treatment did not significantly alter ventricular volumes 1 day ($U = 3$, $n = 4-6$, $P = 0.07$) or 5 days ($n = 9-10$, $P = 0.56$; Mann-Whitney U test; Fig. 5C,D) after TBI. TBI also induced significant cellular labeling for CCasp-3 on day 1 after TBI in cortex and striatum underlying the contusion site

($U = 0$, $n = 4-6$, $P = 0.002$ for both regions; Mann-Whitney U test; Fig. 5E,F) as well as other brain regions (thalamic nuclei, hippocampal dentate gyrus, and subiculum; not shown). In line with ventricular volumes, however, cromoglycate did not significantly reduce CCasp-3 density on the ipsilateral side ($P = 0.17$ cortex, $P = 1.0$ striatum, $n = 4-6$; Mann-Whitney U test; differences were also nonsignificant for the contralateral side; Fig. 5E,F). Sham groups not subjected to TBI and treated with vehicle and/or cromoglycate displayed no change in ventricular size and had very low numbers of CCasp-3-positive cells (data not shown).

Next we examined whether the changes in neuroinflammation-related molecules observed after cromoglycate treatment in MACS-sorted microglia were reflected in the number of microglia or subsequent neuronal death and myelination deficits. The density of Iba1-positive microglia observed by immunohistochemistry 1 day after TBI (i.e., P8) was slightly increased in cortex and striatum of the ipsilateral side compared with the contralateral side in PBS-treated TBI animals ($U = 1$,

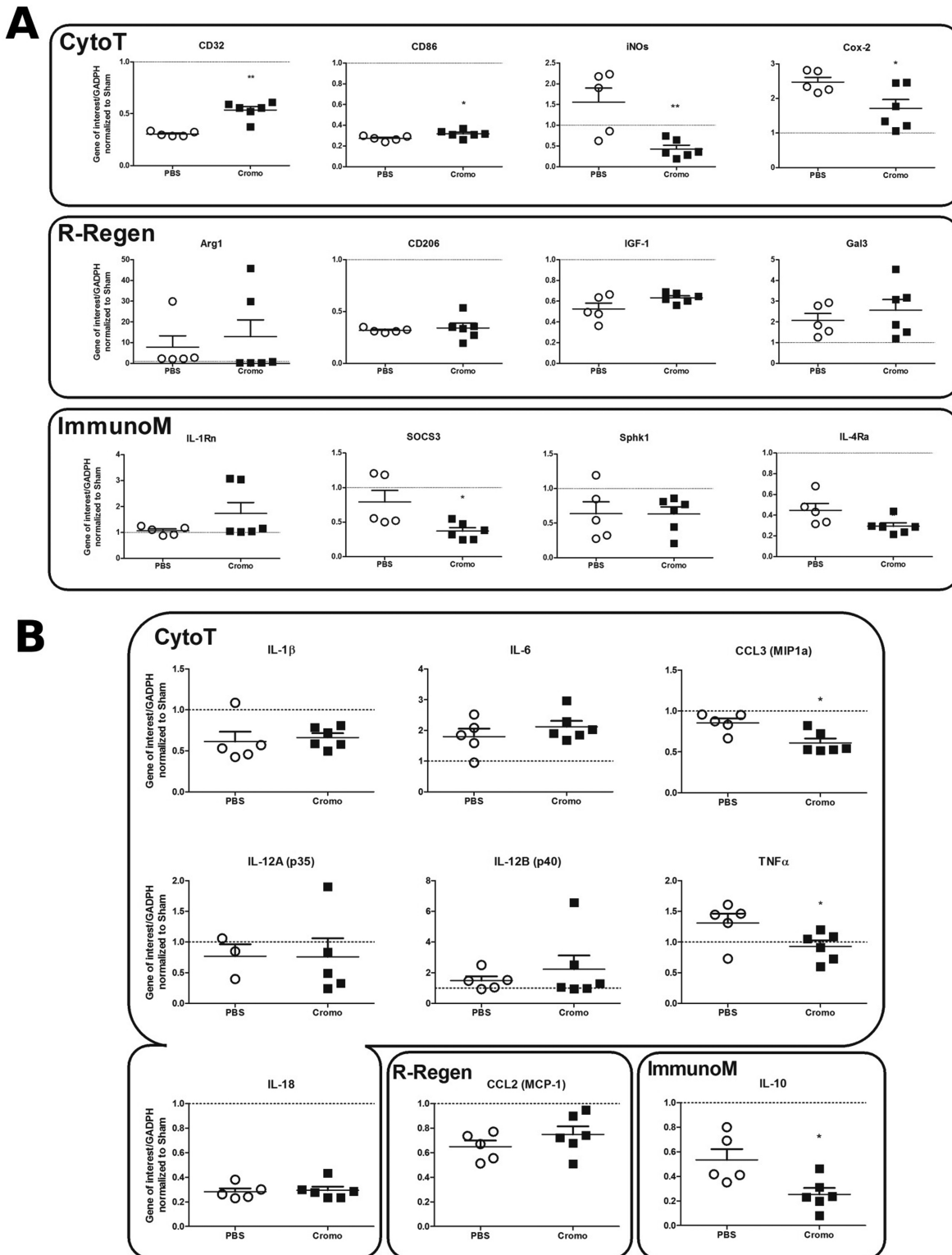


Fig. 4. Effects of pre-TBI cromoglycate treatment on expression of microglial phenotype markers and cytokines/chemokines. Data are normalized to expression levels in the sham group (dashed line) and expressed as mean \pm SEM (n = 5–6 mice/group). Genes are grouped based on predicted role in inflammation, CytoT, R-Regen, and ImmunoM, with PBS-treated groups represented by open symbols

and cromoglycate-treated (Cromo) groups represented by solid symbols. Groups were compared by one-way ANOVA with Dunnett's post test. MACS-sorted CD11b-positive microglia at 1 day post-TBI microglial phenotype markers (A) and microglial cytokine/chemokine gene expression (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

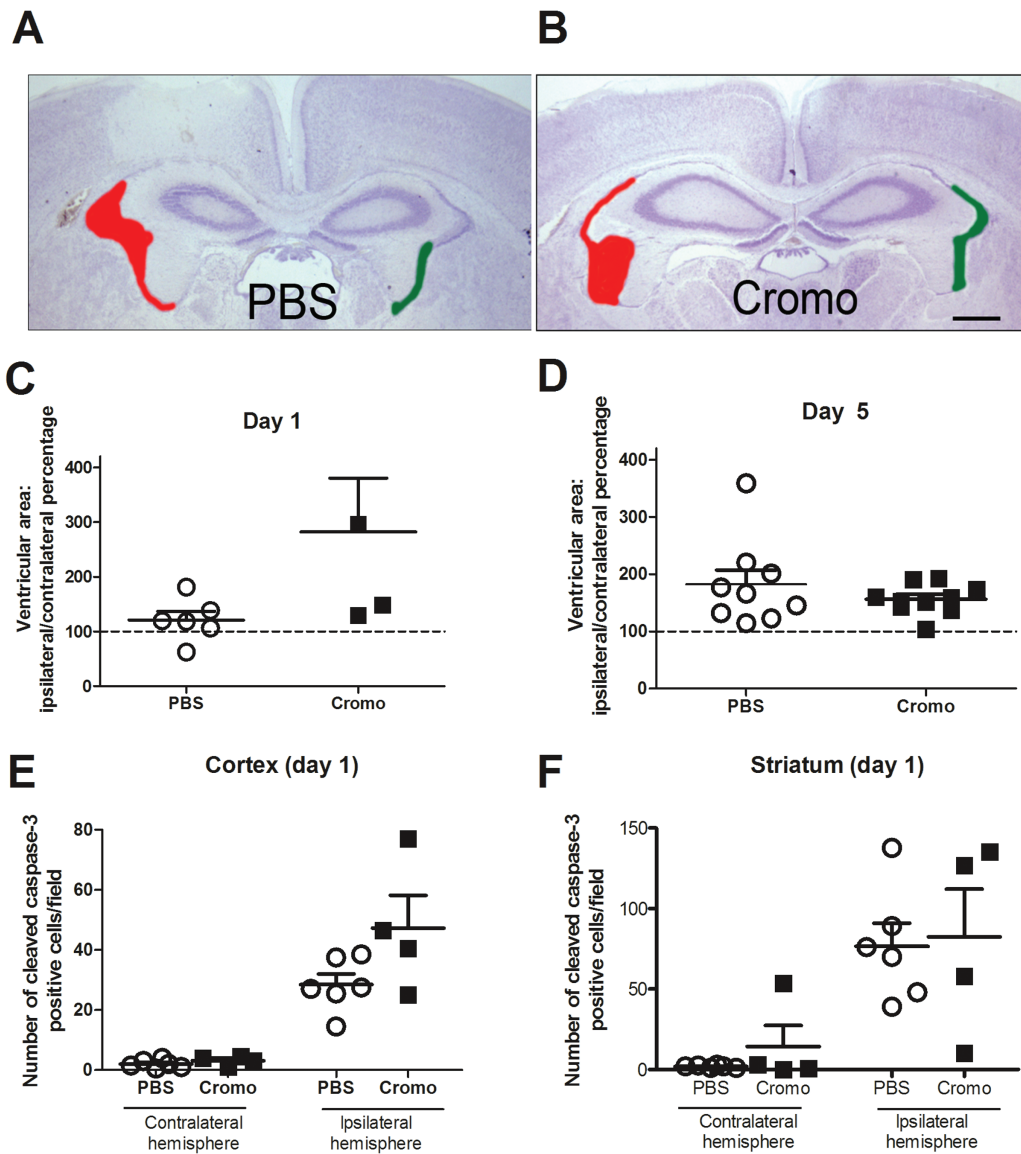


Fig. 5. Effects of post-TBI cromoglycate administration on neuropathology. **A,B**: Representative images of cresyl violet-stained sections from animals treated with PBS (**A**) or cromoglycate (Cromo; **B**) 1 hr after TBI, indicating ventricular cross-sectional area (green, right/contralateral hemisphere; red, left/ipsilateral hemisphere). Ventricular dilatation was used as an index of tissue loss. **C,D**: Quantification of ventricular area on day 1 (**C**) and day 5 (**D**) after TBI. **E,F**:

Quantification of density of CCasp-3-positive cells in PBS-treated vs. cromoglycate-treated animals in cortex (**E**) and striatum (**F**). Data are mean \pm SEM ($n = 4-6$ for 1 day after TBI, $n = 9-10$ for 5 days after TBI). Groups were compared by Mann-Whitney U test. There were no significant differences except those between ipsilateral and contralateral hemispheres (not indicated).

$n = 5$, $P = 0.02$ cortex, $P = 0.05$ striatum; Mann-Whitney U test). However, cromoglycate treatment did not significantly modify microglial numbers ($P = 0.33$ cortex, $P = 0.41$ striatum, $n = 4$; Mann-Whitney U test; Fig. 6A,B). Furthermore, 5 days after TBI (i.e., P12), there was no observable effect of cromoglycate on the area of immunolabeling for the neuronal marker MAP2 ($P = 0.72$) or the myelin marker MBP ($P = 0.08$) on the ipsilateral side

compared with the contralateral side ($n = 9-10$; Mann-Whitney U test; Fig. 6C,D). The density of Iba1-positive microglia and GFAP-positive astrocytes was also quantified on day 5 after TBI and revealed no change with cromoglycate treatment (data not shown). Together these data indicate that inhibiting MC degranulation 1 hr after TBI did not protect against inflammatory microglial activation, neuronal death, or myelination damage.

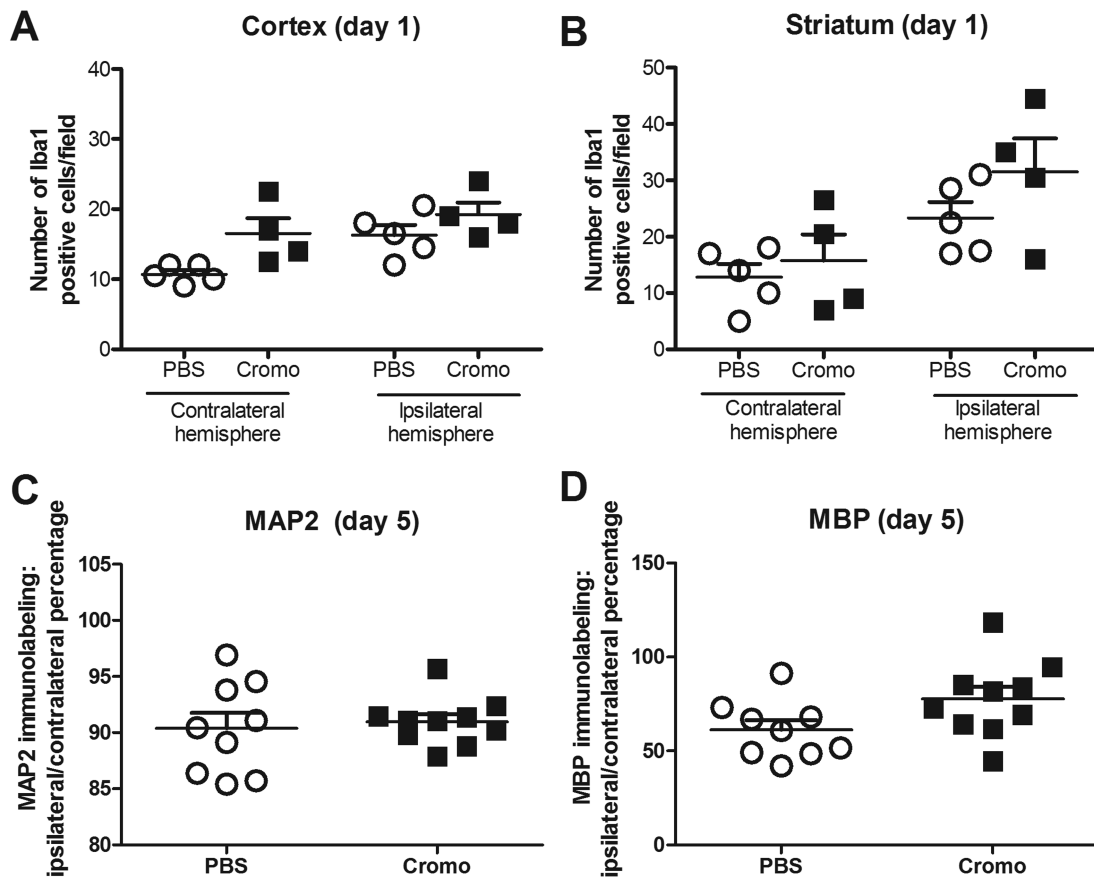


Fig. 6. Effects of post-TBI cromoglycate administration on microglial, neuronal, and myelin markers. **A,B:** Quantification of the density of Iba1-positive cells 1 day and 5 days after TBI in PBS-treated and cromoglycate-treated (1 hr after TBI) mice within cortex (A) and striatum (B). **C:** Quantification of neuronal loss on day 5 after TBI in PBS- and cromoglycate-posttreated mice based on the ratio of the area of MAP2 immunoreactivity between traumatized (ipsilateral, left) and nontraumatized (contralateral, right) hemispheres. **D:**

Quantification of myelin loss on day 5 after TBI in PBS- and cromoglycate-treated mice based on the ratio of the area of MBP immunoreactivity between traumatized (ipsilateral, left) and nontraumatized (contralateral, right) hemispheres. Data are mean \pm SEM ($n = 4$ /group for 1 day after TBI, $n = 9-10$ /group for 5 days after TBI). Groups were compared by Mann-Whitney U test. There were no significant differences except those between ipsilateral and contralateral hemispheres (not indicated).

Cromoglycate Administration Before TBI Does Not Prevent Ventricular Dilatation or Apoptosis

We previously noted a discrepancy between the effects of cromoglycate on the activation of microglia (observed in ex vivo MACS-sorted CD11b-positive cells) and the lack of a significant effect on cellular apoptosis and tissue loss in vivo. Therefore, we examined whether MC degranulation, which is an extremely rapid event, might exert greater effects at a very early postinjury stage, requiring cromoglycate treatment before TBI for any improvement in neuropathology to be observable. We repeated the above-described experiment but with cromoglycate administration 1 hr before TBI and measured changes in ventricular volume on days 1 and 5 after TBI and in CCasp-3-positive cells on day 1 after TBI. Although these results were still not significant, cromoglycate administered before TBI did appear to increase tissue loss, as measured by ventricular dilatation on day 5

but not on day 1 after TBI ($P = 0.27$, $n = 7-10$ for day 1 after TBI; $P = 0.66$, $n = 5-6$ for 5 day after TBI; Mann-Whitney U test; Fig. 7A,B). The density of apoptotic CCasp-3-positive cells in cortex or striatum of pups on day 1 after TBI was also unchanged on the ipsilateral side ($P = 0.47$, cortex, $P = 0.70$ striatum, $n = 7-10$; Mann-Whitney U test; differences were also nonsignificant for the contralateral side; Fig. 7C,D). Together these data indicate that blocking MC degranulation before TBI was insufficient to affect TBI outcome.

MC-Deficient Mice Do Not Display Altered Neuropathological Changes After TBI

Finally, we sought to verify that it was not a dose- or treatment regimen-specific effect that led us to see no effect of targeting MCs with cromoglycate in our pediatric TBI model. Therefore, we used double-heterozygous mice (cKit^{W^v/W}) lacking functional cKit leading to MC

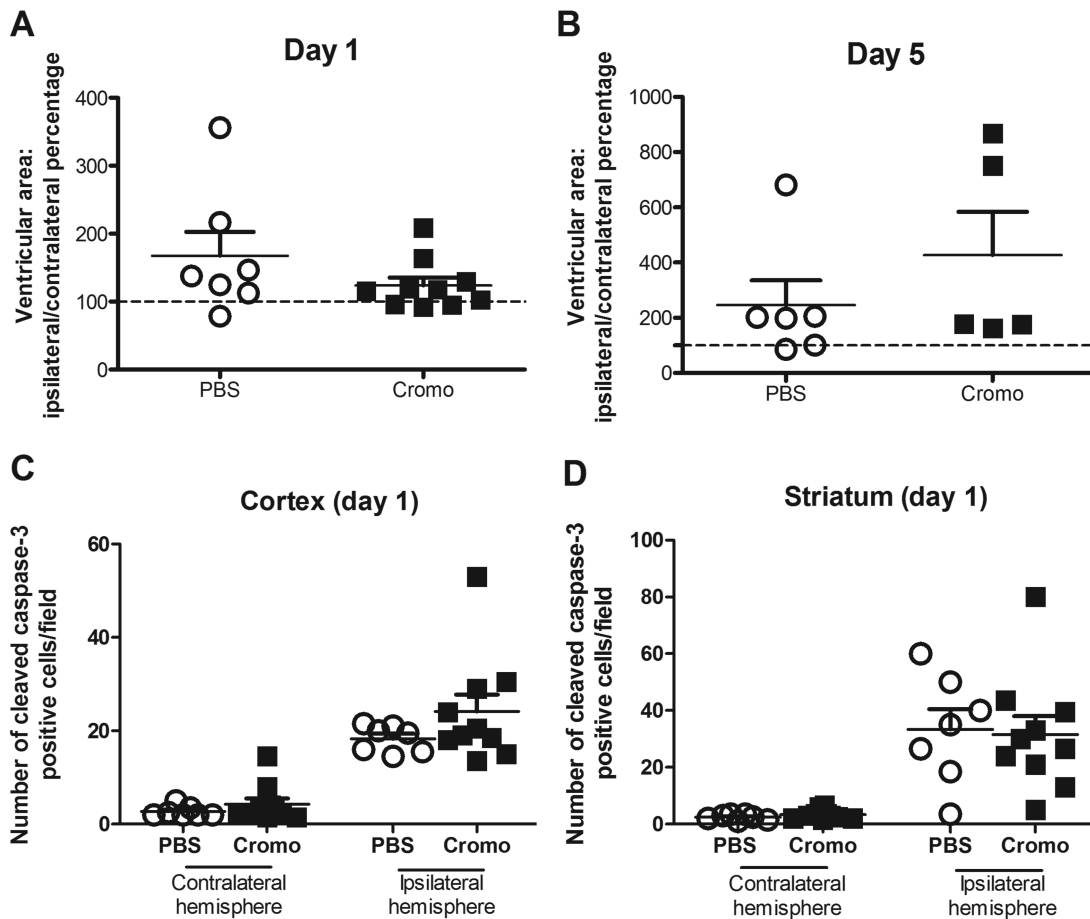


Fig. 7. Effects of pre-TBI cromoglycate (Cromo) administration on neuropathology. **A,B**: Quantification of ventricular area on 1 day (A) and 5 days (B) after TBI in PBS- and cromoglycate-pretreated (1 hr before TBI) mice. **C,D**: Quantification of density of CCasp-3-positive cells in PBS- vs. cromoglycate-treated animals in cortex (C)

and striatum (D). Data are mean \pm SEM (n = 7–10 for 1 day after TBI, n = 5–6 for 5 days after TBI). Groups were compared by Mann-Whitney U test. There were no significant differences except those between ipsilateral and contralateral hemispheres (not indicated).

depletion, with single-heterozygous littermates as controls. cKit^{Wv/W} mice subjected to TBI at P7 and sacrificed 1 day later showed no difference in the TBI-induced increase in ventricular volume compared with single-heterozygous mice (cKit^{Wv/+} or cKit^{W/+}, $P = 0.23$, n = 9–13; Mann-Whitney U test; Fig. 8A) but did show a significant increase in ventricular volume when sacrificed 5 days later ($U = 11$, n = 7–10, $P = 0.02$; Mann-Whitney U test; Fig. 8B). The density of CCasp-3-positive cells was not significantly different between cortex and striatum of cKit^{Wv/W} mice and single-heterozygous controls on day 1 after TBI ($P = 0.14$ cortex, $P = 0.36$ striatum, n = 9–13; Mann-Whitney U test; Fig. 8C,D).

In addition, cKit^{Wv/W} mice were not significantly different from their single-heterozygous littermates in terms of the density of Iba1-positive microglia in cortex or striatum 1 day after TBI ($P = 0.42$ cortex, $P = 0.76$ striatum, n = 9–13; Mann-Whitney U test; Fig. 9A,B).

Similarly, on day 5 after TBI, both groups of mice had similar area measurements of MAP2 immunolabeling as a proxy of neuronal number ($P = 0.47$, n = 7–10; Mann-Whitney U test; Fig. 9C) and MBP immunolabeling as a measure of myelination ($P = 0.89$, n = 7–10; Mann-Whitney U test; Fig. 9D). To summarize, the absence of MCs, although increasing ventricular dilatation at the late but not the early time point assessed, did not significantly influence cell death, microglial number, or surrogates of myelination or healthy mature neurons after TBI.

DISCUSSION

Previous observations have indicated that MCs infiltrate the brain and degranulate after adult TBI (Lozada et al., 2005; Levy et al., 2015), which triggers neuronal death, reactive gliosis, blood–brain barrier opening, and myelination deficits in the brain through inflammatory and excitotoxic pathways (Stokely and Orr, 2008). Therefore,

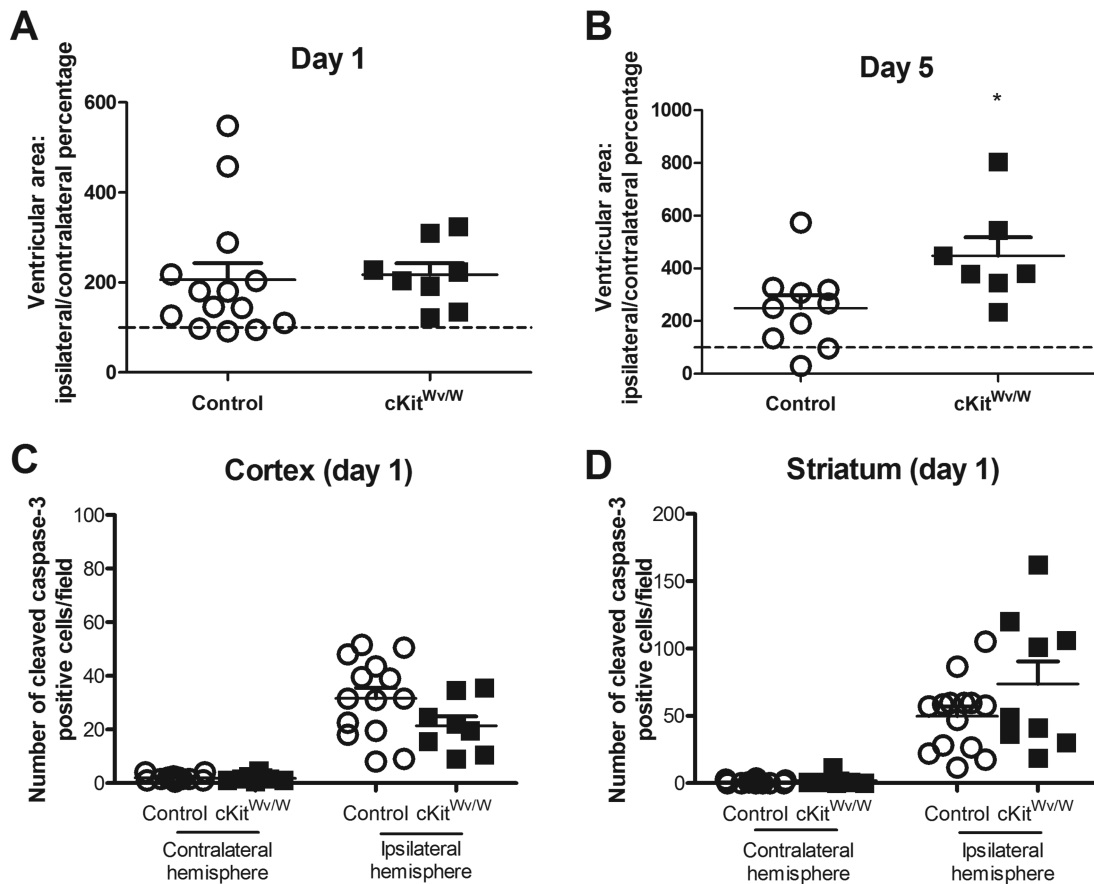


Fig. 8. Effects of genetic deletion of MCs on TBI-induced neuropathology. **A,B**: Quantification of ventricular area 1 day (A) and 5 days (B) after TBI. **C,D**: Quantification of density of CCasp-3-positive cells in MC-deficient double-heterozygous mice (cKit^{Wv/Wv}) vs. single-heterozygous controls (cKit^{Wv/+} or cKit^{+/+}) in cortex (C) and

striatum (D). Data are mean \pm SEM ($n = 9-13$ for 1 day after TBI, $n = 7-10$ for 5 days after TBI). Comparisons were carried out by Mann-Whitney U test. * $P = 0.02$. There were no other significant differences except those between ipsilateral and contralateral hemispheres (not indicated).

we examined the possibility that MC-released molecules could influence the injury mechanisms involved in a model of pediatric TBI. Our results show that several neural cell types express receptors for histamine, one of the main molecules released by MCs and a mediator of inflammation and that histamine exacerbates excitotoxic cell death in primary neuronal cultures. Furthermore, cromoglycate, an inhibitor of MC degranulation, increased the numbers of toluidine blue-positive MCs when administered peripherally before TBI, as had been previously reported in rats (Strbian et al., 2007; Dong et al., 2016). This suggests that cromoglycate effectively inhibited degranulation of the MCs that infiltrated the brain after TBI. However, we did not specifically count the degranulated cells as result of difficulties in finding these “ghost” cells because, after they release their histamine granules, they dissipate. Therefore, we can only make the assumption that increases in number reflect decreased degranulation, as previously reported (Levy et al., 2015). Cromoglycate has limited but significant effects on markers and cytokines typical of activation states of

microglia, the principal mediators of inflammation in the brain. However, whether cromoglycate was administered 1 hr before or 1 hr after TBI, it did not affect TBI-induced ventricular dilatation, apoptosis, increased microglial numbers, or measures of neuronal density or myelination. Finally, the lack of an effect of stabilizing MCs with a pharmacological approach on outcome in this model of pediatric TBI can be largely reproduced in a transgenic mouse line in which mice lack functional cKit and, as such, have no MCs. It thus appears that the influx of MCs after TBI in the pediatric brain is either not sufficient to influence the majority of the neuropathological mechanisms triggered or has effects limited to parameters that were not measured in our experiments.

This is the first study to examine the role of MCs in a pediatric TBI model. However, we have previously identified a role for these cells in a model of excitotoxicity in the immature brain (Patkai et al., 2001; Mesples et al., 2005), and cromoglycate has been shown to reduce lesion size significantly in a neonatal model of hypoxia-ischemia (Jin et al., 2007). We chose a closed-contusion weight-

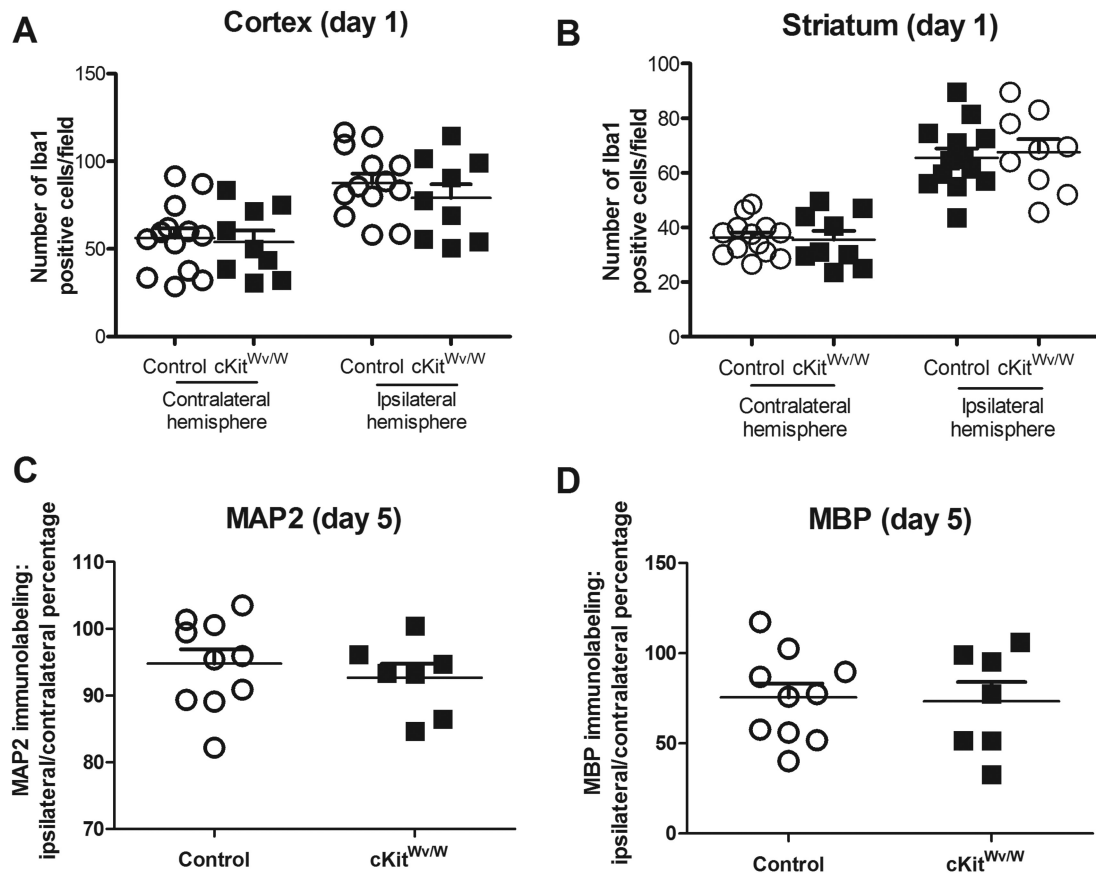


Fig. 9. Effects of genetic deletion of MCs on post-TBI microglial, neuronal, and myelin markers. **A,B**: Quantification of the density of Iba1-positive cells 1 day after TBI in MC-deficient double-heterozygous mice ($cKit^{Wv/W}$) and single-heterozygous controls ($cKit^{Wv/+}$ or $cKit^{W/+}$) within cortex (A) and striatum (B). **C**: Quantification of neuronal loss 5 days after TBI in MC-deficient double-heterozygous mice ($cKit^{Wv/W}$) vs. single-heterozygous controls ($cKit^{Wv/+}$ or $cKit^{W/+}$) based on the area of MAP2 immunoreactivity between traumatized (ipsilateral, left) and nontraumatized (contralateral, right)

hemispheres. **D**: Quantification of myelin loss 5 days after TBI in MC-deficient double-heterozygous mice ($cKit^{Wv/W}$) vs. single-heterozygous controls ($cKit^{Wv/+}$ or $cKit^{W/+}$) based on the ratio of the area of MBP immunoreactivity between traumatized (ipsilateral, left) and nontraumatized (contralateral, right) hemispheres. Data are mean \pm SEM ($n = 9-13$ for 1 day after TBI, $n = 7-10$ for 5 days after TBI). Comparisons were carried out by Mann-Whitney U test. There were no significant differences except those between ipsilateral and contralateral hemispheres (not indicated).

drop model of TBI in P7 mice for this study because the injury mechanisms triggered in this model are similar to those seen in pediatric TBI (Xiong et al., 2013). Our observations on the distribution and timing of cell death are generally in agreement with previous studies that used a similar closed-contusion model in neonatal rodents (Bittigau et al., 1999; Kaindl et al., 2007). In an adult TBI model with the same MC-deficient ($cKit$ knockout) mice that were used in this study (Hendrix et al., 2013), MCs were shown to be protective and were associated with reduced lesion size, astrogliosis, and T-cell infiltration. In our pediatric model, however, apart from an indication that TBI-induced ventricular dilatation could be aggravated in the absence of MCs, the cellular and myelination markers measured were not affected in $cKit$ mice. There are several physiological reasons why the effects of MCs in TBI might differ between the adult and the neonatal brain, including

1) the substantially greater number of MCs in the brain of neonatal rodents and humans compared with adults (Dropp, 1979; Khalil et al., 2007), 2) the differential effects of MC granular contents on the vasculature (Stolp et al., 2005; Ribatti, 2015), and 3) the developmental regulation of MC phenotype, including the types of chymases produced (Dimitriadou et al., 1996). In addition to histamine, MC granules contain a variety of molecules such as heparin, various cytokines, several chymases, and others that are capable of mediating either injury or neuroprotection, and the exact effects of their degranulation could depend on both age and the injury context (Piliponsky et al., 2012; Hendrix et al., 2013). Additional in-depth mechanistic studies are required to elucidate the differences in the underlying neuropathology between hypoxic/ischemic and excitotoxic injury vs. TBI in neonates and the role of MCs in these differences.

The specificity of cromoglycate as a stabilizer of MCs in mice has been contested, but it is acknowledged that, even in rats in which this drug is considered MC specific, subpopulations of MCs respond very differently to cromoglycate exposure (Chen et al., 2001). In addition, as previously mentioned, there are striking differences between neonatal and adult MCs that may influence specificity and effect size (Dimitriadou et al., 1996; Khalil et al., 2007; Monk et al., 2007), and these variables have not been addressed in the literature with regard to the differences between mouse and rat responses to cromoglycate. Furthermore, supporting the efficacy of cromoglycate in mice is the fact that it has been demonstrated to reduce IgM-mediated autoimmunity in a mouse model, an effect not observed in cKit MC KO mice (Chen et al., 2001). In a mouse model of peripheral nerve injury, cromoglycate prevented MC recruitment into the injury (Monk et al., 2007), and we noted that treatment increased the number of MCs, suggesting they were prevented from degranulation because of TBI. Together with the strong safety profile of cromoglycate in the pediatric population, previous work with cromoglycate in mice justified the use of this compound here.

We observed MC recruitment primarily in the meninges, as previously reported in an adult model of TBI (Shimada et al., 2012), although we did not count degranulated “ghost” MC numbers to replicate directly the observation that, in addition to recruitment, there is degranulation of MCs, such as after adult TBI (Lozada et al., 2005) or neonatal hypoxia-ischemia (Biran et al., 2008; Jin et al., 2009). We deduce from the further increase in MC numbers vs. TBI only caused by cromoglycate that degranulation of these recruited MCs was prevented. However, unlike previous reports, we did not observe an increase in microglial number after the inhibition of MC degranulation (Hendrix et al., 2013). Cromoglycate was able to reduce the proinflammatory-associated markers in TBI-activated microglia generally, i.e., reducing iNOS, COX2, and TNF- α . However, the response of microglia was small overall in response to TBI compared with the response to insults such as lipopolysaccharide exposure (Smith et al., 2014). In contrast to our observations, an anti-inflammatory effect of histamine on activated microglia has previously been reported (Ferreira et al., 2012).

In summary, MCs infiltrate the brain and degranulate after TBI at P7. However, despite some modulatory effects of MC degranulation on the inflammatory phenotype of microglia, pharmacologically suppressing MC activity or genetically eliminating MCs had little effect on tissue loss or associated cellular and neuroanatomical changes in our model. This suggests that, compared with those in the adult brain, the effects of MCs in TBI during development may be limited and not a viable target for neurotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Angela Kaindl and Prof. Chris Ikonomidou for work relating to the setup of the TBI

model. The financial supporting organizations played no role in any aspect of study design, analysis, or interpretation or the decision to publish this article.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors have no conflicts of interest.

ROLE OF AUTHORS

All authors had full access to all data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of data analysis. Study concept and design: RM, VC, VD, LT, PG, BF. Technical and material support and acquisition of data: RM, VC, DB, EB, SDL, TLC, SL, LS, JP. Analysis and interpretation of data: RM, VC, TLC, SL, LS, JP, VD, LT, PG, BF. Drafting of the manuscript: RM, VC, SR, VD, LT, PG, BF. Critical revision of the article for important intellectual content: RM, VC, SR, VD, LT, PG, BF. Statistical analysis: RM, VC, PG, BF. Obtained funding: VD, PG, BF. Study supervision: VD, LT, PG, BF.

REFERENCES

- Anderson V, Catroppa C, Morse S, Haritou F, Rosenfeld J. 2005. Functional plasticity or vulnerability after early brain injury? *Pediatrics* 116: 1374–1382.
- Bennet L, Van Den Heuvel L, Dean JM, Drury P, Wassink G, Gunn AJ. 2013. Neural plasticity and the Kennard principle: does it work for the preterm brain? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40:774–784.
- Biran V, Cochois V, Karroubi A, Arrang JM, Charriat-Marlangue C, Heron A. 2008. Stroke induces histamine accumulation and mast cell degranulation in the neonatal rat brain. *Brain Pathol* 18:1–9.
- Bittigau P, Siflinger M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Speer A, Olney JW, Ikonomidou C. 1999. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 45:724–735.
- Chen R, Ning G, Zhao ML, Fleming MG, Diaz LA, Werb Z, Liu Z. 2001. Mast cells play a key role in neutrophil recruitment in experimental bullous pemphigoid. *J Clin Invest* 108:1151–1158.
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Ore MV, Celador IL, Jossierand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Savman K, Mallard C, Gressens P, Fleiss B. 2013. Characterization of phenotype markers and neurotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun* 32:70–85.
- Colton C, Wilcock DM. 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:174–191.
- Dean JM, Wang X, Kaindl AM, Gressens P, Fleiss B, Hagberg H, Mallard C. 2010. Microglial MyD88 signaling regulates acute neuronal toxicity of LPS-stimulated microglia in vitro. *Brain Behav Immun* 24: 776–783.
- Dimitriadou V, Rouleau A, Tuong MD, Ligneau X, Newlands GF, Miller HR, Schwartz JC, Garbarg M. 1996. Rat cerebral mast cells undergo phenotypic changes during development. *Brain Res Dev Brain Res* 97:29–41.
- Dong H, Zhang X, Wang Y, Zhou X, Qian Y, Zhang S. 2016. Suppression of brain mast cells degranulation inhibits microglial activation and central nervous system inflammation. *Mol Neurobiol* [E-pub ahead of print].
- Dropp JJ. 1979. Mast cells in the human brain. *Acta Anat* 105:505–513.
- Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenburg-Didinger G, Lacaud A, Saliba E, Dammann O, Gallego J, Sizonenko S, Hagberg H, Lelievre V, Gressens P. 2011. Systemic

- inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol* 70:550–565.
- Ferreira R, Santos T, Goncalves J, Baltazar G, Ferreira L, Agasse F, Bernardino L. 2012. Histamine modulates microglia function. *J Neuroinflammation* 9:90.
- Fleiss B, Nilsson MK, Blomgren K, Mallard C. 2012. Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitized neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *J Neuroinflammation* 9:70.
- Galli SJ, Nakae S, Tsai M. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6:135–142.
- Hagberg H, Gressens P, Mallard C. 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol* 71:444–457.
- Hendrix S, Kramer P, Pehl D, Warnke K, Boato F, Nelissen S, Lemmens E, Pejler G, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. 2013. Mast cells protect from posttraumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4. *FASEB J* 27:920–929.
- Husson I, Rangon CM, Lelievre V, Bemelmans AP, Sachs P, Mallet J, Kosofsky BE, Gressens P. 2005. BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex* 15:250–261.
- Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. 2007. Mast cell stabilization limits hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Dev Neurosci* 29:373–384.
- Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. 2009. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke* 40:3107–3112.
- Kaindl AM, Zabel C, Stefovskaja V, Lehnert R, Siffringer M, Klose J, Ikonomidou C. 2007. Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborization. *Proteomics Clin Appl* 1:640–649.
- Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Jossierand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler JP, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P. 2012. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol* 72:536–549.
- Keenan HT, Runyan DK, Marshall SW, Nocera MA, Merten DF, Sinal SH. 2003. A population-based study of inflicted traumatic brain injury in young children. *JAMA* 290:621–626.
- Khalil M, Ronda J, Weintraub M, Jain K, Silver R, Silverman AJ. 2007. Brain mast cell relationship to neurovasculature during development. *Brain Res* 1171:18–29.
- Koepsell TD, Rivara FP, Vavilala MS, Wang J, Temkin N, Jaffe KM, Durbine DR. 2011. Incidence and descriptive epidemiologic features of traumatic brain injury in King County, Washington. *Pediatrics* 128:946–954.
- Levy D, Edut S, Baraz-Goldstein R, Rubovitch V, Defrin R, Bree D, Garipey H, Zhao J, Pick CG. 2015. Responses of dural mast cells in concussive and blast models of mild traumatic brain injury in mice: potential implications for posttraumatic headache. *Cephalalgia* 36:915–923.
- Lozada A, Maegele M, Stark H, Neugebauer EM, Panula P. 2005. Traumatic brain injury results in mast cell increase and changes in regulation of central histamine receptors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:150–162.
- Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Bernstein A, Zsebo KM, Zetter BR. 1992. The c-kit receptor ligand functions as a mast cell chemoattractant. *Blood* 79:958–963.
- Mesples B, Fontaine RH, Lelievre V, Launay JM, Gressens P. 2005. Neuronal TGF-beta1 mediates IL-9/mast cell interaction and exacerbates excitotoxicity in newborn mice. *Neurobiol Dis* 18:193–205.
- Monk KR, Wu J, Williams JP, Finney BA, Fitzgerald ME, Filippi MD, Ratner N. 2007. Mast cells can contribute to axon-glial dissociation and fibrosis in peripheral nerve. *Neuron Glia Biol* 3:233–244.
- Panula P, Sundvik M, Karlstedt K. 2014. Developmental roles of brain histamine. *Trends Neurosci* 37:159–168.
- Patkai J, Mesples B, Dommergues MA, Fromont G, Thornton EM, Renaud JC, Evrard P, Gressens P. 2001. Deleterious effects of IL-9-activated mast cells and neuroprotection by antihistamine drugs in the developing mouse brain. *Pediatr Res* 50:222–230.
- Piliponsky AM, Chen CC, Rios EJ, Treuting PM, Lahiri A, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. 2012. The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis. *Am J Pathol* 181:875–886.
- Pinto PS, Poretti A, Meoded A, Tekes A, Huisman TA. 2012. The unique features of traumatic brain injury in children. Review of the characteristics of the pediatric skull and brain, mechanisms of trauma, patterns of injury, complications and their imaging findings—part 1. *J Neuroimaging* 22:e1–e17.
- Ransohoff RM, Perry VH. 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119–145.
- Ribatti D. 2015. The crucial role of mast cells in blood-brain barrier alterations. *Exp Cell Res* 338:119–125.
- Rivara FP, Vavilala MS, Durbine D, Temkin N, Wang J, O'Connor SS, Koepsell TD, Dorsch A, Jaffe KM. 2012. Persistence of disability 24 to 36 months after pediatric traumatic brain injury: a cohort study. *J Neurotrauma* 29:2499–2504.
- Schang AL, Van Steenwinckel J, Chevenne D, Alkmark M, Hagberg H, Gressens P, Fleiss B. 2014. Failure of thyroid hormone treatment to prevent inflammation-induced white matter injury in the immature brain. *Brain Behav Immun* 37:95–102.
- Shimada R, Nakao K, Furutani R, Kibayashi K. 2012. A rat model of changes in dural mast cells and brain histamine receptor H3 expression following traumatic brain injury. *J Clin Neurosci* 19:447–451.
- Silver R, Silverman AJ, Vitkovic L, Lederhendler II. 1996. Mast cells in the brain: evidence and functional significance. *Trends Neurosci* 19:25–31.
- Smith PL, Hagberg H, Naylor AS, Mallard C. 2014. Neonatal peripheral immune challenge activates microglia and inhibits neurogenesis in the developing murine hippocampus. *Dev Neurosci* 36:119–131.
- Stokely ME, Orr EL. 2008. Acute effects of calvarial damage on dural mast cells, pial vascular permeability, and cerebral cortical histamine levels in rats and mice. *J Neurotrauma* 25:52–61.
- Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Lane MA, Potter AM, Saunders NR. 2005. Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell Tissue Res* 320:369–378.
- Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. 2006. Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:605–612.
- Strbian D, Tatlisumak T, Ramadan UA, Lindsberg PJ. 2007. Mast cell blocking reduces brain edema and hematoma volume and improves outcome after experimental intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:795–802.
- Turner CP, Seli M, Ment L, Stewart W, Yan H, Johansson B, Fredholm BB, Blackburn M, Rivkees SA. 2003. A1 adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11718–11722.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci* 14:128–142.

VI. STUDIO II: RUOLO DELLE CELLULE GLIALI IN UN MODELLO MURINO DI ISCHEMIA CEREBRALE PERINATALE

Introduzione:

Lo stroke ischemico perinatale è una delle forme più frequenti di infarto cerebrale neonatale. Una riduzione regionale del flusso ematico cerebrale (cerebral blood flow, CBF) è il principale fattore determinante la topografia dell'evento, e determina l'area necrotica infartuale. Il mantenimento di un flusso ematico sufficiente a livello dell'area adiacente alla zona necrotica è dovuto all'apertura della circolazione collaterale. Il reclutamento dei vasi collaterali è la conseguenza di una vasodilatazione mediata dall'ossido Nitrico (Nitric Oxide, NO), e l'azione dell'NO endogeno può essere amplificata evitando la degradazione del GMP ciclico (cGMP) da parte delle fosfodiesterasi (PDEs). In particolare il sildenafil ed il Tadalafil, due potenti inibitori selettivi della PDEA5, allungano i tempi d'azione del cGMP in vari distretti vascolari. In maniera interessante, in un precedente lavoro effettuato nel nostro laboratorio, il sildenafil aumenta il CBF nel cucciolo di ratto, riducendo i danni ipossico-ischemici¹⁵⁴. Accanto ai suoi noti effetti vascolari, il sildenafil sembrerebbe avere anche altre possibili azioni, ed in particolare sulla modulazione dell'infiammazione. Una molecola della stessa famiglia, lo zaprinast, ha dimostrato ridurre significativamente l'attivazione microgliale ed astrocitaria in ratti adulti sottoposti a traumatismo cranico¹⁶⁴. La microglia è una delle popolazioni cellulari chiave nell'evoluzione della risposta infiammatoria, ma il suo ruolo nelle lesioni ischemiche cerebrali resta dibattuto¹⁶⁵. Tali cellule possono, infatti, shiftare da un fenotipo pro-infiammatorio (M1) ad un fenotipo rigenerativo e di immunomodulazione (M2) a seconda dei diversi stimoli (vedi introduzione).

Sulla base di tali premesse, in questo lavoro gli obiettivi che ci siamo posti sono i seguenti: 1) valutare gli effetti del sildenafil sul CBF in un modello murino di ischemia pura 2) osservare

se tale molecola avesse o meno la capacità di modulare la microglia/la popolazione monocito/macrofagica in senso M1 o M2 in topi di 9 giorni di vita (P9) che sono andati incontro ad ischemia in seguito all'occlusione permanente dell'arteria cerebrale media (pMCAo):

Risultati:

Il nostro studio evidenzia che

- 1. Le modificazioni anatomopatologiche nel tempo sono caratterizzate da una progressione della lesione ischemica in termini di aumento dell'area di rarefazione cellulare e formazione di una cavità a livello del territorio d'irrorazione dell'arteria cerebrale media.**
- 2. Per quanto riguarda lo studio emodinamico, contrariamente a ciò che è stato evidenziato in un modello di ischemia-riperfusionne nel ratto, nel nostro modello la somministrazione di sildenafil subito dopo l'insulto ischemico non induce un aumento della circolazione collaterale (NO mediato).**
- 3. Dal punto di vista anatomopatologico i topi che hanno ricevuto il sildenafil non presentano una riduzione dell'area ischemica rispetto ai controlli a 72 ore dall'insulto, mentre si evidenzia una significativa riduzione dell'evoluzione della lesione a 8 giorni di distanza. Tale neuroprotezione è accompagnata da una riduzione significativa della gliosi perilesionale.**

Il risultati del nostro studio hanno dimostrato che, nel topo C57Bl6j, l'evoluzione naturale della lesione ischemica è caratterizzata da una progressione dell'estensione della lesione che continua anche oltre le 72 ore, ed a 8 giorni dall'insulto raggiunge un plateau, con un aspetto cavitario a livello del core infartuale, e cicatriziale nell'area limitrofa, con un evidente cicatrice gliale. Tale evoluzione è differente da quella riscontrata in modelli di ratto, sia nel

nostro laboratorio, che in letteratura, dove l'estensione della lesione ischemica si stabilizza in 24 ore dall'infarto ^{153,154}. Nel topo C57Bl6j, inoltre, gli animali trattati con sildenafil non presentano una buona risposta emodinamica compensatoria, come evidenziano i risultati dell'esame doppler comune e della metodica del laser spekle contrast imaging (che valuta l'entità della perfusione arteriolare superficiale). La valutazione anatomopatologica a 72 ore conferma la mancata neuroprotezione in acuto del sildenafil, con un volume lesionale nei topi affetti comparabile a quella dei controlli. Anche questi risultati si discostano dai precedenti studi effettuati nel nostro laboratorio ed in letteratura con il ratto ¹⁵⁴. In tale modello, a seguito della somministrazione del sildenafil, vi era una significativa risposta in termini di vasodilatazione arteriolare, che corrispondeva dal punto di vista anatomopatologico ad una significativa riduzione dell'area ischemica ed ad una riduzione della risposta infiammatoria e dal punto di vista clinico ad un miglioramento delle performance motorie ¹⁵⁴.

La mancata efficacia del sildenafil in acuto può essere spiegata dalla carenza di arborizzazione arteriolare, che non può quindi rispondere ad uno stimolo vasodilatatorio e supplire alle carenze vascolari indotte dal trombo. Queste conclusioni fanno del nostro modello un buon modello per studiare proprio quella parte di popolazione i cui benefici di una terapia vasodilatatrice (es.NO inalato) non sarebbero ottimali (es. drepanocitosi, cervello neonatale, vasculopatie ecc.).

Il topo C57Bl/6j presenta una scarsa arborizzazione arteriolare, e può quindi rappresentare un modello di “bad responders” ad eventuali terapie vasodilatative acute. In tale modello le proprietà di neuroprotezione in acuto mediate dal sildenafil non sono più evidenti.

4. In un modello caratterizzato da una scarsa risposta vascolare compensatoria postischemica, il sildenafil esercita una neuroprotezione a medio termine caratterizzata da una ridotta evoluzione dell'estensione lesionale.

Il nostro studio dimostra che, a 8 giorni di distanza dall'insulto ischemico, i topi trattati con sildenafil presentano una lesione ischemica significativamente meno estesa rispetto ai controlli (Vedi Figura 2b, nell'articolo), in una maniera dose dipendente. Il farmaco induce una riduzione dell'evoluzione ischemica spontanea riscontrata in tale modello. Tale risultato dimostra che il sildenafil non agisce solo attraverso il suo effetto mediato dall'NO di rilassamento della muscolatura liscia vascolare, ma anche con meccanismi diversi, più lenti. Questi dati concordano con i risultati ottenuti dal gruppo di Chopp and Co, dove il sildenafil veniva somministrato nel ratto in una finestra temporale ritardata, dove l'estensione della lesione ischemica era già stabilizzata. Nel loro lavoro la somministrazione di sildenafil comportava un recupero funzionale a lungo termine^{153,166,167}.

5. L'effetto ritardato del sildenafil è correlato ad un'aumentata gliosi a 72 h ed ad una ridotta gliosi cerebrale a 8 ore. Il sildenafil modifica, inoltre, la localizzazione delle cellule microgliali pro-infiammatorie che si trovavano soprattutto a livello della penombra ischemica e non a livello del core necrotico come nei controlli.

Nel nostro studio il sildenafil somministrato nell'immediato postoperatorio induce un aumento della gliosi a 72 ore dall'insulto alla dose di 10 mg/kg, e, paradossalmente, una riduzione astrocitaria e microgliale a 8 giorni, a livello della penombra ischemica. Anche la localizzazione delle cellule microgliali è differente negli animali trattati con sildenafil ad alte dosi: a 72 ore abbiamo trovato molte più cellule Cox2+ nella penombra negli animali trattati, mentre in quelli non trattati le cellule cox2+ si trovavano nel core lesionale (vedi figura 3 nell'articolo).

6. Il sildenafil induce uno switch fenotipico microgliale in senso antiinfiammatorio.

Studi in vitro ed in vivo sul fenotipo di attivazione microgliale sono in crescita. Basandosi su precedenti studi sui monociti circolanti, si è visto che una stimolazione pro infiammatoria (LPS, TNF α , IL1 β) induce in vitro un aumento dei marcatori di attivazione M1/M2b ed una riduzione dei marcatori M2a, ed al contrario una stimolazione con IL-4, nota citochina antiinfiammatoria, induce un aumento dei markers di attivazione M2a senza modificare i markers M1/M2b. Colture neuronali primarie risultano inoltre danneggiate in presenza di surnattante del primo fenotipo, neuroprotette in presenza del surnattante del secondo fenotipo⁴⁷. Sulla base di tali evidenze abbiamo scelto di analizzare tramite qPCR 3 markers di attivazione per fenotipo, ed in particolare Cox2 (ptgs2), CD32 e CD86 per il fenotipo M1 “citotossico e proinfiammatorio”, Arg1, Lgals1 e CD206 (MRC1) per il fenotipo M2a di “riparazione e rigenerazione”, IL1-Rn, Sphk1, IL1-Ra per il fenotipo M2b di “immunomodulazione”. Nel nostro modello, per quanto riguarda l’espressione genica, si evidenzia, sia a 72h che a 8 giorni dall’ischemia, una diffusa attivazione globale di tutti i fenotipi microgliali a livello della penombra lesionale rispetto ad una regione corrispondente della corteccia controlaterale, fatta eccezione per Cox2. Il trattamento con sildenafil invece, sembra agire in maniera molto diversa ai due time points: a 72 ore dall’insulto ischemico non modifica i livelli dei markers di attivazione di tipo M1, limita in maniera molto lieve l’aumento di CD206 (fenotipo M2a) e in maniera più marcata l’aumento di IL1-RN ed IL4-Ra (fenotipo M2b); a 8 giorni dall’insulto, invece, aumenta i livelli di CD32 e CD86, marker M1, ed in maniera più consistente attiva il fenotipo M2a (CD206, Arg1 e Lgals3). Per quanto riguarda il fenotipo M2b, il cui ruolo è ambiguo, due dei tre marcatori risultano poco attivati nella penombra ischemica indipendentemente dal trattamento, mentre IL1-RN, la cui espressione è aumentata a livello della penombra, è ulteriormente aumentato nel gruppo di animali trattati con sildenafil (vedi figure 4 e 5 nell’articolo).

5. In maniera interessante, il marcatore fenotipico M1 Cox2 è coespresso, nella stessa cellula microgliale, con il marcatore fenotipico CD206.

Se i marcatori M1/M2 sono coespressi da una stessa cellula microgliale o se vengono espressi da cellule differenti che assumono ruoli opposti, non è ancora chiarito. Anche gli stimoli che inducono lo shift tra un fenotipo microgliale e l'altro sono tutt'altro che noti. Se le evidenze in vitro sembrano essere piuttosto concordanti sulla più parte dei marcatori utilizzati, gli studi in vivo risultano invece contraddittori, e spesso opposti a seconda del modello, del timing a cui vengono analizzati, e all'età dell'animale.

In maniera interessante, nel nostro lavoro abbiamo selezionato un marker di tipo M1 e un marker di tipo M2 e li abbiamo marcati con degli anticorpi fluorescenti, con una tecnica di co-marcaggio. Tale test di immunostochimica ha evidenziato come CD206 si trovi esclusivamente a livello perivascolare, sulla membrana cellulare di una cellula che sicuramente rappresenta una cellula microgliale, e tale cellula esprime allo stesso tempo Cox 2 (vedi figura 7a, nell'articolo).

RESEARCH

Open Access



Sildenafil, a cyclic GMP phosphodiesterase inhibitor, induces microglial modulation after focal ischemia in the neonatal mouse brain

Raffaella Moretti^{1,2}, Pierre-Louis Leger^{1,3}, Valérie C. Besson^{1,4}, Zsolt Csaba¹, Julien Pansiot¹, Lorena Di Criscio¹, Andrea Gentili¹, Luigi Titomanlio^{1,7}, Philippe Bonnin^{5,6}, Olivier Baud^{1,8} and Christiane Charriaut-Marlangue^{1,9*}

Abstract

Background: Perinatal ischemic stroke is the most frequent form of cerebral infarction in neonates; however, evidence-based treatments are currently lacking. We have previously demonstrated a beneficial effect of sildenafil citrate, a PDE-5 inhibitor, on stroke lesion size in neonatal rat pups. The present study investigated the effects of sildenafil in a neonatal mouse stroke model on (1) hemodynamic changes and (2) regulation of astrocyte/microglia-mediated neuroinflammation.

Methods: Ischemia was induced in C57Bl/6 mice on postnatal (P) day 9 by permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAo), and followed by either PBS or sildenafil intraperitoneal (i.p.) injections. Blood flow (BF) velocities were measured by ultrasound imaging with sequential Doppler recordings and laser speckle contrast imaging. Animals were euthanized, and brain tissues were obtained at 72 h or 8 days after pMCAo. Expression of M1- and M2-like microglia/macrophage markers were analyzed.

Results: Although sildenafil (10 mg/kg) treatment potently increased cGMP concentrations, it did not influence early collateral recruitment nor did it reduce mean infarct volumes 72 h after pMCAo. Nevertheless, it provided a significant dose-dependent reduction of mean lesion extent 8 days after pMCAo. Suggesting a mechanism involving modulation of the inflammatory response, sildenafil significantly decreased microglial density at 72 h and 8 days after pMCAo. Gene expression profiles indicated that sildenafil treatment also modulates M1- (*ptgs2*, *CD32* and *CD86*) and M2-like (*CD206*, *Arg-1* and *Lgals3*) microglia/macrophages in the late phase after pMCAo. Accordingly, the number of COX-2⁺ microglia/macrophages significantly increased in the penumbra at 72 h after pMCAo but was significantly decreased 8 days after ischemia in sildenafil-treated animals.

Conclusions: Our findings argue that anti-inflammatory effects of sildenafil may provide protection against lesion extension in the late phase after pMCAo in neonatal mice. We propose that sildenafil treatment could represent a potential strategy for neonatal ischemic stroke treatment/recovery.

Keywords: Neonatal mice, Focal ischemia, Microglia, M2 microglia, Microcirculation

* Correspondence: christiane.marlangue@gmail.com

Olivier Baud and Christiane Charriaut-Marlangue share senior authorship.

¹University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, INSERM, UMR 1141, 75019 Paris, France

⁹INSERM UMR 1141, Hopital Robert Debré, 48 bd Serurier, 75019 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Perinatal/neonatal arterial stroke is a cerebrovascular event occurring around the time of birth, with pathological or radiological evidence of focal arterial infarction mainly affecting the middle cerebral arterial territory, with an incidence of 1/2800 to 1/5000 live births. There is currently no evidence-based treatment for neonates with stroke [1].

Decreased regional cerebral blood flow (CBF) is the principal factor determining the topography of tissue injury after cerebral ischemia and/or hypoxia-ischemia (HI) in the mature and immature rodents [2]. Partially maintained blood flow in the penumbral tissue after stroke is primarily due to the recruitment of collateral circulation in the brain. Collateral recruitment involves nitric oxide (NO)-dependent vasodilatation, and the effects of endogenous NO may be enhanced by preventing cGMP degradation by phosphodiesterases (PDEs). In particular, sildenafil and tadalafil, two potent selective PDE-5 inhibitors, prolong the action of cGMP in multiple vascular territories [3]. Interestingly, sildenafil treatment, by increasing CBF, reduced HI damage in the P7 rat brain [4]. Sildenafil has been reported to promote neurorestoration in rat models of stroke as measured by neurogenesis, synaptogenesis, and angiogenesis [5] and to reduce proliferation of astrocytes and microglia in chronic inflammatory diseases [6].

While microglia are considered as conductors of the inflammatory response in the central nervous system (CNS), their contribution to the progression of ischemic stroke remains debated [7]. Microglia/macrophages may transition between inflammatory and healing phenotypes in response to specific activation cues (review in [8]). While the M1 or classic phenotype is neuroinflammatory and neurotoxic, the M2 phenotype supports the recovery or neural tissue and is characterized by the production of anti-inflammatory mediators and neurotrophic factors [9]. Although the action of sildenafil on neuroinflammation is not fully understood, the cGMP-PDE inhibitor zaprinast was shown to significantly reduce the inflammatory response of astrocytes and microglia/macrophages in adult rats submitted to focal traumatic brain injury [10].

Revealing molecular mechanisms and pharmacological treatments that promote the transition of microglia/macrophages towards a phenotype that facilitates the repair of the neonatal brain after ischemic damage is of therapeutic interest. The goal of this study is to examine if sildenafil citrate (1) mediates CBF and reduces lesion damage and (2) modifies the modulation of microglia/macrophage between M1 and M2 phenotypes in P9 mice subjected to ischemia after permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAo).

Methods

Ethics statement

All experiments were carried out (license A75-19-01, French Department of Agriculture) in accordance with the European Committee's Council Directive and performed to comply with the ethical guidelines of the Robert Debre Hospital Research Council Review Board and have been approved by the local ethic committee (Paris7, France).

Ischemia

pMCAo was carried out under isoflurane anesthesia in 30 % O₂ and 70 % N₂O in P9 C57Bl/6 mouse (Janvier, Le Genest-St. Isle, France; 4.6 ± 0.6 g, *n* = 148). Pups were sacrificed at 72 h and/or 8 days after pMCAo. Two investigators, both blinded to the treatment group, determined the size of the lesion in each animal [11].

Drug treatment

In the first set of experiments, animals were randomly divided into five groups and treated with either PBS or a single dose of sildenafil citrate (0.5, 2.5, 10, and 15 mg/kg; Pfizer, France), given intraperitoneally (i.p.) 5 min after pMCAo. In the second set of experiments, animals were randomly divided into three groups and treated with either PBS or a single dose of sildenafil citrate (0.5 and 10 mg/kg, i.p.) 5 min after pMCAo (see Additional file 1: Figure S1 for an outline of the experimental procedure).

cGMP measurement

Competitive enzyme immunoassay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) was used to quantify cGMP in the forebrain, according to the manufacturer's instructions. Whole brains at P9 were harvested 1 and 3 h after the administration of sildenafil (0.5 and/or 10 mg/kg) and immediately frozen at -80 °C until measurements were performed.

Ultrasonographic brain imaging

Thermoregulated mice (*n* = 6 per group) were subjected to ultrasound measurements under inhaled isoflurane anesthesia (0.8 % in air via a facemask) using an echograph (ACUSON S3000, Siemens, Erlangen, Germany) equipped with a 14.5-MHz linear transducer (14L5 SP) [12]. Heart rate and time-average mean blood flow velocities (mBFVs) were measured in both intracranial carotid arteries (ICA) and the basilar trunk (BT) at baseline and 1 h after pMCAo and PBS and sildenafil (10 mg/kg) treatment.

Laser speckle contrast (LSC) imaging

Imaging was carried out using a full-field laser perfusion imager (FLPI2, Moor Instruments Ltd., Axminster, UK)

[12]. Briefly, thermoregulated and anesthetized (with 1 % isoflurane inhalation in air via a facemask) mouse pups ($n = 6$ per group) were placed in lateral decubitus and the skin incised to provide access to the skull. Vegetable oil was applied to avoid surface dryness. Speckle images (760×568 pixels) were collected at 0.25 Hz (4 ms exposure time) and recorded at baseline, after MCA electrocoagulation and 5, 15, 60, and 90 min after treatment. Blood fluxes were measured in three cortical regions of interest (ROI, 50×50 pixels), ROI 1 present in the core of the infarct and ROI 2 and ROI 3 in the proximal and distal penumbra, respectively. Fluxes in the ROIs were expressed in arbitrary units using a 16-color palette.

Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Animals were sacrificed at 72 h and 8 days after pMCAO ($n = 8$ per group). The harvested tissues correspond to the parietal cortex, including the ischemic core (pale zone) and penumbra at 72 h, and the penumbra at 8 days as the pale zone being a cavity. Total RNA was extracted using RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA purity and quality were assessed by spectrophotometry with the NanoDrop™ apparatus (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Total RNA (1–2 μ g) was subjected to reverse transcription using the iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). RT-qPCR was performed in duplicates for each sample using SYBR Green Supermix (Bio-Rad) for 40 cycles with a 2-step program (5 s of denaturation at 96 °C and 10 s of annealing at 60 °C). Amplification specificity was assessed by melting curve analysis. Primers were designed using Primer3 software. Sequences and NCBI references are provided in Additional file 2: Table S1. Abundance of transcripts of interest was expressed relative to the expression of the reference gene, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Analyses were performed with the Bio-Rad CFX Manager 2.1 software.

Immunohistochemistry

Coronal 16- μ m thick paraffin sections at the MCA and hippocampal level (corresponding to 3.27 and 4.83 mm—atlas of the developing mouse brain at P6) were stained for mouse anti-GFAP (Sigma-Aldrich G3893; 1:500 dilution), goat anti-Iba1 (Abcam ab5076; 1:500), rabbit anti-Iba1 (Wako, 019-19741; 1:1000), goat anti-MRC1 (MMR/CD206 polyclonal Goat IgG, R&D system, AF2535; 1:400), rabbit anti-COX-2 (Abcam; 1:200), goat anti-arginase-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-18354; 1:200), rabbit anti-Glut1 (54-KDa form, Millipore, Molsheim, France; 1:700), and tomato lectin (Vector Laboratories, 1:500). For immunofluorescence, secondary antibodies coupled with the green marker

Fluoroprobe S488 (Interchim, Montluçon, France) or the red fluorescent marker cyanine 3 (Jackson Immuno Research laboratories, West grove, PA) were used. For confocal imaging, sections were analyzed using a Leica TCS SP8 confocal scanning system (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with 405-nm diode, 488-nm argon, and 561-nm DPSS lasers. A series of optical sections separated by 0.3 μ m was collected using the $\times 63$ HC PL APO CS2 objective (numerical aperture 1.40). For each optical section, double- or triple-immunofluorescence images were acquired in sequential mode to avoid potential contamination by fluorescence emission overlap. The orthogonal sectioning and 3D viewing were produced by the Leica Application Suite X-software (Leica Microsystems). Images were equally adjusted for brightness and contrast, and composite illustrations were built in Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA).

Cell quantification

GFAP and Iba-1-positive cells were counted in a blind manner in the penumbra region on three coronal sections for animal at 72 h and 8 days after ischemia and in age-matched controls using a $\times 20$ objective. Iba-1-Arg-1 and Iba1-COX-2 double-positive cells were counted in the same regions with a $\times 20$ lens and then merged images were created with Fiji software (<http://fiji.sc/Fiji>).

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm SD (BF measures and lesion volume) and mean \pm SEM (RT-qPCR, immunohistochemistry, and immunofluorescence). BFV and CBF values measured in the different ROIs were compared using repeated measures ANOVA and a post hoc Newman-Keuls test to analyze differences between the two groups. One-way ANOVA followed by a Newman-Keuls post hoc test was used for the difference between two groups (RT-qPCR, immuno-labeled cells, and lesion volumes). Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Setup of the animal model and effect of sildenafil on CBF and lesion size

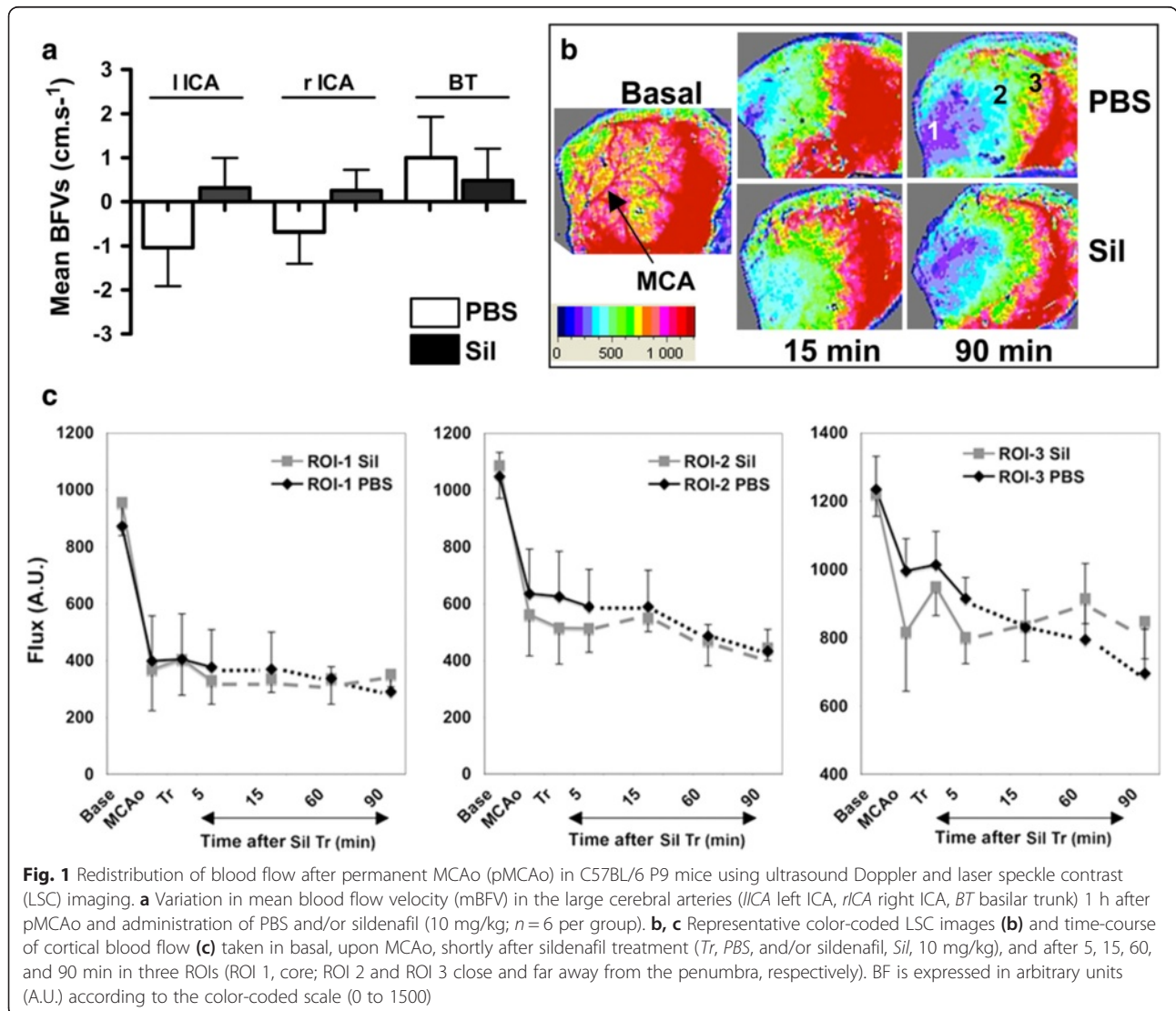
In the first set of experiments (Additional file 1: Figure S1), animals were assessed by color-coded pulsed Doppler ultrasound imaging at baseline and after pMCAO. As compared to basal mBFV, pMCAO induced a significant transient decrease in mBFV in the left ICA and a consecutive significant increase in mBFV in the basilar trunk (BT) 15 min after pMCAO (Additional file 1: Figure S2A). One hour after pMCAO, no significant change in mBFV was observed in the three large arteries (data not shown). One hour after pMCAO and sildenafil administration (10 mg/kg, $n = 8$

each) mBFVs were not modified in the three large arteries as compared to a single PBS administration (Fig. 1a). Heart rates in the sildenafil-treated animals (395 ± 67 bpm) were not significantly different from PBS-treated animals (428 ± 66 bpm) at this time point. No difference was observed between the different doses of sildenafil on mBFVs measured in the large arteries (data not shown), except for the 15 mg/kg dose (Additional file 1: Figure S2B).

Representative patterns and values of cortical BF using LSC imaging are shown in Fig. 1b, c. Immediately after pMCAo, BF dropped in the ROI 1 (core) to a mean value around 40–42 % of basal BF in both groups of animals ($n = 6$ each) and was reduced further to 33–36 % of basal at 90 min after pMCAo. A similar drop in BF was measured in the ROI 2 and in a less severe manner in the ROI 3. BF was further reduced at 90 min after pMCAo, in particular in ROI 3. As expected, sildenafil treatment (10 mg/kg) significantly increased the

concentration of intracellular cGMP to 1.91 ± 0.38 and 1.87 ± 0.31 pmol/mL at 1 and 3 h after administration, respectively, as compared to PBS-treated animals (0.08 ± 0.02 pmol/mL, $p < 0.001$) (Additional file 1: Figure S3). No statistical difference in cGMP concentration was found between the different doses used. Nevertheless, sildenafil treatment did not significantly modify the BF profile in the three distinct ROIs at any time point.

Mean cortical infarct volume at 72 h after pMCAo was 12.5 ± 3.0 % ($n = 14$, one animal died) in PBS-treated animals. Sildenafil at the three lower doses tested (0.5, 2.5, and 10 mg/kg) did not change the mean infarct volume (11.0 ± 3.0 %, $n = 7$; 12.2 ± 3.1 %, $n = 8$; and 13.4 ± 2.3 %, $n = 7$, respectively, N.S.), whereas it increased both infarct volume (21.6 ± 4.6 %, $n = 7$, $p < 0.001$, Fig. 2a) and mortality (3/10 animals died) at 15 mg/kg, suggesting toxicity at high doses (Fig. 2a). Therefore, the 15-mg/kg dose was not further used in the following experiments. Eight days after



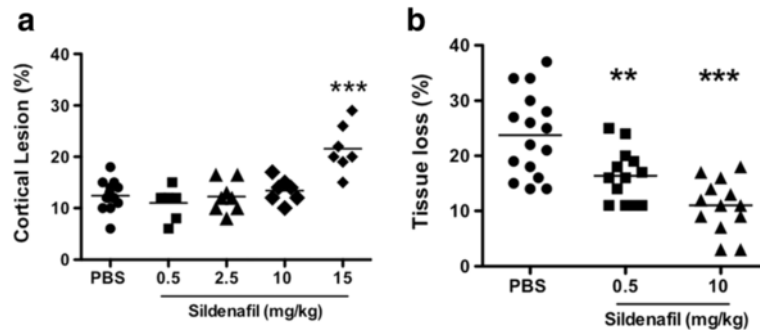


Fig. 2 Effect of sildenafil citrate on the cortical infarct volumes and tissue loss measured 72 h and 8 days after pMCAo, respectively. Sildenafil citrate was given after pMCAo by a single intraperitoneal injection either with PBS or 0.5, 2.5, 10, and 15 mg/kg sildenafil. **a** Cortical lesion at 72 h. **b** Tissue loss at 8 days. Horizontal bar represents the mean. Note that the 15 mg/kg dose is toxic by increasing the infarct volume. Each dot represents one animal. Data were assessed via an ANOVA, and when significant the results of the Newman-Keuls post-test are shown, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ sildenafil dose vs PBS

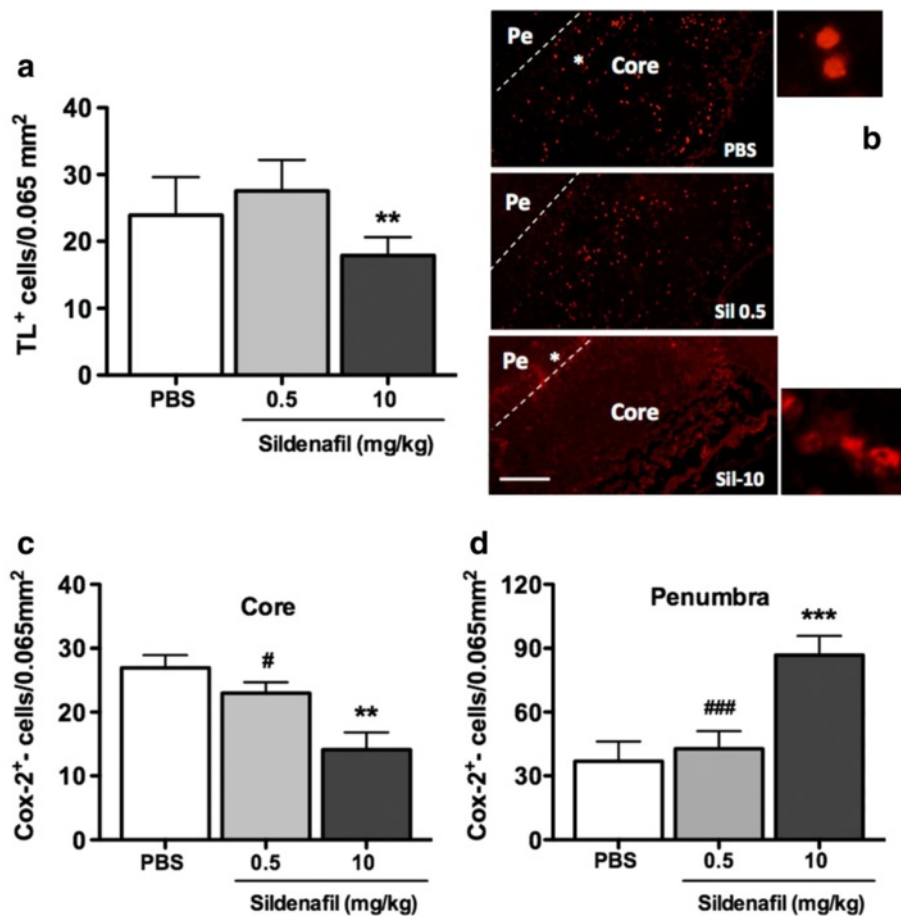


Fig. 3 Effect of sildenafil citrate on the density of microglia/macrophages cells and COX-2 expression at 72 h after pMCAo. **a** Quantitative analysis of tomato-lectin (TL, $n = 6-7$ per group) in PBS, Sil-0.5, and Sil-10 (mg/kg)-treated animals. **b-d** Localization and quantification of COX-2⁺ cells in the core and/or the penumbra in PBS- and sildenafil-treated animals. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, sildenafil vs PBS treatment. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, sildenafil 0.5 vs sildenafil 10. Scale bar represents 100 μm (**b**) and 50 μm (enlarged panels)

pMCAo, lesion volume significantly increased up to $23.8 \pm 7.5\%$ ($n = 16$, $p < 0.01$ vs 72 h) in PBS-treated animals and became cystic. Sildenafil significantly counteracted this increase in a dose-dependent manner to $16.4 \pm 4.8\%$ (sildenafil 0.5 mg/kg; $n = 13$; $p < 0.01$) and $11.0 \pm 4.8\%$ (sildenafil 10 mg/kg; $n = 13$; $p < 0.001$) (Fig. 2b).

Effect of sildenafil treatment on glial activation

Reactive astrogliosis manifested by a significant increase in GFAP immunoreactivity was clearly observed around the lesion in PBS-treated animals at 72 h after pMCAo (Additional file 1: Figure S4 and Additional file 1: Figure S5A, B). Surprisingly, sildenafil significantly increased the prevalence of GFAP⁺

cells at 10 mg/kg. Conversely, sildenafil significantly reduced the number of GFAP⁺ cells 8 days after pMCAo as compared to PBS-treated animals. No significant difference was observed between PBS and 0.5 mg/kg sildenafil treatment at either time point (Additional file 1: Figure S4).

A high abundance of microglia/macrophages (stained by tomato lectin (TL)) was detected in the penumbra (including the white matter) at 72 h. Sildenafil treatment significantly decreased the number of TL⁺-cells at 10 but not 0.5 mg/kg (Fig. 3a and Additional file 1: Figure S5C, D). At this time point, cells positive for the M1-like marker COX-2⁺ [13] were found in the ischemic core in PBS-treated animals, whereas they were mostly observed in the

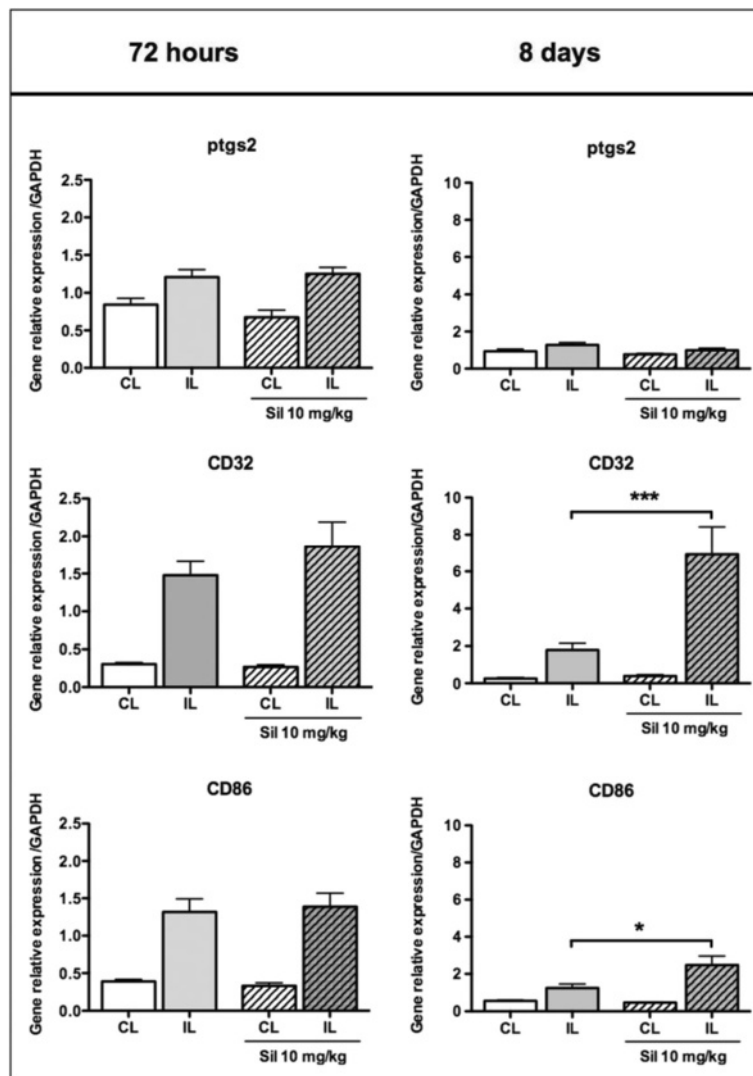


Fig. 4 Gene expression of microglia/macrophage M1-like markers in PBS- and sildenafil (*Sil*)-treated animals, 72 h and 8 days after pMCAo. M1 markers were measured in the ipsilateral (*IL*) and contralateral (*CL*) sides in PBS (*plain bars*) and sil-10 (*hatched bars*) animals. Data are mean \pm SEM. Data were assessed via an ANOVA, and when significant, the results of the Newman-Keuls post-test are shown; * $p < 0.05$, and *** $p < 0.001$, compared to PBS

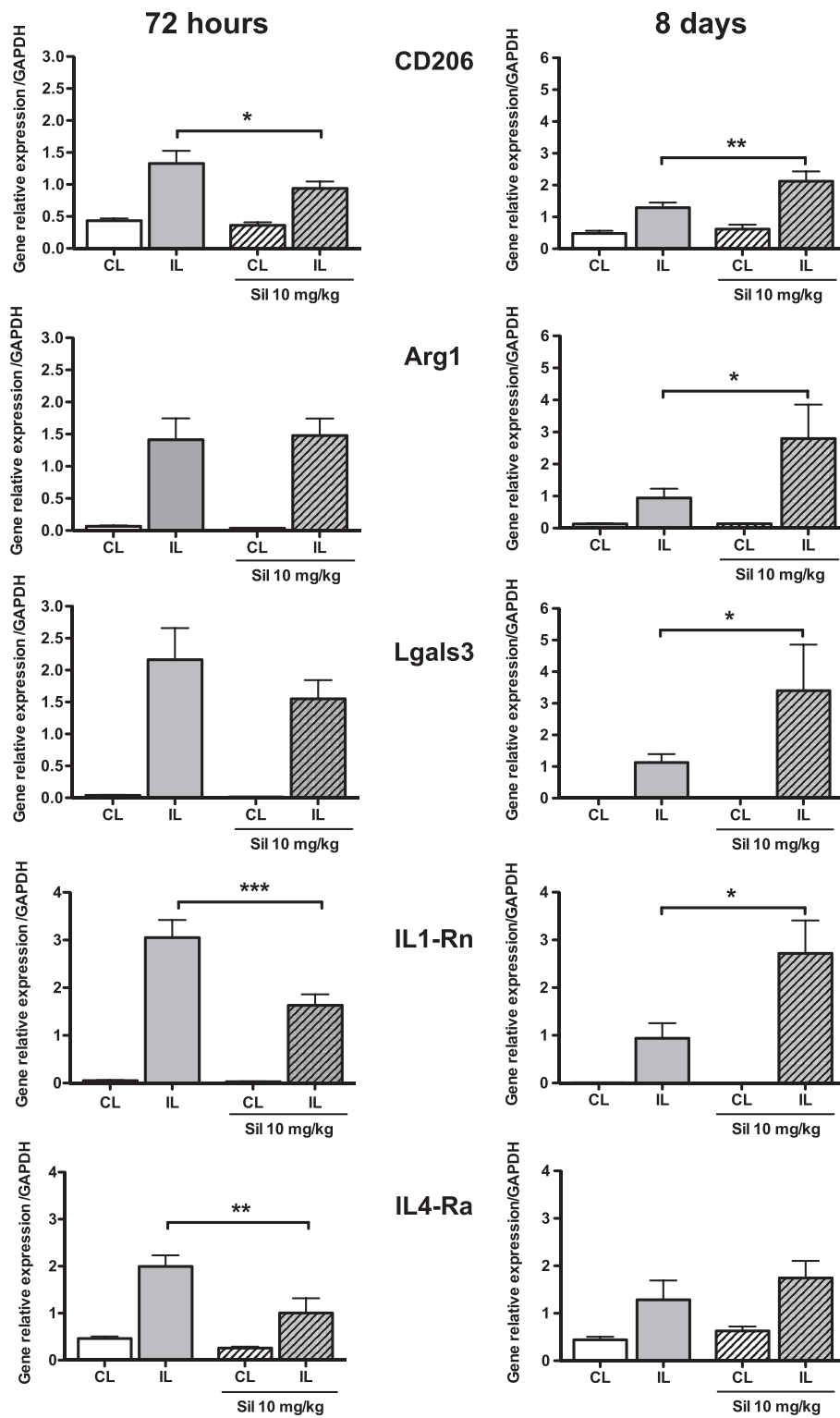


Fig. 5 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 5 Gene expression of microglia/macrophage M2-like markers in PBS- and sildenafil (*Sil*)-treated animals, 72 h and 8 days after pMCAo. M2 markers were measured in the ipsilateral (*IL*) and contralateral (*CL*) side in PBS- (*plain bars*) and sil-10 (*hatched bars*) animals. Data are mean \pm SEM. Data were assessed via an ANOVA, and when significant, the results of the Newman-Keuls post-test are shown; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, compared to PBS

penumbra in 10 mg/kg (but not 0.5 mg/kg) sildenafil-treated animals (Fig. 3b–d). In contrast, 8 days after pMCAo the number of microglia/macrophages stained by Iba-1 were significantly reduced by sildenafil treatment (0.5 and/or 10 mg/kg dose) (Fig. 6b).

We then focused on the phenotype of microglial cells at both transcriptional (Figs. 4 and 5) and translational (Figs. 6 and 7) levels in the cortical tissue obtained from PBS- and sildenafil-treated animals. Seventy-two hours after pMCAo and PBS treatments, most of the markers (M1- and M2-like) were increased with the exception of *ptgs2* (COX-2). As compared to PBS, sildenafil (10 mg/kg) did not change the expression of M1-like (*ptgs2*, *CD32* and *CD86*) markers 72 h after ischemia. In contrast, a significant increase was measured for *CD32* and *CD86* 8 days after pMCAo (Fig. 4). At 72 h after pMCAo, sildenafil treatment (10 mg/kg) significantly decreased mRNA expression of M2-like markers (*CD206*, *IL1-Rn*, and *IL4-Ra*) but not *Arg-1* and *Lgals3*. In contrast, most of these markers (*CD206*, *Arg-1*, *Lgals3* and *IL1-Rn*) were increased 8 days after pMCAo (Fig. 5).

To further address the effect of sildenafil treatment on M1 and M2 markers, we examined the co-localization of Iba-1⁺ (a marker for both M1 and M2 microglia/macrophages) with either the M2-like marker *Arg-1* (Fig. 6a, upper panel) or the M1-like marker COX-2 (Fig. 6a, lower panel) in the cortical penumbra. While a global decrease of Iba-1⁺ microglia/macrophage was observed by sildenafil irrespective of dosage (Fig. 6b), an increase of Iba-1⁺*Arg-1*⁺ double-positive M2 microglia/macrophage was observed at 10 but not 0.5 mg/kg (Fig. 6c), suggesting that a high dosage of sildenafil was required for microglia/macrophages to obtain the M2 status. Interestingly, sildenafil decreased the number of Iba-1⁺COX-2⁺ double-positive M1 microglia/macrophages irrespective of dosage (Fig. 6d), suggesting it does not only affect phenotype polarization and that a lower dose threshold is required for inhibition of neurotoxic M1-type than for activation of neuroprotective M2-type microglia/macrophages.

Co-expression of M1- and M2-like markers in perivascular microglia/macrophages

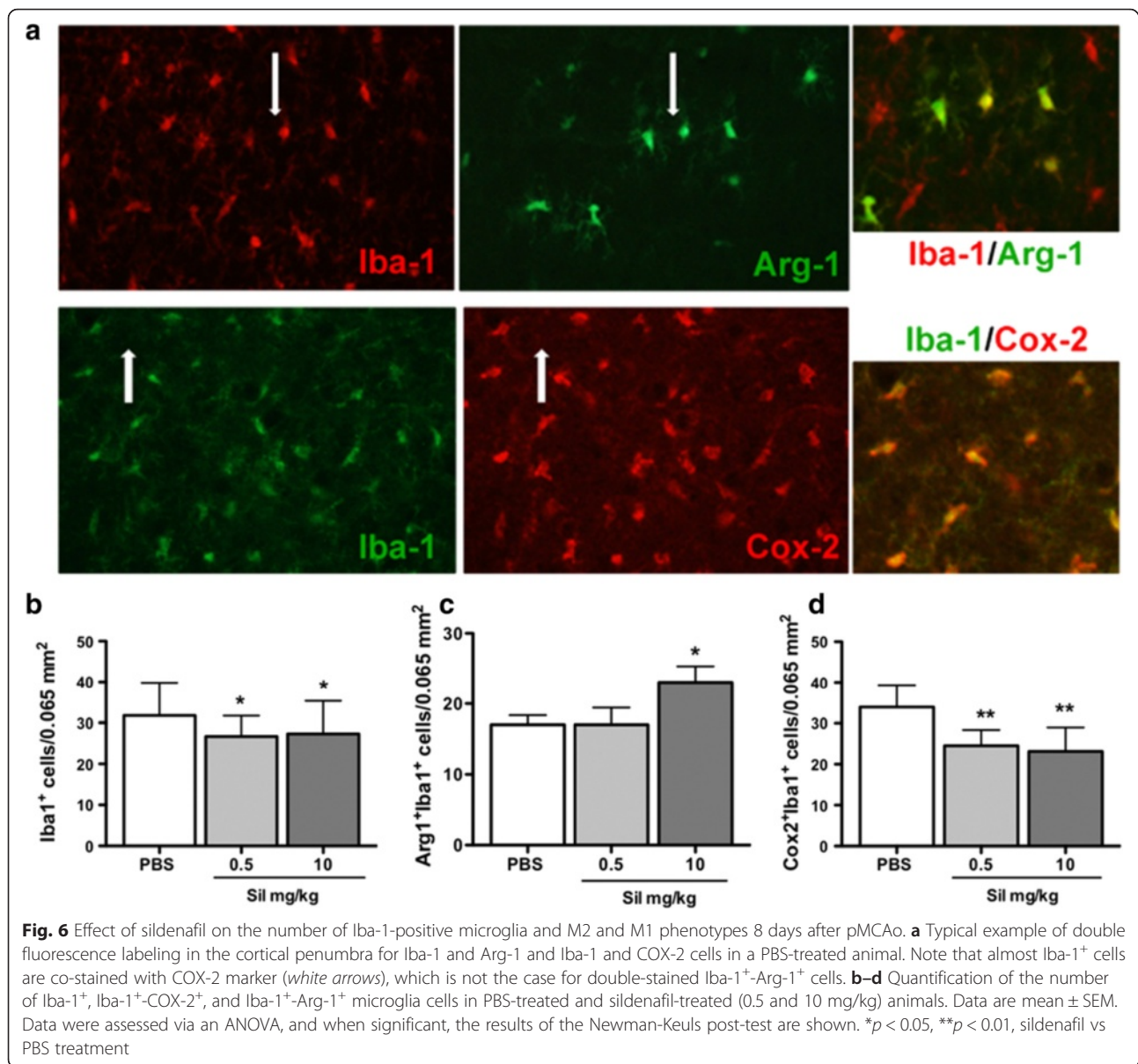
The macrophage mannose receptor MRC-1 (CD206), a marker for M2-type microglia/macrophages, was mainly detected in the leptomeninges from where they entered the neocortex along the penetrating arterioles in the penumbral tissue at 72 h (Fig. 7) and 8 days after

pMCAo (data not shown). On confocal images, we observed the co-localization of MRC-1 with the M1 marker COX-2 (Fig. 7a) indicating either a mixed phenotype or lack of specificity of this marker. MRC-1 expression was present in macrophages/microglia localized around microvessels labeled with the endothelial marker Glut-1 (stained with 54 kDa Glut-1 protein, which regulates import of glucose from the blood to the brain across the endothelial cells of the blood-brain barrier) and present in the penumbra (Fig. 7b and Additional file 1: Figure S6). A few COX-2⁺/*Arg-1*⁺-cells (2–4 cells per brain section) were still detected in the leptomeninges in both PBS- (Fig. 7c) and sildenafil- (10 mg/kg, data not shown) treated animals 8 days after pMCAo.

Discussion

In this study, we show that brain lesions induced by pMCAo in P9 mouse pups evolve between 72 h and 8 days post-ischemia and that the selective inhibition of PDE-5 by sildenafil dose-dependently reduces lesion extent at 8 days post-pMCAo. The protective action of sildenafil appeared to involve a reduction in the overall number of microglia/macrophages in the late phase of lesion development as well as their polarization towards a neuroprotective M2 phenotype.

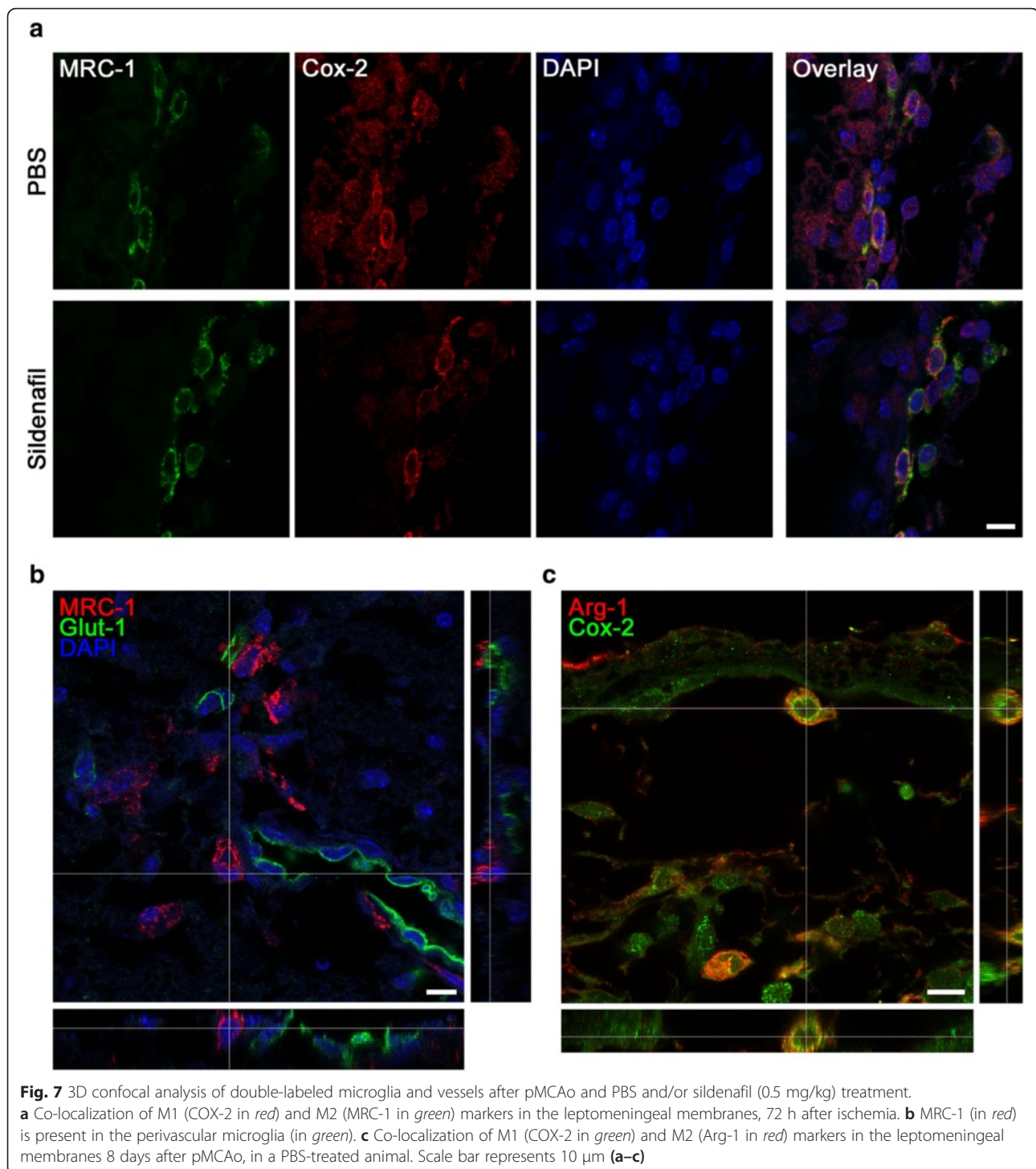
Whereas lesion volumes decrease after pMCAo in adult mice between 24 h and 7 days [14], they increased between 3 and 8 days in neonatal mice, as previously shown in neonatal rat [15]. Whether this difference reflects upon continued tissue destruction even in late phases after occlusion or reduced growth potential of the neonatal brain is yet unclear. Sildenafil treatment reduced lesion size at 8 days post-pMCAO, similar to that found at 72 h, suggesting that sildenafil prevents lesion enlargement. We previously reported that sildenafil treatment, associated with an early significant increase in cerebral blood flow (CBF), reduces hypoxic-ischemic damage in the P7 rat brain [4]. By using both US and LSC imaging, we were here unable to observe early hemodynamic changes in either sildenafil- or PBS-treated mice. A high variability in the number of leptomeningeal and/or pial vessels may explain the hemodynamic differences observed between the rat and mouse. Indeed, all ischemic models in the rat combine transient occlusion of two arteries at the same time, either pMCAo with transient occlusion of one or both common carotid arteries [2, 16] or blockade of the past external carotid artery-internal carotid artery bifurcation



[17, 18]. In contrast, a single pMCAo is sufficient to create ischemic lesions in mice [19]. Together, this suggests that combined occlusion of carotid and MC arteries is necessary to drop the BF in the ipsilateral hemisphere sufficiently for anastomoses to no longer be efficient despite the circle of Willis and to create a lesion in the rat. As BF was only measured up to 90 min after pMCAo, we cannot exclude the contribution of late collateral opening and patency. Together, our data suggest that sildenafil, although given shortly after pMCAo, may have other neuroprotective effects that may develop at later time points of recovery.

The impact of inflammation on post-injury outcome in the developing brain is increasingly recognized. In our pMCAo model in the P9 mouse, strong astrocytic and

microglial responses were detected 72 h after injury and persisted for more than 1 week (personal data). We show that sildenafil potentiates reactive astrogliosis 72 h after pMCAo, in agreement with a previous report following focal cryolesions onto the cortex in adult rats treated with zaprinast and killed 3 days thereafter [9]. Zaprinast was expected to accelerate the formation of the glial scar and the regeneration of the injured tissue [10]. Sildenafil similarly increased GFAP immunoreactivity in adult mice submitted to a cortical cryolesions [20]. After brain injury, NO-dependent cGMP formation can occur in the astrocytes following NO synthase-2 induction in activated astrocytes and infiltrating macrophages [21, 22]. Natriuretic peptides (NPs) comprising atrial (ANP), brain NP (BNP), and C-type (CNP) share the



same intracellular signal transduction pathways with cGMP/cGMP-dependent protein kinase (cGK) as well as the NO pathway. The NPs/NO/cGMP/cGK pathway has been reported to increase BF and to be critical for neo-vascularization in vivo [23]. Interestingly, the content of ANP has been reported to increase in reactive astrocytes 3 days after injury in the white matter (WM) from

autopsied human brain specimens after brain infarction and upregulation of the ANP/cGMP pathway (ANP is a vasorelaxant) may contribute to an increase in BF in response to the BF reduction in the infarcted area [24]. The increase of GFAP⁺ cells observed here 3 days after pMCAo might be related to an increase in ANP and subsequent BF that we did not evaluate and could

further explain the delayed reduction in astrogliosis observed at 8 days after pMCAo.

Another important finding of this study is that sildenafil reduces the recruitment and activation of microglia/macrophages in the penumbral tissue at both 72 h and 8 days after pMCAo, as found for zaprinast in the cortical cryolesion model [9]. Microglial activation may be beneficial or harmful depending on polarization towards a pro-inflammatory M1 or an anti-inflammatory and pro-healing M2 phenotype [25]. Information regarding the expression of M1 and M2 markers and their temporal and spatial evolution in the ischemic brain are largely lacking. Changes in mRNA expression of M1 and M2 markers were maximally increased between 3–5 and 14 days after transient MCAo in the adult C57BL/6 mice [26].

In our neonatal mouse model, we observed an impact of sildenafil treatment on macrophage/microglia activation and the expression of M1- and M2-like markers. Whereas sildenafil only increased M1-like genes 8 days after ischemia, it decreased M2-like genes expression at the same time point. Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), which produce vasodilatory prostaglandins [27], contribute to neurovascular coupling [28] and could contribute to vasodilation in the penumbra and a subsequent absence of lesion extension in animals treated with sildenafil. Furthermore, cerebrovascular dilations to hypercapnia were demonstrated to be prostanoid dependent and nitric oxide independent in the newborn pig brain [29, 30]. The combined increase of potential vasodilatory mediators in astrocytes and COX-2⁺ cells in the penumbra at 72 h could, therefore, induce patency and/or recruitment of collaterals leading to a reduced damage 5 days after (at P17).

A significant upregulation of M2-like mRNA was detected after sildenafil treatment. In the adult rodent, M1 markers (*iNOS*, *CD11b*, *CD16*, and *CD32*) were still elevated at 14 days after stroke, while M2 markers (*CD206*, *Arg-1*, *Ym1/2* and *IL-10*) were decreased at 7 days after ischemia [31]. The M2 phenotype has a stronger capacity to elicit phagocytosis of dead neurons to avoid secondary inflammatory response and promote tissue regeneration, probably by the ANP/cGMP/cKG pathway [32]. We suggest a shift in polarization towards the M2 phenotype may contribute to the ability of sildenafil to prevent the late-stage extension of lesions in our model. We also found MRC-1 (CD-206) protein in infiltrating macrophages (in the leptomeninges), as previously reported after hypoxia-ischemia in the P7 rat [33]; however, we further demonstrate that MRC-1⁺/CD206 perivascular microglia/macrophages entered the brain via penetrating microvessels. In contrast CD-206⁺ cells were exclusively located in the ischemic core in adult mice 24 h after pMCAo [34]. Interestingly, mixed

transitional (Mtran) phenotype has been introduced to characterize double-labeled M1-M2 macrophage/microglia following traumatic brain injury [35]. Such MRC-1⁺/COX-2⁺ and Arg-1⁺/COX-2⁺ macrophage/microglia in the leptomeninges may also represent a transitional Mtran phenotype in our ischemic model.

Conclusions

In conclusion, our study suggests that sildenafil may prevent the progression of the ischemic lesions in neonatal mice through the modulation of inflammatory pathways including microglial/macrophage polarization. Further investigation is needed to elucidate mechanisms that govern the change in microglia/macrophage phenotype and the regulation of lesion size in the neonatal rodent brain. As the use of sildenafil is indicated for idiopathic pulmonary hypertension [36], it could be explored for immunomodulatory stroke treatment in children.

Additional files

Additional file 1: Figures S1–S6. Figure S1. Outline of the experimental procedure in P9 C57BL/6 mice subjected to pMCAo. **Figure S2.** A: mean blood flow velocities (BFVs) in the left and right ICA (lICA, rICA) and basilar trunk (BT) in basal conditions and 15 min after pMCAo. *, #*p* < 0.05 vs basal for each artery. B Variation in arterial blood flow (BF) in P9 mice subjected to pMCAo and administered with PBS (white bars) and/or sildenafil (15 mg/kg, black bars). **Figure S3.** cGMP dosage in the ipsilateral hemisphere in the control (PBS-treated naive mice, *n* = 5) and in sildenafil- (10 mg/kg) treated mice, at 1 and 3 h (h) after treatment. ****p* < 0.001 vs PBS. **Figure S4.** Quantification of GFAP-positive cells in the penumbra at 72 h and 8 days after pMCAo in PBS- and sildenafil-treated animals (*n* = 8 per group). **Figure S5.** Immunohistochemistry for astrocyte (GFAP; A, B) and macrophage (tomato lectin (TL) C–D)/microglia (Iba-1; E, F) in PBS-treated animals (A, C, and E) and sildenafil 10 mg/kg (B, D, and F) at 72 h (A–D) and 8 days (E, F) after pMCAo in mouse pups. **Figure S6.** 3D confocal reconstruction of a microvessel stained with the 54 kDa Glut-1 protein (green) and microglia/macrophage stained with MRC-1 protein (M2-like marker). (PDF 1359 kb)

Additional file 2: Table S1. Primer sequences, protein targets, and NCBI references. (PDF 306 kb)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RM, CCM, and OB conceived and designed the study. RM, PLL, and VB conducted the experimental protocols. RM, LD, AG, and JP performed the histology, histochemistry, and qPCR. ZC performed the confocal analysis. RM, LD, and PB performed the ultrasound imaging. RM and PLL performed the laser speckle contrast imaging. RM, PLL, VB, PB, OB, and CCM analyzed and interpreted data. CCM, RM, and OB wrote the manuscript with input from all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

All the authors are indebted to Dr. E. Camerer (INSERM U970) for critical revision and editing this manuscript.

Author details

¹University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, INSERM, UMR 1141, 75019 Paris, France. ²University degli Studi di Udine, Udine, Italy. ³UPMC-Paris6, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Réanimation Néonatale et Pédiatrique, 75012 Paris, France. ⁴Pharmacologie de la Circulation Cérébrale - EA4475,

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, University of Paris Descartes, Paris, France. ⁵University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, AP-HP, Hôpital Lariboisière, Physiologie Clinique, Explorations-Fonctionnelles, 75010 Paris, France. ⁶University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, INSERM, U965, 75010 Paris, France. ⁷University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, AP-HP, Hôpital Robert Debré, Urgences Pédiatriques, 75019 Paris, France. ⁸University Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, AP-HP, Hôpital Robert Debré, Réanimation Néonatale, 75019 Paris, France. ⁹INSERM UMR 1141, Hopital Robert Debré, 48 bd Serurier, 75019 Paris, France.

Received: 28 December 2015 Accepted: 24 April 2016

Published online: 28 April 2016

References

- Chabrier S, Husson B, Dinomais M, Landrieu P, Nguyen The Tich S. New insights (and new interrogations) in perinatal arterial ischemic stroke. *Thromb Res*. 2011;127:13–22.
- Charriat-Marlangue C, Bonnin P, Leger PL, Renolleau S. Brief update on hemodynamic responses in animal models of neonatal stroke and hypoxia-ischemia. *Exp Neurol*. 2013;248:316–20.
- Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *Am J Cardiol*. 1999;83:3C–12.
- Charriat-Marlangue C, Nguyen T, Bonnin P, Duy AP, Leger PL, Csaba Z, et al. Sildenafil mediates blood-flow redistribution and neuroprotection after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*. 2014;45:850–6.
- Bednar MM. The role of sildenafil in the treatment of stroke. *Curr Opin Investig Drugs*. 2008;9:754–9.
- Nunes AK, Raposo C, Luna RL, Cruz-Hofling MA, Peixoto CA. Sildenafil (Viagra®) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. *Cytokine*. 2012;60:540–51.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17:796–808.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41:14–20.
- Taylor RA, Sansing LH. Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:746068.
- Pifarre P, Prado J, Giral M, Molinero A, Hidalgo J, Garcia A. Cyclic GMP phosphodiesterase inhibition alters the glial inflammatory response, reduces oxidative stress and cell death and increases angiogenesis following focal brain injury. *J Neurochem*. 2010;112:807–17.
- Charriat-Marlangue C, Bonnin P, Gharib A, Leger PL, Villapol S, Pocard M, et al. Inhaled nitric oxide reduces brain damage by collateral recruitment in a neonatal stroke model. *Stroke*. 2012;43:3078–84.
- Leger PL, Bonnin P, Moretti R, Tanaka S, Duranteau J, Renolleau S, et al. Early recruitment of cerebral microcirculation by neuronal nitric oxide synthase inhibition in a juvenile ischemic rat model. *Cerebrovasc Dis*. 2015;41:40–9.
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Ore MV, Celador IL, Jossierand J, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*. 2013;32:70–85.
- Poittevin M, Bonnin P, Pimpie C, Riviere L, Sebric C, Dohan A, et al. Diabetic microangiopathy: impact of impaired cerebral vasoreactivity and delayed angiogenesis after permanent middle cerebral artery occlusion on stroke damage and cerebral repair in mice. *Diabetes*. 2015;64:999–1010.
- Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriat-Marlangue C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke*. 1998;29:1454–60. discussion 61.
- Bonnin P, Leger PL, Deroide N, Fau S, Baud O, Pocard M, et al. Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *J Neurosci Methods*. 2011;198:103–9.
- Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pearce WJ. L-NAME reduces infarct volume in a filament model of transient middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Pediatr Res*. 1995;38:652–6.
- Derugin N, Ferriero DM, Vexler ZS. Neonatal reversible focal cerebral ischemia: a new model. *Neurosci Res*. 1998;32:349–53.
- Tsuji M, Ohshima M, Taguchi A, Kasahara Y, Ikeda T, Matsuyama T. A novel reproducible model of neonatal stroke in mice: comparison with a hypoxia-ischemia model. *Exp Neurol*. 2013;247:218–25.
- Prado J, Pifarre P, Giral M, Hidalgo J, Garcia A. Metallothioneins I/II are involved in the neuroprotective effect of sildenafil in focal brain injury. *Neurochem Int*. 2013;62:70–8.
- Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci*. 2006;26:4930–9.
- Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells: regulation and potential roles in the CNS. *Glia*. 2000;29:1–13.
- Yamahara K, Itoh H, Chun TH, Ogawa Y, Yamashita J, Sawada N, et al. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3404–9.
- Nogami M, Shiga J, Takatsu A, Endo N, Ishiyama I. Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction. *Histochem J*. 2001;33:87–90.
- Fumagalli S, Perego C, Pischiutta F, Zanier ER, De Simoni MG. The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol*. 2015;6:81.
- Hu X, Li P, Guo Y, Wang H, Leak RK, Chen S, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2012;43:3063–70.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001;294:1871–5.
- Stefanovic B, Bosetti F, Silva AC. Modulatory role of cyclooxygenase-2 in cerebrovascular coupling. *Neuroimage*. 2006;32:23–32.
- Leffler CW, Busija DW. Prostanoids and pial arteriolar diameter in hypotensive newborn pigs. *Am J Physiol*. 1987;252:H687–91.
- Willis AP, Leffler CW. NO and prostanoids: age dependence of hypercapnia and histamine-induced dilations of pig pial arterioles. *Am J Physiol*. 1999;277:H299–307.
- Xia CY, Zhang S, Gao Y, Wang ZZ, Chen NH. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol*. 2015;25:377–82.
- Miro-Mur F, Perez-de-Puig I, Ferrer-Ferrer M, Urra X, Justicia C, Chamorro A, et al. Immature monocytes recruited to the ischemic mouse brain differentiate into macrophages with features of alternative activation. *Brain Behav Immun*. 2015. doi:10.1016/j.bbi.2015.08.010.
- Bonestroo HJ, Nijboer CH, van Velthoven CT, Kavelaars A, Hack CE, van Bel F, et al. Cerebral and hepatic inflammatory response after neonatal hypoxia-ischemia in newborn rats. *Dev Neurosci*. 2013;35:197–211.
- Perego C, Fumagalli S, De Simoni MG. Temporal pattern of expression and colocalization of microglia/macrophage phenotype markers following brain ischemic injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2011;8:174.
- Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. Microglia/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2016, in press. PMID: 26486881.
- Fraisse A, Wessel DL. Acute pulmonary hypertension in infants and children: cGMP-related drugs. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11:537–40.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



VI. RUOLO DELLA MICROGLIA IN UN MODELLO MURINO DI TRAUMATISMO PEDIATRICO MODERATO.

Introduzione:

Il TBI in età pediatrica causa deficit cognitivi e comportamentali più severi e persistenti rispetto al traumatismo cranico in età adulta. Comprendere le ragioni di questa particolare sensibilità del bambino è fondamentale, tanto più che i bambini al di sotto dei 4 anni sono quelli che vanno incontro maggiormente a tale problematica. Le cellule microgliali, cellule immunitarie residenti nel parenchima cerebrale, il cui ruolo è quello di mediare la neuroinfiammazione, si attivano durante un TBI, ma le modalità e le tempistiche di tale attivazione non sono ancora chiariti, ed ancor meno in età pediatrica.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare:

- 1) l'evoluzione temporale dell'infiammazione mediata dalla microglia
- 2) il fenotipo microgliale ex vivo, tramite isolamento delle cellule microgliali ed analisi mediante biologia molecolare dei marker di attivazione microgliali e delle citochine infiammatorie
- 3) gli outcomes neuropatologici a 1 e 5 giorni post-traumatismo
- 4) valutare gli effetti della minociclina, un antibiotico dalle note proprietà antiinfiammatorie, ed in particolare capace di inibire l'attivazione microgliale

Risultati:

- 1. Il traumatismo cranico induce un'aumentata morte cellulare, un aumento del numero delle cellule microgliali, ed un moderato aumento globale dei livelli corticali di citochine e chemochine.**

In seguito al TBI nel topo a 7 giorni di vita si assiste ad un aumento del marcaggio con CCasp3 a livello della corteccia sottostante, dei nuclei talamici, e dell'ippocampo, e nello striato. Nelle stesse zone si evidenzia un aumento delle cellule microgliali, in

particolare a livello corticale (del 150%) e striatale (del 350%) evidenziate attraverso un marcaggio Iba1 (vedi figura 1 nell'articolo). L'espressione genica di 20 differenti citochine e chemochine è stata misurata a livello della corteccia a 6, 14 e 24 ore da un traumatismo in un modello di traumatismo cranico pediatrico moderato (vedi introduzione), e comparata ai livelli degli stessi marcatori in animali non traumatizzati. Tali markers sono stati scelti in base ai dati in letteratura e suddivisi in tre fenotipi: citochine e chemochine proinfiammatorie/citotossiche (M1), anti-infiammatorie o dal fenotipo rigenerativo/riparatorio (M2a) o immunomodulatorio (M2b).

Nel nostro lavoro è emerso che, rispetto agli animali controllo, i livelli delle citochine pro/infiammatorie IL-1 β e CCL3 mostravano un' aumentata espressione genica più marcata e persistente nel tempo (aumenti di più di cinque volte il livello di partenza). Anche i markers citochinici di fenotipo M2a, IL-4, ed M2b, IL-10, erano aumentati in tutti i timing analizzati (vedi figura 2 nell'articolo). Le sole citochine che non hanno presentato un' aumentata espressione sono TNF α e IL-12 in nessuno dei timing analizzati.

2. Il traumatismo cranico induce un'espressione microgliale dei markers fenotipici di tipo immunomodulatorio/di rigenerazione.

Le cellule microgliali sono state isolate dal tessuto corticale tramite tecnica di MACS (Isolamento selettivo della microglia mediante biglie magnetiche) a differenti timing post-TBI, in particolare a 2, 6, 14 ore e 1 e 5 giorni post-TBI (vedi figura 3 nell'articolo).

I risultati dimostrano che i marcatori di fenotipo citotossico, CD86 e CD32 risultano ridotti in seguito al TBI; un marcatore dal fenotipo misto (M1-M2a), Cox2, e IL1Rn, dalle funzioni immunomodulatorie, risultano invece aumentati, e due altri marcatori di

immunomodulazione, SOCS3 e IL-4 α , mostrano un iniziale aumento, per poi ritornare a livelli comparabili agli animali non trattati a 1 giorno di distanza dal traumatismo. Per quanto riguarda i marcatori di fenotipo rigenerativo/riparatorio, Arg1 e Gal3 aumentano, mentre CD206 si riduce dopo un TBI.

3. Il blocco dell'attivazione microgliale riduce i danni neuropatologici a 24 ore dal TBI

Un traumatismo cranico induce, nel nostro modello, un danno parenchimale che può essere misurato attraverso il marcaggio con CCasp3, indice di morte cellulare in atto, e attraverso il marcatore neuronale MAP2, o misurando il volume del ventricolo cerebrale laterale, che aumenta rispetto al ventricolo dell'emisfero controlaterale (non traumatizzato) in maniera proporzionale alla perdita di parenchima della corteccia circostante (vedi figura 4 A, B nell'articolo). L'utilizzo della minociclina, inibitore dell'attivazione microgliale, induce una ridotta dilatazione ventricolare ed una ridotta presenza di CCasp 3 rispetto ai controlli a 24 ore dal TBI (vedi figura 4 C,D nell'articolo).

4. L'attenuazione del danno a 24 ore indotto dalla minociclina si accompagna ad una riduzione del numero delle cellule microgliali e ad una differente attivazione microgliale

Il marcaggio Iba1 (marker di attivazione microgliale) su sezioni istologiche di cervello di topi traumatizzati evidenzia come la minociclina induce una ridotta attivazione microgliale a 24 ore dal trauma (vedi figura 5 nell'articolo). Tale dato concorda con i dati in letteratura.

L'analisi dell'espressione genica dei marcatori fenotipici M1, M2a ed M2b su cellule microgliali isolate dal tessuto dei topi traumatizzati e di topi controllo, evidenzia come la minociclina induca modificazioni complesse nel fenotipo microgliale (vedi figura 6

nell'articolo). In particolare per quanto riguarda il fenotipo citotossico iNOS e IL-6 si riducono, ma IL-1 β aumenta; per quanto riguarda il fenotipo immunomodulatore, la minociclina induce un aumento di IL1Rn ma induce un'ulteriore riduzione di IL-10; per quanto riguarda, infine i marker di fenotipo rigenerativo/riparatorio, il trattamento con minociclina induce un aumento ancor più marcato di Gal3 e Arg1 (già aumentati in seguito a TBI), e riduce la tipica perdita di IGF1 trauma indotta.

5. I benefici precoci del trattamento con la minociclina sono scomparsi a 5 giorni dal TBI.

Dopo 5 giorni, il TBI, induce una riduzione del volume tissutale, come si evidenzia tramite marcaggio con MAP2 e tramite misura del volume ventricolare (vedi figura 7 nell'articolo). Contrariamente agli effetti positivi riscontrati a 24 dal trauma, i topi trattati con la minociclina non dimostrano differenze rispetto ai controlli a 5 giorni dal trauma (vedi figura 7A nell'articolo).



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Full-length Article

Role of microglia in a mouse model of paediatric traumatic brain injury

Vibol Chhor^{a,b,c,1}, Raffaella Moretti^{a,b,d,1}, Tifenn Le Charpentier^{a,b}, Stephanie Sigaut^{a,b}, Sophie Lebon^{a,b}, Leslie Schwendimann^{a,b}, Marie-Virginie Oré^{a,b}, Chiara Zuiani^{a,b,3}, Valentina Milan^{a,b}, Julien Josserand^{a,b}, Regina Vontell^e, Julien Pansiot^{a,b}, Vincent Degos^{a,b,f}, Chrysanthy Ikonomidou^g, Luigi Titomanlio^{a,b}, Henrik Hagberg^{e,h}, Pierre Gressens^{a,b,e,2}, Bobbi Fleiss^{a,b,e,*,2}

^a PROTECT, INSERM, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France^b PremUP, Paris, France^c Department of Anesthesia and Intensive Care, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France^d Università degli Studi di Udine, Udine, Italy^e Department of Perinatal Imaging and Health, Department of Division of Imaging Sciences and Biomedical Engineering, King's College London, King's Health Partners, St. Thomas' Hospital, London SE1 7EH, United Kingdom^f Department of Anesthesia and Intensive Care, Pitié Salpêtrière Hospital, F-75013 Paris, France^g Department of Neurology, University of Wisconsin, Madison, WI, USA^h Department of Clinical Sciences, Sahlgrenska Academy/East Hospital, Gothenburg University, 416 85 Gothenburg, Sweden

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2016

Received in revised form 22 October 2016

Accepted 2 November 2016

Available online xxxxx

Keywords:

Phenotype

Cytokine

Chemokine

Apoptosis

Neuron

Immature

Cerebral

Macrophage

Inflammation

Minocycline

ABSTRACT

The cognitive and behavioural deficits caused by traumatic brain injury (TBI) to the immature brain are more severe and persistent than TBI in the mature brain. Understanding this developmental sensitivity is critical as children under four years of age sustain TBI more frequently than any other age group. Microglia (MG), resident immune cells of the brain that mediate neuroinflammation, are activated following TBI in the immature brain. However, the type and temporal profile of this activation and the consequences of altering it are still largely unknown.

In a mouse model of closed head weight drop paediatric brain trauma, we characterized i) the temporal course of total cortical neuroinflammation and the phenotype of *ex vivo* isolated CD11B-positive microglia/macrophage (MG/MΦ) using a battery of 32 markers, and ii) neuropathological outcome 1 and 5 days post-injury. We also assessed the effects of targeting MG/MΦ activation directly, using minocycline a prototypical microglial activation antagonist, on these processes and outcome.

TBI induced a moderate increase in both pro- and anti-inflammatory cytokines/chemokines in the ipsilateral hemisphere. Isolated cortical MG/MΦ expressed increased levels of markers of endogenous reparatory/regenerative and immunomodulatory phenotypes compared with shams. Blocking MG/MΦ activation with minocycline at the time of injury and 1 and 2 days post-injury had only transient protective effects, reducing ventricular dilatation and cell death 1 day post-injury but having no effect on injury severity at 5 days.

This study demonstrates that, unlike in adults, the role of MG/MΦ in injury mechanisms following TBI in the immature brain may not be negative. An improved understanding of MG/MΦ function in paediatric TBI could support translational efforts to design therapeutic interventions.

© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is the most common injury leading to significant lifelong disability that occurs in children (Stanley

et al., 2012). Unfortunately, the cognitive and behavioural deficits caused by traumatic brain injury (TBI) to the immature brain are more severe and persistent than those observed following comparable injuries to the mature (adult) brain (Anderson et al., 2005; Ewing-Cobbs et al., 2006; Hessen et al., 2007; Rivara et al., 2012) (reviewed in (Giza et al., 2007)) with injury in an experimental setting progressing into a chronic brain disorder (Ajao et al., 2012; Kamper et al., 2013). This is in contrast to Kennard's Principle that the immature brain has superior potential for repair (Bennet et al., 2013). This is of particular concern as children under the age of

* Corresponding author at: Inserm U1141, Hôpital Robert Debré, 48 Blvd Séruurier, F-75019 Paris, France.

E-mail address: Bobbi.Fleiss@inserm.fr (B. Fleiss).

¹ Joint first authorship.

² Joint last authorship.

³ Current address: Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italy.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.001>

0889-1591/© 2016 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Please cite this article in press as: Chhor, V., et al. Role of microglia in a mouse model of paediatric traumatic brain injury. Brain Behav. Immun. (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.001>

four years sustain TBI more frequently than any other age group (Koepsell et al., 2011) and in children under the age of 2 years, the rates of TBI serious enough to require intensive care support are as high as 50 per 100,000 (Keenan et al., 2003). A developmental sensitivity to TBI as seen in humans is also observed in a rodent model of TBI, where within the first 30 days of life, injury is maximal when TBI is caused at postnatal day 7 (P7) (Bittigau et al., 1999). In addition, during the first three postnatal weeks, rodents display a heightened sensitivity to excitotoxicity (Ikonomidou et al., 1999). In mouse and humans this period is when developmental processes such as maximal brain growth, synaptogenesis and myelination occur.

In the paediatric population, TBI is caused by injuries and insults, which include acceleration/deceleration injuries (shaken baby syndrome) and contusion injuries (direct skull impact) (Pinto et al., 2012). Contusion injuries are the prevailing form of non-inflicted injuries and also represent a large proportion of inflicted injuries (Pinto et al., 2012). The primary injury process in TBI is mechanical damage (i.e. shear forces inducing vascular damage and bleeding), followed immediately by mast cell degranulation (Stokely and Orr, 2008), and secondary pathological processes, including excitotoxicity, ischemia, mitochondrial dysfunction, activation of matrix metalloproteinases (MMPs) and activation of caspases leading to apoptosis (Xiong et al., 2013). These secondary injury processes induce neuroinflammation, which itself has the potential to be neurotoxic (Hagberg et al., 2012), but which is poorly understood in the immature brain following TBI.

Microglia (MG) are the central regulators of neuroinflammation, involved in the pathological processes of the majority of acute and chronic brain injuries, such as stroke, Alzheimer's disease and multiple sclerosis (for review see (Prinz et al., 2011)). Thus MG are logical candidates to mediate neuropathological changes following TBI in the immature brain. MG possess enormous functional plasticity that allows them to participate in both injury and repair, as reviewed in (Colton and Wilcock, 2010; Ransohoff and Perry, 2009). The nomenclature of these functional activation states (phenotypes) of MG has been simplified to facilitate their description and a common nomenclature includes classic pro-inflammatory or cytotoxic, anti-inflammatory or reparatory/regenerative and immunomodulatory phenotypes.

There are specific differences in the immune and inflammatory responses to injury between neonatal and adult humans and experimental animals (Copland et al., 2004; Giza et al., 2007; Schultz et al., 2004; Zhu et al., 2005), including in microglia responsiveness (Butovsky et al., 2014). Studies of neuroinflammatory profile and MG activation states have recently been published in adult models of TBI (Bye et al., 2007; Kumar et al., 2015) but it is unknown how microglia would respond to a similar injury to the developing brain. As such, this study investigates for the first time the characteristics of MG-driven neuroinflammation in a mouse model of paediatric TBI. Furthermore, as a proof-of-concept, we aimed to assess the effects of modulating MG activity on injury severity using the immunomodulatory tetracycline minocycline. Minocycline reportedly has strongly anti-inflammatory actions and has been used to reduce MG activation and injury with success in numerous pathological models (see Table 1 and review, (Garrido-Mesa et al., 2013)).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Study ethics were approved by the Bichat and Robert Debré Hospital ethics committee (No 2011-14/676-0050) and adhered

to the European Union Guidelines for the Care and Use of Animals. Procedures were typically carried out between 10am and 1 pm (light phase: 7am–7 pm daily), all animals were monitored daily during experimentation. A single animal represents an experimental unit with groups spread between and across litters where possible and each litter had an approximate 50–50% spread of males-females. Specifically, data in Fig. 2 are derived from 6 litters; Fig. 3 derived from 24 litters; Figs. 4, 5 and 7 derived from 6 litters each; Fig. 6 derived from 6 litters. Animals were housed in Plexiglas cages (30x18x15 cm) together with littermates and their dam for the whole of the experiment. Animals had access to standard chow and water *ad libitum* and bedding was wood-chips with shredded paper for nesting (Pharmaserv, France).













2.2. Traumatic brain injury model and experimental procedure

Postnatal day 7 (P7; weight 4–5 g) OF1 mice (Charles River, L'Arbresle, France) of both sexes were randomly (alternating animals) allocated to TBI, control or TBI+ treatment (phosphate buffered saline [PBS] or minocycline) groups. The study protocol is detailed in Fig. 1. A dose of 45 mg/kg of minocycline was chosen based on its prior use in models of adult TBI, stroke and paediatric excitotoxic lesion, see Table 1. In a separate experimental workspace within the animal facility, mice were anesthetized with isoflurane (8% induction) and subjected to a closed head weight-drop head trauma at P7 in a model as described previously (Kaindl et al., 2007). In brief in a process lasting no more than 3 min, the skull was fixed into a stereotaxic frame, the skull surface exposed with a skin incision and the impact device was oriented parallel to the parietal bone with the centre of the foot plate (2 mm diameter) positioned 2 mm anterior and 1 mm lateral to lambda on the parietal bone. The foot-plate was first allowed to touch the skull and was then further depressed by 0.5 mm. The impact device consisted of a hollow stainless-steel cylinder 20 cm in length, perforated at 1 cm intervals to prevent air compression, and guiding a 10 g weight falling from a height of 10 cm onto the foot-plate (2.0 mm in diameter). The contusion impact was delivered unilaterally to the left side of the skull, the same operator conducted all experiments and cortical contusions were of comparable severity in all animals. Body temperature was kept constant via the use of a heating pad maintained at 37 °C until pups were returned to their dams at approximately 15 min post-TBI. Sham animals were anesthetized and an incision made in their scalp, this was then sutured and animals were recovered after 3 min in line with the time taken for the TBI procedure. Minocycline (45 mg/kg in PBS: Sigma, Lyon, France) (Cai et al., 2006; Dommergues et al., 2003) or PBS alone was injected intraperitoneal immediately following TBI, and at 24 and 48 h post-TBI, depending on the protocol. A group of sham minocycline was not included in this study as the specific aim was to investigate the effects of modulating the microglial activation state associated with TBI. Furthermore, minocycline has been widely reported to have no effect on microglial gene expression in a basal state (Kobayashi et al., 2013; Scholz et al., 2015).

2.3. Tissue preparation, and histology

One or five days after TBI, animals were euthanatized via an overdose of pentobarbital and decapitation and brains were immersion fixed (formol 4% for 5 days), embedded in paraffin and coronally sectioned (16 µm) from the frontal pole to the occipital lobes. Ventricular area was determined as described previously (Kaindl et al., 2007; Moretti et al., 2016) on cresyl-violet-stained sections. In short, the border of each lateral ventricle from three serial sections spanning the hippocampus and midstriatum was outlined, then the cross-sectional ventricular areas were

Table 1
Summary of selected studies investigating the neurotherapeutic effects of minocycline.

Study	Animal	Injury	Dose	Regime	Cell death / Lesion Volume	MG number	Outcome	
Dommergues et al. (2003)	P5 mouse	Excitotoxic	45 mg/kg	Twice daily from P5-P7	Decreased Cleaved Caspase-3 at +1 day and decreased lesion volume at +5 days	Decreased numbers of Lectin+ MG	Decreased lesion volume at +5 days	
Fox et al. (2005)	P7 rat	MCAO	45 mg/kg	+2 h & +2 h, or +8 h & +18 h	Decreased lesion volume at +1 day	No change in ED1+ MG numbers	No improvement in lesion volume at +7 days	
Yang et al. (2015)	Adult rat	MCAO	5 mg/kg	+5 min	Decreased infarct on MRI	60% decreased (Increased anti-inflammatory type MG)	Improvements on MRI at 4 week	
Cai et al. (2006)	P4 rat	HI	45 mg/kg	12 h before, immediately after & daily for 3 days	Decreased pyknosis at +4 days	50% decrease in numbers of lectin positive MG	Decreased loss of mature oligodendrocytes and myelin at +2 weeks	
Lechpammer et al. (2008)	P6 rat	HI	50 mg/kg	Immediately following HI	Decreased white matter injury at +3 days	Decreased numbers of CD68+ & MHCII+ cells at +3 days		
Arvin et al. (2002)	P7 rat	HI	22.5–45 mg/kg	Immediately before or +3 h	Decreased lesion volume at +7 days	–	Decreased lesion volume at +7 days	
Tsuji et al. (2004)	P7 mouse	HI	22–135 mg/kg	(1) Twice in first 24 h (45 mg/kg) & twice in the next 24 h (23 mg/kg), or (2) Twice in first 24 h (135 mg/kg) & twice in the next 24 h (68 mg/kg), or (3) Single dose 12 h before HI (45 mg/kg)	Exacerbated total injury score for all treatments (1–3) at +7 days	–	Mouse: Exacerbated total injury score for all treatments (1–3) at +7 days	
	P7 rat		45 mg/kg	(4) Immediately before HI, or(5) 12 h before HI	Decreased total injury score for both treatments (4–5) at +7 days	–	Rat: Decreased total injury score for both treatments (4–5) at +7 days	
Hanlon et al. (2016)	P11 rat	Repeated TBI (CCI)	45 mg/kg	Once immediately after the third and final TBI	No change in fluoro-jade B+ cell number at +3, +7 & +21 days	No change	Exacerbated defects in retention tasks. No improvements in tissue loss or spatial memory defects at +21 days.	
Bye et al. (2007)	Adult mouse	TBI (CCI)	45 mg/kg	+30 min & every 12 h for 3 days	Decreased at +1 day, no change at +4 days	Decreased amoeboid ED1+ MG	No improvement in motor function at +1 week	
Homsy et al. (2010)	Adult mouse	TBI (CCI)	90–45 mg/kg	+5 min (90 mg/kg), +3 h & +9 h (45 mg/kg)	50% decrease in cortical tissue loss	50% Decrease in CD11b+ MG/MΦ	Improvement in locomotor hyperactivity at +8 weeks	
Current study	P7 mouse	TBI (WD)	45 mg/kg	Immediately after & at +24 h & +48 h	Decreased cleaved caspase-3+ cell numbers, decreased ventricular volume at +1 day	15% decrease in numbers of Iba1+ MG (minimal change in activation by gene expression)	No improvements in neuropathology at +5 days	

HI, hypoxic/ischemic. CCI, controlled cortical impact. WD, weight drop.

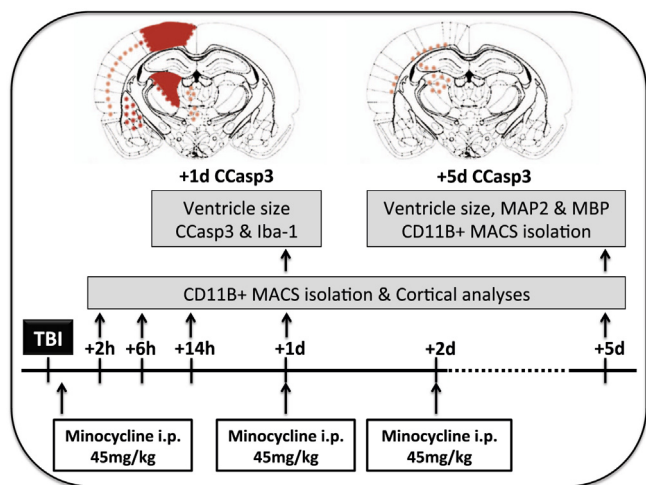


Fig. 1. Schematic representation of the experimental procedures including administration of drugs and tissue collection, and injury distribution. Injury is indicated by the expression of CCasp3 at 1 day (+1d) and 5 days (+5d) following TBI. Slightly increased areas of labelling shown by orange stars, moderate increases by red stars and intense changes shown as blocks of red. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

determined using ImageJ software (version 1.43; National Institute of Health, Bethesda, Md., USA) and the ratio between the left (ipsilateral) and right (contralateral) ventricular areas determined. All tissue processing and analyses were carried out by investigators blind to the treatment group due to coding of the brains and covering of the codes during analysis. There were no differences in the ventricular area of the contralateral hemisphere between sham and TBI mice. Immunohistochemistry (IHC) was performed as previously described (Fleiss et al., 2012), and the antibodies used included: rabbit monoclonal anti-ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1; 1:1000, Wako Chemicals USA, 019-19741), Rabbit monoclonal anti-cleaved caspase 3 (CCasp3; 1:200, Cell Signalling, 9661), mouse monoclonal anti-myelin basic protein (MBP; 1:500, Millipore, MAB382) and mouse monoclonal anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2; 1:2000, Sigma, M4403). After overnight incubation with primary antibodies and washing, sections were incubated with appropriate secondary antibodies (1:200; Vectorlabs, California, USA).

2.4. Analysis of neuropathology

Ventricular volume was assessed by measuring the area of the ipsilateral and contralateral ventricles and expressed as percentage of change compared to the contralateral values. Iba-1-positive and CCasp3-positive cells were counted in the parietal cortex, hippocampal CA1 region and striatum of the traumatized hemisphere, on two images captured using a Leica DM6000 B microscope (Leica Microsystems Ltd.) and a 10X objective at the level of maximum lesion (approximately -1.50 mm from bregma). Counts were carried out using Image J and cell numbers within a given region expressed as cells/mm². The area of MAP2 and MBP immunolabeling was measured at 4–6 levels per brain (one 16 μ m-thick serial section every 576 μ m) as previously described (Fleiss et al., 2012). Volumes of MAP2 and MBP immunolabeling were calculated from area measurements according to Cavalieri's principle using the following formula: $V = SA \times P \times T$, where V is total volume, SA is the sum of the areas measured, P is the inverse of the sampling fraction and T is the section thickness. Volume loss was estimated by the difference in calculated volumes between the contralateral (right) and the ipsilateral hemispheres (left).

2.5. CD11B-antibody-coupled magnetic cell isolation

At different time-points following TBI (2, 6, 14, 24 h and 5 days), cells positive for CD11B (cluster of differentiation 11 beta, a marker for M Φ and MG), were extracted using the antibody-coupled magnetic bead system (MACS) following the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and as previously reported (Schang et al., 2014). In brief, the olfactory bulbs and cerebella were removed and the hemispheres mechanically and enzymatically digested using the Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Germany). Three or four hemispheres were pooled for each sample to ensure sufficient RNA quantities. In a preliminary analysis, comparisons of MG/M Φ activation and cytokine gene expression between left and right sham hemisphere did not show any differences and samples were pooled. Homogenized and digested tissue was incubated with magnetic coupled anti-CD11B antibodies and CD11B-positive cells were separated in a magnetic field before being counted and frozen at -80 °C. The purity of separated cells was assessed using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) for glial fibrillary acidic protein (GFAP; astrocytes), MBP (oligodendrocytes), neuronal nuclear antigen (NeuN; neurons) and CD11B (MG/M Φ), and showed levels of contamination less than 5%. We have described the CD11B-positive population extracted from the brain as MG/M Φ as we cannot exclude a contribution of macrophages to the cell population (Hsieh et al., 2013).

2.6. RNA extraction and quantification of gene expression by real-time qPCR

MG/M Φ qRT-PCR, primer design, and PCR setups were similar to that previously described (Chhor et al., 2013; Husson et al., 2005; Schang et al., 2013). In brief, RNA was extracted using Qiagen RNA extraction columns as per the manufacturers instructions, including initial homogenisation in Trizol (Invitrogen). RNA purity was verified using a nanodrop. Reverse transcription was performed using an iScript RT kit (Biorad) as per manufacturers instructions. PCR reactions were setup on a loading robot in 384 well plates with Sybr green from Biorad as per recommended protocol. Primer sequences are given in Table 2. *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used to normalize the quantitative experiments based on prior reference-gene suitability testing and we verified for each experiment that the raw *Gapdh* values were not significantly different between groups. The relative quantities are expressed as the specific ratio between the gene of interest and the reference gene. Genes were classified as cytotoxic, repair/regeneration or immunomodulatory based on the literature (Colton and Wilcock, 2010; Ransohoff and Perry, 2009) and previous characterization in our lab (Chhor et al., 2013).

2.7. Protein extraction procedure and multiplex cytokine/chemokine assay

Frozen cortices from 6, 14 and 24 h post-TBI were homogenized in 0.1 M PBS, and extracts sonicated in ice-cold homogenization buffer (3 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] and 1% protease inhibitor cocktail, [P8340, Sigma] in 0.1 M PBS) and centrifuged (800xg for 10 min). The supernatant was collected and stored at -80 °C. Protein concentrations were determined via a bicinchoninic acid (BCA) assay. After thawing on ice, supernatants were centrifuged briefly to remove particulates (300g for 10 min). Cytokine and chemokine levels were measured using a 96-well magnetic plate assay on a Bio-Plex 200 according to the manufacturer's instructions (BioRad laboratories, Marnes la Coquette, France). Cytokines and chemokines measured included interleukins

Table 2
Primer sequences and NCBI references.

Gene	Sense	Antisense	NCBI Reference
<i>Gapdh</i>	GGC CTT CCG TGT TCC TAC	TGT CAT CAT ATC TGG CAG GTT	NM_008084.2
<i>iNos</i>	CCC TTC AAT GGT TGG TAC ATG G	ACA TTG ATC TCC GTG ACA GCC	NM_010927.3
<i>CD32</i>	CTG GAA GAA GCT GCC AAA AC	CCA ATG CCA AGG GAG ACT AA	NM_010187.2
<i>CD86</i>	GAG CGG GAT AGT AAC GCT GA	GGC TCT CAC TGC CTT CAC TC	NM_019388.3
<i>Ptgs2</i>	TCA TTC ACC AGA CAG ATT GCT	AAG CGT TTG CGG TAC TCA TT	NM_011198.3
<i>CD206</i>	CTT CGG GCC TTT GGA ATA AT	TAG AAG AGC CCT TGG GTT GA	NM_008625.2
<i>Arg1</i>	GTG AAG AAC CCA CGG TCT GT	GCC AGA GAT GCT TCC AAC TG	NM_007482.3
<i>Lgals3</i>	GAT CAC AAT CAT GGG CAC AG	ATT GAA GCG GGG GTT AAA GT	NM_010705.3
<i>Igf1</i>	TGG ATG CTC TTC AGT TCG TG	GCA ACA CTC ATC CAC AAT GC	NM_010512.4
<i>Sphk1</i>	TCC AGA AAC CCC TGT GTA GC	CAG CAG TGT GCA GTT GAT GA	NM_001172475.1
<i>I11m</i>	TTG TGC CAA GTC TGG AGA TG	TTT TCA GAG CGG ATG AAG GT	NM_031167.5
<i>I14ra</i>	GGA TAA GCA GAC CCG AAG C	ACT CTG GAG AGA CTT GGT TGG	NM_001008700.3
<i>Socs3</i>	CGT TGA CAG TCT TCC GAC AA	TAT TCT GGG GGC GAG AAG AT	NM_007707.3
<i>IL1b</i>	GGG CCT CAA AGG AAA GAA TC	TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG	NM_008361.3
<i>IL-6</i>	CAA AGC CAG AGT CCT TCA GA	GCC ACT CCT TCT GTG ACT CC	NM_031168.1
<i>IL10</i>	CTC CCC TGT GAA AAT AAG AGC	GCC TTG TAG ACA CCT TGG TC	NM_010548.2
<i>IL-12a</i>	TCA CAA CCA TCA GCA GAT CA	TGC AGA GCT TCA TTT TCA CTC	NM_001159424.1
<i>IL-12b</i>	ATC CAG CGC AAG AAA GAA AA	AAT AGC GAT CCT GAG CTT GC	NM_008352.2
<i>IL-18</i>	TTC GTT GAC AAA AGA CAG CC	TAT CAG TCT GGT CTG GGG TTC	NM_008360.1
<i>Tnfa</i>	GCC TCT TCT CAT TCC TGC TT	AGG GTC TGG GCC ATA GAA CT	NM_013693.3
<i>Cxcl1</i>	GCA CCC AAA CCG AAG TCA TA	AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT	NM_008176.3
<i>Cxcl10</i>	GGG TAA AGG GAG GTG GAG AG	GCT TAT TGA AAG CGG TGA GC	NM_021274.2
<i>Ccl2</i>	CAT CCA CGT GTT GGC TCA	TCA TTG GGA TCA TCT TGC TG	NM_011333.3
<i>Ccl3</i>	TTT TGA AAC CAG CAG CCT TT	CTG CCT CCA AGA CTC TCA GG	NM_011337.2
<i>Mbp</i>	CCG GAC CCA AGA TGA AAA C	CTT GGG ATG GAG GTG GTG T	NM_010777.3
<i>Gfap</i>	CTC CTG GTA ACT GGC CGA CT	AAG CCA AGC ACG AAG CTA AC	NM_010277.3
<i>NeuN</i>	CGA TGC TGT AGG TTG CTG TG	CAG ATA TGC TCA GCC AGC AG	NM_001039168.1
<i>CD11B</i>	CTG GTG CTC TTG GCT CTC AT	GCC AGC TTC ATT CAT CAT GT	NM_001082960.1

(IL) IL-1 α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), interferon (IFN) γ , tumor necrosis factor (TNF) α , chemokine C-X-C motif ligand (CXCL) 1 (KC), chemokine ligand (CCL) 2 (also known as MCP-1), CCL3 (also known as MIP1a), CCL4 (also known as MIP1b) and CCL5 (also known as RANTES). All samples were run in duplicate and data analysed with Bio-Plex Manager 6.0 software. Cytokines and chemokines were classified as cytotoxic, repair/regeneration or immunomodulatory based on the literature (Colton and Wilcock, 2010; Ransohoff and Perry, 2009) and previous characterization in our lab (Chhor et al., 2013).

2.8. Statistics

Data are presented as means \pm SEM. No animals were excluded from any analysis. Numbers in each experiment are indicated within the text, or in the figure legends. Sample sizes were based on calculations of effect sizes from previous studies on this model within the laboratory (Kaindl et al., 2007). For two experimental groups, t-tests or Mann Whitney *U* test were performed. Where more than two experimental groups were compared an ANOVA was performed and when this was significant ($p < 0.05$) a Bonferroni post-test was performed. The appropriate statistical test was chosen based on data normality (Kolmogorov-Smirnov test). The statistical test performed on each data set (using GraphPad 5.0 software [San Diego, CA, USA]) is indicated in the figure legend or within the text.

3. Results

3.1. TBI increases early cell death, microglial number and cortical cytokine / chemokine levels

Following TBI, CCasp3-positive cells were present in the underlying cortex, thalamic nuclei, hippocampal dentate gyrus, subiculum and striatum, and increased numbers of Iba-1 positive cells were observed mainly in the underlying cortex, hippocampus

and striatum, and a qualitative representation is found in Fig. 1. Specifically for Iba-1, numbers of positive cells were increased in the cortex following TBI at P1 by $\approx 150\%$ (contralateral 30.86 ± 2.24 versus ipsilateral 46.64 ± 2.41 ; $n = 36$) and in the striatum by $\approx 350\%$ (contralateral 12.05 ± 0.77 versus ipsilateral 47.23 ± 2.36 ; $n = 36$). We analysed the number of Iba-1 positive cells by sex and found no difference between control values for the cortex (contralateral male 25.21 ± 0.74 , $n = 20$ versus contralateral female 23.97 ± 1.17 , $n = 16$; $p = 0.35$, *t*-test) or striatum (contralateral male 11.68 ± 1.07 , $n = 17$ versus contralateral female 12.47 ± 1.15 , $n = 16$; $p = 0.55$, *t*-test), or in the response to injury in the cortex (ipsilateral male 53.71 ± 2.31 , $n = 17$ versus ipsilateral female 51.66 ± 2.48 , $n = 16$; $p = 0.52$, *t*-test) and striatum (ipsilateral male 47.97 ± 3.38 , $n = 17$ versus ipsilateral female 46.43 ± 3.37 , $n = 16$; $p = 0.76$, *t*-test). As such, we grouped males and females for the following analysis. The effects of TBI on the expression of 20 cytokines and chemokines were measured in the ipsilateral hemisphere at 6, 14 h and 24 h, and compared to levels in sham animals (Fig. 2). Expression increased for markers associated with each MG/M Φ phenotype at all three time points. We observed that relative to levels in a sham hemisphere, the pro-inflammatory/cytotoxic phenotype markers IL-1 β and CCL3 (MIP1 α) showed the greatest and most persistent increases in expression over time (> 5 fold). The prototypical anti-inflammatory or reparatory/regenerative cytokine IL-4 and the immunomodulatory cytokine IL-10 were also increased at all three time points in the ipsilateral hemisphere. TNF α and IL-12 (p70) were the only markers that did not significantly increase at any time point.

3.2. TBI induces MG/M Φ expression of markers of a regenerative/immunomodulatory phenotype

CD11B-positive MG/M Φ were isolated from whole cortices using MACS technology at 2, 6 and 14 h and 1 and 5 days post-TBI, and gene expression of 12 phenotype markers was measured (Fig. 3). Expression of the prototypical cytotoxic MG/M Φ markers

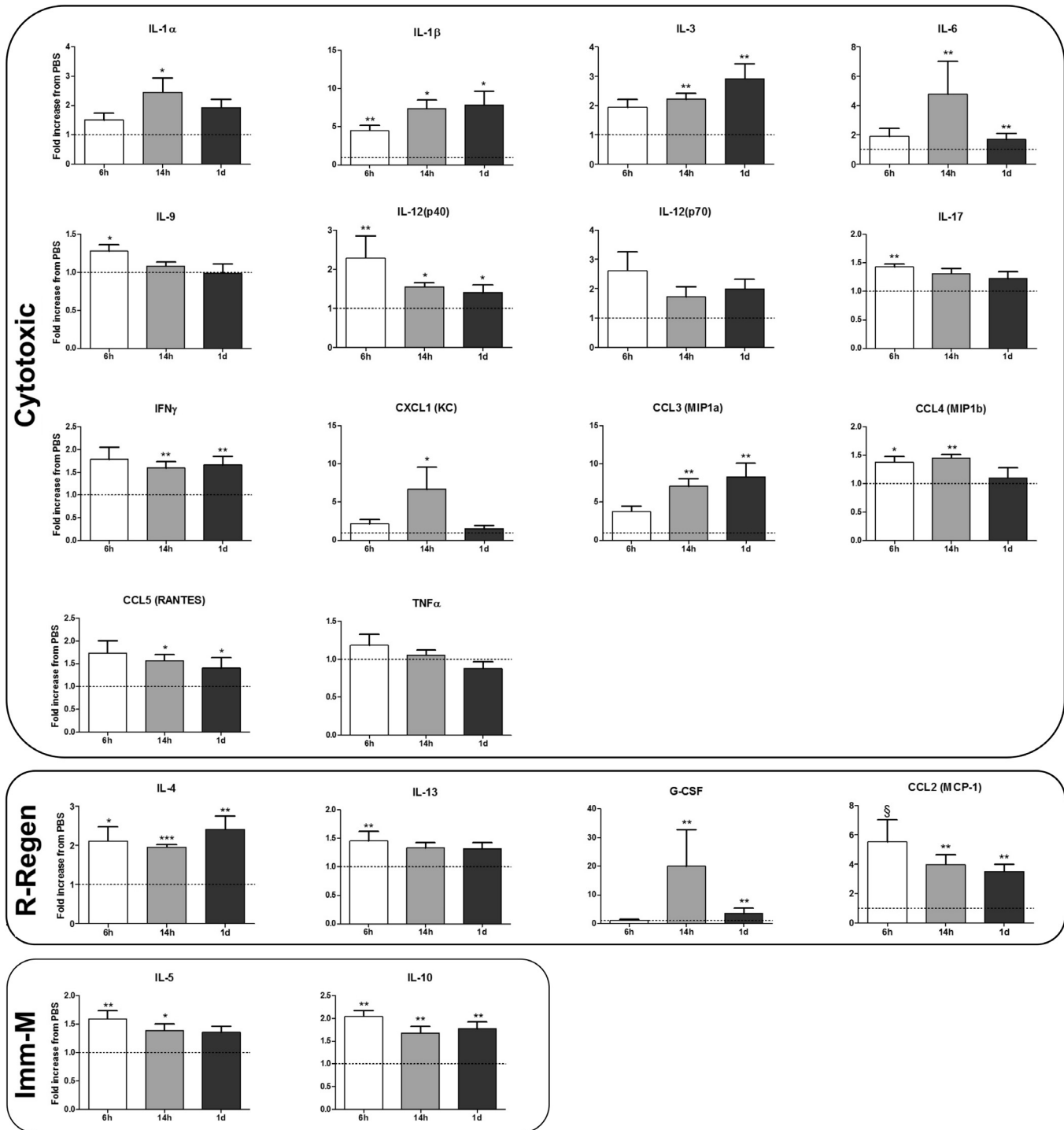


Fig. 2. Expression of cytokines and chemokines from the ipsilateral hemisphere over time post-TBI. Genes are grouped based on predicted role in inflammation: cytotoxic (CytoT), reparatory/regenerative (R-Regen), and immunomodulatory (Immu-M) based on (Colton, 2009; Prinz et al., 2011). Data are normalized to sham group expression (Sham = 1) and are indicated as means \pm SEM (n = 6–8 animals/group). Data were compared to the corresponding sham group using a Mann-Whitney *U* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CD86 and CD32 was decreased by TBI, and iNOS showed no increase at any time point examined. The cross-phenotype marker Cox-2 (cytotoxic-immunomodulatory) and IL1Rn, which has immunomodulatory functions, were persistently increased by TBI. Two additional immunomodulatory markers, SOCS3 and IL-4 α , showed early increases, but by 1-day post-TBI were reduced to below non-TBI levels. Among the reparatory/regenerative MG/M Φ markers, Arg1 and Gal3 showed persistent increases following TBI, but IGF-1 and CD206 were decreased.

3.3. Blocking MG/M Φ activation with minocycline causes improvements in neuropathology at 1 day post-TBI

Early brain injury was assessed via CCasp3 cell counts and using ventricular dilatation, calculated as the ratio of the ventricular size in the ipsilateral vs. the contralateral hemisphere. Animals treated with minocycline had reduced numbers of CCasp3-positive cells in the cortex, hippocampus and striatum (Fig. 4C and D). In agreement with these data, minocycline

treatment led to less ventricular dilatation compared with the untreated group at 1 day post-TBI (Fig. 4A and B). Sham groups treated with either vehicle or minocycline displayed no change in ventricular size and had very low levels of CCasp3-positive cells (data not shown).

3.4. Improved neuropathology due to minocycline is accompanied by reduced MG number and altered MG/MΦ activation

To characterize any relationship between the MG/MΦ inflammatory response and neuroprotection, 1 day following TBI, MG cell numbers were quantified using Iba-1 immunolabeling and the phenotype of isolated CD11B-positive MG/MΦ was assessed. As

expected based on previous reports of the effects of minocycline, the numbers of Iba-1-positive cells were decreased in the cortex, hippocampus and striatum of minocycline-treated animals (Fig. 5). Minocycline induced complex changes in the phenotype and cytokine/chemokine expression of MG/MΦ that were isolated post-TBI (Fig. 6). The cytotoxic phenotype markers iNOS and IL-6 were reduced from TBI only levels by minocycline treatment but IL-1β was increased. Among repair/regeneration markers, treatment with minocycline stimulated a further increase in the expression of Gal3 and Arg1, and reduced the typical loss of IGF1. Among immunomodulatory markers, minocycline increased the expression of IL-1Rn above typical levels but led to an even greater decrease in the expression of IL10.

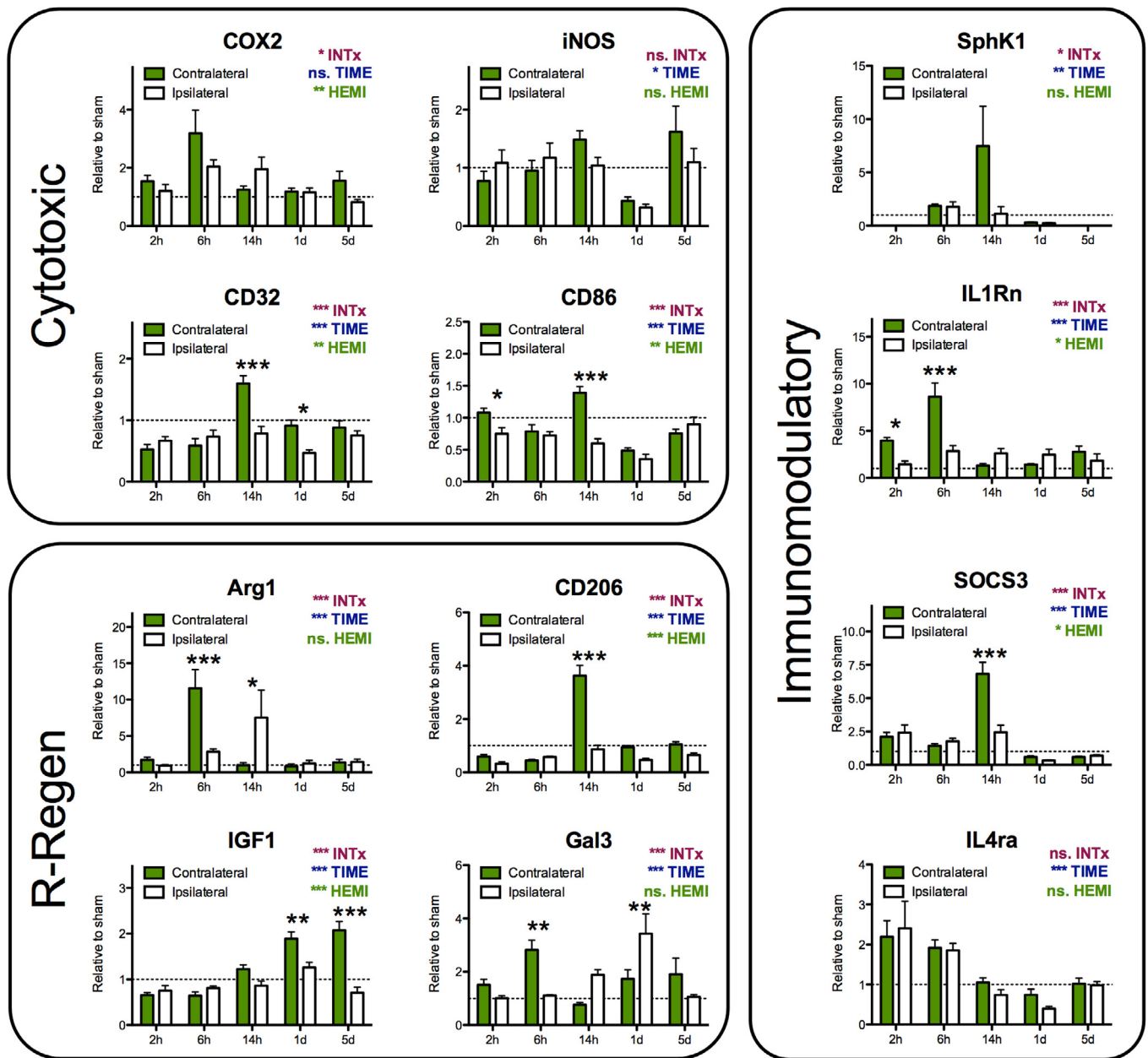


Fig. 3. Expression of phenotype markers by MG/MΦ isolated at various times post-TBI. Genes are grouped based on predicted role in inflammation: cytotoxic, reparatory/regenerative (R-Regen), and immunomodulatory based on (Colton, 2009; Prinz et al., 2011). Data are normalized to sham group expression (Sham = 1) and are means \pm SEM ($n = 5-6$ animals/group). Gene expression over time was analysed with a two way repeated measures ANOVA, with a Bonferroni post-test to compare the relative expression for each hemisphere at each time point. Summary of the ANOVA results are presented on each panel (effects of interaction between variable [INTx], effects of time [TIME] and effects of TBI [HEMI]). Results of the post-test are indicated with: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

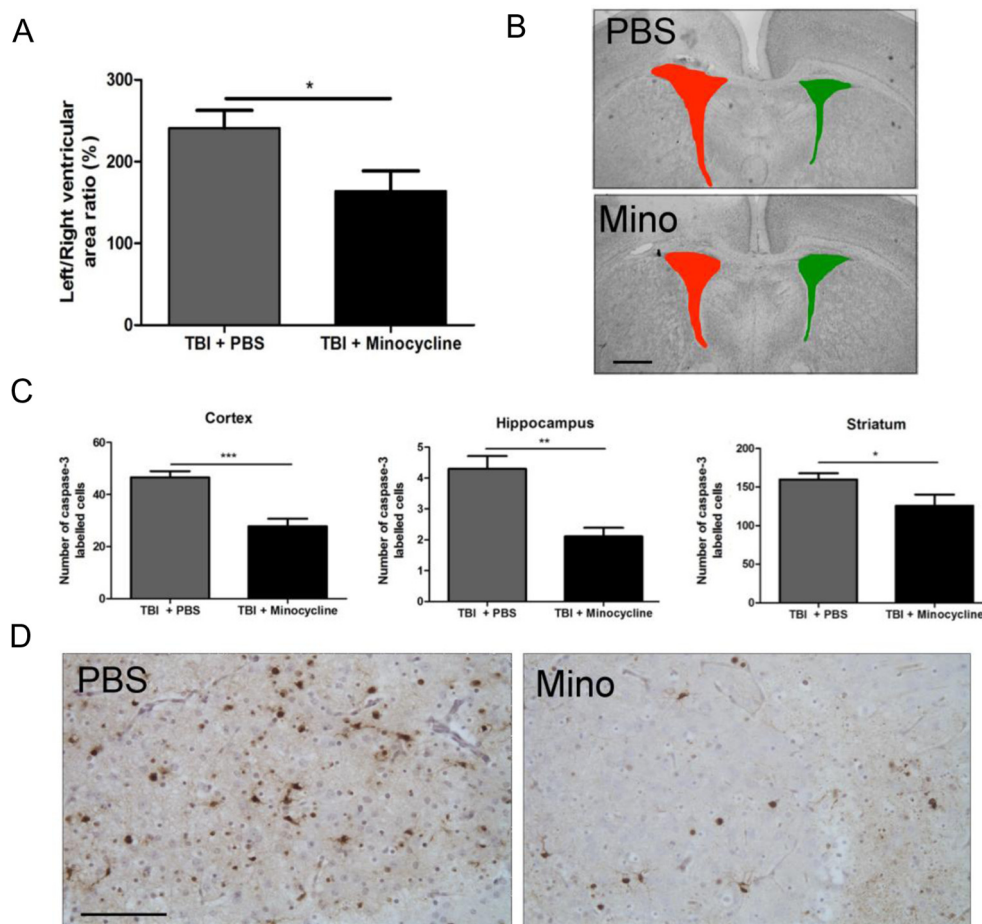


Fig. 4. Minocycline improves neuropathology 1-day post-TBI. A) Quantification of ventricular volume at 1 day post-TBI, and B) representative images of cresyl-violet-stained sections from both groups indicating ventricular size. C) Quantification of CCasp-3-positive cell number. D) Representative images of CCasp-3 immunolabeling in the striatum from both groups, scale bar 50 μ m. Data are indicated by means \pm SEM ($n = 9$ –18 animals/group), and PBS- and minocycline-treated groups were compared via a Student's *t*-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.5. Early improvements in neuropathology due to minocycline treatment are lost by 5 days post-TBI

Immunolabeling for MAP2 and MBP were used as surrogates for damage to neurons and myelination by oligodendrocytes respectively. TBI decreased the volume of tissue immunolabeled for MAP2 and MBP, and persistently caused ventricular dilatation in the injured hemisphere at 5 days post-TBI (P14; Fig. 7). MAP-2 immunolabeling was similar to that reported previously in the immature brain (Carlsson et al., 2011; Lingwood et al., 2008), displaying a more diffuse pattern and with less cytoplasmic intensity than in the adult. Despite improvements at 1-day post-TBI, at 5 days post-TBI, in animals treated with minocycline, ventricle size was identical to that in PBS treated TBI animals (Fig. 7A). In accordance with the ventricular data, the loss of MAP2 and MBP immunolabeling was not prevented by treatment with minocycline (Fig. 7B–E).

4. Discussion and conclusions

4.1. Principal results and the TBI model

In our closed-contusion model of paediatric TBI, injury modestly increased the levels of both pro- and anti-inflammatory cytokines/chemokines in the brain as well as the number of MG. Isolated MG/M Φ had only moderate changes in gene expression,

and increases specifically in markers for the repair/regeneration and immunomodulatory phenotypes. Blocking inflammation/MG/M Φ activation with minocycline decreased MG number, reduced expression of some pro-inflammatory cytokines but was only transiently neuroprotective.

We chose for this study a closed-contusion weight-drop TBI model as it has injury mechanisms similar to those seen in paediatric TBI (Xiong et al., 2013). In particular, within the first 30 days of life, at 7-day old, mice display the most widespread apoptotic injury following TBI (Bittigau et al., 1999). This is also the period of greatest vulnerability to excitotoxic lesion in the rodent (Ikonomidou et al., 1989; McDonald et al., 1988) a likely effect of the reduced compensatory anti-oxidant defences of the immature as opposed to the adult brain (Fan et al., 2003). As apoptotic cell death, excitotoxicity and oxidative stress play crucial roles in the pathogenesis of TBI in the neonate (Ruppel et al., 2001; Zhang et al., 2005); this adds weight to the relative usefulness of modelling TBI at this period of rodent development.

4.2. Cortical tissue damage and injury response following paediatric TBI

Following TBI we observed increased total cortical expression of cytokines and chemokines, as well as dilated ventricles and obvious tissue injury in the thalamus and hippocampus of the injured hemisphere. These observations are generally in agreement with

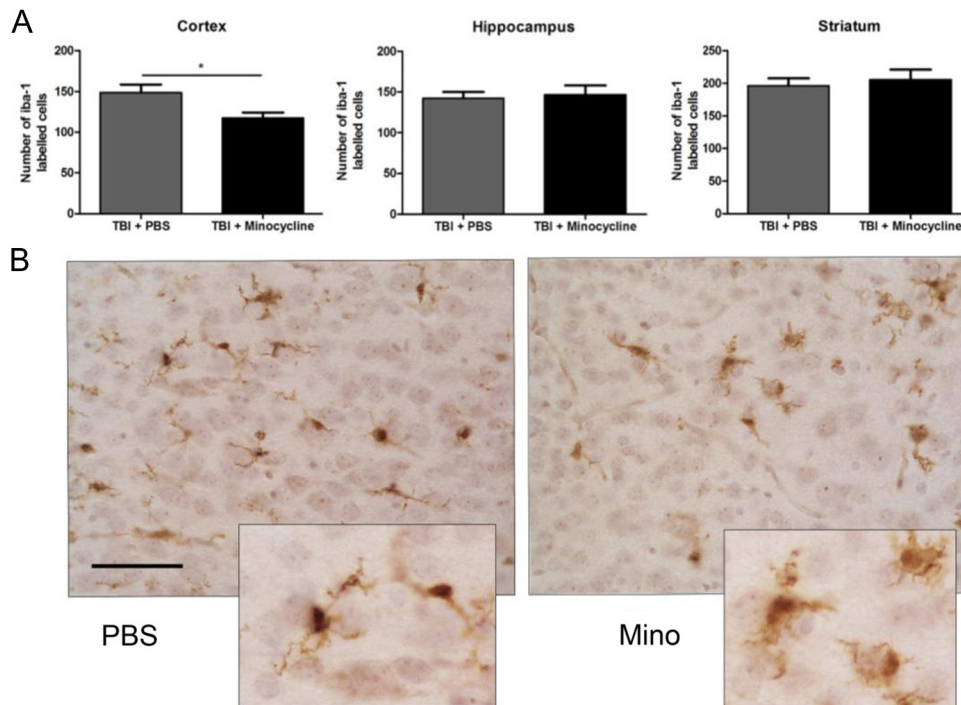


Fig. 5. Minocycline decreases MG cell number 1-day post-TBI. A) quantification of the number of Iba-1-positive cells at 1 day following TBI in PBS- and minocycline-treated mice within the cortex, hippocampus and striatum. B) Representative Iba-1-positive cells in animals from each group from within the striatum, scale bar 50 μm. Data are indicated by means ± SEM (n = 9–16 animals/group). PBS- and minocycline-treated groups were compared via a Student's *t*-test. **p* < 0.05.

previous reports from this model and TBI in large animal models and humans (Helmy et al., 2011; Kaindl et al., 2007; Moretti et al., 2016; Xiong et al., 2013). Specific comparisons across studies are hampered by differences in models and methods, specifically the use of protein versus gene analysis. However, specific comparisons for gene expression can be made to published gene array data. In this context levels of almost all of the jointly reported cytokines and chemokines are considerably lower in our model than that previously reported in two adult rat models of controlled cortical impact (Matzilevich et al., 2002; Raghavendra Rao et al., 2003; White et al., 2013), and one rat model of fluid-percussion injury (Truettner et al., 2005), but were comparable to that reported in a model of adult rat bilateral prefrontal cortical contusion (He et al., 2004). Protein levels for chemokines and cytokines are also consistently and persistently high in previous reports from adult models of contusion and blast-induced TBI (Bye et al., 2007; He et al., 2004; Kumar et al., 2015; Williams et al., 2007). We suggest that further work is needed to ascertain if any smaller magnitude of cortical pro-inflammatory cytokine release is linked to our observation that neonatal TBI induces a predominantly reparatory/regenerative or immunomodulatory MG/MΦ phenotype. As MG/MΦ are the chief drivers of neuroinflammation, a predominantly anti-inflammatory response might prevent cortical inflammation reaching the levels seen in adult injury models, in which there is a robust cytotoxic/pro-inflammatory MG profile (Kumar et al., 2015).

We also wish to briefly discuss the effects of TBI in the contralateral hemisphere. We noted that gene expression was lower than sham level even in the contralateral hemisphere in MG/MΦ for cytotoxic markers (including CD86 and CD32) and also for the repair-regeneration marker CD206 and the immunomodulatory marker SphK1. This type of remote gene expression change has been previously reported in an adult cortical contusion model where it was reported that these are not simply reduced magni-

tude changes spilling over from the ipsilateral cortex but that some effects are specific (White et al., 2013). Remote tissue changes (such as in the cortex following spinal cord injury) are considered to be crucial mediators of sensorimotor dysfunction and cognitive impairments (Ajao et al., 2012; Kamper et al., 2013; Kim et al., 2006). The diffusion of inflammatory products setting up a chain reaction, signalling via gap junctions in astrocytes and changes in neuronal activity patterns in distant areas are hypothesized to underpin these remote effects. Disruption of the developmental functions of MG (such as synaptogenesis) is considered to underpin some of the injury associated with damage to the immature brain at the injury site and in the remote regions, see (Tremblay et al., 2011). Furthermore, on going changes in homeostatic functions are associated with neurodegeneration such as in aging (Grabert et al., 2016; Griffin et al., 2006; Hart et al., 2012; Lourbopoulos et al., 2015). As such, additional longitudinal studies in this model are warranted to explore the remote and persisting effects of TBI.

4.3. MG/MΦ phenotype in paediatric vs. adult TBI and other injury models

This is the first study to assess the phenotype of ex-vivo MG/MΦ over such a comprehensive time course (and with so many markers) after an acute neonatal injury. However, there are interesting temporal studies on isolated MG in an adult TBI model (Kumar et al., 2015), and total cortical inflammation in an adult TBI model (Wang et al., 2013) although the methods of analysis vary making it difficult to directly compare data. However, in adult TBI, the protein expression of ex vivo MG for classical pro-inflammatory markers increased over time such that at +5 days all markers were robustly increased, compared to our gene expression data wherein only three cytotoxic markers were moderately increased, with no cohesive time point of change. The authors of the adult TBI study sought to describe the robust predominantly pro-inflammatory or mixed

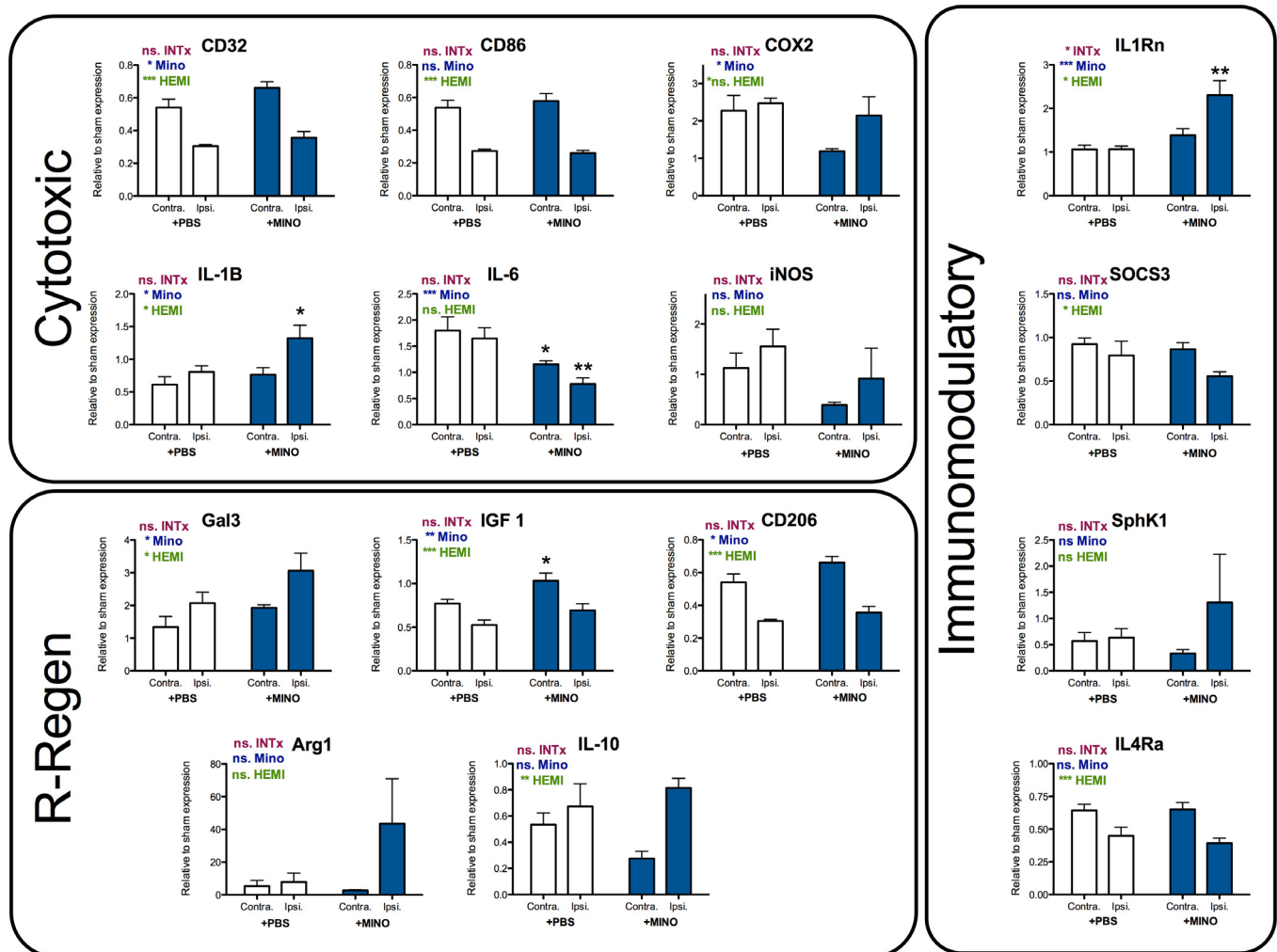


Fig. 6. Effects of minocycline treatment on the expression of phenotype markers from MG/MΦ isolated 24 h post-TBI. Data are shown normalized to expression in a sham group (Sham = 1) and as means \pm SEM ($n = 9–16$ animals/group). Genes are grouped based on predicted role in inflammation: cytotoxic, reparatory/regenerative (R-Regen), and immunomodulatory based on (Colton, 2009; Prinz et al., 2011). Data were compared with a two way ANOVA, with a Bonferroni post-test to compare the relative expression for each hemisphere (PBS versus TBI). Summary of the ANOVA results are presented on each panel (effects of interaction between variable [INTx], effects of time [TIME] and effects of TBI [HEMI]). Results of the post-test comparing each hemisphere are indicated with: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

phenotype that replaced a transient but specific repair/regeneration and immunomodulatory phenotype as “Mtran” (Kumar et al., 2015). In our paediatric model, since cytotoxic MG/MΦ gene expression was generally low, including at 5 days post-TBI, we conclude it is unlikely that this phenotype occurs in this model, although we would need to validate our data with the same FACS based protein analysis. However, when comparing neonatal and adult studies it is worth considering that robust age-dependent differences in MG/MΦ gene expression have been reported (Bennett et al., 2016; Butovsky et al., 2014). In brief, the stage of development is likely important for MG/MΦ reactivity and is an important consideration for studies of neuroinflammation.

Another key point in the interpretation of these data is the ability of cells to co-express markers, reflecting the *in vivo* complexity of phenotype descriptors. Our gene expression analysis does not allow us to determine if there are discrete populations of cells switching phenotype or cell co-expressing different category marker as has been previously reported in adult studies (Bedi et al., 2013; Li et al., 2014; Vogel et al., 2013). Co-expression patterns are likely in our paediatric TBI model, but from the paucity of gene expression changes overall any robust co-expression of markers seems unlikely.

4.4. Mode of action of minocycline as a neuroprotective agent

Minocycline is a second-generation semi-synthetic tetracycline that is best known for reducing pro-inflammatory responses via its effects on MG/MΦ (Homsy et al., 2010; Kobayashi et al., 2013; Ng et al., 2012). Minocycline has been used successfully to reduce brain damage across a diverse range of injury/disease models, such as multiple sclerosis (experimental autoimmune encephalitis), term and preterm brain injury (excitotoxicity and hypoxia-ischemia, respectively) and Alzheimer's disease, for review see (Garrido-Mesa et al., 2013). Minocycline successfully reduced TBI severity at our early time point of 1 day post-lesion, despite there being little pro-inflammatory response from MG/MΦ. It is not clear from the literature whether minocycline can act directly on astrocytes (Kernt et al., 2010; Yoon et al., 2012) to facilitate any effect. Nevertheless, several pathological mechanisms involved in TBI are counteracted by minocycline, possibly accounting for the neuroprotection. These include that minocycline increases levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (Wang et al., 2004) and the chelation of magnesium and calcium (Gonzalez et al., 2007) and also decreases activation of MMPs (Koistinaho et al., 2005) and caspase-1 and caspase-3 (Sanchez Mejia et al., 2001). The

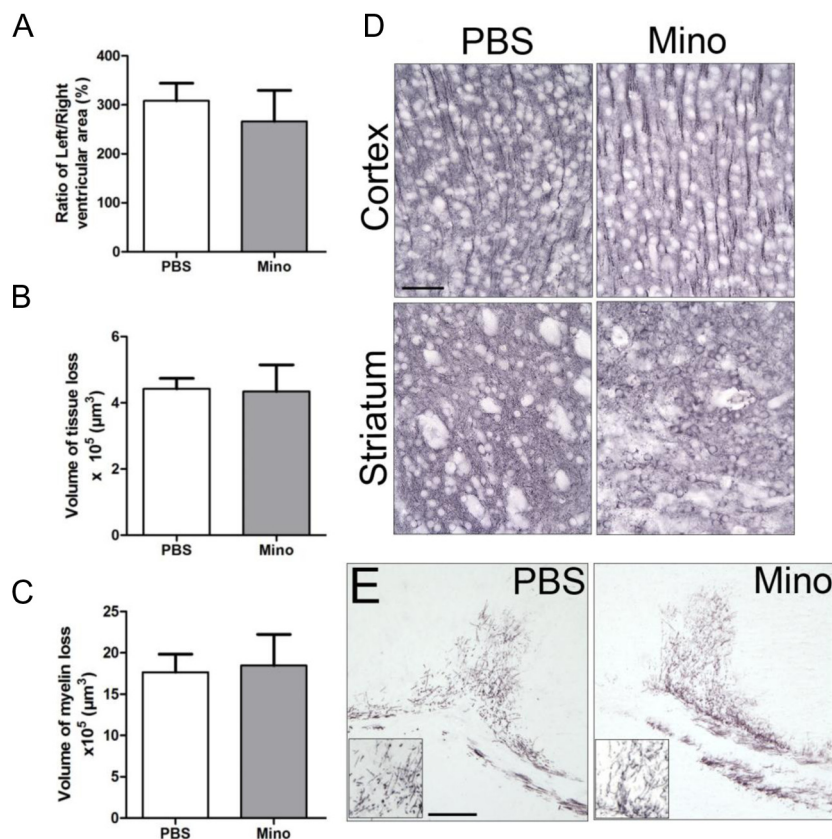


Fig. 7. Lack of improvement in neuropathology in minocycline treated animals 5 days post-TBI. A) Quantification of ventricular size 5 days post-TBI and B) quantification of the volume of tissue loss in the traumatized hemisphere 5 days post-TBI based on MAP-2 immunoreactivity, D) representative photomicrographs of MAP2-immunolabeled sections, scale bar 50 μm . C) and E) quantification and representative images of the volume of white matter loss in the traumatized hemisphere based on MBP immunoreactivity, scale bar 200 μm . Data are indicated by means \pm SEM ($n = 12\text{--}18$ animals/group). PBS- and minocycline-treated groups were compared via a Student's *t*-test.

protective effect of inhibiting MMPs in this model of paediatric TBI has been previously demonstrated (Sifringer et al., 2007).

4.5. Reasons for absence of long-term neuroprotection by minocycline

This study is not the first to report a limited neuroprotective effect of minocycline (Fernandez-Gomez et al., 2005; Fox et al., 2005; Sriram et al., 2006; Yang et al., 2003). Of particular interest is a transient neuroprotective effect reported in an adult closed-contusion TBI model that is strikingly similar to what we observed. In this adult TBI model, behavioural improvements and reduced lesion volume at 1-day post-TBI were lost by 4 days post-TBI (Bye et al., 2007). An early but transient therapeutic effect of minocycline has also been reported following hypoxic-ischemic injury in the mouse (Fox et al., 2005; Nijboer et al., 2010), indicating that this effect of minocycline is not specific to TBI. A limitation of these previous studies and our current study is that we did not test whether behavioural outcomes were improved, despite no change in neuropathology. The concept of a protective phase of the MG/M Φ response after injury has gained enormous support from studies of adult and neonatal models (Faustino et al., 2011; Hernandez-Ontiveros et al., 2013; Hu et al., 2012; Lalancette-Hebert et al., 2007). We speculate that the lack of persistent neuroprotection with minocycline in this model might be because microglia are attempting to repair the brain. As such, there are short-term positive effects (that might relate to positive effects of minocycline on other cells Koistinaho et al., 2005), but when

MG are prevented from attempting to repair the brain in the longer term due to exposure to minocycline these positive gains are neutralised by 5 days. What is apparent however is that as outlined in a (non exhaustive) list of studies in Table 1 there are unclear influences on outcome of species (rat versus mouse) and treatment regime (immediate/early only, versus immediate and continuing). The multitude of differences in experimental conditions and outcome measures preclude any firm conclusions on the influences of these factors on the true neuroprotective ability of minocycline.

5. Conclusions

In summary, despite cortical inflammation and cell death following TBI, MG/M Φ retain the expression of markers of an endogenous repair and regenerative phenotype in this model. Also, there are only moderate increases in total cortical inflammatory markers compared to adult injury models. We identified that using minocycline to modify the activity of MG/M Φ had positive early effects on injury, but did not persistently improve outcome. This work adds considerably to our understanding of neuroinflammation after TBI in a neonatal model by suggesting that further therapy design should focus on supporting repair and regeneration type MG/M Φ activation states rather than blanket immunosuppression.

Conflict of Interest Statement

All authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Inserm, Université Paris Diderot, Université Sorbonne-Paris-Cité, Investissement d'Avenir (ANR-11-INBS-0011, NeurATRIS), ERA-NET Neuron (Micromet), DHU PROTECT, PremUP, Fondation de France, Fondation pour la Recherche sur le Cerveau, Fondation des Gueules Cassées, Institut Servier, Roger de Spoelberch Foundation, Grace de Monaco Foundation, Leducq Foundation, Cerebral Palsy Alliance Research Foundation Australia, The Swedish Medical Research Council (VR 2015-02493), Hjärfonden (Brain Foundation 2015-0004), Swedish Governmental Grant to Researchers at University Hospitals (ALFGBG-426401), and the Wellcome Trust (WSCR32674). In addition, the authors acknowledge financial support from the Department of Health via the National Institute for Health Research (NIHR) comprehensive Biomedical Research Centre award to Guy's & St Thomas' NHS Foundation Trust in partnership with King's College London and King's College Hospital NHS Foundation Trust. The supporting bodies played no role in any aspect of study design, analysis, interpretation or decision to publish these data.

References

- Ajao, D.O., Pop, V., Kamper, J.E., Adami, A., Rudbeck, E., Huang, L., Vlkolinsky, R., Hartman, R.E., Ashwal, S., Obenaus, A., Badaut, J., 2012. Traumatic brain injury in young rats leads to progressive behavioral deficits coincident with altered tissue properties in adulthood. *J. Neurotrauma* 29, 2060–2074.
- Anderson, V., Catroppa, C., Morse, S., Haritou, F., Rosenfeld, J., 2005. Functional plasticity or vulnerability after early brain injury? *Pediatrics* 116, 1374–1382.
- Arvin, K.L., Han, B.H., Du, Y., Lin, S.Z., Paul, S.M., Holtzman, D.M., 2002. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann. Neurol.* 52, 54–61.
- Bedi, S.S., Smith, P., Hetz, R.A., Xue, H., Cox, C.S., 2013. Immunomagnetic enrichment and flow cytometric characterization of mouse microglia. *J. Neurosci. Methods* 219, 176–182.
- Bennet, L., Van Den Heuvel, L., Dean, J.M., Drury, P., Wassink, G., Gunn, A.J., 2013. Neural plasticity and the Kennard Principle – does it work for the preterm brain? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*
- Bennett, M.L., Bennett, F.C., Liddelov, S.A., Ajami, B., Zamanian, J.L., Fernhoff, N.B., Mulinyawe, S.B., Bohlen, C.J., Adil, A., Tucker, A., Weissman, I.L., Chang, E.F., Li, G., Grant, G.A., Hayden Gephart, M.G., Barres, B.A., 2016. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E1738–E1746.
- Bittigau, P., Siffringer, M., Pohl, D., Stadthaus, D., Ishimaru, M., Shimizu, H., Ikeda, M., Lang, D., Speer, A., Olney, J.W., Ikonomidou, C., 1999. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann. Neurol.* 45, 724–735.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., Koeglspenger, T., Dake, B., Wu, P.M., Doynan, C.E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J.D., Ransohoff, R.M., Gygi, S.P., Antel, J.P., Weiner, H.L., 2014. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* 17, 131–143.
- Bye, N., Habgood, M.D., Callaway, J.K., Malakooti, N., Potter, A., Kossmann, T., Morganti-Kossmann, M.C., 2007. Transient neuroprotection by minocycline following traumatic brain injury is associated with attenuated microglial activation but no changes in cell apoptosis or neutrophil infiltration. *Exp. Neurol.* 204, 220–233.
- Cai, Z., Lin, S., Fan, L.W., Pang, Y., Rhodes, P.G., 2006. Minocycline alleviates hypoxic-ischemic injury to developing oligodendrocytes in the neonatal rat brain. *Neuroscience* 137, 425–435.
- Carlsson, Y., Schwendemann, L., Vontell, R., Rousset, C.I., Wang, X., Lebon, S., Charriaut-Marlangue, C., Supramaniam, V., Hagberg, H., Gressens, P., Jacotot, E., 2011. Genetic inhibition of caspase-2 reduces hypoxic-ischemic and excitotoxic neonatal brain injury. *Ann. Neurol.* 70, 781–789.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Ore, M.V., Celador, I.L., Jossierand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Savman, K., Mallard, C., Gressens, P., Fleiss, B., 2013. Characterization of phenotype markers and neurotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav. Immun.* 32, 70–85.
- Colton, C.A., 2009. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4, 399–418.
- Colton, C.A., Wilcock, D.M., 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 9, 174–191.
- Copland, I.B., Martinez, F., Kavanagh, B.P., Engelberts, D., McKelrie, C., Belik, J., Post, M., 2004. High tidal volume ventilation causes different inflammatory responses in newborn versus adult lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 739–748.
- Dommergues, M.A., Plaisant, F., Verney, C., Gressens, P., 2003. Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. *Neuroscience* 121, 619–628.
- Ewing-Cobbs, L., Prasad, M.R., Kramer, L., Cox Jr., C.S., Baumgartner, J., Fletcher, S., Mendez, D., Barnes, M., Zhang, X., Swank, P., 2006. Late intellectual and academic outcomes following traumatic brain injury sustained during early childhood. *J. Neurosurg.* 105, 287–296.
- Fan, P., Yamauchi, T., Noble, L.J., Ferriero, D.M., 2003. Age-dependent differences in glutathione peroxidase activity after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 20, 437–445.
- Faustino, J.V., Wang, X., Johnson, C.E., Klihanov, A., Derugin, N., Wendland, M.F., Vexler, Z.S., 2011. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J. Neurosci.* 31, 12992–13001.
- Fernandez-Gomez, F.J., Gomez-Lazaro, M., Pastor, D., Calvo, S., Aguirre, N., Galindo, M.F., Jordan, J., 2005. Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death. *Neurobiol. Dis.* 20, 384–391.
- Fleiss, B., Nilsson, M.K., Blomgren, K., Mallard, C., 2012. Neuroprotection by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in a model of lipopolysaccharide-sensitized neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *J. Neuroinflammation* 9, 70.
- Fox, C., Dingman, A., Derugin, N., Wendland, M.F., Manabat, C., Ji, S., Ferriero, D.M., Vexler, Z.S., 2005. Minocycline confers early but transient protection in the immature brain following focal cerebral ischemia-reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1138–1149.
- Garrido-Mesa, N., Zarzuelo, A., Galvez, J., 2013. Minocycline: far beyond an antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* 169, 337–352.
- Giza, C.C., Mink, R.B., Madikians, A., 2007. Pediatric traumatic brain injury: not just little adults. *Curr. Opin. Crit. Care* 13, 143–152.
- Gonzalez, J.C., Egea, J., Del Carmen Godino, M., Fernandez-Gomez, F.J., Sanchez-Prieto, J., Gandia, L., Garcia, A.G., Jordan, J., Hernandez-Guijo, J.M., 2007. Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca(2+) signalling in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 26, 2481–2495.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Baillie, J.K., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., McColl, B.W., 2016. Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 19, 504–516.
- Griffin, R., Nally, R., Nolan, Y., McCartney, Y., Linden, J., Lynch, M.A., 2006. The age-related attenuation in long-term potentiation is associated with microglial activation. *J. Neurochem.* 99, 1263–1272.
- Hagberg, H., Gressens, P., Mallard, C., 2012. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann. Neurol.* 71, 444–457.
- Hanlon, L.A., Huh, J.W., Raghupathi, R., 2016. Minocycline Transiently Reduces Microglia/Macrophage Activation but Exacerbates Cognitive Deficits Following Repetitive Traumatic Brain Injury in the Neonatal Rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 75, 214–226.
- Hart, A.D., Wyttenbach, A., Perry, V.H., Teeling, J.L., 2012. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. *Brain Behav. Immun.* 26, 754–765.
- He, J., Evans, C.O., Hoffman, S.W., Oyesiku, N.M., Stein, D.G., 2004. Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 189, 404–412.
- Helmy, A., Carpenter, K.L., Menon, D.K., Pickard, J.D., Hutchinson, P.J., 2011. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 658–670.
- Hernandez-Ontiveros, D.G., Tajiri, N., Acosta, S., Giunta, B., Tan, J., Borlongan, C.V., 2013. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front. Neurol.* 4, 30.
- Hessen, E., Nestvold, K., Anderson, V., 2007. Neuropsychological function 23 years after mild traumatic brain injury: a comparison of outcome after paediatric and adult head injuries. *Brain Inj.* 21, 963–979.
- Homsy, S., Piaggio, T., Croci, N., Noble, F., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Jafarian-Tehrani, M., 2010. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *J. Neurotrauma* 27, 911–921.
- Hsieh, C.L., Kim, C.C., Ryba, B.E., Niemi, E.C., Bando, J.K., Locksley, R.M., Liu, J., Nakamura, M.C., Seaman, W.E., 2013. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *Eur. J. Immunol.* 43, 2010–2022.
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R.K., Chen, S., Gao, Y., Chen, J., 2012. Microglia/Macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* 43, 3063–3070.
- Husson, I., Rangon, C.M., Lelievre, V., Bemelmans, A.P., Sachs, P., Mallet, J., Kosofsky, B.E., Gressens, P., 2005. BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb. Cortex* 15, 250–261.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L., Olney, J.W., 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283, 70–74.
- Ikonomidou, C., Mosinger, J.L., Salles, K.S., Labruyere, J., Olney, J.W., 1989. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 9, 2809–2818.
- Kaindl, A.M., Zabel, C., Stefovskaja, V., Lehnert, R., Siffringer, M., Klose, J., Ikonomidou, C., 2007. Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: Implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborization. *Proteomics Clin. Appl.* 1, 640–649.
- Kamper, J.E., Pop, V., Fukuda, A.M., Ajao, D.O., Hartman, R.E., Badaut, J., 2013. Juvenile traumatic brain injury evolves into a chronic brain disorder: behavioral and histological changes over 6months. *Exp. Neurol.* 250, 8–19.

- Keenan, H.T., Runyan, D.K., Marshall, S.W., Nocera, M.A., Merten, D.F., Sinal, S.H., 2003. A population-based study of inflicted traumatic brain injury in young children. *JAMA* 290, 621–626.
- Kernt, M., Neubauer, A.S., Eibl, K.H., Wolf, A., Ulbig, M.W., Kampik, A., Hirneiss, C., 2010. Minocycline is cytoprotective in human trabecular meshwork cells and optic nerve head astrocytes by increasing expression of XIAP, survivin, and Bcl-2. *Clin. Ophthalmol.* 4, 591–604.
- Kim, B.G., Dai, H.N., McAtee, M., Vicini, S., Bregman, B.S., 2006. Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 198, 401–415.
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomi, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., Kadomatsu, K., 2013. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 4, e525.
- Koepsell, T.D., Rivara, F.P., Vavilala, M.S., Wang, J., Temkin, N., Jaffe, K.M., Durbin, D. R., 2011. Incidence and descriptive epidemiologic features of traumatic brain injury in King County, Washington. *Pediatrics* 128, 946–954.
- Koistinaho, M., Malm, T.M., Kettunen, M.I., Goldsteins, G., Starckx, S., Kauppinen, R. A., Opdenakker, G., Koistinaho, J., 2005. Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloproteinase-9-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 460–467.
- Kumar, A., Alvarez-Croda, D.M., Stoica, B.A., Faden, A.I., Loane, D.J., 2015. Microglial/macrophage polarization dynamics following traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*.
- Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., Kriz, J., 2007. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci.* 27, 2596–2605.
- Lechpammer, M., Manning, S.M., Samonte, F., Nelligan, J., Sabo, E., Talos, D.M., Volpe, J.J., Jensen, F.E., 2008. Minocycline treatment following hypoxic/ischaemic injury attenuates white matter injury in a rodent model of periventricular leucomalacia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34, 379–393.
- Li, Z., Ma, L., Kullesskaya, N., Voikar, V., Tian, L., 2014. Microglia are polarized to M1 type in high-anxiety inbred mice in response to lipopolysaccharide challenge. *Brain Behav. Immun.* 38, 237–248.
- Lingwood, B.E., Healy, G.N., Sullivan, S.M., Pow, D.V., Colditz, P.B., 2008. MAP2 provides reliable early assessment of neural injury in the newborn piglet model of birth asphyxia. *J. Neurosci. Methods* 171, 140–146.
- Lourbopoulos, A., Erturk, A., Hellal, F., 2015. Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. *Front. Cell Neurosci.* 9, 54.
- Matzilevich, D.A., Rall, J.M., Moore, A.N., Grill, R.J., Dash, P.K., 2002. High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *J. Neurosci. Res.* 67, 646–663.
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V., 1988. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* 459, 200–203.
- Moretti, R., Chhor, V., Bettati, D., Banino, E., De Lucia, S., Le Charpentier, T., Lebon, S., Schwendimann, L., Pansiot, J., Rasika, S., Degos, V., Titomanlio, L., Gressens, P., Fleiss, B., 2016. Contribution of mast cells to injury mechanisms in a mouse model of pediatric traumatic brain injury. *J. Neurosci. Res.*
- Ng, S.Y., Semple, B.D., Morganti-Kossmann, M.C., Bye, N., 2012. Attenuation of microglial activation with minocycline is not associated with changes in neurogenesis after focal traumatic brain injury in adult mice. *J. Neurotrauma* 29, 1410–1425.
- Nijboer, C.H., Heijnen, C.J., Willemsen, H.L., Groenendaal, F., Dorn 2nd, G.W., van Bel, F., Kavelaars, A., 2010. Cell-specific roles of GRK2 in onset and severity of hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice. *Brain Behav. Immun.* 24, 420–426.
- Pinto, P.S., Poretti, A., Meoded, A., Tekes, A., Huisman, T.A., 2012. The unique features of traumatic brain injury in children. Review of the characteristics of the pediatric skull and brain, mechanisms of trauma, patterns of injury, complications and their imaging findings—part 1. *J. Neuroimaging* 22, e1–e17.
- Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., Ransohoff, R.M., 2011. Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 14, 1227–1235.
- Raghavendra Rao, V.L., Dhodda, V.K., Song, G., Bowen, K.K., Dempsey, R.J., 2003. Traumatic brain injury-induced acute gene expression changes in rat cerebral cortex identified by GeneChip analysis. *J. Neurosci. Res.* 71, 208–219.
- Ransohoff, R.M., Perry, V.H., 2009. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Rivara, F.P., Vavilala, M.S., Durbin, D., Temkin, N., Wang, J., O'Connor, S.S., Koepsell, T.D., Dorsch, A., Jaffe, K.M., 2012. Persistence of disability 24 to 36 months after pediatric traumatic brain injury: a cohort study. *J. Neurotrauma* 29, 2499–2504.
- Ruppel, R.A., Kochanek, P.M., Adelson, P.D., Rose, M.E., Wisniewski, S.R., Bell, M.J., Clark, R.S., Marion, D.W., Graham, S.H., 2001. Excitatory amino acid concentrations in ventricular cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: the role of child abuse. *J. Pediatr.* 138, 18–25.
- Sanchez Mejia, R.O., Ona, V.O., Li, M., Friedlander, R.M., 2001. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* 48, 1393–1399 (Discussion 1399–1401).
- Schang, A.L., Van Steenwinckel, J., Chevenne, D., Alkmark, M., Hagberg, H., Gressens, P., Fleiss, B., 2013. Failure of thyroid hormone treatment to prevent inflammation-induced white matter injury in the immature brain. *Brain Behav. Immun.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.11.005>.
- Schang, A.L., Van Steenwinckel, J., Chevenne, D., Alkmark, M., Hagberg, H., Gressens, P., Fleiss, B., 2014. Failure of thyroid hormone treatment to prevent inflammation-induced white matter injury in the immature brain. *Brain Behav. Immun.* 37, 95–102.
- Scholz, R., Sobotka, M., Caramoy, A., Stempf, T., Moehle, C., Langmann, T., 2015. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J. Neuroinflammation* 12, 209.
- Schultz, C., Temming, P., Bucszy, P., Gopel, W., Strunk, T., Hartel, C., 2004. Immature anti-inflammatory response in neonates. *Clin. Exp. Immunol.* 135, 130–136.
- Sifringer, M., Stefovskaya, V., Zentner, I., Hansen, B., Stepulak, A., Knaute, C., Marzahn, J., Ikonomidou, C., 2007. The role of matrix metalloproteinases in infant traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 25, 526–535.
- Sriram, K., Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., 2006. Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor- α . *J. Neurochem.* 96, 706–718.
- Stanley, R.M., Bonsu, B.K., Zhao, W., Ehrlich, P.F., Rogers, A.J., Xiang, H., 2012. US estimates of hospitalized children with severe traumatic brain injury: implications for clinical trials. *Pediatrics* 129, e24–e30.
- Stokely, M.E., Orr, E.L., 2008. Acute effects of calvarial damage on dural mast cells, pial vascular permeability, and cerebral cortical histamine levels in rats and mice. *J. Neurotrauma* 25, 52–61.
- Tremblay, M.E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., Nimmerjahn, A., 2011. The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci.* 31, 16064–16069.
- Truettner, J.S., Suzuki, T., Dietrich, W.D., 2005. The effect of therapeutic hypothermia on the expression of inflammatory response genes following moderate traumatic brain injury in the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 138, 124–134.
- Tsuji, M., Wilson, M.A., Lange, M.S., Johnston, M.V., 2004. Minocycline worsens hypoxic-ischemic brain injury in a neonatal mouse model. *Exp. Neurol.* 189, 58–65.
- Vogel, D.Y., Vereyken, E.J., Glim, J.E., Heijnen, P.D., Moeton, M., van der Valk, P., Amor, S., Teunissen, C.E., van Horsen, J., Dijkstra, C.D., 2013. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J. Neuroinflammation* 10, 35.
- Wang, G., Zhang, J., Hu, X., Zhang, L., Mao, L., Jiang, X., Liou, A.K., Leak, R.K., Gao, Y., Chen, J., 2013. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*
- Wang, J., Wei, Q., Wang, C.Y., Hill, W.D., Hess, D.C., Dong, Z., 2004. Minocycline up-regulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 19948–19954.
- White, T.E., Ford, G.D., Surles-Zeigler, M.C., Gates, A.S., Laplaca, M.C., Ford, B.D., 2013. Gene expression patterns following unilateral traumatic brain injury reveals a local pro-inflammatory and remote anti-inflammatory response. *BMC Genomics* 14, 282.
- Williams, A.J., Wei, H.H., Dave, J.R., Tortella, F.C., 2007. Acute and delayed neuroinflammatory response following experimental penetrating ballistic brain injury in the rat. *J. Neuroinflammation* 4, 17.
- Xiong, Y., Mahmood, A., Chopp, M., 2013. Animal models of traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 128–142.
- Yang, L., Sugama, S., Chirichigno, J.W., Gregorio, J., Lorenzl, S., Shin, D.H., Browne, S. E., Shimizu, Y., Joh, T.H., Beal, M.F., Albers, D.S., 2003. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 74, 278–285.
- Yang, Y., Salayandia, V.M., Thompson, J.F., Yang, L.Y., Estrada, E.Y., Yang, Y., 2015. Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood-brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *J. Neuroinflammation* 12, 26.
- Yoon, S.Y., Patel, D., Dougherty, P.M., 2012. Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. *Neuroscience* 221, 214–224.
- Zhang, X., Chen, Y., Jenkins, L.W., Kochanek, P.M., Clark, R.S., 2005. Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit. Care* 9, 66–75.
- Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Bahr, B.A., Shibata, M., Uchiyama, Y., Hagberg, H., Blomgren, K., 2005. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ.* 12, 162–176.

VI. COMPORTAMENTO DELLA BARRIERA EMATOENCEFALICA IN UN MODELLO MURINO DI TRAUMATISMO CRANICO PEDIATRICO MODERATO

Essendo questa parte del mio lavoro ancora in corso, saranno esposti i risultati preliminari e non l'articolo già pubblicato.

Introduzione:

Come precedentemente descritto, un TC è caratterizzato da un danno primario, dovuto all'impatto diretto di una forza applicata al tessuto nervoso, e da un danno secondario, che perdura nel tempo, amplifica il danno primario e comprende edema cerebrale, aumento della pressione intracranica, ipoperfusione tissutale ed innesco della cascata infiammatoria¹²².

L'importanza dello studio della BEE dopo un neurotrauma nasce dall'evidenza che la barriera possa svolgere un ruolo chiave nel processo neuroinfiammatorio post-traumatico, ritenuto responsabile del mantenimento del danno cerebrale nel tempo e dello sviluppo di complicanze a lungo termine⁷².

Il ruolo della BEE nel processo post-traumatico non è ancora completamente chiaro, in particolare nel cervello in via di sviluppo, in considerazione dei differenti meccanismi di trasporto, dei peculiari sistemi giunzionali e della diversa espressione enzimatica.

Descrivere le tempistiche e le modalità con cui avvengono le modificazioni della BEE dopo un neurotrauma ha lo scopo non solo di identificare la finestra temporale in cui il SNC è a maggior rischio di danno secondario, ma anche di individuare i meccanismi e il timing con cui i farmaci hanno maggior probabilità di penetrare nell'encefalo⁷².

Materiali e metodi

Le procedure dello studio sono state effettuate conformemente alle Linee Guida Europee che regolamentano la sperimentazione animale (European Union Guidelines for the Care and Use of Animals), previo consenso del Comitato Etico dell'Ospedale Robert Debré di Parigi e

dell'Istituto Nazionale Francese di Sanità e Ricerca Medica (INSERM). Al fornitore Charles River (Arbresle, Francia) sono stati ordinati topi femmina di razza C57Bl6/J e di razza OF1 con cucciolate di circa 6-8 topi per ciascuna. I topi sono stati nutriti ad libitum ed accuditi in una sala con luminosità e temperatura controllate (ciclo notte/giorno: 12 h/12 h; temperatura 21°C +/- 3°C). Le procedure sperimentali del nostro modello sono state effettuate su topi di 7 giorni di età cronologica (P7), età che corrisponde, dal punto di vista dello sviluppo cerebrale, ad un neonato a termine.

E' stato scelto di studiare un topo P7 poiché Bittagu e il suo gruppo hanno osservato che la suscettibilità post-traumatica di un cervello murino nel primo mese di vita, è massima a 7 giorni. Tale fase di sviluppo del SNC, sia nell'uomo che nel topo, è caratterizzata da un'intensa crescita cerebrale e da una marcata attività sinaptogenetica e di mielinizzazione¹⁶⁸ (vedi figura 11 capitolo "Il modello ibotenato come modello di eccitotossicità")

Modello di Trauma Cranico e procedura sperimentale

Ogni cucciolo di topo è stato pesato ed è stata confermata l'omogeneità del campione, con un peso medio per ciascun animale di circa 4-5 g. Inizialmente il topo è stato anestetizzato con isofluorano per via inalatoria, indi, mediante un'incisione cutanea, è stata esposta la scatola cranica in corrispondenza dell'emicranio sinistro.

Il trauma cranico è stato effettuato con un dispositivo cilindrico di circa 20 cm da cui è stato lasciato cadere un peso di 10 g da un'altezza di 10 cm. La caduta del peso, la cui superficie di impatto è di 2 mm, ha provocato un trauma diretto sulla calotta cranica. Tale modello è un adattamento di quello di Kaindl e corrisponde ad un traumatismo cranico moderato¹⁶⁹. La testa è stata posizionata in modo preciso, con lo strumento orientato parallelamente alla lambda formata dalla fusione delle scissure craniche sinistre, 2 mm davanti ed 1 mm lateralmente alla sutura cranica ed a contatto diretto con la testa del topo.

È stato effettuato un traumatismo unilaterale, in corrispondenza dell'emicranio sinistro, eseguito sempre dallo stesso operatore. In questo modo l'entità del trauma cranico è stata considerata la stessa per tutte le procedure. I topi sono stati sacrificati a precisi times points dopo il TC (2 ore , 4 ore , 24 ore, 48 ore, 5 giorni e 45 giorni dopo il trauma). Sono stati sacrificati 10 topi per time point.

Biologia Molecolare

Campione utilizzato. Per quanto riguarda i topi C57Bl6/J, dopo il sacrificio per decapitazione, il cervello è stato prelevato e congelato immediatamente con del ghiaccio secco. I campioni ottenuti sono stati conservati a -80°C fino all'utilizzo per le tecniche di biologia molecolare. La qPCR (Reazione a Catena della Polimerasi di tipo Quantitativo) è stata effettuata su campioni di tessuto cerebrale congelati a -80°C . Sono stati selezionati 2 gr di materiale per emisfero, corrispondenti all'area traumatizzata e all'area corrispondente dell'emisfero cerebrale omolaterale (controllo).

Estrazione proteica. Sul campione cerebrale prelevato, è stata realizzata l'estrazione di RNA (secondo protocollo Quiagen, Rneasy Universal Lipid Tissue Mini Kit Qiagen, Hilden, Germany). La quantità di RNA per ogni campione è stata stimata per mezzo di uno spettrofotometro (Nanodrop 2000, Fisher Techbnnnnnology), in grado di valutare la purezza del campione; in generale, oltre al picco di assorbanza degli acidi nucleici (260nm), viene stimato il picco di assorbanza delle proteine (280nm) e dei fenoli (230nm) e, se il rapporto 260/280 e 260/230 è situato tra 1,8 e 2, il campione è utilizzabile.

Formazione di DNA. L'RNA è stato sottoposto all'azione della Trascrittasi Inversa, che codifica DNA complementare a partire da RNA. Per ogni campione è stato utilizzato un volume totale di 20 μL (4 μL di tampone 5X iScript Reaction Mix Bio-Rad, 1 μL di Reverse Transcriptase Bio-Rad e 15 μL , comprendenti il volume di RNA necessario per ottenere 1 μg

di RNA e H₂O). E' stato applicato il programma Bio-Rad dell'apparecchiatura MyIQ Single Color Real-Time PCR Detection System Bio-Rad iCycler, che comprende 3 Step (Step 1 a 25°C per 5 minuti, Step 2 a 42°C per 30 minuti, Step 3 a 85°C per 5 minuti).

PCR quantitativa. La qPCR simultaneamente amplifica e quantifica il DNA. Il DNA viene amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi e dopo ogni turno di amplificazione, viene quantificato. Il protocollo da noi utilizzato comprende i seguenti Step: denaturazione a 90° (Step 1); ibridizzazione a 60°C ed elongazione a 72°C (Step 2); melt curve tra i 65°C e i 90°C (Step 3). Gli Step 1 e 2 sono stati ripetuti 40 volte e l'apparecchiatura utilizzata è CFX384 Real Time System.

I *primers* scelti nel nostro studio sono: Ocl (Occludina), Cld5 (Clodina 5), JAM1 e JAM2 (Junctional Adherens Molecules 1 e 2), Zo1 (Zonulina 1), Cdh5 (Caderina 5), Abcb1a e Abcb1b (ATP-Binding Cassette b1 a e b), Abcg-2 (Breast Cancer Related Proteins, ABC-G2, Abcbg, P-gpg2), MMP2 e 9 (Metalloproteasi 2 e 9), VEGFa (Vascular Endothelial Growth Factor a).

Primers	Sequenza senso	Sequenza antisenso
Ocl	CTACAAATGGACGTCGCC	TACAAATGGACGTCGCC
Cld5	CTGGTGCTGTGTTGGTAGG	ACGATGTTGTGGTCCAGGAA
JAM1	AACCCGGGCCTTCATGAATT	TCTGGGCCTGGCAGTAGTAT
JAM2	AAGAAGGAAACCCAGCTCG	GAGCTGTTGTTGTGTGTGCC
Zo1	CAACAGGTACAGGCCAGAG	TTGCTCATAACTTCGCGGGT
Cdh5	TTGCCCTGAAGAACGAGGAC	ACTGCCCATACTTGACCGTG

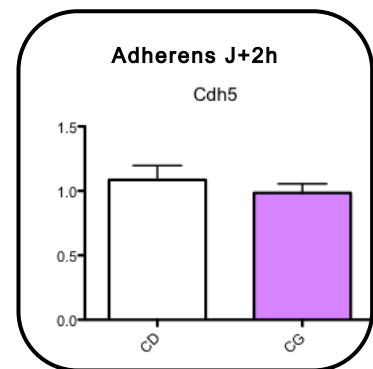
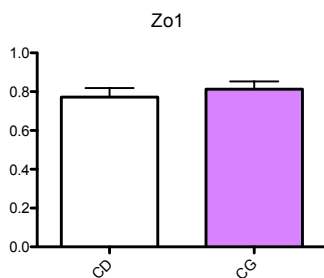
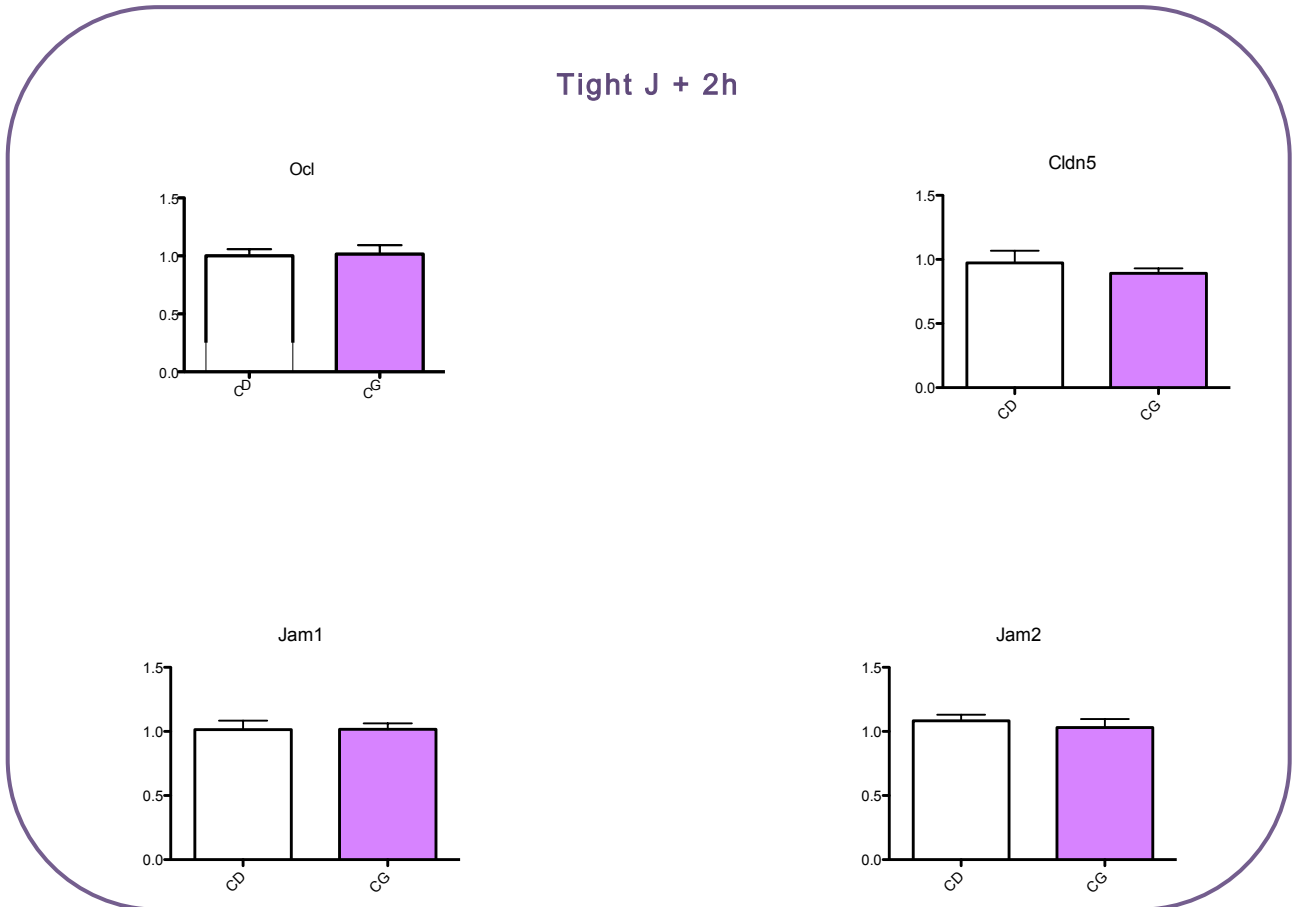
Abcb1a	TGGGGCAGGTCAGTTCATTC	TTTAGGCCTTGCGTGCTGTA
Abcb1b	GGCCGAGAAGATGTCACCAT	TGTCAAATTGGTGGGGCAGT
Abcg-2	TGGAGCTGATCACTGACCCT	TCAGGAGCAAAAGGACAGCA
MMP2	TAGCCTATTCCTCGTGGCAG	GGTGTAGGTGTAGATCGGGG
MMP9	CGTCATTCGCGTGGATAAGG	TTTGAAACTCACACGCCAG
VEGFa	GCTGTAACGATGAAGCCCTG	CCTATGTGCTGGCTTTGGTG

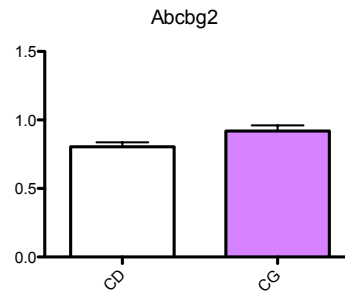
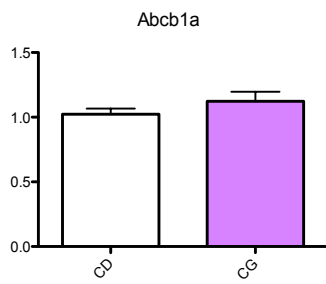
Tali primers sono stati selezionati sulla base dei dati in letteratura e di un precedente lavoro effettuato allo scopo di identificare i markers più rilevanti che si associano a un'aumentata permeabilità della barriera ematoencefalica (vedi annesso 1)

Analisi statistica per biologia molecolare. L'analisi statistica dei dati di Biologia Molecolare è stata effettuata attraverso il software Graph Pad PRISM 5.0 (GraphPad Softwares, San Diego). Dopo aver verificato le distribuzioni del campione (test D'Agostino and Pearson) e che le varianze fossero equivalenti (test F), ai dati con distribuzione normale è stato applicato Unpaired T test. Alle distribuzioni non normali, è stato applicato il test non parametrico di Mann-Whitney. Le significatività sono state rappresentate come *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Risultati:

1-Alterazioni di barriera dopo **2 ore** (2 heures, h) dal TC, confronto tra corteccia omolaterale (Cortex Gauche, CG) e controlaterale al trauma (Cortex Droite, CD). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

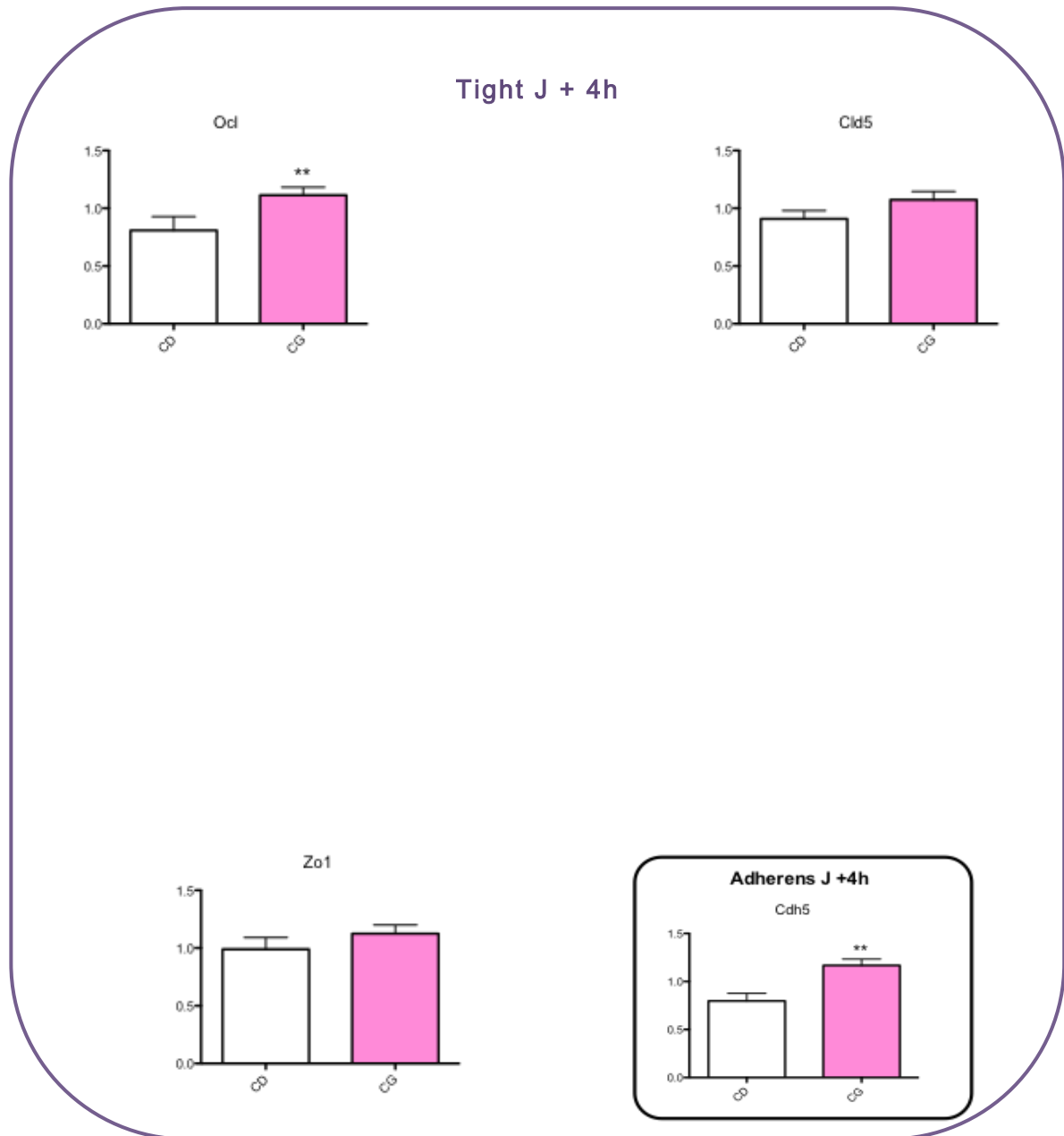


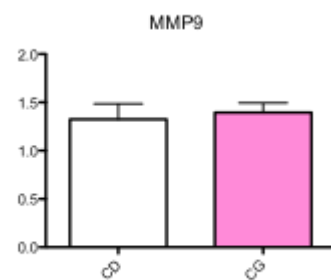
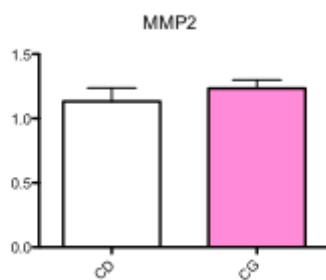
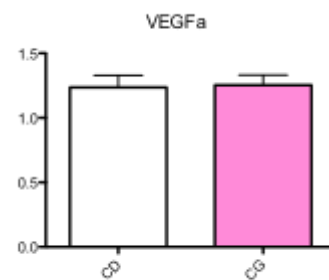
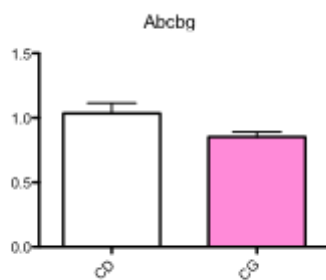
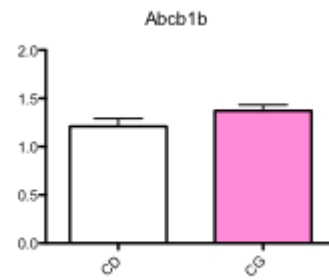
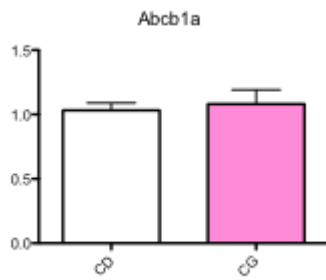


Non si riscontrano differenze significative tra emisfero traumatizzato e controlaterale nell'espressione di markers di barriera (Ocl, Cldn5, JAM1, JAM2, Zo1, Cdh5, Abcb1a, Abcbg2).

A **2 ore** dal TC la BEE è a riposo e non sono ancora messi in atto meccanismi per contrastarne l'apertura.

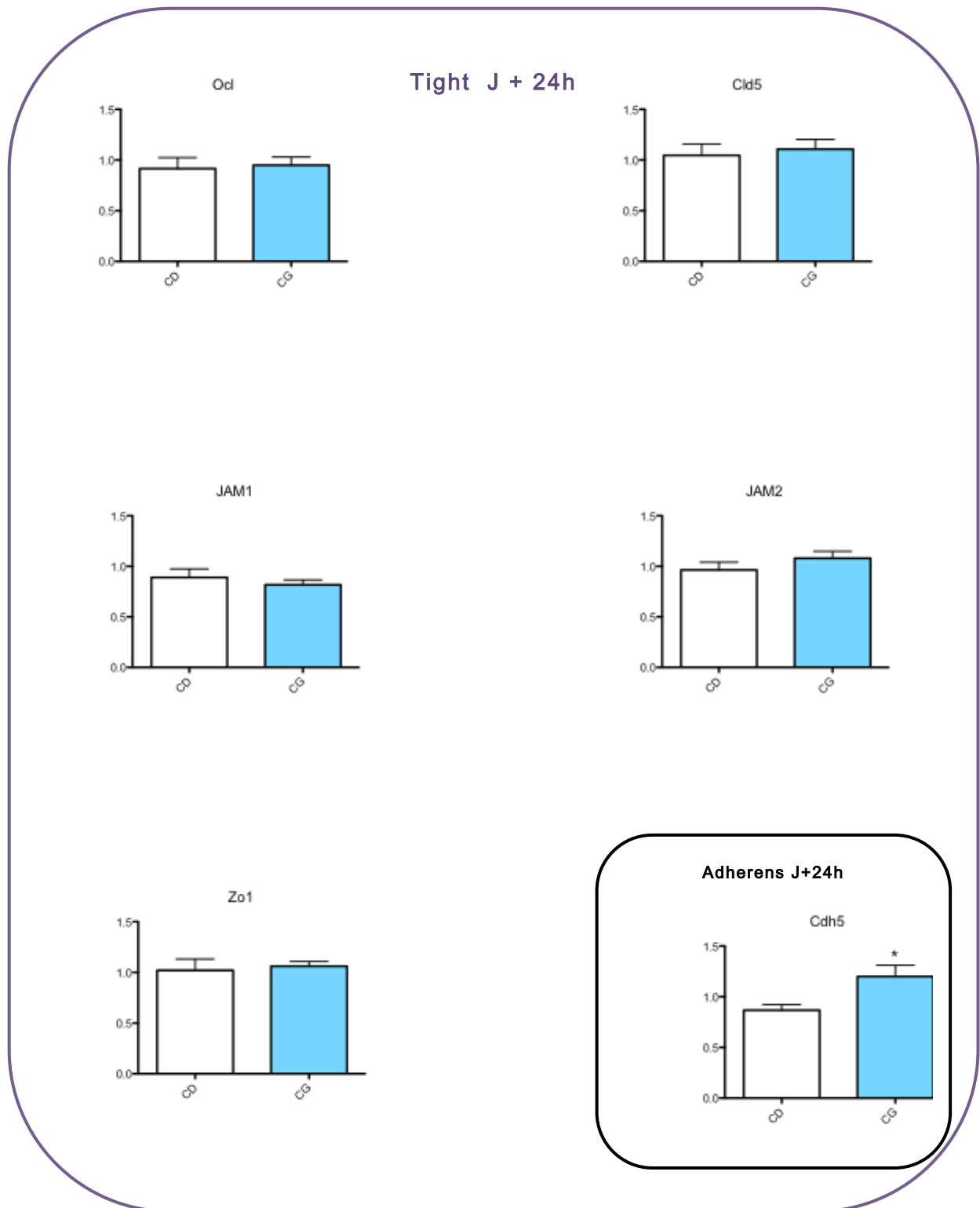
2- Alterazioni di barriera dopo **4 ore** (4 heures) dal TC, confronto tra corteccia omolaterale (Cortex Droite, CD) e controlaterale al trauma (Cortex Gauche, CG). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

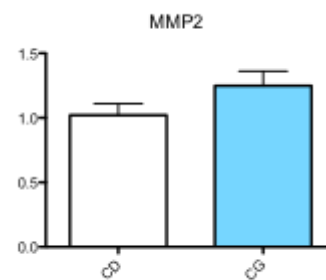
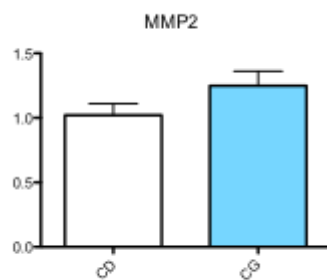
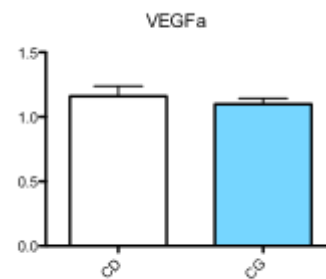
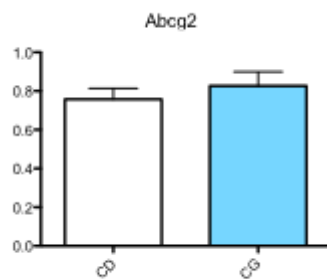
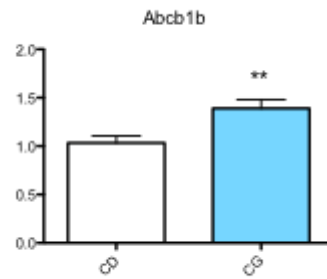
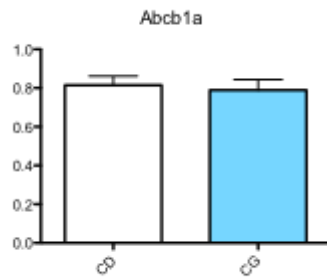




Si assiste ad un incremento significativo dell'espressione di Ocl (TJ, $p < 0,01$) e Cdh5 (AJ, $p < 0,01$) nel tessuto cerebrale dell'emisfero traumatizzato. Non si osservano differenze tra i due emisferi nell'espressione di Cld5, JAM1, JAM2, Zo1, Abcb1a, Abcb1b, Abcbg, VEGFa, MMP2 e MMP9.

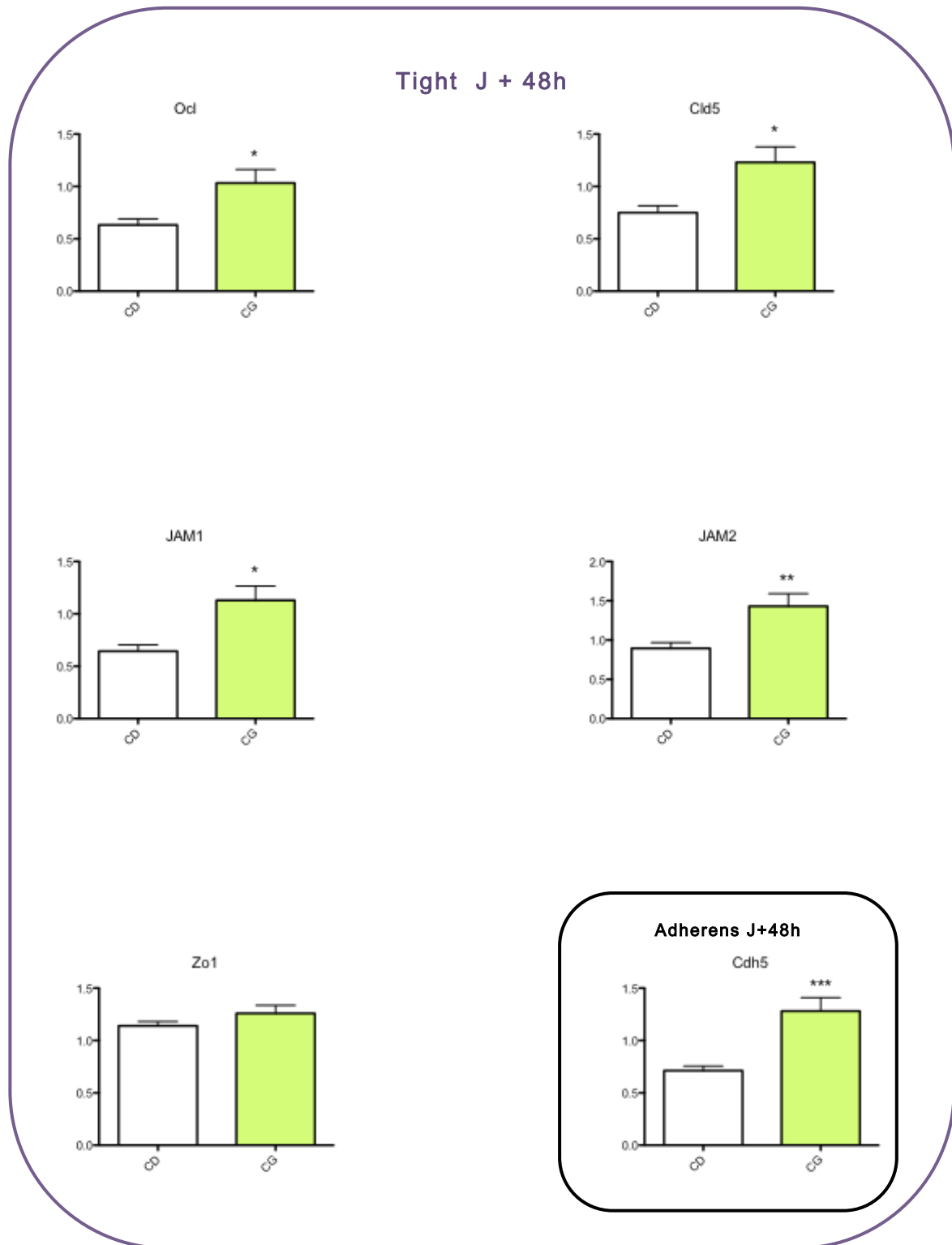
3-Alterazioni di barriera dopo **24 ore** (24 heures, h) dal TC, confronto tra corteccia omolaterale (Cortex Gauche, CG) e controlaterale al trauma (Cortex Droite, CD). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

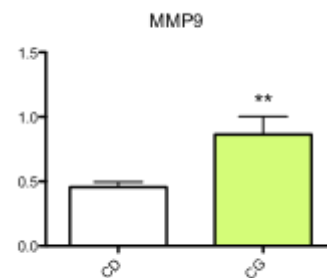
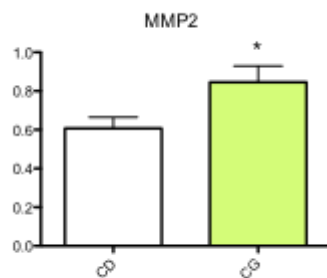
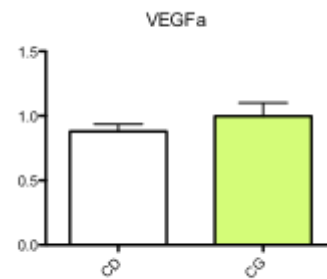
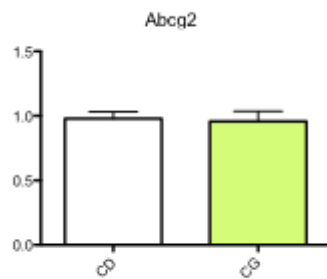
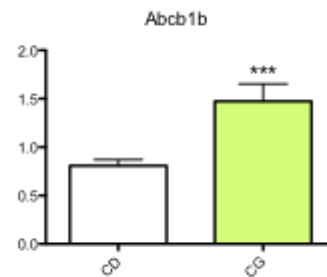
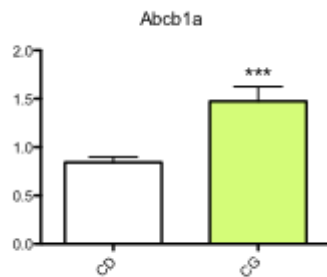




Nell'emisfero corrispondente al trauma si evidenzia un aumento significativo dell'espressione della Cdh5 ($p < 0,05$), principale costituente delle AJ e di Abcb1b ($p < 0,01$), trasportatore della famiglia delle ATP-Binding Cassette. Non si osservano differenze nell'espressione di Ocl, Cld5, JAM1, JAM2, Zo1, Abcb1a, Abcg2, VEGFa, MMP2 e MMP9.

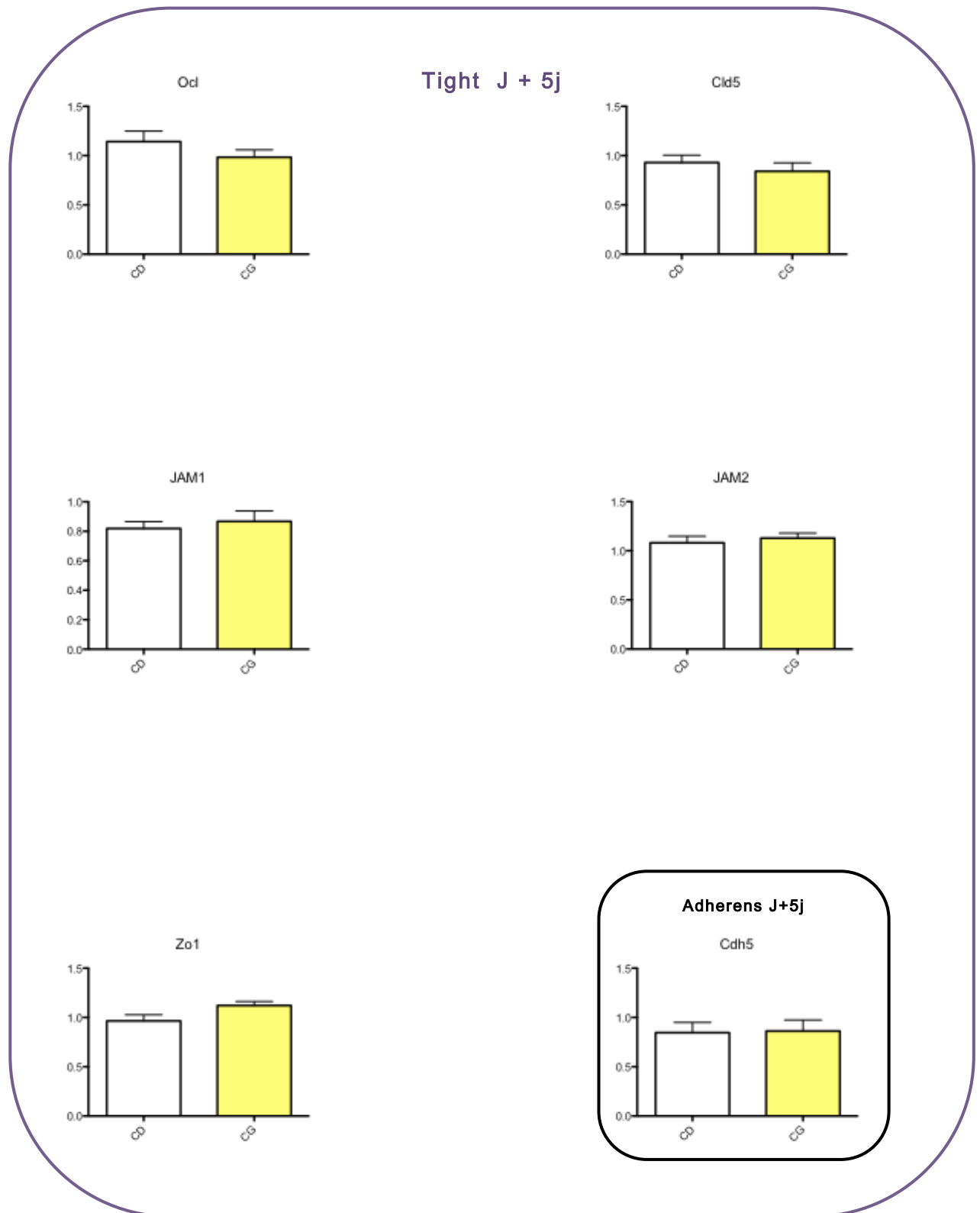
4-Alterazioni di barriera dopo **48 ore** (48 heures, h) dal TC, confronto tra corteccia omolaterale (Cortex Droite, CD) e controlaterale al trauma (Cortex Gauche, CG). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

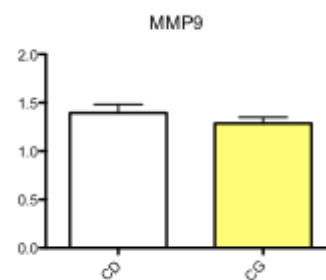
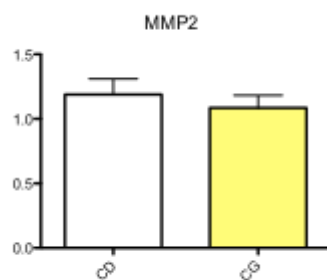
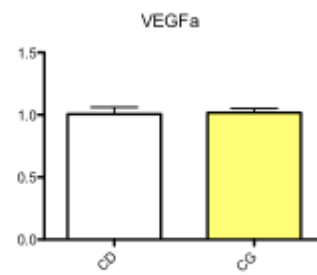
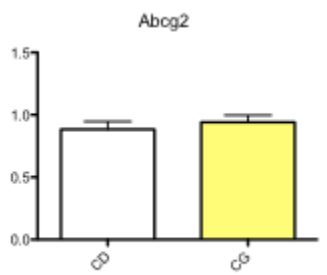
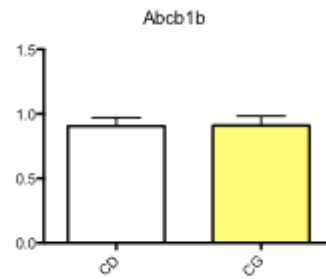
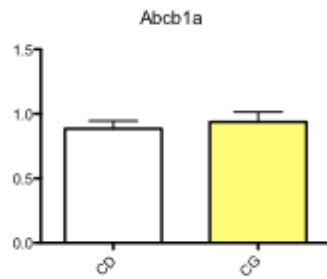




Nell'emisfero cerebrale traumatizzato si osserva un consistente aumento delle componenti di TJ e AJ, dei trasportatori di membrana e delle metalloproteasi. In particolare si documenta incremento di Ocl ($p < 0,05$), Cld5 ($p < 0,05$), JAM1 ($p < 0,05$), JAM2 ($p < 0,01$), Cdh5 ($p < 0,001$), Abcb1a ($p < 0,001$), Abcb1b ($p < 0,001$), MMP2 ($p < 0,05$) e MMP9 ($p < 0,01$) nella parte di cervello lesionata. Non ci sono differenze significative nella produzione di Zo1, Abcg2 e VEGFa.

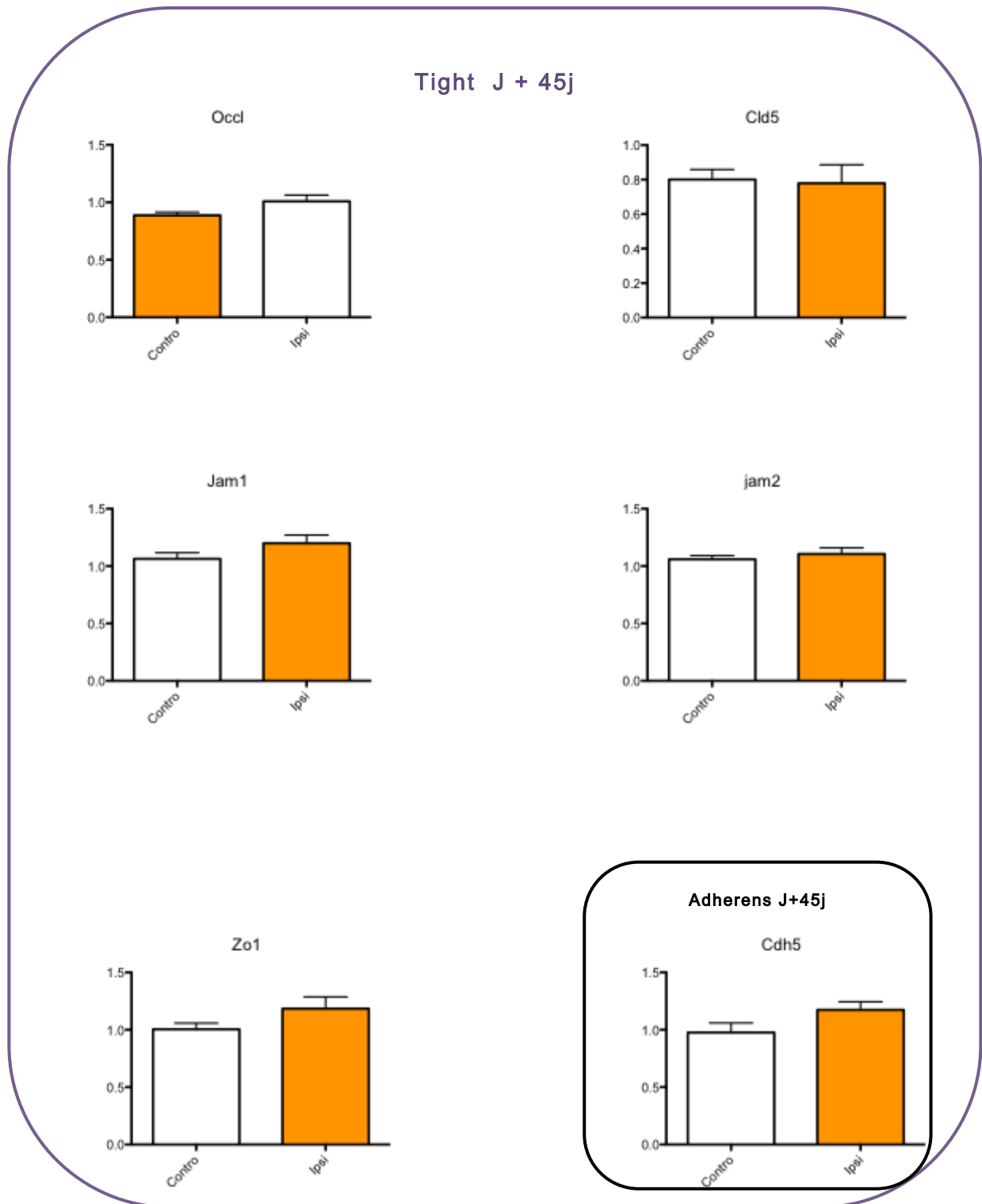
5-Alterazioni di barriera dopo **5 giorni** (5 jours, j) dal TC, confronto tra corteccia omolaterale (Cortex Gauche, CG) e controlaterale al trauma (Cortex Droite, CD). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

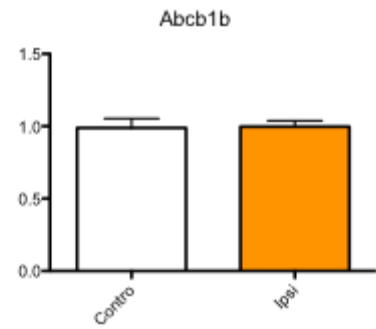
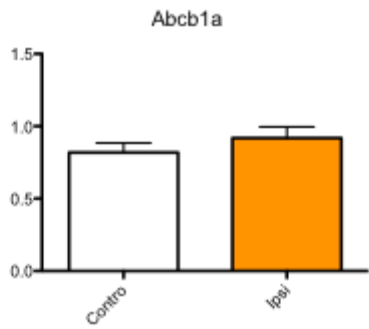




Non si documentano differenze significative tra emisfero lesionato ed emisfero controlaterale nell'espressione genica di molecole di barriera (Ocl, Cld5, JAM1, JAM2, Zo1, Cdh5, Abcb1a, Abcb1b, Abcg2, VEGFa, MMP2, MMP9).

6- Alterazioni di barriera dopo **45 giorni** (45 jours, j) dal TC, confronto tra corteccia omolare (Cortex Gauche, CG) e controlaterale al trauma (Cortex Droite, CD). *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$





Non si evidenziano differenze significative, tra emisfero traumatizzato e controllo controlaterale nell'espressione di molecole di barriera (Ocl, Cld5, JAM1, JAM2, Zo1, Cdh5, Abcb1a, Abcb1b).

Tabella 3: tabella riassuntiva dei risultati ottenuti nei vari timing studiati. Azzurro chiaro, non significatività statistica. Azzurro : p<0,05. Azzurro scuro: p<0,01. Blu : p<0,001.

	2 ore	4 ore	24 ore	48 ore	5 giorni	45 giorni
Ocl						
Cldn5						
JAM1						
JAM2						
Zo1						
Cdh5						
Abcb1a						
Abcb1b	/					
Abcg-2						/
MMP2	/					/
MMP9	/					/
VEGF2	/					/

Conclusione:

A **4 ore** inizia un precoce coinvolgimento dei meccanismi giunzionali con un incremento di Oc1 e di Cdh5, molecole appartenenti rispettivamente a TJ ed AJ. L'Oc1 sembra avere un ruolo nel contrastare alterazioni acute delle dinamiche vascolari, agendo come proteina regolatrice in grado di tamponare uno shock ⁸¹. La Cdh5 partecipa alla stabilizzazione fisica della barriera contrapponendosi alla sua apertura e svolge una funzione di contenimento fisico e di stabilizzazione delle TJ ^{85,86}.

A **24 ore** viene confermata un'aumentata espressione di Cdh5, già incrementata precocemente a 4 ore dal TC. Si assiste, inoltre, ad una considerevole espressione di Abcb1a, trasportatore di membrana sul versante luminale dei vasi sanguigni che ha la funzione di intercettare substrati liposolubili in eccesso e di evitarne il passaggio spontaneo attraverso una barriera potenzialmente lesionata e più permeabile ⁹³. Topi knock-out per il gene che codifica per la glicoproteina-p (P-gp, detta anche ABCB1a e 1b) mostrano una maggior tendenza ad accumulare proteina $\alpha\beta$ amiloide, suggerendo come tale trasportatore svolga un ruolo nella clearance delle sostanze tossiche cerebrali ¹²³.

Dopo **48 ore** dall'evento, nell'emisfero cerebrale sottoposto al trauma, si osserva una vasta espressione di molecole di barriera, tra cui proteine giunzionali, trasportatori ed enzimi. Un aumento dell'espressione genica di queste proteine riflette la necessità di ripristinare, ricostruire e rigenerare in seguito ad una perdita.

Per quanto riguarda le proteine giunzionali si osserva un aumento della maggior parte delle componenti delle TJ e delle AJ. Cld5 è considerata la principale stabilizzatrice di membrana e sembra essere la proteina più direttamente responsabile del mantenimento dell'integrità della barriera. Topi knock-out per tale gene mostrano un perdita dell'integrità di BEE per molecole fino a 800 Da ^{77,83}. In letteratura la Cld5 sembra essere

diminuita quando la BEE è aperta e l'aumento della sua espressione è parallelo alla messa in atto di meccanismi di riparazione ¹²³. Dopo un danno cerebrale si osserva una ridotta espressione di Cld5, in particolare dopo 2 ore, nel modello murino adulto di cold brain injury ¹⁷⁰. Nel nostro studio, la Cld5 aumenta in modo significativo a 48 ore. È noto che tale proteina viene influenzata, nella sua espressione, dalla Cdh5, componente delle AJ, che a 48 ore è massimamente espressa e che risulta già aumentata a 4 ore dal trauma ^{77,83}. Anche in letteratura viene descritto che, parallelamente al ripristino della struttura fisica di barriera, si assiste ad una iperespressione di Cld5 per 1-2 settimane dopo un trauma cranico severo epidurale ¹⁷¹.

Nel nostro studio si documenta, inoltre, l'incremento delle proteine JAM1 e JAM2, coinvolte nella stabilizzazione della membrana e che sembrerebbero contribuire alla riduzione della permeabilità paracellulare ⁸².

Parallelamente ai tentativi di ripristino della barriera, aumenta l'espressione di Abcb1a e Abcb1b, importanti trasportatori che, eliminando i prodotti di scarto e pompando all'esterno molecole tossiche, mantengono l'ambiente intracerebrale costante.

L'incrementata espressione, infine, di MMP2 e MMP9, metalloproteasi che interagiscono con collagene, fibronectina e laminina, riflette la perdita dell'integrità di barriera ed il rimodellamento della NeuroVascular Unit (Ek, Wong et). Livelli incrementati di MMP potrebbero essere di origine microgliale; tali proteine alterano la membrana basale e degradano le TJ, partecipando al danno di barriera ¹⁷².

A **5** e a **45 giorni** dal TC, la BEE sembra aver ripristinato l'integrità e non presenta alterazioni strutturali, enzimatiche o di trasporto.

Riassumendo, l'apertura di BEE si manifesta con un'alterazione precoce a carico di TJ e di AJ, dalle prime ore dopo il trauma fino ad un picco massimo a 48 ore. La permeabilità

di BEE si riflette nell'aumentata attività di alcuni trasportatori, che a 24 ore, ed in modo massimale a 48 ore, hanno il compito di eliminare alcune molecole che, in condizioni fisiologiche, non sarebbero entrate nello spazio cerebrale. A 48 ore si verifica, infine, l'espressione di metalloproteasi, in concomitanza alla perdita di integrità strutturale. Dopo 5 giorni dal TC la BEE sembra essere di nuovo integra.

IX. CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Il SNC è stato per anni considerato un organo “santuario”, protetto dalla BBB contro l’ingresso delle cellule infiammatorie ed immunitarie. Negli ultimi decenni tale credenza è stata completamente rivisitata, da quando si è dimostrata la presenza di cellule dell’immunità innata nel parenchima cerebrale, le quali non solo agiscono rapidamente davanti ad un insulto cerebrale, ma sono anche responsabili del richiamo delle cellule infiammatorie ed immunitarie sistemiche mediante una complessa interazione mediata da citochine e chemochine. Da allora moltissimi studi sono fioriti in tale settore, i quali hanno apportato ed apportano sempre nuove conoscenze, ma allo stesso tempo apportano anche sempre nuovi quesiti. In questo lavoro ho cercato di rispondere a qualcuno di questi quesiti, anche se è evidente che la strada da percorrere per arrivare a delle certezze è ancora molto lunga.

Il primo risultato importante del mio lavoro è stato quello di dimostrare che, nel traumatismo cranico del cervello in via di sviluppo, l’apporto delle cellule mastocitarie è minore. La loro inibizione tramite il cromoglicato, iniettato prima o subito dopo il traumatismo cranico, non induce neuroprotezione, né in termini di riduzione della dilatazione ventricolare indotta dal traumatismo, né in termini di morte cellulare, né di riduzione della gliosi. Lo stesso effetto è stato ottenuto mediante l’utilizzo di topi knock out per il recettore c-kit, indispensabile per una corretta maturazione mastocitaria.

Tali dati discordano con uno studio precedente effettuato in un modello di TBI adulto, nel quale si evidenziava l’ingresso cerebrale da parte dei mastociti in seguito al trauma, la loro rapida degranolazione, con conseguente morte neuronale, gliosi reattiva e difetto di mielinizzazione, mediati dall’eccitotossicità¹⁷³. Anche nei topi knock out per c-kit, un TBI effettuato in età adulta sembra causare danni più importanti, ed una reazione gliale maggiore rispetto a topi con funzionalità mastocitaria integra¹⁷⁴.

Per quanto riguarda il cervello in via di sviluppo, l'influsso dei mastociti sul traumatismo cranico non era ancora stato studiato. Precedenti studi su modelli di ischemia cerebrale neonatale effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato una precoce infiltrazione da parte dei mastociti ed un accumulo d'istamina nelle cellule neuronali prima che queste ultime vadano incontro a degenerazione¹⁷⁵, ad indicare un possibile contributo dei mastociti al danno ischemico. Il cromoglicato, inoltre, utilizzato in un modello di ipossischemia neonatale, riduce significativamente la taglia della lesione ischemica¹⁷⁶.

Ci sono molte possibili ragioni che possono spiegare tali differenze. Il cervello in via di sviluppo presenta, infatti, una percentuale di mastociti significativamente maggiore rispetto ad un cervello adulto. Anche il contenuto dei granuli di secrezione nei mastociti circolanti¹⁷⁷ ed il fenotipo di tali cellule è diverso in fase neonatale rispetto al topo adulto¹⁷⁸. Tali differenze nel fenotipo e la differente composizione dei granuli di secrezione non sono state sufficientemente studiate, ma una diversa composizione in chimesi e citochine potrebbe avere effetti diversi a seconda dell'età e dello stimolo dannoso.

Nella seconda parte del mio lavoro, mi sono dunque concentrata su un'altra popolazione cellulare: le cellule gliali. L'infiammazione è sempre più riconosciuta quale mediatore dell'outcome post insulto nel cervello in via di sviluppo. Essa infatti induce la morte neuronale sia direttamente sia aumentando l'eccitotossicità e lo stress ossidativo attraverso la secrezione di citochine, radicali liberi, ed altri prodotti tossici o l'induzione del rilascio di molecole eccitotossiche, come il glutammato¹⁷⁹. L'eccitotossicità è particolarmente deleteria in questa finestra temporale in cui i progenitori degli oligodendrociti (OLPs) presentano un'elevata suscettibilità allo stress ossidativo, ai radicali liberi ed all'infiammazione, e gli enzimi antiossidanti endogeni non hanno ancora

raggiunto concentrazioni ed attività enzimatica cerebrali adeguate. La risposta immunitaria agisce non solo nella fase acuta del danno, ma anche molto tempo dopo, influenzando la risposta funzionale e, nel caso del cervello in via di sviluppo, anche condizionandone la normale maturazione.

L'attivazione astrocitaria post-lesionale in letteratura è associata sia a un effetto benefico che ad un effetto dannoso⁶⁹.

Per quanto riguarda la popolazione microgliale, i dati in letteratura riguardanti il suo contributo dell'attivazione microgliale all'evoluzione del danno sono innumerevoli, ed il problema principale non è l'assenza di dati, ma piuttosto la discordanza tra i risultati (vedi introduzione). Sempre più studi su modelli di roditori adulti sembrano recentemente smorzare le certezze di qualche anno fa, e la distinzione netta tra fenotipo classico "M1" ed alternativo "M2" sta progressivamente sparendo per fare spazio a fenotipi di transizione¹⁸⁰.

Poche sono le informazioni riguardanti l'attivazione della microglia nel periodo neonatale. Per questo motivo in questi anni ho cercato di studiare il comportamento di tali cellule in differenti modelli di danno cerebrale neonatale.

Nei miei lavori, in cui ho utilizzato rispettivamente topi a P7 per il TBI e P9 per l'ischemia cerebrale, la microglia gioca un ruolo fondamentale, essendo attivata in seguito al danno in entrambi i modelli.

Nel modello d'ischemia cerebrale, il Sildenafil risulta neuroprotettore non tanto in acuto, grazie alle sue proprietà vasodilatatrici (poiché la razza di topo scelta non ha una buona vascolarizzazione collaterale da reclutare), bensì più a lungo termine. Tali benefici sembrano associarsi ad una modulazione fine dell'attivazione microgliale: anche se il numero globale di cellule microgliali non cambiava, nei topi che avevano ricevuto il

sildenafil vi era una diversa espressione dei fenotipi di attivazione microgliale , in particolare a 8 giorni, nel periodo di maggiore efficacia in termini di neuroprotezione, gli animali trattati con sildenafil presentavano un aumento dell'espressione genica dei principali marcatori M2, mentre più precocemente la stessa molecola induceva piuttosto una loro riduzione.

Nel modello di trauma cranico pediatrico, i nostri risultati dimostrano che il danno corticale induce una risposta citochinica moderata di entrambi i patterns citochinici pro ed anti-infiammatori, e che la microglia esprime dei markers fenotipici che corrispondono ad un fenotipo piuttosto immunomodulatore o di riparazione/rigenerazione (M2). Tale risposta è tuttavia molto più modesta rispetto a quella a cui va incontro un cervello adulto sottoposto allo stesso danno, come hanno evidenziato alcuni interessanti lavori su ratti sottoposti a impatto corticale diretto¹⁸¹⁻¹⁸³ o a danno da percussione da fluido¹⁸⁴. Saranno necessari ulteriori studi per chiarire se tale risposta più modesta sia in qualche modo correlata al fenotipo microgliale M2 che abbiamo riscontrato nel nostro modello pediatrico. Secondo Kumar et al. la microglia esprime, nell'adulto, un fenotipo pro-infiammatorio M1 che aumenta nel tempo fino ad un picco a 5 giorni, mentre il fenotipo antiinfiammatorio è solo temporaneamente espresso ma estremamente specifico. Tale autore introduce il concetto di fenotipo mTran, per descrivere il comportamento intermedio della microglia nel suo modello¹⁸⁰.

Questi risultati rivelano che il ruolo dualistico storicamente attribuito alla microglia deve essere rivisitato, e che anche per la fascia neonatale si deve parlare piuttosto di un fenotipo di transizione, e suggeriscono che le moderne strategie terapeutiche dovrebbero mirare a favorire il fenotipo M2 di rigenerazione/riparazione o immunomodulazione, probabilmente già naturalmente più importante nelle prime fasi del danno nel neonato

rispetto all'adulto, e a prevenire la comparsa del fenotipo M1/pro-infiammatorio, piuttosto che puntare a una cieca immunosoppressione.

Le questioni che rimangono ancora aperte sono le seguenti:

Questi marcatori microgliali di superficie sono espressi dalla stessa cellula, e ne definiscono quindi il fenotipo di attivazione, o sono essi espressi da cellule limitrofe, ed è quindi il numero delle cellule di un fenotipo che le rende il sottogruppo più determinante nella risposta al danno?

In maniera interessante, nel nostro lavoro abbiamo selezionato un marker di tipo M1 e un marker di tipo M2 e li abbiamo marcati con degli anticorpi fluorescenti, con una tecnica di co-marcaggio. Tale test d'immunoistochimica ha evidenziato come CD206 si trovi esclusivamente a livello perivascolare, sulla membrana cellulare di una cellula che sicuramente rappresenta una cellula microgliale, tale cellula esprime allo stesso tempo Cox 2.

E ancora, qual è l'apporto della microglia residente e quale quello dei macrofagi circolanti? La problematica principale in immunologia è la difficoltà nel distinguere tali popolazioni cellulari, in quanto i macrofagi circolanti, una volta raggiunto il parenchima cerebrale, assumono una conformazione del tutto identica a quella della microglia residente.

Per cercare di rispondere a quest'ultimo quesito, nell'ultimo periodo della mia tesi, ho cercato di studiare le modificazioni della BBB.

I miei risultati, ancora preliminari, evidenziano che a livello della BBB si assiste a un'alterazione precoce a carico di TJ e di AJ, dalle prime ore dopo il trauma fino ad un picco massimo a 48 ore. La permeabilità di BEE si riflette nell'aumentata attività di alcuni trasportatori, che a 24 ore, ed in modo massimale a 48 ore, hanno il compito di eliminare alcune molecole che, in condizioni fisiologiche, non sarebbero entrate nello spazio cerebrale. A 48 ore si verifica, infine, l'espressione di metalloproteasi, in concomitanza alla perdita di integrità strutturale. Dopo 5 giorni dal TC la BEE sembra essere di nuovo integra.

Integrando i risultati ottenuti dallo studio della BEE e della microglia concludiamo che, mentre a livello della BBB i principali cambiamenti si verificano a 48 ore dal TC, l'attivazione microgliale sembra più precoce, con un picco d'attivazione tra 14h e 1 giorno dal trauma. Come sottolineato, tuttavia, l'attivazione microgliale è modesta rispetto a quella dell'adulto. A 5 giorni dal trauma, la BEE sembra aver ripristinato la propria permeabilità. Tuttavia le primissime modificazioni dell'espressione genica delle TJ si verificano già dalle prime 4 h dal TC, e solo l'immunoistochimica e le prove di funzionalità di barriera (vedi prospettive future) ci potranno aiutare a definire con certezza se queste modificazioni siano sufficienti ad alterare la permeabilità di membrana.

Esiste una stretta relazione tra apertura di barriera, infiltrazione di cellule dal circolo e stimolazione microgliale. Recenti evidenze hanno ipotizzato come l'attivazione microgliale moduli l'espressione delle costituenti delle TJ (in particolare Zo-1, Cld5 ed Occl) e che quindi possa influire sull'integrità di barriera. D'altra parte, l'endotelio della BEE, secernendo molecole infiammatorie, può a sua volta, influenzare l'attivazione

microgliale ¹²³. Per la prima volta, nel nostro studio, viene indagato questo aspetto della neuroinfiammazione in un modello di TC in età pediatrica.

Comprendere con precisione se l'apertura della BBB avviene fin dalle prime modificazioni dell'espressione genica della TJ (quindi a 4h) o se solo in corrispondenza delle alterazioni massive di tutte le sue componenti sarà una tappa molto importante per cercare di definire il timing d'ingresso dei macrofagi circolanti, e quindi il loro contributo al danno infiammatorio.

Prospettive future :

Al fine di descrivere in modo più preciso l'espressione di markers microgliali e di BEE, l'obiettivo futuro è quello di correlare, in modo più esteso, i risultati ottenuti mediante biologia molecolare con informazioni acquisite per mezzo dell'immunoistochimica. Le tecniche di immunoistochimica, infatti, sebbene meno obiettive, più lunghe da realizzare e talvolta difficilmente quantificabili, forniscono informazioni temporalmente vere, che riflettono la presenza in tempo reale di determinate molecole a livello tissutale, e consentono di caratterizzare, morfologicamente, le proteine di interesse. Il paradigma sperimentale in programma è rappresentato nella figura 12.

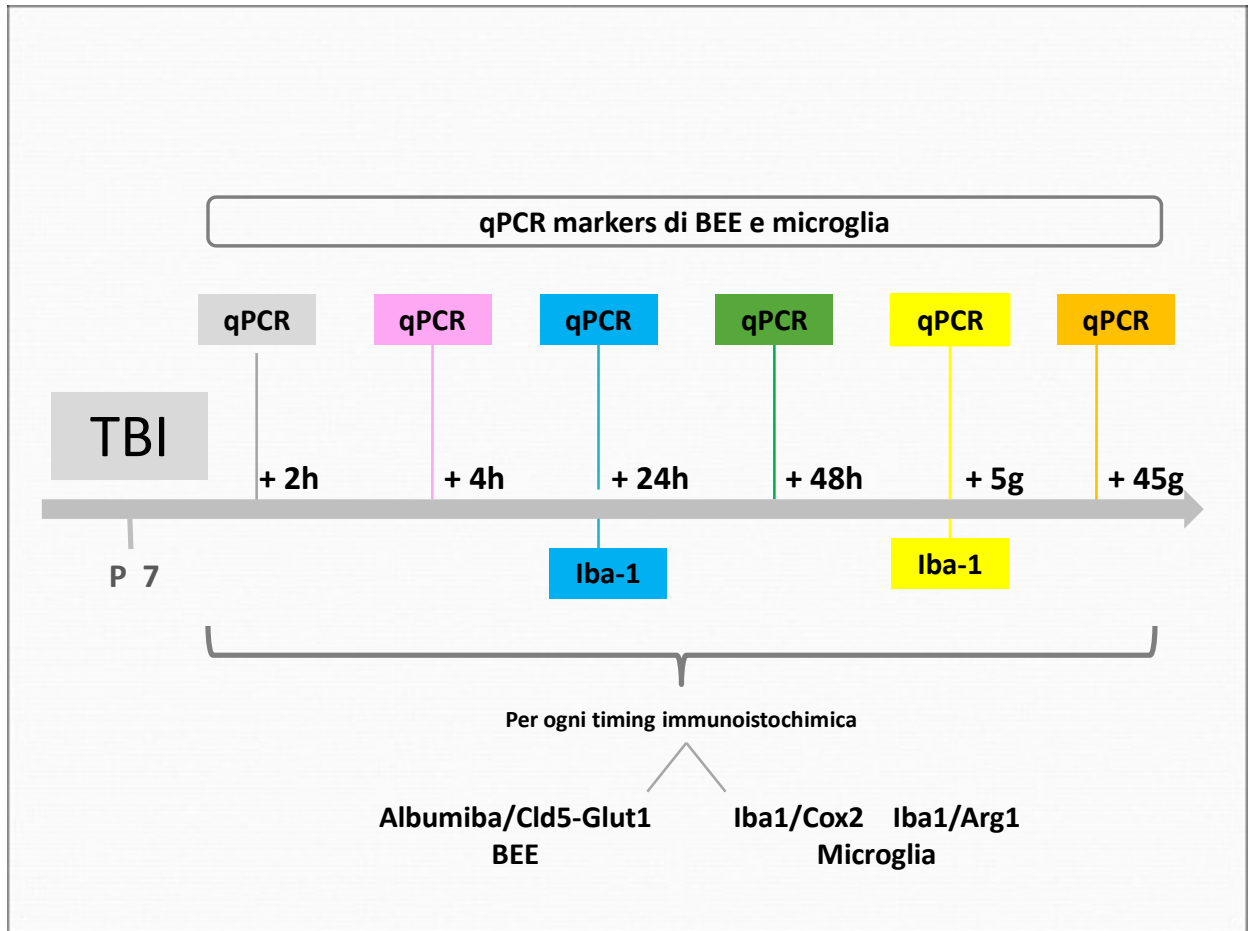


Figura 12 Paradigma sperimentale in programma : Albumina/Cld5-Glut1 : co-marcaggio dei vetrini istologici con Clodina 5 (una delle principali TJ) e Glut1 (trasportatore del glucosio presente nell'endotelio dei capillari). Per le stesse sezioni marcaggio con albumina, presente nel circolo sanguigno e assente in condizioni fisiologiche nel parenchima cerebrale. Iba1/Cox2 : co-marcaggio delle cellule microgliali attivate (marcaggio Iba-1) e un marker di attivazione microgliale M1 proinfiammatorio (Cicloossigenasi 2, Cox2). Iba1/Arg1 : co-marcaggio delle cellule microgliali attivate (marcaggio Iba1) con un marker di attivazione microgliale M2 (Arginasi 1, Arg1).

X. BIBLIOGRAFIA

1. Raju TN, Nelson KB, Ferriero D, Lynch JK. Ischemic perinatal stroke: summary of a workshop sponsored by the National Institute of Child Health and Human Development and the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. *Pediatrics*. Sep 2007;120(3):609-616.
2. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet. Neurology*. Aug 2008;7(8):728-741.
3. Quayle KS, Powell EC, Mahajan P, et al. Epidemiology of blunt head trauma in children in U.S. emergency departments. *N Engl J Med*. Nov 13 2013;371(20):1945-1947.
4. Langlois JA, Rutland-Brown W, Thomas KE. The incidence of traumatic brain injury among children in the United States: differences by race. *The Journal of head trauma rehabilitation*. May-Jun 2005;20(3):229-238.
5. Anderson V, Catroppa C, Morse S, Haritou F, Rosenfeld J. Functional plasticity or vulnerability after early brain injury? *Pediatrics*. Dec 2005;116(6):1374-1382.
6. Koepsell TD, Rivara FP, Vavilala MS, et al. Incidence and descriptive epidemiologic features of traumatic brain injury in King County, Washington. *Pediatrics*. Nov 2011;128(5):946-954.
7. Levin HS, Aldrich EF, Saydjari C, et al. Severe head injury in children: experience of the Traumatic Coma Data Bank. *Neurosurgery*. Sep 1992;31(3):435-443; discussion 443-434.
8. Mittenberg W, Wittner MS, Miller LJ. Postconcussion syndrome occurs in children. *Neuropsychology*. Jul 1997;11(3):447-452.
9. Rivara FP, Koepsell TD, Wang J, et al. Incidence of disability among children 12 months after traumatic brain injury. *American journal of public health*. Nov 2012;102(11):2074-2079.
10. Keenan HT, Bratton SL. Epidemiology and outcomes of pediatric traumatic brain injury. *Developmental neuroscience*. 2006;28(4-5):256-263.
11. Keenan HT, Runyan DK, Marshall SW, Nocera MA, Merten DF, Sinal SH. A population-based study of inflicted traumatic brain injury in young children. *Jama*. Aug 6 2003;290(5):621-626.
12. Holling EE, Leviton A. Characteristics of cranial ultrasound white-matter echolucencies that predict disability: a review. *Developmental medicine and child neurology*. Feb 1999;41(2):136-139.
13. Platt MJ, Cans C, Johnson A, et al. Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 European centres: a database study. *Lancet*. Jan 6 2007;369(9555):43-50.
14. Woodward LJ, Edgin JO, Thompson D, Inder TE. Object working memory deficits predicted by early brain injury and development in the preterm infant. *Brain : a journal of neurology*. Nov 2005;128(Pt 11):2578-2587.
15. Larroque B, Ancel PY, Marret S, et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *Lancet*. Mar 8 2008;371(9615):813-820.
16. Allin M, Walshe M, Fern A, et al. Cognitive maturation in preterm and term born adolescents. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. Apr 2008;79(4):381-386.
17. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, et al. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *The New England journal of medicine*. Oct 1 2009;361(14):1349-1358.
18. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet*. Feb 19-25 2005;365(9460):663-670.
19. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The New England journal of medicine*. Oct 13 2005;353(15):1574-1584.

20. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet neurology*. Jan 2009;8(1):110-124.
21. Volpe JJ. Encephalopathy of prematurity includes neuronal abnormalities. *Pediatrics*. Jul 2005;116(1):221-225.
22. Srinivasan L, Dutta R, Counsell SJ, et al. Quantification of deep gray matter in preterm infants at term-equivalent age using manual volumetry of 3-tesla magnetic resonance images. *Pediatrics*. Apr 2007;119(4):759-765.
23. Pierson CR, Folkerth RD, Billiards SS, et al. Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant. *Acta neuropathologica*. Dec 2007;114(6):619-631.
24. Iwata S, Bainbridge A, Nakamura T, et al. Subtle white matter injury is common in term-born infants with a wide range of risks. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. Nov 2010;28(7):573-580.
25. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews*. Apr 2011;91(2):461-553.
26. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990;39(1):151-170.
27. Turrin NP, Rivest S. Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. *Molecular neurobiology*. Dec 2006;34(3):221-242.
28. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, et al. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. Apr 6 2012;336(6077):86-90.
29. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience*. 2011;33(3-4):199-209.
30. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, et al. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience*. Mar 2013;16(3):273-280.
31. Monier A, Adle-Biassette H, Delezoide AL, Evrard P, Gressens P, Verney C. Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. May 2007;66(5):372-382.
32. Monier A, Evrard P, Gressens P, Verney C. Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *The Journal of comparative neurology*. Dec 1 2006;499(4):565-582.
33. Opydo-Chanek M, Dabrowski Z. Response of astrocytes and microglia/macrophages to brain injury after bone marrow stromal cell transplantation: a quantitative study. *Neuroscience letters*. Jan 7 2011;487(2):163-168.
34. Varvel NH, Grathwohl SA, Baumann F, et al. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 30 2012;109(44):18150-18155.
35. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*. Feb 2013;39(1):3-18.
36. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. May 27 2005;308(5726):1314-1318.
37. Raivich G. Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends in neurosciences*. Nov 2005;28(11):571-573.
38. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:119-145.
39. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of neuroinflammation*. 2014;11:98.
40. Colton CA. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. Dec 2009;4(4):399-418.
41. Ghosh M, Xu Y, Pearse DD. Cyclic AMP is a key regulator of M1 to M2a phenotypic conversion of microglia in the presence of Th2 cytokines. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):9.

42. Anthony RM, Urban JF, Jr., Alem F, et al. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med.* Aug 2006;12(8):955-960.
43. Kaindl AM, Favrais G, Gressens P. Molecular mechanisms involved in injury to the preterm brain. *J Child Neurol.* Sep 2009;24(9):1112-1118.
44. Harry GJ. Microglia during development and aging. *Pharmacol Ther.* Sep 2013;139(3):313-326.
45. Ekdahl CT. Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol.* 2012;3:41.
46. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* Feb;173(4):692-702.
47. Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain, behavior, and immunity.* Aug 2013;32:70-85.
48. Lalancette-Hebert M, Swarup V, Beaulieu JM, et al. Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* Jul 25 2012;32(30):10383-10395.
49. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, et al. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. *Ann Neurol.* Sep 2011;70(3):374-383.
50. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol.* Feb 2015;173(4):692-702.
51. Hsieh CL, Kim CC, Ryba BE, et al. Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain. *European journal of immunology.* Aug 2013;43(8):2010-2022.
52. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics.* Oct;7(4):366-377.
53. Wang G, Zhang J, Hu X, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* Dec 2013;33(12):1864-1874.
54. Walker PA, Shah SK, Jimenez F, Aroom KR, Harting MT, Cox CS, Jr. Bone marrow-derived stromal cell therapy for traumatic brain injury is neuroprotective via stimulation of non-neurologic organ systems. *Surgery.* Nov 2012;152(5):790-793.
55. Tchantchou F, Zhang Y. Selective inhibition of alpha/beta-hydrolase domain 6 attenuates neurodegeneration, alleviates blood brain barrier breakdown, and improves functional recovery in a mouse model of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma.* Apr 1 2013;30(7):565-579.
56. Busch SA, Hamilton JA, Horn KP, et al. Multipotent adult progenitor cells prevent macrophage-mediated axonal dieback and promote regrowth after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* Jan 19 2011;31(3):944-953.
57. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma.* May 20 2012;29(8):1614-1625.
58. Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, et al. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *Journal of neuroinflammation.* 2012;9:40.
59. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology.* Mar 2007;184(1-2):53-68.
60. Biran V, Joly LM, Heron A, et al. Glial activation in white matter following ischemia in the neonatal P7 rat brain. *Experimental neurology.* May 2006;199(1):103-112.
61. Vexler ZS, Yenari MA. Does inflammation after stroke affect the developing brain differently than adult brain? *Developmental neuroscience.* 2009;31(5):378-393.

62. Liu XH, Kwon D, Schielke GP, Yang GY, Silverstein FS, Barks JD. Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Oct 1999;19(10):1099-1108.
63. Faustino JV, Wang X, Johnson CE, et al. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Sep 7 2011;31(36):12992-13001.
64. Desestret V, Riou A, Chauveau F, et al. In vitro and in vivo models of cerebral ischemia show discrepancy in therapeutic effects of M2 macrophages. *PloS one*. 2013;8(6):e67063.
65. Nelissen S, Lemmens E, Geurts N, et al. The role of mast cells in neuroinflammation. *Acta neuropathologica*. May 2013;125(5):637-650.
66. Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *European journal of immunology*. Jul 2010;40(7):1843-1851.
67. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*. Oct 19 2011;12(11):1035-1044.
68. Young JD, Liu CC, Butler G, Cohn ZA, Galli SJ. Identification, purification, and characterization of a mast cell-associated cytolytic factor related to tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 1987;84(24):9175-9179.
69. Villapol S, Gelot A, Renolleau S, Charriaut-Marlangue C. Astrocyte responses after neonatal ischemia: the yin and the yang. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. Aug 2008;14(4):339-344.
70. Chhor V, Schang AL, Favrais G, Fleiss B, Gressens P. [Long-term cerebral effects of perinatal inflammation]. *Arch Pediatr*. Sep 2012;19(9):946-952.
71. Nag S. *The Blood Brain Barrier*. Humana Press; 2003.
72. Saunders NR, Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM. Barriers in the brain: a renaissance? *Trends in neurosciences*. Jun 2008;31(6):279-286.
73. Mollgard K, Balslev Y, Lauritzen B, Saunders NR. Cell junctions and membrane specializations in the ventricular zone (germinal matrix) of the developing sheep brain: a CSF-brain barrier. *Journal of neurocytology*. Aug 1987;16(4):433-444.
74. Saunders NR, Knott GW, Dziegielewska KM. Barriers in the immature brain. *Cellular and molecular neurobiology*. Feb 2000;20(1):29-40.
75. Abbott NJ, Romero IA. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Molecular medicine today*. Mar 1996;2(3):106-113.
76. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and molecular neurobiology*. Feb 2005;25(1):5-23.
77. Begley DJ, Brightman MW. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*. 2003;61:39-78.
78. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of cell biology*. Mar 1969;40(3):648-677.
79. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in neurosciences*. Dec 2001;24(12):719-725.
80. McCaffrey G, Staats WD, Quigley CA, et al. Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo. *Journal of neurochemistry*. Dec 2007;103(6):2540-2555.
81. Yu AS, McCarthy KM, Francis SA, et al. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. Jun 2005;288(6):C1231-1241.
82. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease*. Nov 2008;32(2):200-219.

83. Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology*. May 12 2003;161(3):653-660.
84. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. Jul 2004;84(3):869-901.
85. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. Jan 2006;7(1):41-53.
86. Taddei A, Giampietro C, Conti A, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology*. Aug 2008;10(8):923-934.
87. Ek CJ, Dziegielewska KM, Habgood MD, Saunders NR. Barriers in the developing brain and Neurotoxicology. *Neurotoxicology*. Jun 2012;33(3):586-604.
88. Ghersi-Egea JF, Leninger-Muller B, Suleman G, Siest G, Minn A. Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *Journal of neurochemistry*. Mar 1994;62(3):1089-1096.
89. Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry*. Dec 2008;107(6):1518-1528.
90. Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Murat A, Jouveta A, Buenerd A, Belin MF. Brain protection at the blood-cerebrospinal fluid interface involves a glutathione-dependent metabolic barrier mechanism. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Sep 2006;26(9):1165-1175.
91. Schinkel AH, Mol CA, Wagenaar E, van Deemter L, Smit JJ, Borst P. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur J Cancer*. Jul-Aug 1995;31A(7-8):1295-1298.
92. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, et al. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. May 20 1994;77(4):491-502.
93. Ek CJ, Wong A, Liddel SA, Johansson PA, Dziegielewska KM, Saunders NR. Efflux mechanisms at the developing brain barriers: ABC-transporters in the fetal and postnatal rat. *Toxicology letters*. Aug 1 2010;197(1):51-59.
94. Krishnamurthy P, Schuetz JD. The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. Aug 2005;18(4):349-358.
95. Dermietzel R, Krause D, Kremer M, Wang C, Stevenson B. Pattern of glucose transporter (Glut 1) expression in embryonic brains is related to maturation of blood-brain barrier tightness. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. Feb 1992;193(2):152-163.
96. Vannucci SJ, Seaman LB, Brucklacher RM, Vannucci RC. Glucose transport in developing rat brain: glucose transporter proteins, rate constants and cerebral glucose utilization. *Molecular and cellular biochemistry*. Nov 23 1994;140(2):177-184.
97. Braun LD, Cornford EM, Oldendorf WH. Newborn rabbit blood-brain barrier is selectively permeable and differs substantially from the adult. *Journal of neurochemistry*. Jan 1980;34(1):147-152.
98. Hagenbuch B. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. Jun 2007;21(2):209-221.
99. Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, et al. Blood-CSF barrier function in the rat embryo. *The European journal of neuroscience*. Jul 2006;24(1):65-76.
100. Saunders NR, Liddel SA, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol*. 2012;3:46.
101. Krishnaswamy A, Klein JP, Kapadia SR. Clinical cerebrovascular anatomy. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*. Mar 1 2010;75(4):530-539.

102. Liebeskind DS. Collateral circulation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Sep 2003;34(9):2279-2284.
103. Shuaib A, Butcher K, Mohammad AA, Saqqur M, Liebeskind DS. Collateral blood vessels in acute ischaemic stroke: a potential therapeutic target. *Lancet neurology*. Oct 2011;10(10):909-921.
104. Brozici M, van der Zwan A, Hillen B. Anatomy and functionality of leptomeningeal anastomoses: a review. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Nov 2003;34(11):2750-2762.
105. Defazio RA, Levy S, Morales CL, et al. A protocol for characterizing the impact of collateral flow after distal middle cerebral artery occlusion. *Translational stroke research*. Mar 2011;2(1):112-127.
106. Alpers BJ. Compensatory mechanisms in occlusive vascular disease of the brain. *Archives of neurology*. Nov 1959;1:531-534.
107. Krabbe-Hartkamp MJ, van der Grond J, de Leeuw FE, et al. Circle of Willis: morphologic variation on three-dimensional time-of-flight MR angiograms. *Radiology*. Apr 1998;207(1):103-111.
108. Zhang H, Prabhakar P, Sealock R, Faber JE. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. May 2010;30(5):923-934.
109. Coyle P. Diameter and length changes in cerebral collaterals after middle cerebral artery occlusion in the young rat. *The Anatomical record*. Oct 1984;210(2):357-364.
110. Herz RC, Jonker M, Verheul HB, Hillen B, Versteeg DH, de Wildt DJ. Middle cerebral artery occlusion in Wistar and Fischer-344 rats: functional and morphological assessment of the model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Mar 1996;16(2):296-302.
111. Chalothorn D, Clayton JA, Zhang H, Pomp D, Faber JE. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiological genomics*. Jul 18 2007;30(2):179-191.
112. Bang OY, Saver JL, Alger JR, et al. Patterns and predictors of blood-brain barrier permeability derangements in acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Feb 2009;40(2):454-461.
113. Bang OY. Multimodal MRI for ischemic stroke: from acute therapy to preventive strategies. *J Clin Neurol*. Sep 2009;5(3):107-119.
114. Silvestrini M, Altamura C, Cerqua R, et al. Early activation of intracranial collateral vessels influences the outcome of spontaneous internal carotid artery dissection. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Jan 2011;42(1):139-143.
115. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*. May 2004;5(5):347-360.
116. Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiological reviews*. Jan 1998;78(1):53-97.
117. Peterson EC, Wang Z, Britz G. Regulation of cerebral blood flow. *International journal of vascular medicine*. 2011;2011:823525.
118. Faraci FM, Brian JE, Jr. Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Mar 1994;25(3):692-703.
119. Pinto PS, Meoded A, Poretti A, Tekes A, Huisman TA. The unique features of traumatic brain injury in children. review of the characteristics of the pediatric skull and brain, mechanisms of trauma, patterns of injury, complications, and their imaging findings--part 2. *J Neuroimaging*. Apr 2012;22(2):e18-41.
120. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. Oct 2010;7(4):366-377.
121. Ewing-Cobbs L, Prasad MR, Kramer L, et al. Late intellectual and academic outcomes following traumatic brain injury sustained during early childhood. *Journal of neurosurgery*. Oct 2006;105(4 Suppl):287-296.

122. Moretti R, Pansiot J, Bettati D, et al. Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. *Front Neurosci.* 2015;9:40.
123. Pop V, Badaut J. A neurovascular perspective for long-term changes after brain trauma. *Transl Stroke Res.* Dec 1 2011;2(4):533-545.
124. Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, et al. Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci.* Jan 2007;25(1):231-238.
125. Baburamani AA, Ek CJ, Walker DW, Castillo-Melendez M. Vulnerability of the developing brain to hypoxic-ischemic damage: contribution of the cerebral vasculature to injury and repair? *Frontiers in physiology.* 2012;3:424.
126. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nature neuroscience.* Jul 2001;4(7):702-710.
127. Haynes RL, Baud O, Li J, Kinney HC, Volpe JJ, Folkerth DR. Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol.* Jul 2005;15(3):225-233.
128. Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature.* Dec 22 2005;438(7071):1167-1171.
129. Rufini O, Valanzano A, Calamandrei G. [Animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy]. *Annali dell'Istituto superiore di sanita.* 2001;37(4):561-566.
130. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology.* Sep 2007;28(5):931-937.
131. Charriaut-Marlangue C, Bonnin P, Leger PL, Renolleau S. Brief update on hemodynamic responses in animal models of neonatal stroke and hypoxia-ischemia. *Experimental neurology.* Oct 2013;248:316-320.
132. Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nature protocols.* 2009;4(9):1328-1337.
133. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain research.* Apr 27 1981;211(1):67-77.
134. Shohami E, Shapira Y, Cotev S. Experimental closed head injury in rats: prostaglandin production in a noninjured zone. *Neurosurgery.* May 1988;22(5):859-863.
135. Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *Journal of neurosurgery.* Feb 1994;80(2):291-300.
136. McIntosh TK, Noble L, Andrews B, Faden AI. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Central nervous system trauma : journal of the American Paralysis Association.* 1987;4(2):119-134.
137. McIntosh TK, Vink R, Noble L, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989;28(1):233-244.
138. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience methods.* Oct 1991;39(3):253-262.
139. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature reviews. Neuroscience.* Feb 2013;14(2):128-142.
140. Pappius HM. Local cerebral glucose utilization in thermally traumatized rat brain. *Annals of neurology.* May 1981;9(5):484-491.
141. Dobbing J. The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics.* Jan 1974;53(1):2-6.
142. Whitelaw A, Thoresen M. Antenatal steroids and the developing brain. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition.* Sep 2000;83(2):F154-157.
143. Kass DA, Champion HC, Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circulation research.* Nov 26 2007;101(11):1084-1095.

144. Wallis RM, Corbin JD, Francis SH, Ellis P. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. *The American journal of cardiology*. Mar 4 1999;83(5A):3C-12C.
145. Boolell M, Gepi-Attee S, Gingell JC, Allen MJ. Sildenafil, a novel effective oral therapy for male erectile dysfunction. *British journal of urology*. Aug 1996;78(2):257-261.
146. Weimann J, Ullrich R, Hromi J, et al. Sildenafil is a pulmonary vasodilator in awake lambs with acute pulmonary hypertension. *Anesthesiology*. Jun 2000;92(6):1702-1712.
147. Hemnes AR, Champion HC. Sildenafil, a PDE5 inhibitor, in the treatment of pulmonary hypertension. *Expert review of cardiovascular therapy*. May 2006;4(3):293-300.
148. Menniti FS, Ren J, Coskran TM, et al. Phosphodiesterase 5A inhibitors improve functional recovery after stroke in rats: optimized dosing regimen with implications for mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. Dec 2009;331(3):842-850.
149. Palmeri A, Privitera L, Giunta S, Loreto C, Puzzo D. Inhibition of phosphodiesterase-5 rescues age-related impairment of synaptic plasticity and memory. *Behavioural brain research*. Mar 1 2013;240:11-20.
150. Zhang L, Yu W, Schroedter I, Kong J, Vrontakis M. Galanin transgenic mice with elevated circulating galanin levels alleviate demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. *PloS one*. 2012;7(3):e33901.
151. Pifarre P, Prado J, Baltrons MA, et al. Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Acta neuropathologica*. Apr 2011;121(4):499-508.
152. Nunes AK, Raposo C, Luna RL, Cruz-Hofling MA, Peixoto CA. Sildenafil (Viagra(R)) down regulates cytokines and prevents demyelination in a cuprizone-induced MS mouse model. *Cytokine*. Nov 2012;60(2):540-551.
153. Zhang R, Wang Y, Zhang L, et al. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Nov 2002;33(11):2675-2680.
154. Charriaut-Marlangue C, Nguyen T, Bonnin P, et al. Sildenafil mediates blood-flow redistribution and neuroprotection after neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Mar 2014;45(3):850-856.
155. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 22 1998;95(26):15769-15774.
156. Choi HB, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. May 2 2007;27(18):4957-4968.
157. Switzer JA, Hess DC, Ergul A, et al. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Sep 2011;42(9):2633-2635.
158. Dong W, Xiao S, Cheng M, Ye X, Zheng G. Minocycline induces protective autophagy in vascular endothelial cells exposed to an in vitro model of ischemia/reperfusion-induced injury. *Biomedical reports*. Feb 2016;4(2):173-177.
159. Yang Y, Salayandia VM, Thompson JF, Yang LY, Estrada EY. Attenuation of acute stroke injury in rat brain by minocycline promotes blood-brain barrier remodeling and alternative microglia/macrophage activation during recovery. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:26.
160. Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain : a journal of neurology*. Jul 2003;126(Pt 7):1628-1637.

161. Homsí S, Piaggio T, Croci N, et al. Blockade of acute microglial activation by minocycline promotes neuroprotection and reduces locomotor hyperactivity after closed head injury in mice: a twelve-week follow-up study. *Journal of neurotrauma*. May 2010;27(5):911-921.
162. Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Kovanen PT, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation*. Jul 24 2007;116(4):411-418.
163. Strbian D, Tatlisumak T, Ramadan UA, Lindsberg PJ. Mast cell blocking reduces brain edema and hematoma volume and improves outcome after experimental intracerebral hemorrhage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Apr 2007;27(4):795-802.
164. Pifarre P, Prado J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J, Garcia A. Cyclic GMP phosphodiesterase inhibition alters the glial inflammatory response, reduces oxidative stress and cell death and increases angiogenesis following focal brain injury. *Journal of neurochemistry*. Feb 2010;112(3):807-817.
165. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine*. Jul 2011;17(7):796-808.
166. Zhang L, Zhang Z, Zhang RL, et al. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain research*. Nov 6 2006;1118(1):192-198.
167. Zhang L, Zhang RL, Wang Y, et al. Functional recovery in aged and young rats after embolic stroke: treatment with a phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Apr 2005;36(4):847-852.
168. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol*. Jun 1999;45(6):724-735.
169. Kaindl AM, Zabel C, Stefovská V, et al. Subacute proteome changes following traumatic injury of the developing brain: Implications for a dysregulation of neuronal migration and neurite arborization. *Proteomics Clin Appl*. Jul 2007;1(7):640-649.
170. Nag S, Venugopalan R, Stewart DJ. Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol*. Nov 2007;114(5):459-469.
171. Lin JL, Huang YH, Shen YC, Huang HC, Liu PH. Ascorbic acid prevents blood-brain barrier disruption and sensory deficit caused by sustained compression of primary somatosensory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. Jun 2010;30(6):1121-1136.
172. Truettner JS, Alonso OF, Dietrich WD. Influence of therapeutic hypothermia on matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. Nov 2005;25(11):1505-1516.
173. Stokely ME, Orr EL. Acute effects of calvarial damage on dural mast cells, pial vascular permeability, and cerebral cortical histamine levels in rats and mice. *Journal of neurotrauma*. Jan 2008;25(1):52-61.
174. Hendrix S, Kramer P, Pehl D, et al. Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Mar 2013;27(3):920-929.
175. Biran V, Cochois V, Karroubi A, Arrang JM, Charriaut-Marlangue C, Heron A. Stroke induces histamine accumulation and mast cell degranulation in the neonatal rat brain. *Brain pathology*. Jan 2008;18(1):1-9.
176. Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. Mast cells are early responders after hypoxia-ischemia in immature rat brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Sep 2009;40(9):3107-3112.
177. Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, et al. Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell and tissue research*. Jun 2005;320(3):369-378.

178. Dimitriadou V, Rouleau A, Tuong MD, et al. Rat cerebral mast cells undergo phenotypic changes during development. *Brain research. Developmental brain research*. Nov 22 1996;97(1):29-41.
179. Fernandez-Lopez D, Natarajan N, Ashwal S, Vexler ZS. Mechanisms of perinatal arterial ischemic stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. Jun 2014;34(6):921-932.
180. Kumar A, Alvarez-Croda DM, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. Microglial/Macrophage Polarization Dynamics following Traumatic Brain Injury. *Journal of neurotrauma*. Oct 1 2016;33(19):1732-1750.
181. Matzilevich DA, Rall JM, Moore AN, Grill RJ, Dash PK. High-density microarray analysis of hippocampal gene expression following experimental brain injury. *Journal of neuroscience research*. Mar 1 2002;67(5):646-663.
182. White TE, Ford GD, Surlis-Zeigler MC, Gates AS, Laplaca MC, Ford BD. Gene expression patterns following unilateral traumatic brain injury reveals a local pro-inflammatory and remote anti-inflammatory response. *BMC genomics*. Apr 25 2013;14:282.
183. Raghavendra Rao VL, Dhodda VK, Song G, Bowen KK, Dempsey RJ. Traumatic brain injury-induced acute gene expression changes in rat cerebral cortex identified by GeneChip analysis. *Journal of neuroscience research*. Jan 15 2003;71(2):208-219.
184. Truettner JS, Suzuki T, Dietrich WD. The effect of therapeutic hypothermia on the expression of inflammatory response genes following moderate traumatic brain injury in the rat. *Brain research. Molecular brain research*. Aug 18 2005;138(2):124-134.

IX. ANNESSO 1: LA MELATONINA LIMITA L'APERTURA DELLA BARRIERA EMATOENCEFALICA SECONDARIA AL DANNO ECCITOTOSSICO IN UN MODELLO MURINO DI LEUCOMALACIA PERIVENTRICOLARE

Introduzione:

Il ruolo principale della BBB è di mantenere un microambiente cerebrale perfettamente controllato.

Le TJs permettono una stretta connessione a livello delle barriere, e, con le adherens junctions, le proteine trasportatrici di membrana, gli enzimi metabolici e la matrice extracellulare, contribuiscono alla selettività cellulare ed alla permeabilità di barriera. I periciti e i pedicelli degli astrociti si uniscono a tale complesso a formare la cosiddetta Unità Neurovascolare (NVU): tali concetti, ancora in fase di studio nell'adulto, sono molto poco caratterizzati nel cervello in via di sviluppo. Storicamente considerata immatura, la BBB nel cervello in via di sviluppo sembra piuttosto essere già funzionante fin dai primi stadi di sviluppo embrionale, ed avere delle peculiarità che la rendono "funzionalmente" selettiva per certe proteine indispensabili allo sviluppo cerebrale [ENREF 68](#)⁷².

Il glutammato è la tossina eccitatoria principale in corso di sviluppo. Tra i differenti tipi di recettori ionotropici per il glutammato è l'N-metil-D-Aspartato a mediare il danno eccitotossico neuronale. I recettori metabotropici per il glutammato, invece, stimolando l'idrolisi del fosfoinositide, potenziano gli effetti del recettore NMDA. L'ibotenato, un analogo del glutammato derivato dalla *muscarina amanita*, attiva sia i recettori N-Methyl-D-Aspartato (NMDA), sia i recettori metabotropici del glutammato, non legandosi, invece, ai recettori Alpha-Amino-3-Hidroxy-5Methyl-4-Isoxazoleproipionate (AMPA) né

ai recettori Kainato. Nel topo, se iniettato a livello intracranico, produce una disgenesia corticale e della sostanza bianca sottocorticale diversa a seconda dell'età a cui le iniezioni vengono effettuate. Se iniettato il primo giorno dopo la nascita (P0) crea un prototipo di microgiria, se iniettato 5 giorni dopo la nascita (P5), causa le stesse anomalie che si ritrovano nella leucomalacia periventricolare. P5 corrisponderebbe nell'uomo allo sviluppo cerebrale di un neonato pretermine, picco di incidenza della leucomalacia periventricolare.

Gli obiettivi principali di questo studio erano quelli di utilizzare un **modello di leucomalacia periventricolare, già ampiamente studiato nel nostro centro in termini di evoluzione neuropatologica, al fine di** 1) correlare le modificazioni fisiche di permeabilità della BBB con le differenze di espressione genica tramite qPCR delle differenti componenti della BBB 2) di valutare eventuali proprietà neuroprotettive della melatonina in tale modello.

Risultati

1. Gli animali sottoposti al danno eccitotossico non subivano alterazioni morfologiche importanti a 2h, mentre a 4h il tessuto periventricolare dal lato dell'iniezione assumeva un aspetto simile a quello che si ha nei danni ipossico-ischemici. Il trattamento con la melatonina attenuava in maniera importante tali anomalie.

Figura 2 nell'articolo.

2. Il marcaggio immunoistochimico Cld5 aveva un aspetto normale a 2h, mentre a 4h gli animali iniettati con ibotenato mostravano, nell'emisfero coinvolto, un ridotto marcaggio con Cld5. Questa disregolazione era del tutto evitata in presenza di melatonina.

Figura 3 nell'articolo.

- 3. L'entità della lesione ibotenato a 5 giorni dall'insulto, era notevolmente diminuita a livello della sostanza bianca negli animali trattati con melatonina rispetto a quelli non trattati.**

Figura 4 nell'articolo.

- 4. Lo studio funzionale della permeabilità della BBB mediante iniezione di destrani 3kD ha evidenziato un'apertura della barriera presente già a 2h dall'insulto, e assente a 18h. La melatonina comportava una netta riduzione dell'area di stravasamento e della densità parenchimale dei destrani.**

Figura 5 nell'articolo

- 5. L'analisi delle principali proteine che contribuiscono alla funzionalità della barriera ematoencefalica, studiate tramite PCR quantitativa, evidenzia che già a due ore dall'insulto vi è una disregolazione importante di Occl, Cld5, Cdh5, Jam1, Jam2 e Zo1 (principali TJs), e che tali modificazioni (che siano esse nel senso di un aumento o di una riduzione) sono evitate in caso di trattamento con la melatonina. A 4h vi è uno stravasamento nettamente ridotto, e a 18h non si evidenzia più stravasamento di destrani.**

In particolare l'espressione genica di Cld5, Jam1 e Cdh5 aumenta, mentre quella di Occl e Jam2 si riduce. Per quanto riguarda i trasportatori di efflusso, l'ibotenato induce una riduzione significativa dell'espressione genica di Abcg2.

La melatonina sembra agire contro tali modifiche, che o sono meno pronunciate, o sono addirittura assenti negli animali trattati con melatonina rispetto ai controlli.

Figura 7a, e tabella 2 nell'articolo.

Quindi gli effetti benefici della melatonina nello studio della funzionalità mebranaria riscontrati a 4 ore (più tardivamente), sembrano essere già all'opera più precocemente, a 2 ore dall'evento, a livello trascrizionale.

6. Anche a 4 ore vi sono delle modifiche, spesso non concordanti con quelle riscontrate a 2h.

A 4 ore, infatti, in presenza di ibotenato si assiste esclusivamente a delle riduzioni di espressione, in particolare di Occl, Cld5, Jam1 e Pgp1a. La melatonina, in questo caso, agisce diversamente: assistiamo ad una riduzione meno importante dell'Occl rispetto ai controlli, e ad una riduzione di Cld5, di Pgp1a e della Cdh5 più importante rispetto ai topi non trattati (dove nel caso della Cdh non vi è nemmeno riduzione).

Figura 7b, e tabella 2

7. A 18 ore si riscontrano solo leggere modifiche a livello di Cdh5, JAM2 e dei trasportatori di efflusso Pgp1b e Abcg2, in accordo con i dati di immunoistochimica e con lo studio funzionale della permeabilità di membrana.

Figura 7c e tabella 2

Conclusione:

Indipendentemente dai risultati ottenuti riguardo al trattamento con la melatonina, questo lavoro ci ha permesso di confermare attraverso il confronto tra studi morfologici e funzionali della barriera, che in tale modello la BBB perde le sue caratteristiche strutturali e le sue capacità funzionali (di impermeabilità) a partire dalle 4 ore dopo l'insulto eccitotossico, e che a livello trascrizionale le modificazioni cominciano più

precocemente, già a due ore dall'insulto. Laddove le proprietà della BBB sono di nuovo funzionanti (assenza di stravasamento di destrano), le modifiche a livello trascrizionale sono anch'esse quasi interamente ritornate a valori normali, o sono in aumento (probabile meccanismo compensatorio).

Anche le alterazioni delle TJs e delle proteine trasportatrici rappresentano quindi un buon parametro per lo studio della BBB, soprattutto per una valutazione quantitativa del danno, ma vanno sempre associate a studi morfologici o, ancor meglio, di funzionalità di barriera.

MELATONIN REDUCES EXCITOTOXIC BLOOD–BRAIN BARRIER BREAKDOWN IN NEONATAL RATS

R. MORETTI,^{a,b,c,d,e,f} A. ZANIN,^{b,c,d,f} J. PANSIOT,^{b,c,d}
D. SPIRI,^{b,c,d} L. MANGANOZZI,^{b,c,d} I. KRATZER,^f
G. FAVERO,^g A. VASILJEVIC,^f V. E. RINALDI,^{b,c,d}
I. PIC,^{b,c,d} D. MASSANO,^{b,c,d} I. D'AGOSTINO,^{b,c,d}
A. BABURAMANI,^h M. A. LA ROCCA,^{b,c,d}
L. F. RODELLA,^g R. REZZANI,^g J. EK,^h N. STRAZIELLE,^{f,i}
J.-F. GHERSI-EGEA,^f P. GRESSENS,^{b,c,d,j} AND
L. TITOMANLIO^{a,b,c,d,*f}

^a Pediatric Emergency Department, APHP, Robert Debré Hospital, Paris, France

^b Inserm, U1141, Paris, France

^c Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMRS 1141, Paris, France

^d PremUP, Paris, France

^e Università degli studi di Udine, 33100 Udine, Italy

^f Lyon Neurosciences Research Center, Inserm U1028, CNRS UMR5292 – Lyon University, Lyon, France

^g Section of Anatomy and Physiopathology, Department of Clinical and Experimental Sciences, University of Brescia, Brescia, Italy

^h Perinatal Center, Dept Neuroscience and Physiology, Sahlgrenska Academy, Gothenburg University, Gothenburg, Sweden

ⁱ Brain-i, Lyon, France

^j Centre for the Developing Brain, Department of Division of Imaging Sciences and Biomedical Engineering, St. Thomas' Hospital, London, United Kingdom

Abstract—The blood–brain barrier (BBB) is a complex structure that protects the central nervous system from peripheral insults. Understanding the molecular basis of BBB function and dysfunction holds significant potential for future strategies to prevent and treat neurological damage. The aim of our study was (1) to investigate BBB alterations following excitotoxicity and (2) to test the protective properties of melatonin. Ibotenate, a glutamate analog, was injected intracerebrally in postnatal day 5 (P5) rat pups to mimic excitotoxic injury. Animals were then randomly divided into two groups, one receiving intraperitoneal (i.p.) melatonin injections (5 mg/kg), and the other phosphate buffer saline (PBS) injections. Pups were sacrificed 2, 4 and 18 h after ibotenate injection. We determined lesion size at 5 days by histology, the location and organization of tight junction (TJ) proteins by immunohistochemical studies, and BBB leakage by dextran

extravasation. Expression levels of BBB genes (TJs, efflux transporters and detoxification enzymes) were determined in the cortex and choroid plexus by quantitative PCR. Dextran extravasation was seen 2 h after the insult, suggesting a rapid BBB breakdown that was resolved by 4 h. Extravasation was significantly reduced in melatonin-treated pups. Gene expression and immunohistochemical assays showed dynamic BBB modifications during the first 4 h, partially prevented by melatonin. Lesion-size measurements confirmed white matter neuroprotection by melatonin. Our study is the first to evaluate BBB structure and function at a very early time point following excitotoxicity in neonates. Melatonin neuroprotects by preventing TJ modifications and BBB disruption at this early phase, before its previously demonstrated anti-inflammatory, antioxidant and axonal regrowth-promoting effects. © 2015 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: blood–brain barrier, brain development, ibotenate, periventricular white matter damage, melatonin.

INTRODUCTION

The main role of the blood–brain barrier (BBB) and blood–cerebrospinal fluid barrier (BCSFB, i.e. choroid plexus) is to maintain a precisely regulated intracerebral (i.c.) microenvironment. Tight junctions (TJs) closely connect barrier cells, and, together with adherens junctions, influx and efflux transporters, metabolic enzymes and the extracellular matrix, contribute to cell polarity and selective barrier permeability. Pericytes and astrocytic end-feet associated with the endothelium within the neurovascular unit are also fundamental in regulating the BBB phenotype (Neuwelt, 2004; Abbott et al., 2006, 2010; Neuwelt et al., 2008; Li et al., 2014).

Less is known about these barriers in the developing brain. BBB and BCSFB integrity plays a key role in protecting the developing brain (Ek et al., 2012). Recent studies have demonstrated that TJs in the BBB and BCSFB are already effective at the earliest stages of development (Saunders et al., 2008). Indeed, the high protein concentration of embryonic CSF appears to be a consequence of transcellular transfer across the epithelial cells of the choroid plexus, rather than a consequence of TJ immaturity (Liddelow et al., 2013). TJs are impermeable even to small molecules, and selective protein transfer is useful for ventricular expansion and central nervous system (CNS) development (Ek et al., 2006; Johansson et al., 2008). On the other hand, BBB breakdown is an

*Corresponding author. Address: Pediatric Emergency Department, INSERM U-1141, AP-HP Robert Debré University Hospital, 48, Blvd Sérurier, 75019 Paris, France. Tel: +33-01-40-03-40-05; fax: +33-01-40-03-47-74.

E-mail address: luigi.titomanlio@rdb.aphp.fr (L. Titomanlio).

[†] The authors contributed equally.

Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; BCSFB, blood–cerebrospinal fluid barrier; CNS, central nervous system; HPS, Hemalum phloxin saffron; P5, postnatal day 5; PBS, phosphate buffer saline; TJ, tight junction.

important contributing factor to injury in many neurological disorders in adults and infants. The extreme vulnerability of the developing brain seems mainly to stem from its susceptibility to toxins, drugs and deleterious endogenous compounds that are released during perinatal injuries and attain the neuropil during the developmental processes of cell division, differentiation, migration and synaptogenesis. Under pathological conditions such as cerebral ischemia–reperfusion (IR) or in the presence of an activated excitotoxic cascade, damage to cerebrovascular endothelial cells causes alterations in BBB function that could exacerbate neuronal injury and death. Elucidating early changes in BBB transport and permeability is key to understanding BBB function after cerebral ischemia and excitotoxic damage in newborns (Dammann and Leviton, 2004).

Animal models of perinatal brain injury have proven useful for understanding its pathophysiology and identifying potential neuroprotective agents (Northington, 2006). A well-characterized murine model of perinatal excitotoxic injury consists of the i.c. injection of the glutamate analog ibotenate in 5-day-old mouse pups (Marret et al., 1995). Ibotenate activates NMDA and metabotropic receptors, and leads to brain lesions that simulate both the hypoxic–ischemic gray matter lesions that characterize human full-term and near-term newborns and the white matter lesions that are typical of preterm newborns (Gressens et al., 2005; Johnston, 2005). Several treatments administered intraperitoneally (i.p.) have been found to reduce ibotenate-induced lesions in mouse pups, indicating potential neuroprotective effects that could be extended to humans (Husson et al., 2002; Bousslama et al., 2006). Melatonin, a hormone that modulates the entrainment of the circadian rhythms of several biological functions (Hardeland et al., 2012), easily crosses the BBB (Reiter et al., 2014), and has been proven to be neuroprotective either through its antiapoptotic and vasoconstrictive effects (Kaur et al., 2008), or by limiting the excitotoxic cascade (Tutunculer et al., 2005). Both melatonin and its metabolites are powerful antioxidants (Pei et al., 2003; Tai et al., 2010; Galano et al., 2013; Zhang and Zhang, 2014). Recent studies have shown a beneficial role for this molecule in preventing BBB disruption in adult models of traumatic brain injury, stroke and subarachnoid hemorrhage (Kaur and Ling, 2008; Kabadi and Maher, 2010; Dehghan et al., 2013) (Chen et al., 2014). Finally, melatonin has also been proven safe for use in children (Fulia et al., 2001; Gitto et al., 2001; Weiss et al., 2006).

The aim of the present study was (1) to characterize acute variations in BBB and BCSFB permeability and alterations in TJ proteins in the developing brain after exposure to an excitotoxic challenge, and (2) to evaluate the effects of melatonin on BBB function in the developing animal.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

In order to understand the time-course of alterations in the BBB and BCSFB after ibotenate injection and the neuroprotective effects of melatonin, three different time points were chosen: 2, 4 and 18 h after the insult (+2, +4 and +18 h). An additional time point 24 h after

injection was also used to investigate alterations of the BCSFB in the choroid plexus. The long-term effects of ibotenate and melatonin on brain lesions were evaluated in animals sacrificed at P10.

The experimental paradigm is shown in Fig. 1.

Animal preparation

All experimental procedures were performed with prior approval from the Ethics Committee of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and in accordance with NIH guidelines for the humane handling of animals. Female Sprague–Dawley rats with a 4 day-old litter (10 pups per litter) were obtained from Charles River (St. Germain-sur-l'Arbresle, France). Rats were given food and water *ad libitum* and housed in a temperature/light-controlled animal care facility. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

Treatments

Excitotoxic brain lesions were caused in postnatal day 5 (P5) rat pups by injecting them i.c. with 5 mg/mL ibotenate (Tocris 0285, Bristol, UK) diluted in phosphate buffer saline (PBS), as previously described (Marret et al., 1995; Gressens et al., 1997; Dommergues et al., 2000; Laudenbach et al., 2001; Tahraoui et al., 2001; Husson et al., 2002). Ibotenate was injected into the neopallial parenchyma using a 25-gauge needle and 50- μ L Hamilton syringe (Massay, France), mounted on a calibrated microdispenser attached to a rigid mechanical holder. The needle was inserted intracranially 2 mm under the external surface of the scalp into the frontoparietal region of the right hemisphere, 2.5 mm from the midline in the mediolateral plane and 4 mm anterior to the bregma in the rostrocaudal plane. Two 1- μ L boluses (5 μ g each) of ibotenate were injected. This dose has been shown to consistently cause brain damage in P5 mice (Husson et al., 2005). Two sham groups were also included, with only needle injury or PBS injections. Melatonin (Sigma M5250) 5 mg/kg was diluted with PBS 1 \times -DMSO 5% and then injected i.p. Control pups were injected i.p. with PBS 1 \times -DMSO 5%. All i.p. injections were administered 10 min after ibotenate injections.

Determination of lesion size

Lesion size was determined in 10 pups per group of both sexes. The pups were decapitated 5 days after i.c. ibotenate injection (P10), and their brains were fixed in 4% formaldehyde for 5 days and then embedded in paraffin. The size of neocortical and white matter lesions can be defined by the length on three orthogonal axes: the lateral–medial axis (in a coronal plane), the radial axis (also in a coronal plane, from the pial surface to the lateral ventricle), and the fronto-occipital axis (in a sagittal plane). In previous studies (Marret et al., 1995; Pansiot et al., 2010) we found an excellent correlation among the measurements from the three axes of the excitotoxic lesions. Based on these findings, we cut serial sections of the entire brain in the coronal plane at 15- μ m intervals in

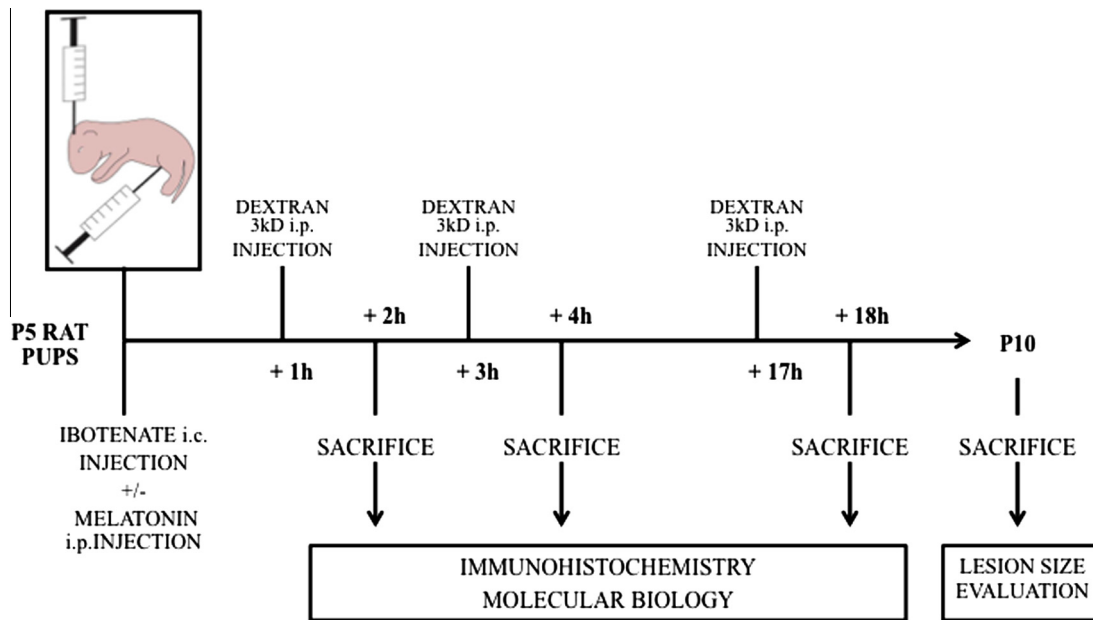


Fig. 1. *In vivo* experimental paradigm. Excitotoxic brain lesions were induced by two 1- μ l bolus intracerebral injections of ibotenate (5 μ g each) in P5 rat pups. Animals were randomly divided into two groups, which received either a 5 mg/kg melatonin i.p. injection or a PBS i.p. injection immediately after the excitotoxic insult. Three time points for histological/immunochemical and molecular biological evaluation were chosen: 2 h, 4 h, and 18 h after the ibotenate injection. One hour before each time point we injected 40 mg/kg of biotinylated Dextran, 3 kDa, i.p. Lesion size was evaluated 5 days after ibotenate injection, at P10, by Cresyl Violet staining.

order to have an accurate and reproducible determination of the fronto-occipital diameter of the lesion. Then we multiplied the maximum diameter by the number of sections in which the lesion was present in cresyl violet staining and the thickness per section. The size of the lesion in each brain was determined independently by two investigators blinded to the treatment group.

Immunohistochemistry

Thirteen animals of both sexes from each treatment group were sacrificed by decapitation. Dissected brains were fixed by immersion in formalin-free fixative (RCL2, Alphelys, Plaisir, France) and embedded in paraffin. Coronal sections (4- μ m thick) were cut from the blocks with a Leica microtome and Hemalum phloxin saffron (HPS) morphological studies and immunohistochemical labeling were performed a rabbit polyclonal anti-Cld2 antibody (51-6100) and a mouse monoclonal anti-Cld5 antibody (35-2500; both from Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at a final concentration of 2.5 μ g/ml using a BenchMark_XT system (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ, USA), according to the manufacturer's instructions. Immunoreactivity was detected using an Amplification kit and an ultraView Universal DAB detection kit (both from Ventana). Sections were counterstained with hematoxylin. The localization, uniformity and intensity of labeling were assessed in several sections obtained from the area comprising the injection site and the hippocampus.

Dextran injections

Dextran are indicators of the permeability of cellular interfaces to polar solutes, and are typically used as

markers of BBB leakage. Detectable in brain sections, biotinylated dextrans provide information about sites of extravasation and are also used to study the magnitude of BBB breakdown, because disruption of the BBB is not an "all or nothing" event, and the molecular size of the tracer needs to be taken into consideration. 40 mg/kg of biotinylated dextran, MW 3000 (lysine fixable powder, Life Technologies), diluted in distilled water, was injected i.p. into rat pups at +2, +4 and +18 h after ibotenate injection, and pups sacrificed 1 h later. Brains were immediately frozen in isopentane (-50°C). Coronal sections of the entire brain 10 μ m-thick were cut with a cryostat. The slides were then incubated with avidin and biotinylated horseradish peroxidase reagents (ABC kit Vectastain) and then with SIGMAFAST™ 3,3' diaminobenzidine tablets (Sigma). They were then counterstained with Cresyl violet. To evaluate tracer extravasation through the BBB, we used two methods: measurement of the area of extravasation, and measurement of staining density. Both these parameters were calculated using Image J (<http://rsb.info.nih.gov>).

Sucrose permeability

Brain/plasma sucrose concentration ratios were measured as an index of overall BBB permeability at +4, +18 and +72 h ($n = 9/\text{time point}$) after ibotenate injection in P5 animals. Sucrose was chosen as a small lipid-insoluble, passive BBB marker. Radiolabeled (^{14}C)-sucrose (2 $\mu\text{Ci}/\text{animal}$; American Radiochemicals) was injected (10 $\mu\text{L}/\text{g}$) i.p. and animals killed 30 min after injection by an overdose of thiopental. Blood was sampled directly from the heart and plasma was separated by centrifugation as previously described (Habgood et al., 1993; Ek et al., 2001). The brain was

removed, the left and right hemispheres dissected out, and tissues weighed and frozen in scintillation vials before further processing. Soluene-350 (0.5 mL, Packard Biosciences) was added to each vial containing brain tissue and left for 24 h at 35 °C to completely solubilize tissues. Following this, 4.5 mL of scintillation fluid (Ultra Gold, Packard Biosciences) was added to all vials containing brain and plasma samples. The radioactivity in each vial was determined by liquid scintillation counting (1409 DSA, Wallac) and expressed as dpm/ μ g sample. Sucrose concentration ratios were calculated as previously described (Ek et al., 2015).

Quantitative real-time PCR

The lesioned zone was dissected out from brains and total DNA-free RNA was extracted using an RNeasy lipid tissue mini kit (Qiagen). 1 μ g of RNA was used for reverse transcription with Iscript cDNA synthesis kit (BioRad). In order to evaluate the effects of ibotenate on the BBB at +2, +4 and +18 h, we chose to study the most important TJ proteins (occludin Occl, Cld5, junctional adhesion molecules Jam1 and Jam2, and zonula occludens Zo1), the main adherens junction protein (cadherin Cdh5) and the principal members of the efflux transporter system (Abcg2, Pgp1a and Pgp1b). Genes involved in the synthesis of early

inflammatory mediators (cyclooxygenase Cox2, prostaglandin E synthase PTGES and prostaglandin D2 synthase PTGDS) were also analyzed. To standardize gene expression in samples, we used the housekeeping gene GAPDH. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using a supermix (Bio-Rad) containing Sybr Green, for 40 cycles with a 2-step program (95–60 °C); each reaction was run with eight animals, and samples were assessed in duplicate.

The effect of ibotenate on the choroidal expression levels of neuroprotective genes was investigated by qRT-PCR performed on tissues isolated at +4 h and 24 h. These genes included those for TJ proteins specific to the choroidal epithelium (Cld2, 3, 9, 19, 22), efflux transporters (Slc21a7, Slc21a14, Abcc1, Abcc4, Abcb1a, Abcb1b), and detoxification enzymes (glutathione-S-transferases Gstm1 and GstP1, epoxide hydrolase EH1, superoxide dismutase SOD1, heme oxygenase HO-1, glutathione peroxidase Gpx1) (Kratzer et al., 2012, 2013). The glucose transporter Slc2a1, which plays an important role in supplying energy to barrier cells and to the neuropil, as well as early inflammatory genes (phospholipase Pla2, Cox2 and interleukin IL-1 β) were also investigated. Target gene expression levels in the choroid plexus were normalized to the housekeeping gene HPRT.

Sense and antisense primers for all genes analyzed in both barriers are listed in Table 1.

Table 1. List of primers used in qPCR

Gene name	Forward primer 5'→3'	Reverse primer 5'→3'
Claudin 2	GGCTACCAGGCCAGCCTCT	TGCCTGTAACCCTGGGGGCA
Claudin 3	ACTACCAACCGTCGATGTACCC	CCATTCGACTTGGACAGTTCCCT
Claudin 5	TGAGCATTTCGGTCTTAGCC	TCACAGTGTCTTGGCAAGC
Claudin 9	GCTGTGATGGGCTGAAGGCTTCC	TCAACAGGGTTGGAGCACCCG
Claudin 19	CAAGACCCCGCCACACGTG	AGCACCGTGCCTGAGATCC
Claudin 22	TGCTTTATTTACTGGTGCCTG	CTTCCCTCTGTGGTATCATC
JAM1	CCGTGCCTTCATCAATTCTT	ATGCGTACAGCCTCTCACCT
JAM2	TGTGGAGCTACGGTGTCAAG	TACGAGCTGTTCTGTGTGC
Zonulin 1	GTCGCAATGGTTAACGGAGT	CGTGCACATCCTCGTCATAG
Cadherin 5	CGCCAAAAGAGAGACTGGAT	TTGTGACGGTTCACATTGGA
Slc21a14	TGTCTTGTGGTGTCAATC	ATCATGCCTGACCAGTTTCC
Abcb1a	CATACAAATGCCATCCATGC	CCCCTTCTTTTCTTGCTA
Abcb1b	AGAACGCAGACTTGATCGTG	CAGCCTGAACCATCGAGAA
Abcc1	ATGGTGTCAAGTGGTTAGG	TGTGGGAAGAAGAGTTGC
Abcc4	TTCCCTTCGACCTTATCCT	TAGGCAGCTGTTGTCAAGTG
Gstm1	CCACATTTTGGAGCCCAAGT	TGAGTGCAGGTGAGCAAGG
GstP1	TGTACTTCCCAGTTCGAGGG	GGGTGAGGTCTCCATCTTCA
EH1	GCTGTGCTCTGAATGACTCT	CTCTCCAGGCCTCCATCC
Gpx1	CTCACCCGCTCTTAACCTTC	ATGATGTAAGTGGGGTCGGT
SOD1	CCAGTGCAGGACCTCATTTT	TCCCAGCATTTCAGTCTTT
HO-1	GGAAAGCAGTCATGGTCAGTCA	CCCTCCTGTGCTCTCCTTTGT
Cox2	CTGGAAACCTAGCACCTTCG	TGATGGTGGTGTCTTGGTA
PTGDS	ACTCCCGTGTCTGTCACTC	ATTCTCCACCAAGGCAAAAG
PTGES	CAGTTCGCCTGTTTCTCCAT	TCCTCTGGTTCAGCCTTCAT
PLA2I	CCTTTGGCTCAATTCAGGTC	ACAATGGCAACCGTAGAAGC
IL-1b	TGGGCAGTCTCCAGGGGAAGC	AATGCTGCCTCGTACCCCC
hprt	CAGGCCAGACTTTGTTGGAT	CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG
Gapdh	GGCCTTCCGTGTTCTTAC	TGTCATCATATCTGGCAGGTT

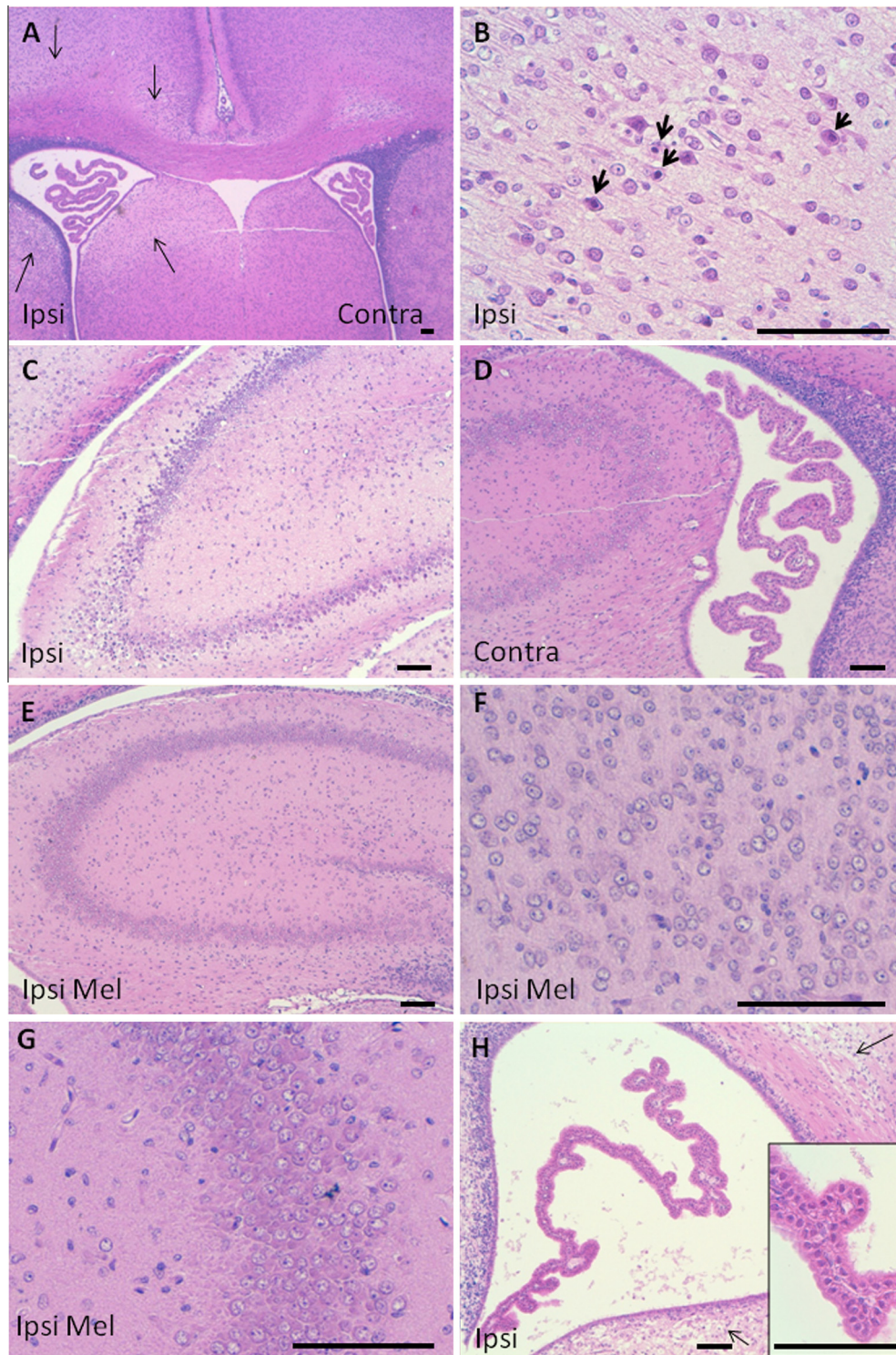


Fig. 2. HPS staining of coronal brain sections of animals injected with ibotenate, with or without pretreatment with melatonin. (A–G) Brain sections at the level of the ibotenate injection 4 h after the insult. (A) The tissue (arrows) on the ipsilateral side of the brain (Ipsi) appears clearer than the contralateral side (Contra), with the exception of the region immediately adjacent to the corpus callosum which was affected on both sides. (B) Numerous neurons display a pyknotic nucleus (small arrows), and/or a hyper eosinophilic cytoplasm in the deep cortical layer. (C, D) Similar alterations in the ipsilateral but not the contralateral hippocampus. (E) Melatonin treatment (Mel) completely prevents alterations in HPS staining in ibotenate-treated animals. (F, G) In these animals, pyknotic nuclei are not observed in the deep cortical layers (F) or hippocampus (G). H: Brain sampled 24 h after ibotenate insult. The choroid plexus (insert) and ependyma do not display any signs of alteration following ibotenate injection, while neuropil lesions are exacerbated in comparison to the 4-h time point (arrows). Scale bars = 100 μ m.

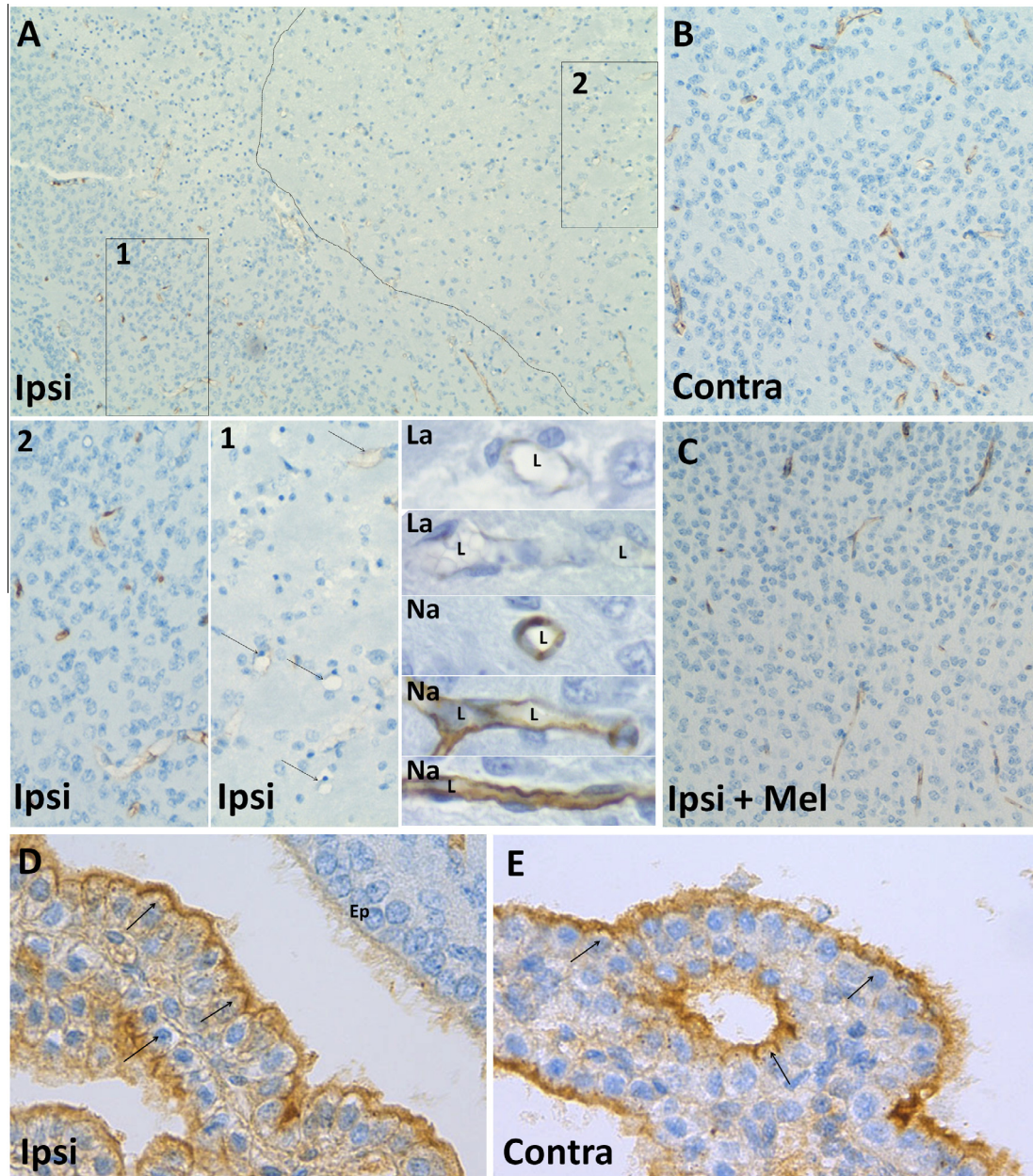


Fig. 3. Cld5 and Cld2 immunolocalization in animal brains injected with ibotenate, with or without treatment with melatonin. (A–C) Cld5 immunolabeling in brains sampled 4 h after ibotenate injection. In (A) a normal-appearing area (left) and a lesioned area (right) can be seen. Boxes are enlarged below. Cld5 immunoreactivity is strongly decreased or lost in the microvessels from the lesioned region (arrows). Na and La: High magnification pictures highlight the strong Cld5 immunolabeling associated with microvessel tight junctions in normal-appearing areas (Na), while the signal is strongly decreased or absent in lesioned areas (La). L: lumen of the microvessel. In (B) contralateral tissue is shown as a control. In (C) Cld5 immunolabeling in the ipsilateral tissue of animals treated with melatonin appears similar to the control tissue. (D, E) Cld2 immunolabeling in lateral ventricle choroid plexuses from brains sampled 4 h after ibotenate injection. Arrows show the epithelial layer. A similar typical apicolateral labeling pattern is seen in the ipsilateral (D) and contralateral (E) choroidal epithelium. Ep: ependyma.

Statistical analysis

Statistical analysis of all data was performed using GraphPad PRISM version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For all results, normal distribution was assessed with the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. To compare two groups with a normal distribution, a *t* test was performed whereas in the absence of a normal distribution, a Mann–Whitney *U* test was used. For more than two groups, a one-way

ANOVA followed by a Newman–Keuls post hoc test was used for Gaussian distributions, whereas a Kruskal–Wallis test followed by a Dunn's post hoc test was performed for non-Gaussian distributions.

RESULTS

The main goal of this study was to evaluate acute BBB changes and the potential neuroprotective role of

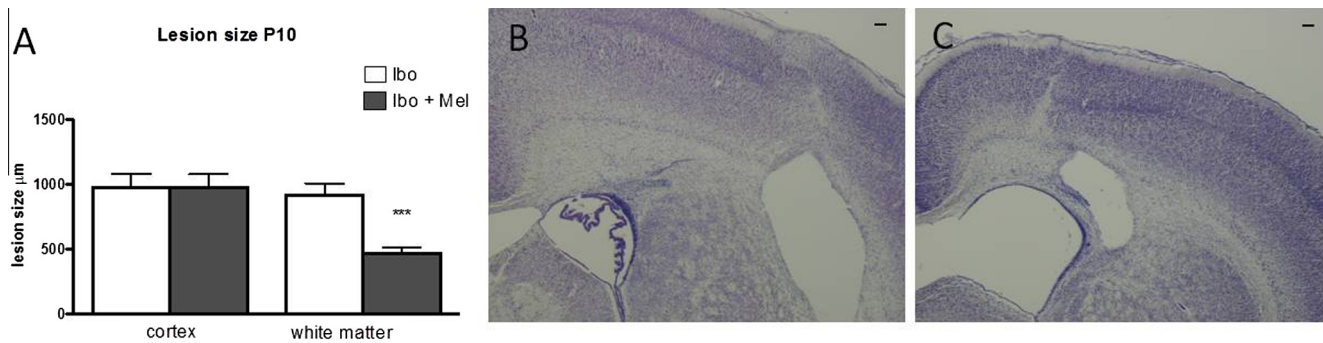


Fig. 4. (A) Quantitative analysis of lesion size in the cortical plate and white matter induced by the intracerebral injection of ibotenate in the presence (Ibo + Mel) or absence (Ibo) of an intraperitoneal injection of melatonin, 5 mg/kg. (B, C) Cresyl-violet-stained sections showing brain lesions induced by ibotenate injected in P5 rat pups and studied at P10. ((B) intraperitoneal PBS injection, (C) intraperitoneal melatonin injection, 5 mg/kg). 2× enlargement, scale bar = 100 µm.

melatonin in the context of excitotoxic damage to the developing brain.

Morphological alterations

The brains of animals sacrificed 2 h after ibotenate injection, with or without melatonin treatment, displayed normal histological features, without signs of lesion, as assessed by HPS staining (not illustrated). At 4 h after ibotenate administration, the tissue surrounding the lateral ventricle on the injected side showed an unusually clear aspect on HPS staining, resembling the changes that can be observed in hypoxic–ischemic insults (Fig. 2A, arrows). Altered areas included the deep cortical layers, the dorsal part of the caudate putamen, and the hippocampus (Fig. 2C, D). The lesions were characterized by the shrinkage of numerous neurons in an edematous vacuolated neuropil. Neurons exhibited typical alterations observed after hypoxic–ischemic insults, i.e. pyknotic nuclei and hyper eosinophilic cytoplasm (Fig. 2B). Melatonin treatment significantly prevented these histological abnormalities in ibotenate-treated animals (Fig. 2E–G). The choroid plexus and ependyma did not display any signs of alteration following ibotenate injection, even 24 h after the insult (Fig. 2H, insert), although neuropil lesions were exacerbated in comparison to those observed at +4 h (Fig. 2H, arrows).

Immunohistochemical labeling for Cld5, a BBB-specific TJ protein expressed by developing cerebral endothelial cells, was typical of brain microvascular TJ labeling (Kratzer et al., 2012) at +2 h (not illustrated). At +4 h after ibotenate injection, Cld5 immunoreactivity was decreased or absent in the capillaries of lesioned areas (Fig. 3A, arrows, and La high magnifications), unlike the labeling pattern observed in the contralateral tissue (Fig. 3B). This apparent TJ disorganization mediated by ibotenate could induce functional changes in BBB integrity. Cld5 immunolocalization was fully preserved by melatonin treatment (Fig. 3C). Cld2, a choroid–plexus-specific epithelial TJ protein, displayed a typical apical intercellular localization in both the ipsi- and contralateral choroid plexuses of ibotenate-injected animals (Fig. 3D), similar to that observed in PBS-injected animals (not shown), at all time points

investigated. This suggests that TJ organization at the BCSFB, unlike the BBB, was preserved in ibotenate-treated animals.

Melatonin reduces lesion size

Five days after melatonin injection (P10), a significant decrease in the size of the ibotenate-induced lesion was observed in the white matter. These effects were not observed in the gray matter, where the extent of the damage did not differ between treated and untreated animals (Fig. 4).

Functional studies of the BBB

We used two different methods to determine changes in BBB permeability to small lipid-insoluble molecules: ¹⁴C-sucrose permeability measurements were used to assess overall changes in BBB function in the whole hemisphere, and 3kD dextran to detect focal disruptions of the BBB after ibotenate treatment. To evaluate extravasation of the dextran tracer through the BBB after ibotenate injection, both the density of labeling and the size of the dextran-positive area were evaluated (Fig. 5D, E). While brain/plasma sucrose concentration ratios revealed no apparent differences in BBB sucrose permeability between the ipsilateral and contralateral whole hemispheres (data shown in Fig. 6), Dextran extravasation demonstrated a focal BBB disruption as early as 2 h after ibotenate (Fig. 5A, a). This disruption seemed to be attenuated at +4 h, and no longer detectable at +18 h (data not shown). The extravasation involved the area surrounding the ibotenate injection. A significant reduction of both parameters (density and area) was observed at the +2-h time point after the injection of melatonin (Fig. 5B, b, D, E). No extravasation was observed in the sham groups (Fig. 5C, c).

BBB TJ, adherens junctions and transporter gene expression

Time-dependent modifications and melatonin effects on Occl, Cld5, Cdh5, Jam1, Jam2, Zo1, Cox2, Abcg2, PGP1a and PGP1b gene expression are resumed in Table 2. Complete quantitative RT-PCR results are

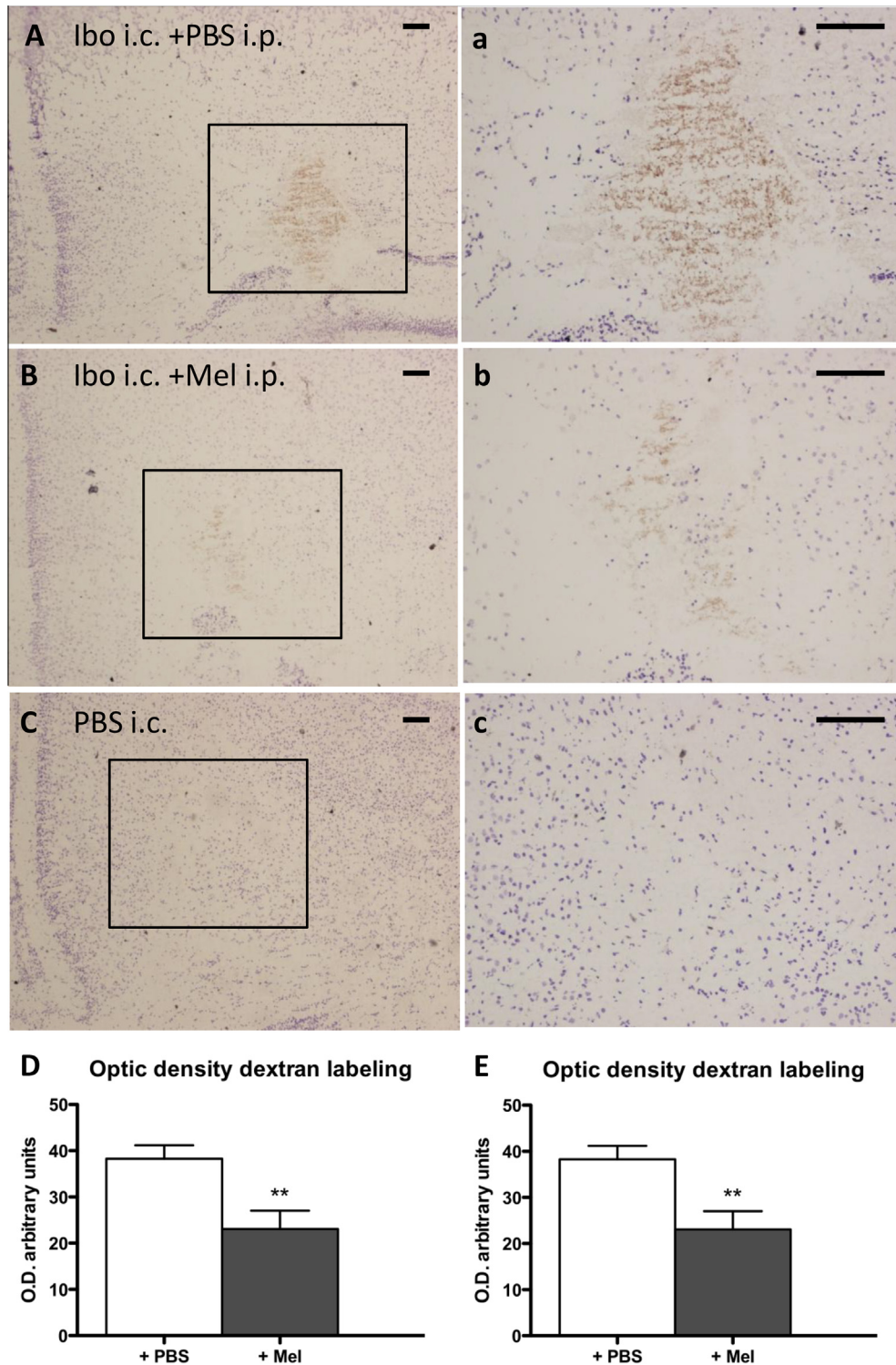


Fig. 5. Neopallial parenchyma, left hemisphere. Left hand panels: low-magnification images of dextran immunolabeling and cresyl violet counterstaining. Right hand panels: high-magnification images of insets shown at left. (A) Biotinylated dextran (3kDa) labeling, 2 h after intracerebral ibotenate injection. (B) Biotinylated dextran labeling at the 2-h time point in animals treated with intracerebral ibotenate as well as with intraperitoneal melatonin, 5 mg/kg. (C) Absence of biotinylated dextran extravasation in animals injected with PBS alone intracranially at the 2-h time point. (D, E) Difference in dextran extravasation in terms of dextran-labeled area (D) and optical density of dextran labeling (E) at the 2-h time point, with (+ mel) or without melatonin (+ PBS) treatment. Scale bar = 100 μ .

shown in Fig. 7. At the +2-h time point (Table 2, Fig. 7A), ibotenate caused a deregulation of TJ protein expression: a significant reduction of the TJ proteins Occl and Jam2,

and a significant augmentation of Cld5, Jam1 and Cdh5. These effects were abolished in the presence of melatonin. Regarding the expression of the efflux

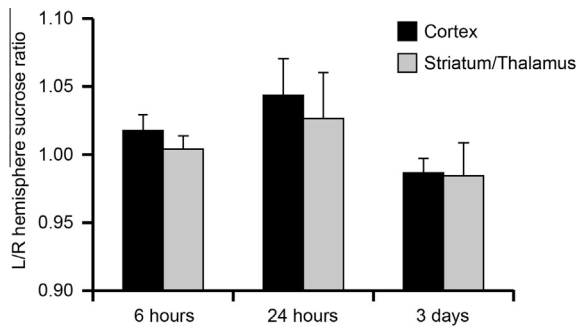


Fig. 6. Sucrose concentration ratios between the left (not injected) and right (ibotenate injected) hemisphere in animals at different times after ibotenate injection, and in different areas of the brain.

transporters Abcg2, Pgp1a and Pgp1b, ibotenate injection only significantly reduced the expression levels of Abcg2. With melatonin treatment, this decrease in expression was less pronounced. In the presence of melatonin, the levels of Abcb1a and Abcb1b were significantly reduced. At the +4-h time point (Table 2, Fig. 7B), significant alterations were seen in the ipsilateral cortex only with regard to the expression of Occl (which was augmented) and Cld5, Jam1 and Pgp1a (which were reduced). The effects of melatonin were not consistent, as it acted by potentiating the effects of ibotenate on Occl, Cld5 and Pgp1a, but by restoring basal levels of Jam1. At +18 h, only slight alterations were seen in the expression levels of the TJ proteins Cdh5 and Jam2 and the efflux transporter proteins Pgp1b and Abcg2 in the ipsilateral cortex compared to the contralateral cortex, with or without melatonin, in accordance with histological and functional data (Table 2, Fig. 7C).

BCSFB gene expression

Among all the genes implicated in the specific neuroprotective functions of the choroid plexus

(Strazielle and Gherzi-Egea, 2013) that we studied, only the expression levels of the HO-1, GstPi1, Slc2a1, and Abcb1b genes were significantly increased at the +4 h time point in the choroid plexus of the ipsilateral ventricle, when compared to the contralateral plexus. This increase was prevented by treatment with melatonin (Fig. 8A). No difference was observed at 24 h in the expression levels of TJ proteins in the ipsilateral choroid plexus compared to the contralateral one (data not shown), in accordance with immunohistochemical and histological data. To assess whether ibotenate treatment triggered an inflammatory response within the choroid plexus, the expression of three genes involved in the early inflammatory response and associated with the choroid plexus, Pla2, Cox2 and IL-1 β , was studied. The expression of these genes was barely increased in the ipsilateral tissue compared to the contralateral tissue, the difference reaching a statistical significance level of only $p < 0.1$ for Cox2 and IL-1 β . These moderate effects were abolished by melatonin treatment (Fig. 8B).

DISCUSSION

In this study, we demonstrate for the first time that BBB changes occur at an early stage in a model of focal perinatal brain damage, and that melatonin reduces BBB damage. Understanding the molecular mechanisms of the dysfunction of the BBB and BCSFB during perinatal brain damage is a research priority for the identification of targets suitable for therapeutic manipulation, since preventing barrier breakdown would help prevent the increase in paracellular permeability and the development of neuronal damage and cerebral edema (Neuwelt et al., 2008). Several studies in the last decade have focused on BBB breakdown during stroke in adulthood. Most of these studies have that BBB opening occurs at two distinct times, which correspond in terms of gene expression to the deregulation of several TJ and transporter proteins followed by the activation of

Table 2. Schematic representation of time dependent effect on gene expression variation of the principal TJ proteins and efflux transporter 2 h, 4 h and 18 h after ibotenate injection (left columns), and melatonin effects (right columns). Top-oriented arrows: increase in RT-quantitative gene expression levels compared to contralateral cortex. Down-oriented arrows: decrease in RT-quantitative gene expression levels compared to controls. *, **, ***, $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively by a one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls post hoc test

Gene name	Gene symbol	+2h		+4h		+18h	
		Ipsi vs Contra	Ipsi+Mel vs Ipsi	Ipsi vs Contra	Ipsi+Mel vs Ipsi	Ipsi vs Contra	Ipsi+Mel vs Ipsi
Occludin	Occl	↘ ***	↗ ***	↘ ***	- -	- -	- -
Claudin 5	Cld5	↗ *	↘ ***	↘ **	- -	- -	- -
Cadherin 5	Cdh5	↗ **	- -	- -	- -	↗ **	↗ *
Junctional adhesion molecule 1	JAM1	↗ **	↘ *	↘ *	↗ *	- -	- -
Junctional adhesion molecule 2	JAM2	↘ *	↗ ***	- -	- -	↗ **	↗ *
Zonula occludens 1	ZO1	- -	↗ ***	- -	- -	- -	- -
phagocytic glycoprotein-1a	PGP1a	- -	↘ **	↘ *	↘ *	- -	↘ *
phagocytic glycoprotein-1b	PGP1b	- -	↘ **	- -	- -	- -	- -
ATP-binding cassette sub-family G 2	ABCG2	↘ *	- -	- -	- -	- -	↘ *
Cytochrome c oxidase subunit 2	Cox 2	- -	↗ ***	↗ **	- -	- -	- -
Prostaglandin-H2 D-isomerase	PTGDS	↘ **	- -	↘ ***	- -	- -	- -
Prostaglandin E synthase	PTGES	- -	- -	↗ **	- -	- -	- -

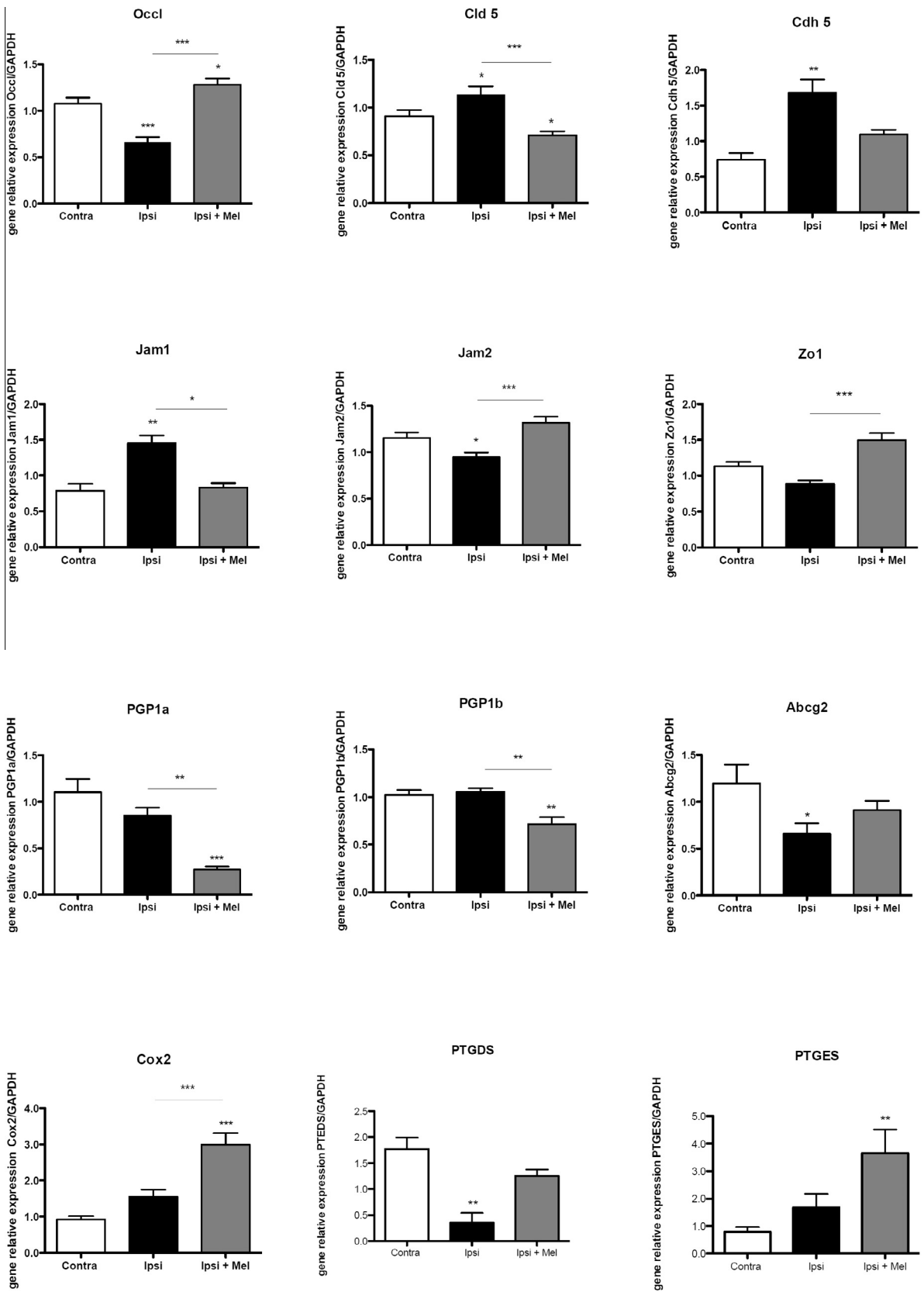


Fig. 7a. Analysis of 2-h gene expression levels (RT-PCR) of TJ (Occl, Cld5, Zo1, Jam1, Jam2), adherens junction (Cdh5), transporter (Pgp1a, Pgp1b, Pgp2) and inflammatory molecules (Cox2, PTGDS, PTGES) in the cortex of P5 rats injected with ibotenate i.c. Ipsi: injected cortex; Contra: contralateral non-injected cortex (control) Ipsi + Mel: Injected cortex in the presence of melatonin. The results are shown as mean \pm SEM. *, **, ***, $p < 0.05, 0.01, 0.001$, respectively by a one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls post hoc test.

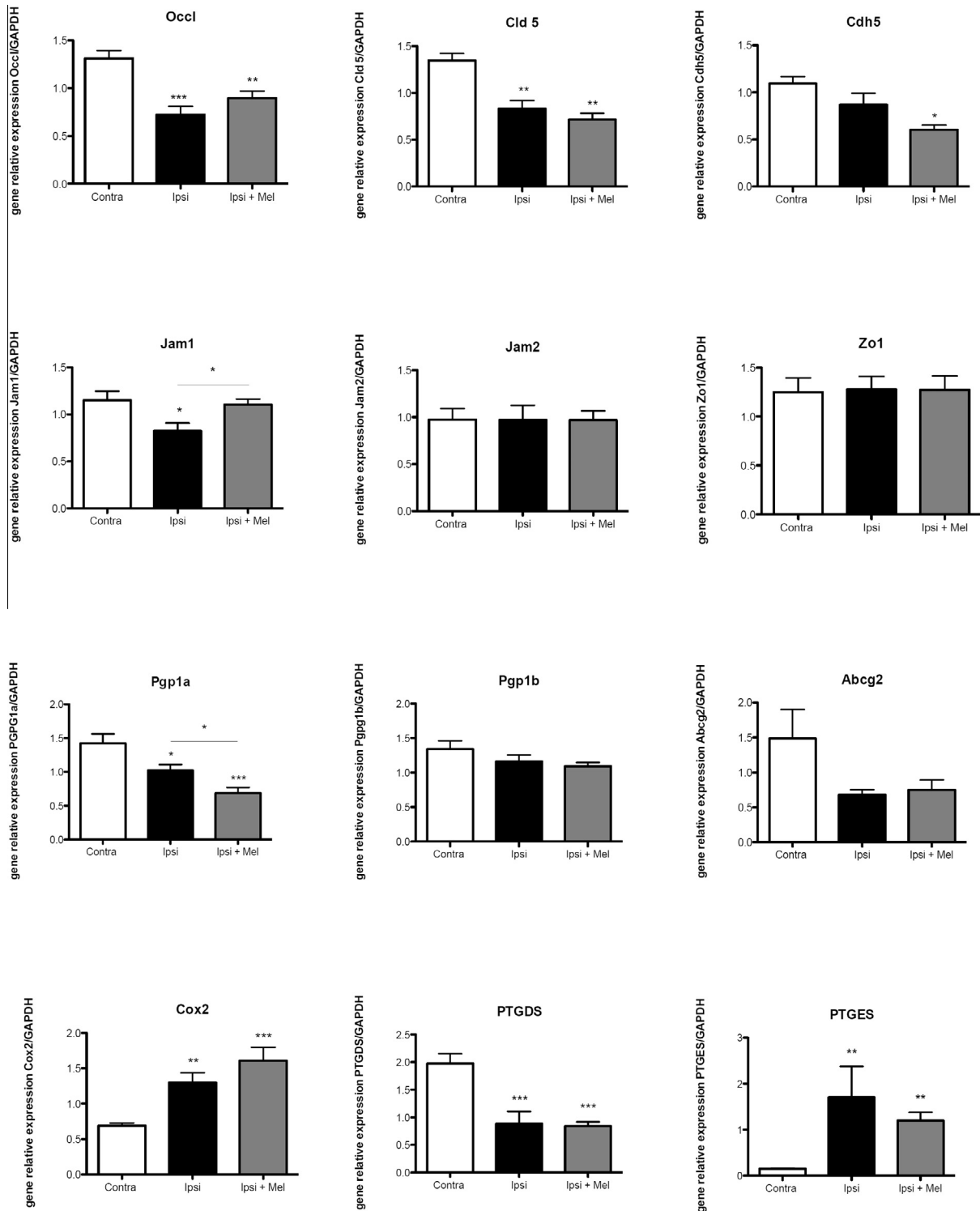


Fig. 7b. Analysis of 4-h gene expression levels (RT-PCR) of TJ (Occl, Cld5, Zo1, Jam1, Jam2), adherens junction (Cdh5), transporter (Pgp1a, Pgp1b, Pgp2) and inflammatory molecules (Cox2, PTGDS, PTGES) in the cortex of P5 rats injected with ibotenate i.c. Ipsi: injected cortex; Contra: contralateral non-injected cortex (control) Ipsi + Mel: Injected cortex in the presence of melatonin. The results are shown as mean \pm SEM. *, **, ***, $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively by a one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls post hoc test.

proteolytic enzymes and inflammatory molecules at the basal lamina (Sandoval and Witt, 2008; Fernandez-Lopez et al., 2012). The activation of these pathways within the neurovascular unit is observed both during BBB opening and reconstruction, and during angiogenesis

after the insult. However, until now, little was known about these processes in the developing brain, where TJ proteins play a key role in the functional preservation of barrier integrity (Bazzoni et al., 2000), and where changes in their expression and localization directly correlate with

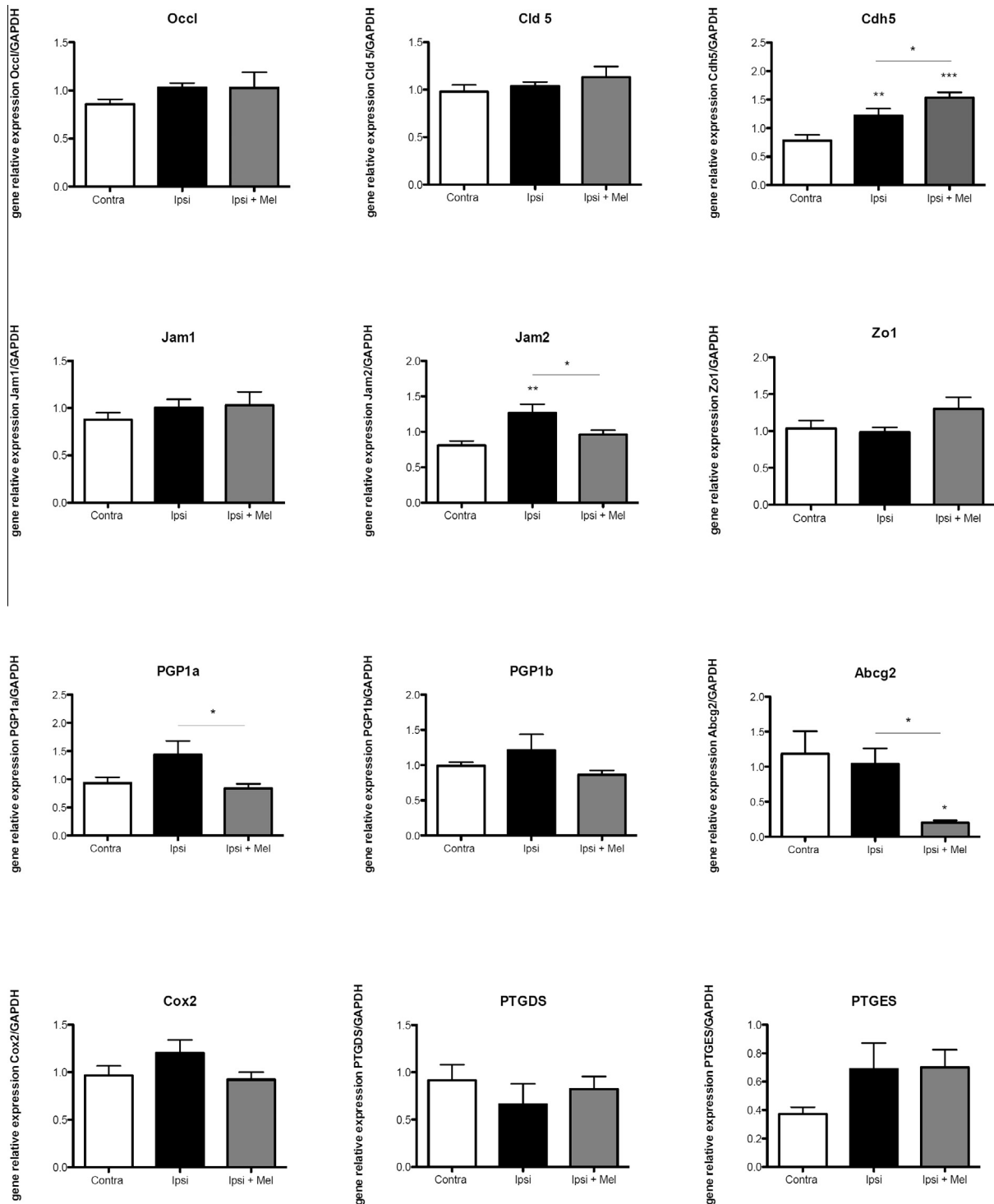


Fig. 7c. Analysis of 18-h gene expression levels (RT-PCR) of TJ (Occl, Cld5, Zo1, Jam1, Jam2), adherens junction (Cdh5), transporter (Pgp1a, Pgp1b, Pgp2) and inflammatory molecules (Cox2, PTGDS, PTGES) in the cortex of P5 rats injected with ibotenate i.c. Ipsi: injected cortex; Contra: contralateral non-injected cortex (control) Ipsi + Mel: Injected cortex in the presence of melatonin. The results are shown as mean \pm SEM. *, **, ***, $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively by a one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls post hoc test.

BBB permeability and vasogenic edema (Nitta et al., 2003; Witt et al., 2008).

The breakdown of the BBB 2 h after the excitotoxic insult was confirmed by the passage of biotinylated dextrans into the cortical parenchyma, in agreement

with modifications in TJ protein expression and localization seen at the +2-h and +4-h time points. This disruption was limited to the area around the ibotenate injection. Immunohistochemistry confirmed these changes in TJ proteins, even if there was not

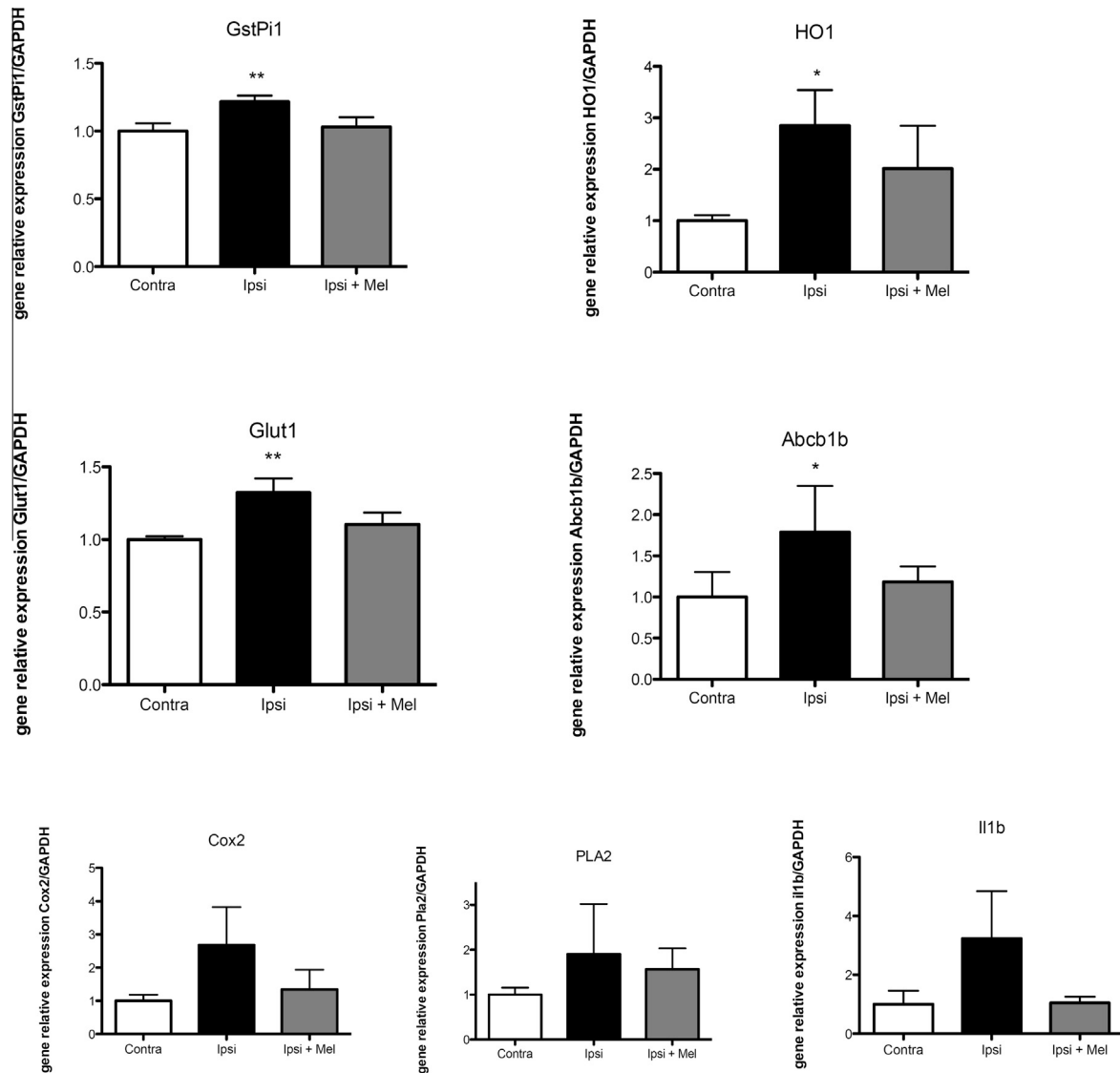


Fig. 8. Gene expression levels of selected neuroprotective and inflammatory genes in the choroid plexuses of ibotenate-treated rats, 4 h after ibotenate injection. (A) mRNA levels of hemoxygenase 1 (HO-1), glutathione-S-transferase Pi1 (GstPi1), ATP-binding cassette transporter b1b (Abcb1b) and solute carrier 2a1 (Slc2a1). (B) mRNA level of cyclooxygenase 2 (Cox2), phospholipase A2 (PLA2) and interleukin 1 β (Il-1b). Data are expressed as mean \pm SEM and are normalized relative to mean mRNA levels measured in the contralateral choroid plexus. Contra: contralateral to the site of injection; Ipsi: ipsilateral to the site of injection; Ipsi + Mel: melatonin treatment following ibotenate injection. * ** : $p < 0.05$, $p < 0.01$ respectively for comparisons with the contralateral choroid plexis, 1-tailed paired Student's t test.

enough evidence to suggest the precise mechanism of this change in permeability (paracellular rather than transcellular) or an eventual consequent modification in protein translation. The absence of significant alterations in sucrose permeability confirmed a focal rather than a diffuse insult. Also, the BCSFB was only barely modified by ibotenate injection. Taken together, these data suggest that following excitotoxic damage, the BBB is vulnerable whereas the BCSFB is resistant even in the early phases of lesion development. The proteins mainly responsible for BBB impermeability are Occl and Cld5. Occl is an integral membrane protein that plays a role in regulating TJ properties (Sundstrom et al., 2009). In endothelial cells, Occl participates in TJ regulation in

response to cytokines, such as IFN- γ (Marchiando et al., 2010; Van Itallie et al., 2010), and growth factors, such as VEGF (Murakami et al., 2009). Existing data show that Clds form the backbone of TJ strands, while Occl, which cannot form TJ strands (Forster, 2008), plays a role in the regulation of permeability by being incorporated into the Cld-based strands. When studying BBB alterations, we observed significant modifications in the expression of TJ proteins, which may account for the functional alteration of BBB properties that leads to augmented permeability: a significant reduction in the expression of Occl and Jam2, and a significant increase in the expression of Cld5, Jam1 and of the adherens junction protein Cdh5 by qRT-PCR. This overexpression of Cld5

mRNA did not correspond to immunohistochemical labeling at +2 h, probably because of the delay between gene expression and the production and membrane localization of the protein. In contrast, a close correspondence was found at the +4-h time point, when a significant decrease in Cld5 labeling corresponded to significantly low gene expression levels.

The neuroprotective role of melatonin has been widely studied in the last decade, and there is evidence of its neuroprotective effects through antiapoptotic (Yon et al., 2006), vasoconstrictive (Kaur et al., 2008) and antioxidant pathways (Pei et al., 2003; Tai et al., 2010), or by an attenuation of the excitotoxic cascade (Tutunculer et al., 2005). We have previously demonstrated in mice that melatonin promotes secondary lesion repair, inducing axonal regrowth and sprouting (Husson et al., 2002). In the same study (Husson et al., 2002), we evaluated the effects of melatonin on lesion size 5 days after ibotenate injection at different time points. We found that melatonin injected 4 h after ibotenate was not protective in terms of either lesion size or reactive gliosis. These data as well as results that we obtained in the present study suggest that the effects of melatonin on TJs occur earlier than 4 h, and that this molecule is neuroprotective rather than neuroregenerative. Gene expression returns to control levels in melatonin samples, irrespective of the direction of change caused by the injury, at the 2-h time point. We can only speculate that this sudden effect probably does not occur through the standard receptors MT1 and MT2, and consider the implication of a second messenger system or others forms of signalization to justify an effect so restrictive in time. Similarly, the metabolites of melatonin have also been shown to possess many of the same properties (Pei et al., 2003; Tai et al., 2010; Galano et al., 2013; Zhang and Zhang, 2014), but are unlikely to mediate such short-term effects.

In conclusion, in the present study, we show that melatonin also acts by preserving BBB function after an excitotoxic insult. This was confirmed by both morphological and functional observations. Gene expression analysis suggests that melatonin might act by preventing modifications in TJ proteins. Lesion-size analysis at P10 also confirms that melatonin has a long-term protective effect on white matter lesions, as observed in a neonatal stroke model (Villapol et al., 2011). The positive effects of melatonin on BBB permeability are in accordance with a previous study conducted in hydrocephalic rat pups, in which melatonin reduced hydrocephalus-induced BBB permeability (Turgut et al., 2007). However, to our knowledge, this is the first study of the effects of a single dose of melatonin administered post-injury on BBB behavior.

CONCLUSION

CNS barrier alterations after acute excitotoxic damage occur early and are mainly confined to the BBB. Melatonin has an early effect on BBB TJ proteins, and a neuroprotective effect on white matter lesions over the long term. Melatonin could represent a potential therapeutic candidate in pediatric diseases, especially

involving excitotoxic damage, where a disruption of the BBB is observed, e.g. pediatric stroke, hydrocephalus, herpes encephalitis or shaken baby syndrome. These arguments are much more important when we consider that melatonin has been proven to be safe in infants (Gitto et al., 2013) and children, and is not uncommonly used in these populations. Further studies are needed to identify the molecular pathways by which melatonin acts on the BBB after acute brain damage and its potential beneficial effects in clinical trials.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

- Anna Zanin, Raffaella Moretti, Julien Pansiot acquisition of data, drafting the manuscript, statistical analysis and interpretation of data, revising the manuscript.
- Daniele Spiri, Lucilla Manganozzi, Ingrid Kratzer, Gaia Favero, Alexandre Vasiljevic, Victoria Elisa Rinaldi, Isabelle Pic, Davide Massano, Irene D’Agostino, Ana Baburamani: acquisition of data, revising the manuscript.
- Maria Anna La Rocca, Luigi Fabrizio Rodella, Rita Rezzani, Joakim Ek, Nathalie Strazielle, Jean-François Gherzi-Egea,: interpretation of data, revising the manuscript.
- Luigi Titomanlio and Pierre Gressens: conception and design, interpretation of data, revising the manuscript.

Acknowledgment—The authors are grateful to Ms. Stefania Cas-trezza (University of Brescia) and to Karen Silva (Lyon) for their technical support, and to Ms. Rasika S. for her precious suggestions.

The study was supported by Grants from Inserm, Université Paris Diderot, APHP (Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle to P. Gressens), Fondation PremUP, Fondation Roger de Spoelberch, Fondation Grace de Monaco. The authors acknowledge financial support from the Department of Health via the National Institute for Health Research (NIHR) comprehensive Biomedical Research Centre award to Guy’s & St. Thomas’ NHS Foundation Trust in partnership with King’s College London and King’s College Hospital NHS Foundation Trust. The support bodies played no role in any aspect of study design, analysis, interpretation or decision to publish these data.

REFERENCES

- Abbott NJ et al (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53.
- Abbott NJ et al (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25.
- Bazzoni G et al (2000) Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275:20520–20526.
- Bousslama M et al (2006) Treatment-induced prevention of learning deficits in newborn mice with brain lesions. *Neuroscience* 141:795–801.
- Chen J et al (2014) Melatonin attenuates inflammatory response-induced brain edema in early brain injury following a subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of pro-inflammatory cytokines. *J Pineal Res* 57:340–347.
- Dammann O, Leviton A (2004) Inflammatory brain damage in preterm newborns—dry numbers, wet lab, and causal inferences. *Early Hum Dev* 79:1–15.

- Dehghan F et al (2013) Effect of melatonin on intracranial pressure and brain edema following traumatic brain injury: role of oxidative stresses. *Arch Med Res* 44:251–258.
- Dommergues MA et al (2000) Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann Neurol* 47:54–63.
- Ek CJ et al (2001) Permeability and route of entry for lipid-insoluble molecules across brain barriers in developing *Monodelphis domestica*. *J Physiol* 536:841–853.
- Ek CJ et al (2006) Functional effectiveness of the blood–brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol* 496:13–26.
- Ek CJ et al (2012) Barriers in the developing brain and Neurotoxicology. *Neurotoxicology* 33:586–604.
- Ek CJ et al (2015) Brain barrier properties and cerebral blood flow in neonatal mice exposed to cerebral hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Fernandez-Lopez D et al (2012) Blood–brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. *J Neurosci* 32:9588–9600.
- Forster C (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130:55–70.
- Fulia F et al (2001) Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res* 31:343–349.
- Galano A et al (2013) On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J Pineal Res* 54:245–257.
- Gitto E et al (2001) Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res* 50:756–760.
- Gitto E et al (2013) Protective role of melatonin in neonatal diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2013:980374.
- Gressens P et al (1997) Vasoactive intestinal peptide prevents excitotoxic cell death in the murine developing brain. *J Clin Invest* 100:390–397.
- Gressens P et al (2005) The effects of AMPA receptor antagonists in models of stroke and neurodegeneration. *Eur J Pharmacol* 519:58–67.
- Habgood MD et al (1993) The nature of the decrease in blood-cerebrospinal fluid barrier exchange during postnatal brain development in the rat. *J Physiol* 468:73–83.
- Harceland R et al (2012) Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res* 52:139–166.
- Husson I et al (2002) Melatoninergic neuroprotection of the murine periventricular white matter against neonatal excitotoxic challenge. *Ann Neurol* 51:82–92.
- Husson I et al (2005) BDNF-induced white matter neuroprotection and stage-dependent neuronal survival following a neonatal excitotoxic challenge. *Cereb Cortex* 15:250–261.
- Johansson PA et al (2008) The blood–CSF barrier explained: when development is not immaturity. *BioEssays* 30:237–248.
- Johnston MV (2005) Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol* 15:234–240.
- Kabadi SV, Maher TJ (2010) Posttreatment with uridine and melatonin following traumatic brain injury reduces edema in various brain regions in rats. *Ann N Y Acad Sci* 1199:105–113.
- Kaur C, Ling EA (2008) Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res* 5:71–81.
- Kaur C et al (2008) Melatonin attenuates hypoxia-induced ultrastructural changes and increased vascular permeability in the developing hippocampus. *Brain Pathol* 18:533–547.
- Kratzer I et al (2012) Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood–CSF barrier. *Histochem Cell Biol* 138:861–879.
- Kratzer I et al (2013) Developmental changes in the transcriptome of the rat choroid plexus in relation to neuroprotection. *Fluids Barriers CNS* 10:25.
- Laudenbach V et al (2001) Nociceptin/orphanin FQ exacerbates excitotoxic white-matter lesions in the murine neonatal brain. *J Clin Invest* 107:457–466.
- Li YN et al (2014) Ischemic neurons activate astrocytes to disrupt endothelial barrier via increasing VEGF expression. *J Neurochem* 129:120–129.
- Liddelow SA et al (2013) Mechanisms that determine the internal environment of the developing brain: a transcriptomic, functional and ultrastructural approach. *PLoS One* 8:e65629.
- Marchiando AM et al (2010) Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol* 189:111–126.
- Marret S et al (1995) Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:358–370.
- Murakami T et al (2009) Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* 284:21036–21046.
- Neuwelt EA (2004) Mechanisms of disease: the blood–brain barrier. *Neurosurgery* 54:131–140. discussion 141–142.
- Neuwelt E et al (2008) Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 7:84–96.
- Nitta T et al (2003) Size-selective loosening of the blood–brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161:653–660.
- Northington FJ (2006) Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *ILAR J* 47:32–38.
- Pansiot J et al (2010) Neuroprotective effect of inhaled nitric oxide on excitotoxic-induced brain damage in neonatal rat. *PLoS One* 5: e10916.
- Pei Z et al (2003) Melatonin reduces nitric oxide level during ischemia but not blood–brain barrier breakdown during reperfusion in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res* 34:110–118.
- Reiter RJ et al (2014) Delivery of pineal melatonin to the brain and SCN: role of canaliculi, cerebrospinal fluid, tanycytes and Virchow-Robin perivascular spaces. *Brain Struct Funct* 219:1873–1887.
- Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood–brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 32:200–219.
- Saunders NR et al (2008) Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci* 31:279–286.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2013) Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol Pharm* 10:1473–1491.
- Sundstrom JM et al (2009) Identification and analysis of occludin phosphosites: a combined mass spectrometry and bioinformatics approach. *J Proteome Res* 8:808–817.
- Tahraoui SL et al (2001) Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. *Brain Pathol* 11:56–71.
- Tai SH et al (2010) Melatonin inhibits postischemic matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation via dual modulation of plasminogen/plasmin system and endogenous MMP inhibitor in mice subjected to transient focal cerebral ischemia. *J Pineal Res* 49:332–341.
- Turgut M et al (2007) Melatonin ameliorates blood–brain barrier permeability, glutathione, and nitric oxide levels in the choroid plexus of the infantile rats with kaolin-induced hydrocephalus. *Brain Res* 1175:117–125.
- Tutunculer F et al (2005) The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage. *Pediatr Int* 47:434–439.
- Van Itallie CM et al (2010) Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell Sci* 123:2844–2852.
- Villapol S et al (2011) Melatonin promotes myelination by decreasing white matter inflammation after neonatal stroke. *Pediatr Res* 69:51–55.

Weiss MD et al (2006) Sleep hygiene and melatonin treatment for children and adolescents with ADHD and initial insomnia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:512–519.

Witt KA et al (2008) Reoxygenation stress on blood–brain barrier paracellular permeability and edema in the rat. *Microvasc Res* 75:91–96.

Yon JH et al (2006) Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 21:522–530.

Zhang HM, Zhang Y (2014) Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J Pineal Res* 57:131–146.

(Accepted 23 October 2015)
(Available online 2 November 2015)

IX. ANNESSO 2: PUBBLICAZIONI/PRESENTAZIONI

• INERENTI IL DOTTORATO

Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain.

Moretti R, Pansiot J, Bettati D, Strazielle N, Ghersi-Egea JF, Damante G, Fleiss B, Titomanlio L, Gressens P. *Front Neurosci.* **2015 Feb 17;9:40.**

Presentazione orale : « Effets d’un inhibiteur de la phosphodiesterase 5 (sildenafil) dans un modèle d’ischémie néonatale chez la souris » Moretti R, Paris, Congrès SFN-JFRN 2015 (Journées Françaises de Recherche en Neonatologie)

Presentazione orale: “Il ruolo della Barriera Ematoencefalica nel traumatismo cranico pediatrico. Esperienza di laboratorio” Nel contesto di una sezione di Anatomia e Fisiopatologia intitolata “Blood Brain Barrier and melatonin”. Brescia, 25 giugno 2015

Presentazione orale: “pediatric TBI: post-traumatic inflammation” Moretti R, International INSERM Meeting. Paris, june 2015

Presentazione orale : « Sildenafil, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, induces microglial modulation after focal ischemia in the neonatal mouse brain » FEPS 2016 - Federation of European Physiological Societies and the French Physiological society – Paris, 29 Juin - 1er Juillet 2016

Poster: Sildenafil, a cGMP phosphodiesterase inhibitor, induces microglial modulation after focal ischemia in the neonatal mouse brain Moretti R, Charriaut-Marlangue C.

9th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair - Leipzig 19 - 22

April 2016

• **ALTRE PUBBLICAZIONI/PRESENTAZIONI DURANTE IL CORSO DI DOTTORATO**

Association between childhood migraine and history of infantile colic. Romanello, S.; Spiri, D.; Marcuzzi, E.; Zanin, A.; Boizeau, P.; Riviere, S.; Vizeneuve, A.; Moretti, R.; Carbajal, R.; Mercier, J.C.; Wood, C.; Zuccotti, G. V.; Crichiutti G.; Alberti, C.; Titomanlio, L. **JAMA**. 2013;309(15):1607-1612.

Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models

Titomanlio L, Fernández-López D, Manganozzi L, Moretti R, Vexler ZS, Gressens P. **Pediatr Neurol**. 2015 Jun;52(6):566-84.

Early Recruitment of Cerebral Microcirculation by Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibition in a Juvenile Ischemic Rat Model.

Leger PL, Bonnin P, Moretti R, Tanaka S, Duranteau J, Renolleau S, Baud O, Charriaud-Marlangue C. **Cerebrovasc Dis**. 2016; 41(1-2):40-9.

Recovery position significantly associated with a reduced admission rate of children with loss of consciousness.

Julliand S, Desmarest M, Gonzalez L, Ballesteros Y, Martinez A, Moretti R, Rivas A, Lacroix L, Biver A, Lejay E, Kanagarajah L, Portillo N, Crichiutti G, Stefani C, Da Dalt L, Spiri D, Van De Voorde P, Titomanlio L. **Arch Dis Child**. 2016 Jun;101(6):521-6.

Glial response to 17 β -estradiol in neonatal rats with excitotoxic brain injury.

Pansiot J, Pham H, Dalous J, Chevenne D, Colella M, Schwendimann L, Fafouri A, Mairesse J, Moretti R, Schang AL, Charriaut-Marlangue C, Gressens P, Baud O. **Exp Neurol. 2016 Aug; 282:56-65**

Buccal midazolam compared to rectal diazepam reduces seizure duration in children in the outpatient setting Moretti R, Julliand S, Rinaldi V, Titomanlio L. Accettato in Pediatric Emergency Care.

- **IN FASE DI STAMPA:**

“ **brain edema in developing brain disease**” Moretti, R.; Chhor, V.; Titomanlio, L; Fleiss, B.; Gressens, P. Questo capitolo farà parte di un libro dedicato all’edema cerebrale, edito da Badaut, J., e sarà mandato in edizione in dicembre 2016.

- **ARTICOLI IN REVISIONE:**

“**Why is the risk of ZIKV-induced microcephaly restricted to early pregnancy?**”

Passemard, S. ; El Ghouzzi, V. ; Gil, S. ; Mounce, B.; Rak M., Degrelle S. ; Besnard, M. ; Moretti, R., Simon-Lorière, E. ; Vignuzzi, M., Huttner W. ; Gressens, P.